

Optische Untersuchungen einzelner Quantensysteme

Experimentelle Verifizierung verschiedener Fluktuationstheoreme
eines diskreten Systems
Einzelmolekülspektroskopie an Lichtsammelkomplexen höherer
Pflanzen

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

Vorgelegt von

Sebastian Schuler

aus Stuttgart–Bad Cannstatt

Hauptberichter: Prof. Dr. Jörg Wrachtrup
Mitberichter: Prof. Dr. Clemens Bechinger

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2006

3. Physikalisches Institut der Universität Stuttgart
2006

Abstract

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse optischer Untersuchungen an einzelnen Quantensystemen vorgestellt. Die analysierten Systeme führen zu einer thematischen Zweiteilung der Abhandlung.

Das Kapitel 2 befasst sich mit der experimentellen Verifizierung mehrerer Fluktuationstheoreme eines getriebenen Zwei-Niveau-Systems mit zeitabhängigen Raten. Hierfür wird ein einzelnes Defektzentrum in Diamant optisch zwischen einem fluoreszierenden und einem nichtfluoreszierenden Zustand geschaltet.

In Kapitel 3 werden die Resultate der Untersuchungen am Lichtsammelkomplex LHC-II höherer Pflanzen vorgestellt. Der Fokus liegt dabei auf der direkten Messung einzelner Übergangsdipolmomente mittels Fluoreszenz- und Anregungsspektroskopie.

Zusammengehalten werden diese beiden Teile durch die verwendete Methode, die konfokale Mikroskopie einzelner Moleküle, die in Kapitel 1 zusammen mit den experimentellen Aufbauten kurz vorgestellt wird.

This work presents the results of optical experiments on single quantum systems. The analyzed systems split the thesis into two parts.

Chapter 2 covers the experimental verification of multiple fluctuation theorems for a driven two-level system with time-dependent rates. For this purpose a single defect center in diamond is switched optically between a fluorescent and a non-fluorescent state.

Chapter 3 deals with the spectroscopic properties of the light-harvesting complex LHC-II of higher plants. The focus is on the direct measurement of single transition dipole moments using fluorescence and excitation spectroscopy.

In both parts the research method was the confocal microscopy of single molecules, which is introduced together with the experimental set-ups in chapter 1.

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	9
KAPITEL 1: GRUNDLAGEN	13
1.1 Konfokale Mikroskopie	13
1.2 Einzelmolekülspektroskopie	16
1.2.1 Fluoreszenzspektroskopie	17
1.2.2 Anregungsspektroskopie	18
1.3 Experimentelle Realisierung	19
1.3.1 Tieftemperaturaufbau	19
1.3.2 Raumtemperaturaufbau	23
KAPITEL 2: FLUKTUATIONSTHEOREME	25
2.1 Theoretische Grundlagen	25
2.1.1 Fluktuationstheoreme (FT)	26
2.1.1.1 FT für Systeme im dynamischen Gleichgewicht	27
2.1.1.2 Zeitlich getriebene Systeme	28
2.1.1.3 Das FT für eine Mastergleichung mit zeitabhängigen Raten.....	32
2.2 Das verwendete System	40
2.2.1 Das Photochrome Zentrum	40
2.2.1.1 Der Timetrace	41
2.2.1.2 Die Übergangsraten	42
2.2.1.3 Das elektronische Modell	44
2.2.1.4 Geltungsbereich der linearen Näherung.....	45
2.3 Messungen und Verarbeitung	46
2.3.1 Glätten des Traces und Bestimmung der Sprungzeiten	48

2.3.2 Bestimmung der Raten a_0 und b_0	50
2.3.3 Bestimmung der Modulationstiefe γ	50
2.3.4 Bestimmung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten $p_0(\tau)$ und $p_1(\tau)$	51
2.3.5 Parameterwahl	52
2.4 Auswertung und Diskussion.....	53
2.4.1 Größen für das Zwei-Niveau-System („Two-Level System“ TLS).....	54
2.4.2 Die stochastische Größe R	56
2.4.2.1 Das integrale Fluktuationstheorem.....	56
2.4.2.2 Die Verteilungen von R	58
2.4.2.3 Das Fluktuationstheorem nach Crooks.....	63
2.4.3 Die Entropie s	66
2.4.3.1 Die Entropie entlang einer Trajektorie	66
2.4.3.2 Die Größen R und ΔS_{tot}	72
2.4.3.3 Das integrale Fluktuationstheorem für ΔS_{tot}	75
2.4.3.4 Die Verteilungen von ΔS_{tot}	80
2.4.3.5 Das Fluktuationstheorem nach Crooks.....	82
2.4.3.6 Bedeutung der Entropie	84
KAPITEL 3: DER ANTENNENKOMPLEX LHC-II	87
3.1 Einführung.....	87
3.2 Die Struktur des LHC-II.....	91
3.2.1 Die Chlorophylle	93
3.2.2 Die Carotinoide.....	95
3.2.3 Spektroskopie an LHC-II.....	96
3.3 Probenpräparation.....	98
3.3.1 LHC-II in Polyvinylalkohol (PVA).....	98
3.3.2 Immobilisierung von Liposomen mit inserierten LHC-II	99
3.3.2.1 Immobilisierung auf Quarz.....	100
3.3.2.2 Immobilisierung auf Glimmer.....	102
3.3.3 Immobilisierung mutierter LHC-II auf einer selektiv bindenden Oberfläche.....	105
3.3.3.1 Die Oberfläche.....	105
3.3.3.2 Bindung der Proteine	106
3.3.3.3 Probenpräparation und Selektivität der Bindung	109

3.4 Messung und Datenverarbeitung	111
3.4.1 Fluoreszenzspektren.....	111
3.4.2 Anregungsspektren.....	116
3.4.3 Zusammenführung der Polarisationsaussagen und Fazit.....	122
3.5 Ergebnisse und Diskussion	122
3.5.1 Monomere mit zwei His6-tags auf einer HRP-Ni-NTA Oberfläche	123
3.5.1.1 Fluoreszenzspektroskopie	123
3.5.1.2 Anregungsspektroskopie.....	130
3.5.2 Trimere mit His6-tags am C-Terminus auf einer HRP-Ni-NTA Oberfläche	137
3.5.2.1 Fluoreszenzspektroskopie	137
3.5.2.2 Anregungsspektroskopie.....	142
3.5.3 Abschließende Diskussion der Messungen an einzelnen LHC-II mit His6-tags	148
3.5.4 Trimere in Liposomen.....	152
ZUSAMMENFASSUNG	155
SUMMARY	159
LITERATURVERZEICHNIS.....	165

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APD	Avalanche-Photodiode
ATP	Adenosintriphosphat
AOM	akustooptischer Modulator
CCD	Charge-Coupled Device
Chl <i>a/b</i>	Chlorophyll <i>a/b</i>
cps	counts per second
CS	Conformational Substates
FT	Fluktuationstheorem
FTC	Fluktuationstheorem nach Crooks
FLN	Fluorescence Line-Narrowing
FWHM	Full Width at Half Maximum
His6-tag	Abfolge von sechs Histidin-Imidazolringen
HRP	Horse-Radish Peroxidase
LHC-II	Light-Harvesting Complex II
NA	Numerische Apertur
NADP⁺	Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
OD	Optische Dichte
PS-I/II	Photosystem I/II
PSF	Point Spread Function
PW	Phonon Wing
PZ	Photochromes Zentrum
SMD	Single Molecule Detection
TLS	Two-Level System
ZPL	Zero-Phonon Line

Einleitung

Das bekannte Titelbild von Thomas Hobbes' Leviathan zeigt den einzelnen Bürger als Teil der Staatsautorität. Tatsächlich fühlt sich der Mensch im Allgemeinen von der globalen Welt ebenso wie von den ihm selbst zu Grunde liegenden, mikroskopischen Gesetzen vollständig entkoppelt.

Je nach Größenordnung von Länge, Geschwindigkeit, Energie oder Zeit eröffnen sich eine Fülle eigener „Welten“, die größtenteils völlig unabhängig voneinander untersucht werden können. Durch diese scheinbare oder auch tatsächliche Unabhängigkeit wurden erhebliche Fortschritte in der Physik, wie auch in vielen anderen Wissenschaften, überhaupt erst möglich. So führt die Vernachlässigung von mikroskopischen Details zu einer zuverlässigen Beschreibung makroskopischer Zusammenhänge. Dennoch ist es der Anspruch der Physik, auch diese grundlegenden Systeme zu charakterisieren. Der Erfolg einer mikroskopischen Theorie wird oftmals anhand der Bestätigung makroskopischer Gesetzmäßigkeiten gemessen und es ist angeraten, die völlige Entkopplung der beschreibenden Skalen durch eine hierarchische Anordnung zu ersetzen, bei der eine Beschreibung aus einer anderen, feineren hervorgeht.

Die Detektion einzelner Moleküle („Single Molecule Detection“: SMD) bietet eine Möglichkeit der direkten experimentellen Beobachtung von Systemen auf der Längenskala einiger Angström. 1989 und 1990 gelang es den Gruppen von Moerner [1] und Orrit [2] nahezu zeitgleich die Fluoreszenz einzelner Pentazenmoleküle, eingebettet in eine p-Terphenylmatrix, zu detektieren. Das sich nun rasant entwickelnde Feld der SMD ermöglichte wenig später die optische Untersuchung einzelner Moleküle in Flüssigkeiten [3], die Messung einzelner Spins mittels optisch detektierter magnetischer Resonanz [4,5] als auch die Erforschung einzelner

Quantenpunkte [6], sowie einzelner Defekte in Diamant [7]. Mitte der 90er Jahre entdeckte die Biologie den Nutzen der SMD für ihre Zwecke. Die wohl beeindruckendsten Ergebnisse aus dieser Kombination von Fachgebiet und Methode sind die direkte Beobachtung der Drehschritte von 120° einzelner ATPasen in der Gruppe von Kinosita [8], die Bestimmung der passiven Kräfte einzelner Muskelproteine durch Bustamante et al. [9], die Aufklärung der elektronischen Struktur einzelner bakterieller Lichtsammelkomplexe in den Gruppen von Hochstrasser [10] und Schmidt [11], sowie die Verfolgung des Eindringens einzelner Viren in eine lebende Zelle durch Bräuchle et al. [12].

Die Methoden der SMD sind vielfältiger Natur. Neben den optischen Untersuchungsmethoden [13,14], wie der Nahfeldmikroskopie, der konfokalen Mikroskopie und den Weitfeldmikroskopieverfahren, z.B. der Totalreflexionsmikroskopie (TIRFM), finden verschiedene Kraftmikroskopiemethoden [15] und Tunnelmikroskopieverfahren [16] rege Anwendung. Gemein sind den verschiedenen Methoden der SMD die Möglichkeit des Zugriffs auf Parameter, die in Messungen am Ensemble durch Mittelungsprozesse verschwinden. Das Verhalten des Ensembles lässt sich im Allgemeinen durch eine häufige Wiederholung des Experiments an unterschiedlichen einzelnen Systemen rekonstruieren. Die dafür benötigte Zeit ist einer der limitierenden Faktoren der SMD.

In dieser Arbeit werden zwei völlig unterschiedliche Systeme, ein Defektzentrum in Diamant und der Antennenkomplex LHC-II höherer Pflanzen, mit einer jeweils eigenen Fragestellung untersucht. Die inhaltliche Klammer bildet die dafür verwendete Untersuchungsmethode einzelner Moleküle, die konfokale Mikroskopie.

Mit ihren vielfältigen optischen Eigenschaften könnten einzelne Defektzentren in Diamant als Einzelphotonenquellen [17] oder zur Realisierung eines Quantencomputers [18] oder zum Bau optischer Informationsspeicher [19] dienen. Im Fall dieser Arbeit werden mittels eines speziellen Defekts, der zwischen einem fluoreszierenden und einem dunklen Zustand geschaltet werden kann, verschiedene, theoretisch vorhergesagte Fluktuationstheoreme experimentell verifiziert. Die Fluktuationstheoreme bilden eine Klasse von nichtlinearen Mittelwertsrelationen der Entropieproduktion, die auch fern des Gleichgewichts ihre Gültigkeit bewahren.

Antennenkomplexe gehören zu den Pigment-Proteinkomplexen und dienen der Absorption von Licht und der Weiterleitung der gewonnenen Energie. Die eingebauten Pigmente ermöglichen die spektroskopische Untersuchung einzelner Moleküle ohne künstliche Fluorophore. Die bahnbrechenden Publikationen im Zusammenhang mit dem LHC-II höherer Pflanzen sind sicherlich die räumlichen Strukturdaten von Kühlbrandt et al. [20] und Liu et al. [21] mittels Beugungsexperimenten an Kristallen der Antennenkomplexe. Darüber hinaus wurde eine

Vielzahl von spektroskopischen Ensemblemessungen veröffentlicht [22-26], die maßgeblich zur Charakterisierung des Energietransfers innerhalb der Komplexe beitragen. Fluoreszenz- und Anregungsspektren einzelner Monomere und Trimere des LHC-II bei Temperaturen des superfluiden Heliums (2K) geben einen direkten Zugang zu den Dipolmomenten der absorbierenden und emittierenden Übergänge der Komplexe und damit zu deren elektronischer Struktur.

Nach einer kurzen Einführung in die konfokale Mikroskopie und Spektroskopie gliedert sich die Arbeit in zwei Teile. In Kapitel 2 werden zunächst die theoretischen Grundlagen der Fluktuationstheoreme angerissen, die optischen Eigenschaften des verwendeten Defektzentrums erläutert und abschließend die Messergebnisse präsentiert und bewertet. Das Kapitel 3 widmet sich nach einer Vorstellung des Pigmentproteinkomplexes LHC-II den Ergebnissen der spektroskopischen Untersuchungen an einzelnen LHC-II Monomeren und Trimeren.

Kapitel 1 : Grundlagen

Dieses Kapitel erläutert die Grundlagen der konfokalen Mikroskopie. Die Kombination aus Untersuchungsmethode und speziell präparierter Probe erlaubt die Detektion und spektroskopische Analyse einzelner Moleküle. Den theoretischen Ausführungen folgt eine Beschreibung der experimentellen Umsetzung. Angepasst an das untersuchte System wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei konfokale Mikroskope aufgebaut. Das eine für die Messung bei Raumtemperatur, das andere zur Untersuchung einer Probe in superfluidem Helium.

1.1 Konfokale Mikroskopie

In der konfokalen Mikroskopie sind die Quelle, die beleuchtete Probe und die Abbildung konfokal angeordnet. Abb. 1.1 zeigt schematisch einen solchen Aufbau.

Die Abbildung einer Punktlichtquelle auf die Probe wird wiederum auf eine Lochblende („Pinhole“) abgebildet, um anschließend den Detektor zu beleuchten. Das Anregungsvolumen ist mit dem Detektionsvolumen identisch und wird Fokalvolumen genannt. In diesem Beispiel wird sowohl in Anregung als auch in Detektion dieselbe Optik genutzt (epiaxialer Aufbau). Es kann aber auch in Transmission mit zwei Objektiven gemessen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Aufbauten waren allesamt epiaxial und daher wird im Folgenden dieser spezielle Fall behandelt.

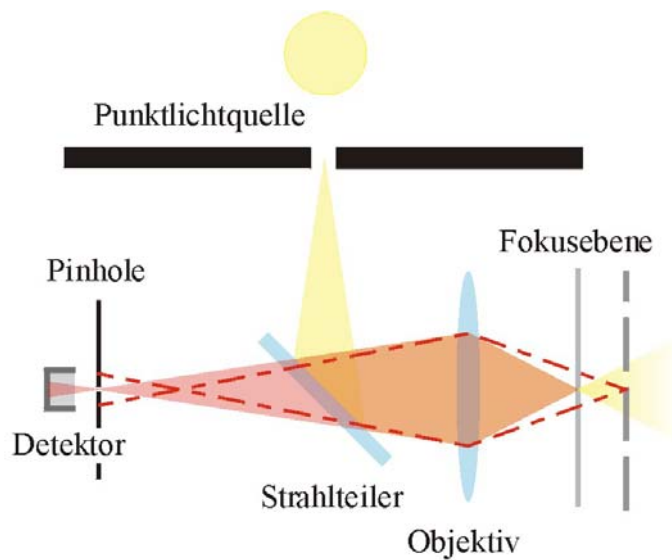


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskops. Eine Punktlichtquelle wird auf die Probe und das beleuchtete Volumen auf ein „Pinhole“ abgebildet. Ein Punkt außerhalb des Fokalvolumens (gestrichelte Linie) wird schwächer beleuchtet, entwirft ein unscharfes Bild auf dem „Pinhole“ und wird vom Detektor nahezu nicht registriert.

Neben dem Strahlengang eines Emitters in der Fokusebene ist in Abb. 1.1 der einer Lichtquelle außerhalb der Fokusebene eingezeichnet (gestrichelte Linie). Die Unterdrückung des Beitrags eines Objekts außerhalb des Fokalvolumens ist zweifach. Es wird schwach beleuchtet und der Großteil des emittierten Lichts verfehlt die Lochblende. Nur ein Objekt, das konfokal mit Quelle und „Pinhole“ ist, wird wesentlich zum detektierten Licht beitragen.

Die Größe des Fokalvolumens bestimmt somit die Auflösung des konfokalen Aufbaus. Die Abbildung einer Punktlichtquelle und damit die Abbildungsfunktion eines konventionellen Mikroskops wird durch die „Point Spread Function“ (PSF) beschrieben [27]. Für die Näherung eines paraxialen Strahlengangs hat sie die folgende Form:

$$\begin{aligned} p(0, \rho) &= 2J_1^2(\rho) / \rho^2 \\ p(\zeta, 0) &= (\sin \frac{\zeta}{4} / \frac{\zeta}{4})^2 . \end{aligned} \quad (1.1)$$

Hierbei ist J_1 die sphärische Besselfunktion 1. Ordnung, ζ und ρ sind generalisierte Koordinaten.

Im Fall der epiaxialen konfokalen Mikroskopie ergibt sich demnach die effektive Abbildungsfunktion

$$p(\zeta, \rho)_{\text{konf}} = p(\zeta, \rho) \times p(\zeta, \rho) . \quad (1.2)$$

$p(\zeta, \rho)$ kann als die Wahrscheinlichkeit betrachtet werden ein Photon der Punktlichtquelle im Punkt $p(\zeta, \rho)$ anzutreffen oder ein von diesem Punkt emittiertes Photon zu detektieren.

In Abb. 1.2A ist die PSF, in B die effektive Abbildungsfunktion des konfokalen Mikroskops jeweils für $\zeta = 0$ dargestellt.

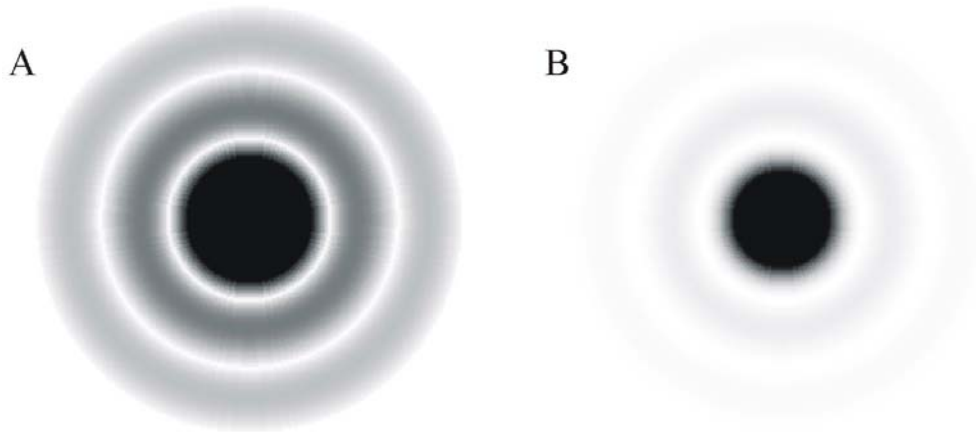


Abb. 1.2: Abbildungsfunktion eines konventionellen (A) und eines konfokalen (B) Mikroskops jeweils für $\zeta = 0$. Im konfokalen Fall ist die Intensität stärker im Hauptmaximum konzentriert.

Ein Vergleich der beiden Funktionen zeigt im konfokalen Fall ein steileres Hauptmaximum und deutlich weniger ausgeprägte Nebenmaxima. Wendet man hierfür die Auflösungsbedingung nach Rayleigh an, ergibt sich in lateraler Richtung

$$\Delta r_{\text{konf}} = 0,44 \frac{\lambda_0}{NA} \quad (1.3)$$

und als axiale Auflösung

$$\Delta z_{\text{konf}} = \frac{1,5n\lambda}{NA^2}, \quad (1.4)$$

wobei λ die Wellenlänge des verwendeten Lichts, n der Brechungsindex und NA die numerische Apertur des Objektivs ist.

Verglichen mit einem konventionellen Mikroskop [28] ist das eine Verbesserung sowohl der lateralen als auch der axialen Auflösung. Bedingt durch die unterdrückten Nebenmaxima ergibt sich zusätzlich ein erhöhter Kontrast und daher die Möglichkeit, Objekte unterschiedlicher Intensität aufzulösen.

Die Größe des „Pinhole“ wurde in die bisherigen Betrachtungen noch nicht mit einbezogen. Mathematisch gesehen ergibt sich die Abbildungsfunktion aus der Faltung der PSF mit dem

„Pinhole“. Anschaulich betrachtet sollte der Durchmesser des „Pinhole“ so gewählt werden, dass möglichst viele Photonen des beleuchteten Volumens und möglichst wenige Photonen von Objekten außerhalb des konfokalen Volumens auf den Detektor gelangen. Ein „Pinhole“ von der Größe des zentralen Maximums der Abbildungsfunktion ist hierfür eine gute Wahl. Ein kleineres „Pinhole“ würde die Auflösung nicht weiter verbessern.

Um ein Bild aufzunehmen benötigt man Informationen von mehr als einem Punkt. Hierfür gibt es unterschiedliche experimentelle Realisierungsmöglichkeiten [13,28]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Probe rasterförmig, durch Verkippen des Anregungsstrahles („Beam Scanning“) oder durch das Bewegen der Probe selbst („Sample Scanning“), Punkt für Punkt abgefahren.

Die wahre Leistungsfähigkeit eines konfokalen Aufbaus zeigt sich erst in Verbindung mit der zu untersuchenden Probe. Verdünnt man die Probe so stark, dass der mittlere Abstand der einzelnen Moleküle größer als die Auflösung des Mikroskops ist, kann man den Laserstrahl auf ein einzelnes Molekül fokussieren. Die detektierte Fluoreszenz stammt somit von einem einzelnen Molekül.

Ein konfokales Mikroskop ermöglicht die Untersuchung von einzelnen Molekülen. Die Vorzüge sind:

- Es wird immer nur ein Molekül zeitgleich untersucht. Währenddessen wird der Rest der Probe nicht beleuchtet und damit nicht zerstört.
- Es wird nur die Fluoreszenz des Fokalvolumens detektiert. Wenig Untergrund und damit ein hoher Kontrast sind die Folge.
- Aufgrund der hohen axialen Auflösung können auch Untersuchungen im Inneren dreidimensionaler Proben durchgeführt werden. Ein Beispiel hierfür sind Defektzentren in Diamant [7,29].

1.2 Einzelmolekülspektroskopie

Spektroskopische Einzelmoleküluntersuchungen ergeben im Gegensatz zu Ensemblesmessungen im Allgemeinen sehr schmale Banden. Im Fall des Ensembles tragen viele verschiedene Moleküle zur Linienbreite bei. Diese gestaltet sich aufgrund der inhomogenen Umgebung deutlich verbreitert gegenüber der eines einzelnen Quantensystems. Man spricht von einer inhomogenen Linienverbreiterung im Gegensatz zur homogenen Verbreiterung.

Eine inhomogen stark verbreiterte Linie beinhaltet einen großen Informationsverlust. So erhält man durch die messbaren Größen Intensität, Wellenlänge und Polarisation einzelner Quantensysteme Auskunft über die Orientierung, die Konformation und die direkte Umgebung des untersuchten Systems. Um die homogenen Linien aus der breiten, inhomogenen Linie herauszuschälen, gibt es neben der Einzelmolekülspektroskopie [13,30,31] noch andere Untersuchungsmöglichkeiten wie z.B. Lochbrennexperimente [32-34] und Photonenecho [35].

Spektrale Diffusion

Es zeigt sich, dass selbst bei Temperaturen um $2K$ elektronische Übergänge einzelner Moleküle zeitlich nicht konstant in der Wellenlänge sind. Dieses Verhalten wird spektrale Diffusion genannt und ist abhängig von der Matrix, in die der Fluorophor eingebettet ist [13].

Für Pigmentproteinkomplexe bildet das Protein die Matrix für die gebundenen Pigmente. Der energetische Grundzustand eines Proteins ist hochgradig entartet. Es existiert eine hohe Anzahl isoenergetischer Strukturen („Conformational Substates“: CS), die durch geringe Energiebarrieren getrennt sind. Proteindynamik kann nun als Übergang zwischen verschiedenen CS durch Tunnelprozesse oder thermische Anregung beschrieben werden [36]. Übergänge zwischen verschiedenen CS (Proteindynamik) verändern die energetische Umgebung der eingebetteten Pigmente. Diese reagieren darauf mit einer Verschiebung der spektralen Linien.

Mittels zeitaufgelöster Lochbrennexperimenten wurde die Proteindynamik bei $4K$ auf einer Zeitskala von $10^{-5} - 10^5 s$ untersucht. Von $10^{-5} - 10^{-1} s$ ist die homogene Linienbreite lediglich durch die reine Dephasierung und die Lebensdauer des angeregten Zustandes bestimmt. Im Bereich von $10^{-1} - 10^5 s$ werden die optischen Spektren von spektraler Diffusion mit Sprüngen bis zu einigen Nanometern dominiert [32]. Die Raten der zugehörigen Übergänge zwischen den CS können dabei von der Anregungsleistung abhängen [37]. Die Begründung dafür ist folgende: Je höher die Anregungsleistung, desto mehr Energie wird durch strahlungslose Relaxationsprozesse in der Probe deponiert und desto häufiger werden Übergänge zwischen den CS. Man spricht dann von photoinduzierten Sprüngen.

1.2.1 Fluoreszenzspektroskopie

In der Fluoreszenzspektroskopie einzelner Moleküle wird das emittierte Licht spektral zerlegt bevor es den Detektor erreicht. Hiefür bietet sich ein Gitterspektrograph mit nachfolgender CCD-Kamera an. Das so gemessene Spektrum ist eine Auftragung der Intensität über die Wellenlänge. Abb. 1.3A zeigt als Beispiel das Spektrum eines einzelnen Pigmentproteinkom-

plexes bei $2K$. Bei genügend hoher Auflösung des Spektrometers kann man aus der Linienbreite Rückschlüsse auf die Lebensdauer des angeregten Zustandes ziehen.

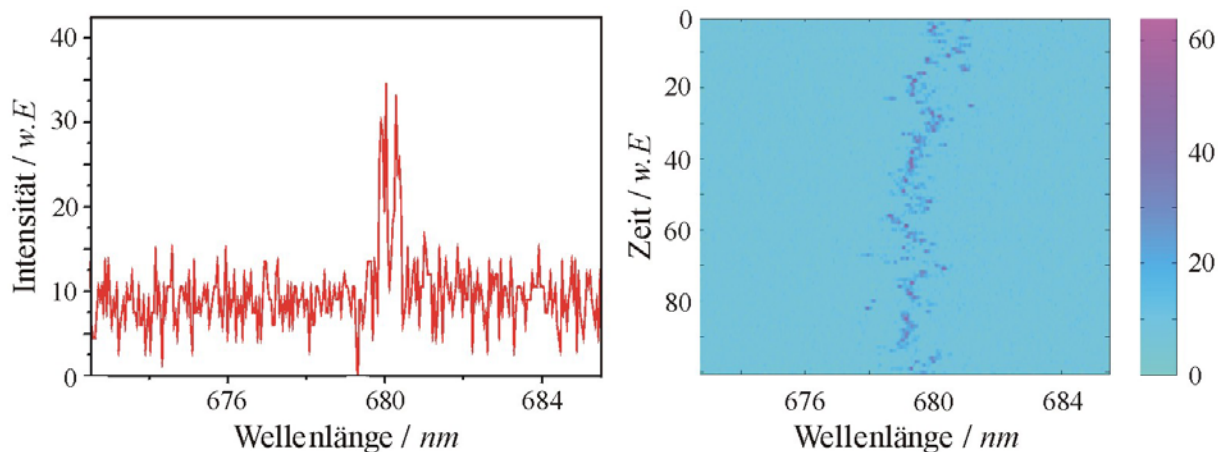


Abb. 1.3: Spektrum eines einzelnen Pigmentproteinkomplexes aufgenommen bei $T=2K$ (A). Aufgetragen ist die Intensität in w.E. über die Wellenlänge in nm. B zeigt den Trail von mehreren Spektren des gleichen Moleküls. Hierbei sind die Spektren in zeitlicher Abfolge untereinandergelegt während die Intensität jedes Spektrums farbig codiert ist. Das Fluoreszenzmaximum verändert seine spektrale Position mit fortschreitender Zeit. Man spricht von spektraler Diffusion, die in diesem Fall einige nm beträgt.

Trägt man mehrere Spektren des gleichen Moleküls untereinander auf und kodiert die Intensität der einzelnen Spektren farbig, erhält man eine Entwicklung der Spektren über der Zeit, einen sogenannten „Spectral Trail“ (Abb. 1.3B). Hiermit gewinnt man einen Überblick über die spektrale Position der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit und somit über das Ausmaß der spektralen Diffusion.

1.2.2 Anregungsspektroskopie

Anregungsspektroskopie oder auch Anregungs-Emissionsspektroskopie steht für das Durchstimmen eines schmalbandigen Lasers in der Wellenlänge bei gleichzeitiger Detektion der emittierten Photonen [38]. Wendet man diese Methode auf einzelne Moleküle an, erhält man bei hoher Absorption eine große, bei geringer Absorption eine kleine Anzahl an Photonen. Zwingend ist dabei, dass die Absorption des Anregungslichtes in Fluoreszenz aus dem angeregten Zustand mündet. Abb. 1.4 zeigt das Anregungsspektrum eines einzelnen Pigmentproteinkomplexes bei $2K$.

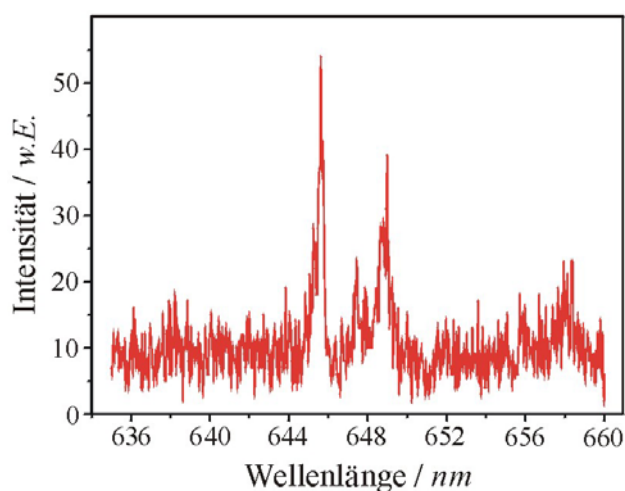


Abb. 1.4: Anregungsspektrum eines einzelnen Pigmentproteinkomplexes bei 2K. Aufgetragen ist die Intensität der Fluoreszenz in w.E. über die spektrale Position des Anregungslasers in nm. Die Orte hoher Intensität entsprechen hoher Absorption und können einzelnen elektronischen Übergängen zugeordnet werden.

Die deutlich erkennbaren Linien starker Fluoreszenz lassen auf hohe Absorption bei diesen Wellenlängen des Anregungslasers schließen. Ordnet man die Linien einzelnen Absorbern zu, kann man aus der Linienbreite die Lebensdauer des angeregten Zustandes ermitteln. Erschwert wird dies durch die auch hier vorhandene spektrale Diffusion.

Die Kontrolle der Polarisation des Anregungslichtes ermöglicht die Bestimmung der Orientierung des Übergangsdipolmoments des absorbierenden Zustandes.

1.3 Experimentelle Realisierung

Die experimentellen Daten dieser Arbeit wurden an zwei konfokalen Mikroskopen aufgenommen. Für die Untersuchung der Pigmentproteinkomplexe wurde ein Setup für Messtemperaturen bis zu 2K konzipiert und aufgebaut. Die Untersuchung der Defektzentren erfolgte mit Hilfe eines bei Raumtemperatur operierenden konfokalen Mikroskops.

1.3.1 Tieftemperaturaufbau

Als Anregungslichtquelle steht ein von einem Argon-Ionen Laser (CR Innova) gepumpter Farbstofflaser (CR 699 betrieben mit DCM) mit einer Linienbreite von 1cm^{-1} zur Verfügung. Angetrieben durch einen computergesteuerten Steppermotor (Oriel 18500) kann der doppelbrechende Filter des Farbstofflasers gedreht werden. Damit wird dessen Wellenlänge mit einer Auflösung von $0,038\text{nm}$ über einen Bereich von $635\text{--}660\text{nm}$ bei gering schwankender Ausgangsleistung durchgestimmt. Mittels einer polarisationserhaltenden Glasfaser (Newport) wird das Licht auf den schwingungsgedämpften Tisch (Melles-Griot) des optischen Aufbaus geführt. Dieser ist in Abb. 1.5 skizziert.

Das polarisierte Laserlicht wird nach der Glasfaser zunächst leistungsstabilisiert (Stabilisator: ConOptics) und anschließend depolarisiert. Ein danach alternativ eingebrachter drehbarer Polarisator (Owis) ermöglicht die Kontrolle der Anregungspolarisation. Ein Kurzpass ($>OD5$) der Firma Omega entfernt die langwellige Fluoreszenz des Lasers und der Glasfaser. Als Strahlteiler wird ein Quarzkeil (Bernhard-Halle Nachfolger) mit einer mittleren Dicke von $0,5\text{cm}$ und einem Keilwinkel von 4° gewählt. Somit kann der ohnehin schwächere Reflex der zweiten Oberfläche auch bei steil einfallendem Licht durch ein Diaphragma ausgeblendet werden. Der Scanner besteht aus zwei Scanspiegeln, die durch Galvanometer verkippt werden können. Angesteuert wird dieses „Beam Scanning“-System der Firma General Scanning über den Messcomputer mit Hilfe einer D/A Karte. Der verkippte Strahl wird mittels eines telezentrischen Systems, bestehend aus zwei Linsen (Brennweite $f = 25\text{cm}$) so geführt, dass die Hauptebene des Objektivs immer an derselben Stelle getroffen wird. Eine Verkipfung des Strahles entspricht somit einem Abrastern der Probe.

Das Objektiv und die Probe befinden sich im Innern des Kryostaten (siehe Abb. 1.6). Der Kryostat (Janis) ist ein kombinierter Fluss- Badkryostat, mit welchem Temperaturen von bis zu 2K (superfluides Helium) erreichbar sind.

Das Fluoreszenzlicht durchläuft die identische Optik. Um reflektiertes Anregungslicht zu filtern, werden nach dem Strahlteiler ein holographischer Notchfilter (Kaiser, $>OD6$) und ein Bandpass (Omega, $>OD5$) mit einer Transmission von jeweils $>80\%$ eingebracht. Diese Kombination ist notwendig, um das in der Wellenlänge variierende Laserlicht über den gesamten Durchstimmbereich zu blocken. Das „Pinhole“ wurde zu einer Größe von $50\mu\text{m}$ gewählt. Als Detektor stehen eine Avalanche-photodiode (SPCM-AQR 16, EG&G) und ein Spektrometer, bestehend aus einem Gitterspektrographen (Acton) und einer stickstoffgekühlten, rückbeleuchteten CCD-Kamera (Princeton Instruments) zur Verfügung. Um Aussagen über die Polarisation des Fluoreszenzlichtes treffen zu können, wurde dem Spektrometer ein Wollastonprisma vorgeschaltet, welches Licht in zwei senkrecht zueinander stehende Polarisationsrichtungen aufspaltet.

Die peltiergekühlte und aktiv gequenchte Avalanche-photodiode (APD) besticht durch eine sehr geringe Dunkelzählrate (<30 „counts per second“ *cps*) und eine hohe Detektionseffizienz (bis zu 70%). Ein eingebauter Diskriminator liefert pro detektiertem Photon einen TTL-Puls, der von der Zählerkarte des Computers weiterverarbeitet wird.

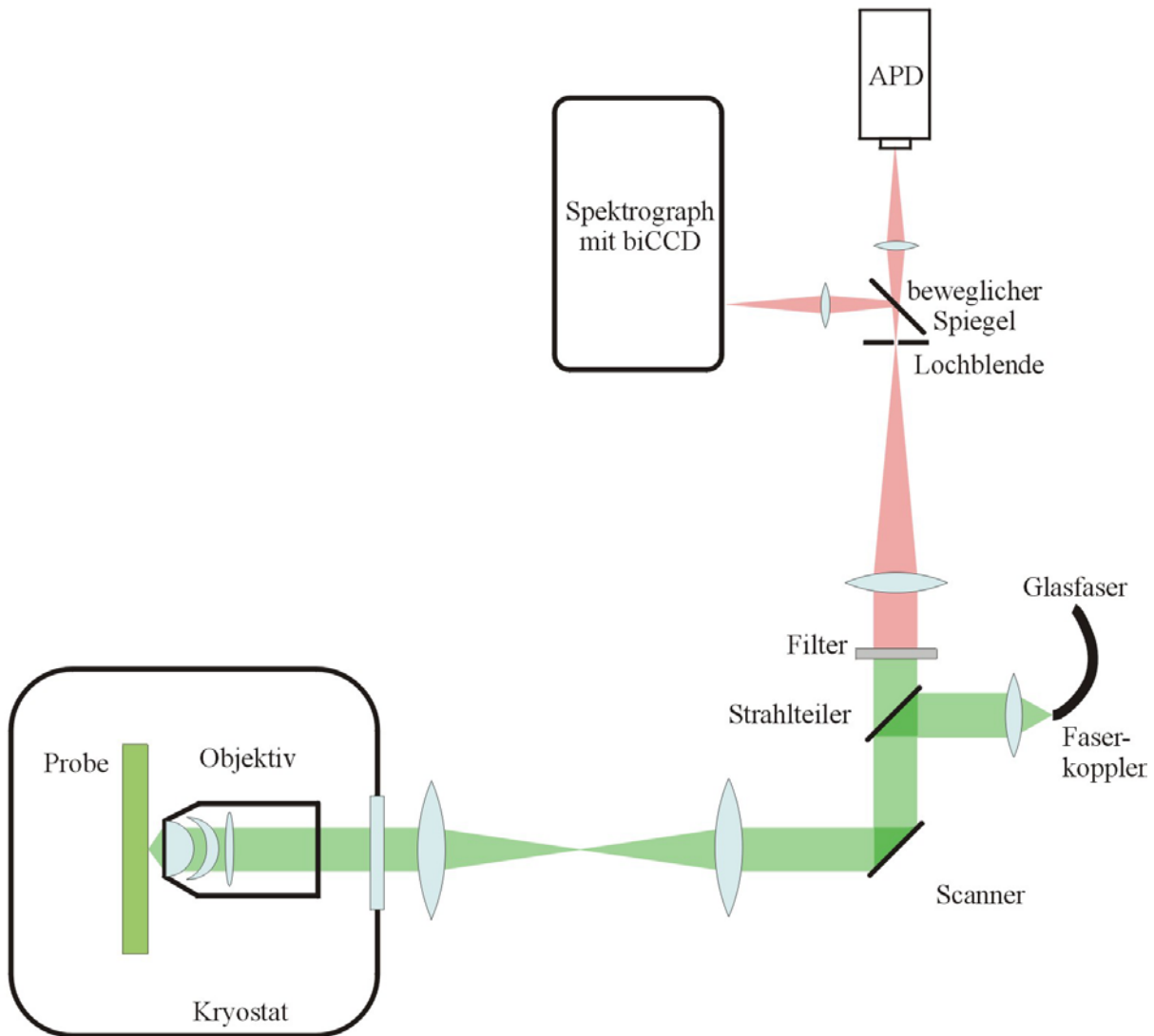


Abb. 1.5: Aufbau des verwendeten Mikroskops bei tiefen Temperaturen. Das Anregungslicht wird mittels der Scanvorrichtung und des telezentrischen Systems auf das Objektiv geführt. Objektiv und Probe sitzen im Innern eines Kryostaten, der bis auf 2K abgekühlt werden kann. Das gefilterte Fluoreszenzlicht erreicht nach Durchlaufen der Lochblende den Detektor.

Das Spektrometer hat bei Stickstoffkühlung eine vernachlässigbar kleine Dunkelzählrate. Das Ausleserauschen beträgt <3 counts bei einer Ausleserate von 100kHz . Der 400×1340 Pixel CCD-Chip besitzt eine maximale Detektionseffizienz von 90% bei der Wellenlänge 900nm . Ein PC verarbeitet die detektierten und umgewandelten Signale weiter. Die TTL-Pulse der APD werden mit Hilfe eines am Institut geschriebenen Programms in zweidimensionale Bilder des gescannten Bereichs oder in Timetraces eines festen Punktes auf der Probe umgewandelt. Dieselbe Software steuert den Steppermotor des Farbstofflasers und ermöglicht somit die

Akquisition von Anregungsspektren einzelner Fluoreszenzpunkte. Das Spektrometer wird durch ein mitgeliefertes Programm von Princeton Instruments bedient.

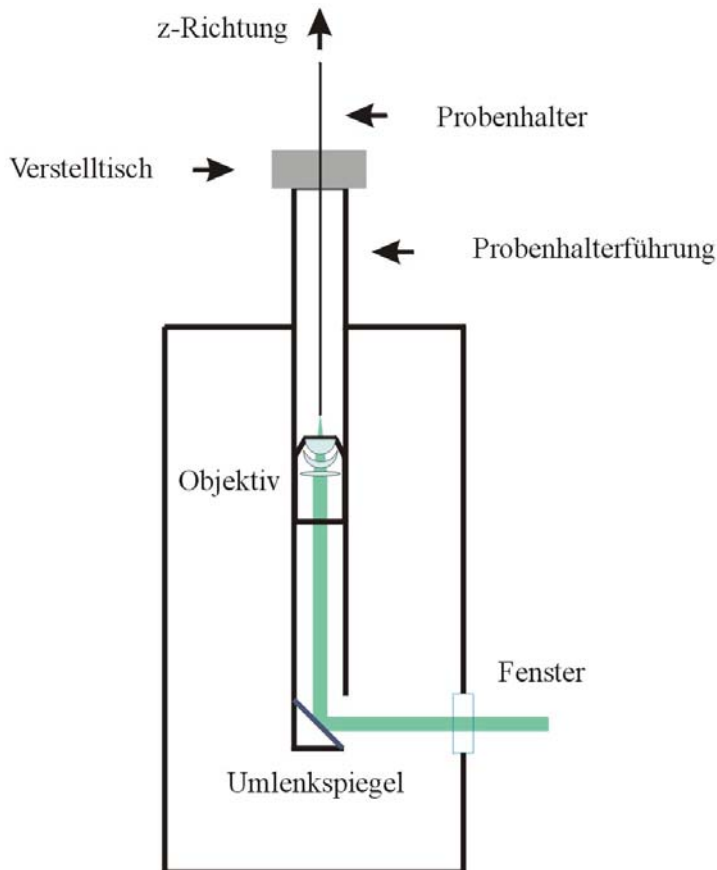


Abb. 1.6: Das Innere des Kryostaten. Mittels eines Umlenkspiegels gelangt der Laserstrahl zum Objektiv, welches von superfluidem Helium umspült wird. Die Feineinstellung des Abstandes zwischen Probe und Objektiv erfolgt durch einen Verstelltisch am oberen Ende des Probenhalters.

In Abb. 1.6 ist der Kryostat mit den sich darin befindlichen optischen Bauteilen detaillierter dargestellt. Der Umlenkspiegel und das Objektiv sind an einer herausnehmbaren Probenhalterführung angebracht. Beim Einsetzen dieser Führung in den Kryostaten ist darauf zu achten, dass der Laserstrahl senkrecht in das Mikroskopobjektiv trifft. Der eigentliche Probenhalter ist ein ca. 1m langes Stahlrohr, an dessen Ende ein rundes Deckglas mit einem Durchmesser von 5mm mit Vakuumpfett aufgeklebt werden kann. Er kann durch eine Öffnung in der Führung in den Kryostaten eingebracht werden. Dies ermöglicht ein Wechseln der Probe auch bei tiefen Temperaturen. Durch einen in die Probenhalterführung eingebauten Verstelltisch kann der Probenhalter und damit die Probe relativ zum Objektiv in z-Richtung bewegt werden. Objektiv (NA: 0,85) und Umlenkspiegel werden bei tiefen Temperaturen von flüssigem Helium umspült. Daher müssen Halterung und Bauteile diesen extremen Bedingungen angepasst sein. Beim Objektiv handelt es sich um eine Spezialanfertigung der Firma Bernhard-Halle

Nachfolger. Es wurde in geringer Stückzahl extra für den Einsatz in flüssigem Helium konzipiert und angefertigt.

Eine optimistische Abschätzung der Detektionseffizienz dieses Aufbaus wird in [39] zu ca. 5% angegeben.

1.3.2 Raumtemperaturaufbau

Als Anregungslichtquelle steht erneut ein Farbstofflaser (CR 699 betrieben mit DCM bei 670nm), gepumpt durch einen Argon-Ionen Laser (CR Innova), zur Verfügung. Zusätzlich wird ein Teil des Pumpstrahles ausgekoppelt, durch ein Prisma in seine spektralen Anteile zerlegt und die Linie bei 514nm ebenfalls zur Anregung der Probe verwendet. Durch zwei Glasfasern gelangt das Licht der beiden Laser auf den schwingungsgedämpften Tisch (Newport). Zuvor wird die grüne Anregung durch einen akustooptischen Modulator (AOM) geleitet, der mit Hilfe eines Funktionsgenerators eine Sinusfunktion auf die Intensität aufmodulieren kann.

Abb. 1.7 ist eine Darstellung des Aufbaus bei Raumtemperatur. Direkt nach der Faser wird das rote Licht leistungsstabilisiert (CRI) und ein Teil des grünen Lichtes ausgekoppelt und auf eine APD (APD1 in Abb. 1.7) fokussiert. Mit Hilfe eines dichroischen Spiegels werden die beiden Wellenlängen anschließend exakt überlagert, um über einen Strahlteiler in das Objektiv (Olympus Öl, NA: 1,3) geleitet zu werden. Als Strahlteiler wurde eine Quarzglasscheibe mit einer Dicke von einem Zentimeter gewählt. So kann bei einem Einfallswinkel von 45° der Reflex der zweiten Oberfläche durch ein Diaphragma ausgeblendet werden. Der 3D-Piezoscantisch mit einem Scanbereich von $200 \times 200 \times 20 \mu\text{m}$ (PI) ermöglicht ein computergesteuertes Abrastern der aufmontierten Probe bei einer Auflösung von $0,5\text{nm}$ für jede Achse. Das Fluoreszenzlicht wird von derselben Optik eingesammelt, durchläuft den Strahlteiler um auf das „Pinhole“ ($d = 50 \mu\text{m}$) fokussiert zu werden. Zuvor wird reflektiertes Anregungslicht durch einen Langpass750 (Omega >OD6) mit einer Transmission von 90% entfernt. Als Detektor steht eine weitere APD (APD2 in Abb. 1.7) zur Verfügung. Die Spezifikationen der beiden verwendeten APDs sind mit denen aus Kapitel 1.3.1 identisch. Die TTL-Pulse der Detektoren können von einem selbstgeschriebenen Computerprogramm mit Hilfe einer Zählerkarte zeitgleich ausgelesen werden. Neben der Ansteuerung des Scantischs über eine D/A-Karte übernimmt diese Software auch die Kommunikation mit dem Frequenzgenerator und kontrolliert somit die Intensität des grünen Lichts.

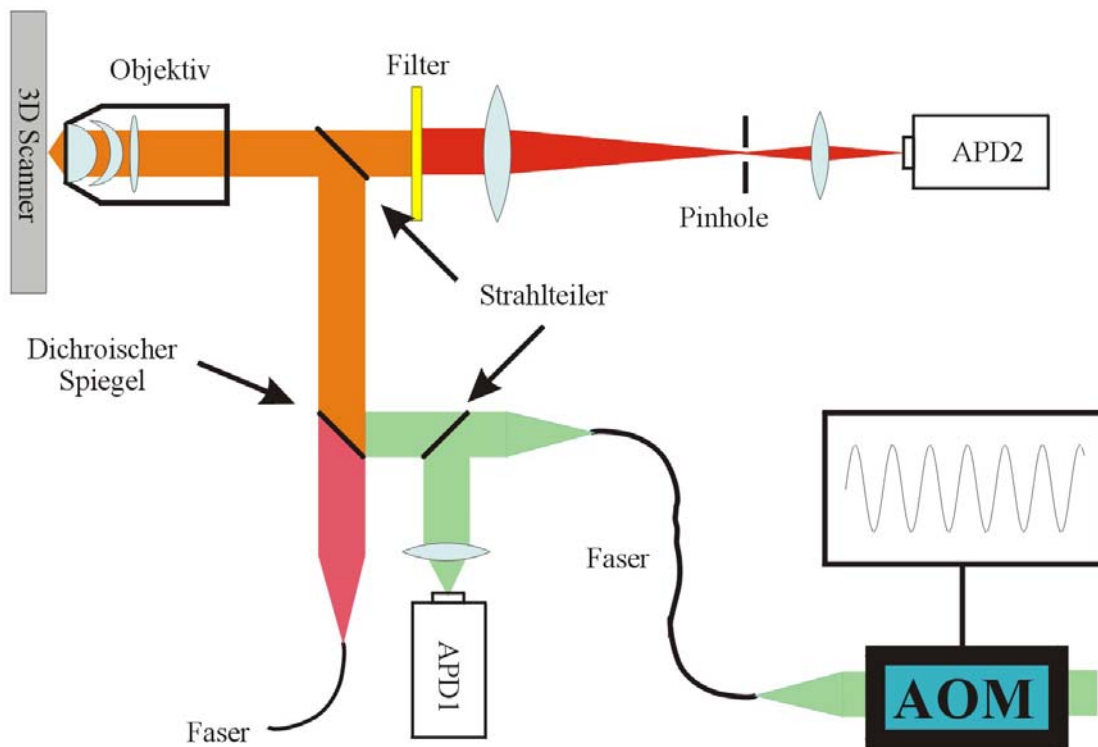


Abb. 1.7: Aufbau des konfokalen Mikroskops zur Verwendung bei Raumtemperatur. Das Licht der beiden Laser wird mit einem dichroischen Spiegel gemischt und auf das Objektiv geleitet. Die Fluoreszenz der auf den Piezoscanner aufmontierten Probe wird vom gleichen Objektiv eingesammelt, gefiltert, auf das „Pinhole“ abgebildet und durch eine APD detektiert. Dem grünen Laser kann durch einen AOM eine sinusförmige Modulation aufgebracht werden und seine Intensität wird durch eine zweite APD separat überwacht.

Erneut ist eine Abschätzung der Detektionseffizienz des konfokalen Mikroskops in [39] zu finden. Mit ca. 10% liegt sie deutlich höher als die des Aufbaus für tiefe Temperaturen.

Die in den nachfolgenden Kapiteln angegebenen Anregungsleistungen der Laser beziehen sich immer auf die gemessene Leistung vor dem abbildenden Objektiv.

Kapitel 2 : Fluktuationstheoreme

Die experimentelle Verifizierung verschiedener Fluktuationstheoreme stellt den ersten Teil dieser Arbeit dar und ist Gegenstand dieses Kapitels. Einer Einführung in die Theorie der Fluktuationstheoreme folgt die Vorstellung des experimentell untersuchten Systems (eines einzelnen Defektzentrums in Diamant) und eine detaillierte Beschreibung der Datengewinnung und Weiterverarbeitung. Abgeschlossen wird das Kapitel von der erfolgreichen Überprüfung der theoretischen Voraussagen mittels der experimentellen Ergebnisse.

2.1 Theoretische Grundlagen

Die energetische Beschreibung eines Ensembles von vielen Teilchen ist Gegenstand der klassischen Thermodynamik. Hierfür wird der makroskopische Zustand des Ensembles durch Zustandsvariablen (z.B. Druck, Temperatur, Enthalpie ...) charakterisiert und dadurch von anderen Zuständen des Ensembles abgegrenzt. Die Thermodynamik ist eine phänomenologisch abgeleitete Theorie der gegenseitigen Abhängigkeit der Zustandsvariablen und der möglichen Zustandsänderungen. Sie kann z.B. die Energieaustauschprozesse von so unterschiedlichen Systemen wie Magneten, Gasen oder Supraleitern beschreiben. Der Zustand eines Systems, das sich nicht im Gleichgewicht befindet, ist durch makroskopische Variablen kaum zu

beschreiben. Orte und Impulse der einzelnen Teilchen des Ensembles, die sogenannten Mikrozustände, fließen in diese Betrachtung nicht ein.

Ein und derselbe makroskopische Zustand lässt sich gewöhnlich durch sehr viele Mikrozustände realisieren. Der Grundgedanke der Statistischen Mechanik ist es, Wahrscheinlichkeitsaussagen über die Mikrozustände bei gegebenem Makrozustand zu machen. Eines der Ziele der Statistischen Mechanik ist die Ableitung bzw. die Begründung der makroskopischen Gesetze thermodynamischer Systeme mit Hilfe der Gesetze seiner mikroskopischen Bestandteile. Hierbei entspricht eine Beschreibung der makroskopischen Thermodynamik einer mikroskopischen Beschreibung von Gleichgewichtszuständen. Darüber hinaus vermag die Statistische Physik Aussagen über Systeme im Nichtgleichgewicht und über kleine Systeme zu treffen.

Verlässt man die makroskopische Welt und wirft einen Blick auf immer kleinere Systeme mit immer weniger Teilchen, erhält das Verhalten des einzelnen Teilchens ein zunehmend größeres Gewicht. In makroskopischen Systemen ist das physikalische Verhalten reproduzierbar und Abweichungen vom Mittelwert des Ensembles sind in der Regel extrem klein und daher nicht beobachtbar. Je kleiner das Ensemble, desto stärker wird dessen Verhalten von statistischen Fluktuationen um den Mittelwert beeinflusst. Prinzipiell bedeutet die Dominanz der Fluktuationen, dass ein Experiment, welches unter einem bestimmten Protokoll durchgeführt wird, bei gleichen Startbedingungen, nach mehrmaliger Durchführung, unterschiedliche Trajektorien aufweisen wird. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Fluktuation der aufgebrauchten Arbeit für die mechanische Entfaltung eines einzelnen Proteins [40].

Der Zustand von kleinen Systemen wird im Allgemeinen nicht mehr durch die makroskopischen Zustandsvariablen beschrieben. Für das Beispiel des faltenden und entfaltenden Proteins ist der Abstand zwischen dessen Enden der beschreibende Parameter. Besteht die Möglichkeit der externen zeitlichen Manipulation eines solchen Parameters, spricht man von einem Kontrollparameter λ .

2.1.1 Fluktuationstheoreme (FT)

Um die Fluktuationen der Messgröße eines mehrfach durchgeführten Experiments mathematisch zu beschreiben, wurden im letzten Jahrzehnt mit Hilfe unterschiedlicher Ansätze eine Fülle an Fluktuationstheoremen hergeleitet. Sie geben exakte Lösungen selbst für stark getriebene Systeme fern des Gleichgewichts, gültig jenseits der „Linear Response Theory“ [41]. Um eine grobe Klassifizierung der Theoreme vorzunehmen, ist es nützlich, zwischen Systemen zu unterscheiden, deren Verhalten und Eigenschaften zeitlich unabhängig sind (Systeme

im dynamischen Gleichgewicht), und solchen, die ein zeitabhängiges Verhalten aufweisen (getriebene Systeme). Angemerkt sei, dass der englische Begriff „Steady State“ in dieser Arbeit dem dynamischen Gleichgewicht entspricht und das statische Gleichgewicht im Allgemeinen mit „Equilibrium“ übersetzt wird.

2.1.1.1 FT für Systeme im dynamischen Gleichgewicht

Gestützt auf die Ergebnisse einer Computersimulation von gescherten Flüssigkeiten [42], wurden Mitte der 90er Jahre Fluktuationstheoreme für getriebenen deterministische und chaotisch dynamische Prozesse hergeleitet [43,44]. Die zugrunde liegende Relation ist folgende:

Ein System produziere kontinuierlich Wärme und stehe im Kontakt mit einem Wärmebad der Temperatur T . Die Rate, mit der die Wärme an das Bad abgegeben wird, ist die sogenannte Entropieproduktion $\sigma = Q/T\tau$, wobei τ das Zeitintervall für den Austausch der Wärmemenge Q ist. Verknüpft mit der Temperatur ist eine zeitabhängige Wahrscheinlichkeitsverteilung der Entropieproduktion $P_\tau(\sigma)$. Dann gilt mit der Boltzmannkonstanten k_B für alle σ :

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{k_B}{\tau} \ln \left(\frac{P_\tau(\sigma)}{P_\tau(-\sigma)} \right) = \sigma. \quad (2.1)$$

Für unendlich lange Zeiten τ bedeutet dies, dass eine Wärmeabgabe des Systems an das Bad (positives σ) sehr viel wahrscheinlicher ist als eine Wärmeaufnahme des Systems aus dem Bad (negatives σ) [45]. Die Entropieproduktion ist demnach im Durchschnitt immer positiv. Für makroskopische Systeme ist die Wärme und damit σ eine extensive Variable, was einen exponentiellen Anstieg des Verhältnisses $P_\tau(\sigma)/P_\tau(-\sigma)$ mit der Größe des Systems und damit eine faktische Unwahrscheinlichkeit negativer Entropieproduktion zur Folge hat. Bei sehr kleinen Systemen fallen die Trajektorien mit negativer Entropieproduktion aber durchaus ins Gewicht.

In der Folgezeit wurden ähnliche Fluktuationsrelationen auch für Diffusionssysteme [46,47], chemische Reaktionen [48] und für ein einzelnes Enzym [49] hergeleitet. Für eine experimentelle Überprüfung wurde ein kolloidales Teilchen mittels einer Laserpinzette mit konstanter Geschwindigkeit durch eine viskose Flüssigkeit gezogen [50,51].

2.1.1.2 Zeitlich getriebene Systeme

Die Jarzynski Gleichung

Die Jarzynski Gleichung ist eine nichtlineare Relation für die dissipierte Arbeit eines an ein Wärmebad gekoppelten Systems, das von einem Gleichgewichtszustand A in einen Gleichgewichtszustand B überführt wird [52,53]. Entscheidend ist hierbei, dass der Weg zwischen den Zuständen über das Nichtgleichgewicht führen kann. Im Gegensatz zu (2.1) macht die Jarzynski Relation eine exakte Angabe über eine fluktuierende Größe eines Messprozesses von endlicher Dauer.

Der Gleichgewichtszustand eines an ein Wärmebad gekoppelten Systems sei durch einen Kontrollparameter λ bestimmt. Zum Zeitpunkt $\tau = 0$ sei das System im Gleichgewichtszustand A mit dem Kontrollparameter $\lambda(0) = \lambda_A$. Nun wird durch ein zeitabhängiges Protokoll $\lambda(\tau)$ für $0 \leq \tau \leq t$ der Kontrollparameter von $\lambda(0) = \lambda_A$ nach $\lambda(t) = \lambda_B$ geändert und damit das System aus dem Gleichgewicht getrieben. Der Zustand unmittelbar nach Ende des Protokolls ist nicht im Gleichgewicht (er wird zur Unterscheidung mit B' bezeichnet), äquilibriert aber bei festgehaltenem λ_B in den Gleichgewichtszustand B. Nach Jarzynski gilt dann

$$\exp\left(-\frac{\Delta F}{k_B T}\right) = \left\langle \exp\left(-\frac{W}{k_B T}\right) \right\rangle, \quad (2.2)$$

wobei ΔF die Differenz der Freien Energie der Gleichgewichtszustände A und B, W die aufgebrauchte Arbeit, k_B die Boltzmannkonstante und T die Temperatur des Wärmebads ist. Da während der Relaxation von B' nach B keine Arbeit verrichtet wird, kann somit die Differenz der Freien Energie zweier Gleichgewichtszustände aus Messungen, die im Nichtgleichgewicht enden, berechnet werden. Die spitzen Klammern stehen für eine Mittelung über unendlich viele Messungen. Im Fall von experimentellen Untersuchungen wird im Rahmen der Genauigkeit von ausreichend vielen Messungen gesprochen. Die aufgebrauchte Arbeit entspricht für einen reversiblen Prozess der Differenz der freien Energie. Für einen irreversiblen Prozess beträgt die dissipierte Arbeit entlang einer Trajektorie demnach $W_{dis} = W - \Delta F$. Die Relation wird daher auch häufig in der Form

$$\left\langle \exp\left(\frac{-W_{dis}}{k_B T}\right) \right\rangle = 1 \quad (2.3)$$

geschrieben. Da es sich bei Jarzynski um eine Bedingung für den Mittelwert einer Funktion der fluktuierenden Größe handelt, spricht man von einem integralen Fluktuationstheorem.

Eine unmittelbare Folgerung der Gleichung lautet $\langle W \rangle \geq \Delta F$ bzw. $\langle W_{dis} \rangle \geq 0$, für makroskopische Systeme identisch mit dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik. Obwohl der Mittelwert der dissipierten Arbeit niemals negativ wird, muss es dennoch einzelne Trajektorien mit $W_{dis} \leq 0$ geben damit die Gleichung (2.3) erfüllt ist. Wie schon von Loschmidt 1876 angemerkt, müssen die Bewegungsgleichungen der Mikrosysteme zeitumkehrinvariant sein. Die Trajektorien negativer Arbeit garantieren diese Invarianz.

Für die Beobachtung von Trajektorien negativer Werte mit einer reellen Chance gibt Jarzynski in Ref. [53] eine Abschätzung für die Fluktuationen der Arbeit in der Größenordnung von $k_B T$. Dies schließt makroskopische Systeme aus. Ein erster experimenteller Nachweis der Jarzynski Relation gelang 2002 mittels der schon erwähnten entfalteten und faltenden Proteine [40].

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass die Relation für unmittelbares Schalten zwischen den Gleichgewichtszuständen der „Perturbation Method“ zur Berechnung von Differenzen der Freien Energie mittels Computersimulationen entspricht [54-56]. Auf diesem Gebiet finden sich auch die meisten Anwendungen der Jarzynski Gleichung [57,58].

Das FT nach Crooks

1999 leitete Gavin Crooks [59] ein Theorem ab, das viele der schon bekannten FT als Spezialfälle seiner verallgemeinerten Version enthält. Dies schließt auch einige der Fluktuationstheoreme für Systeme im dynamischen Gleichgewicht mit ein (vgl. Kapitel 2.1.1.1). Hier beschränken wir uns allerdings auf die Aussagen für zeitlich getriebene Systeme.

Betrachten wir erneut ein an ein Wärmebad der Temperatur T gekoppeltes System, das sich zum Zeitpunkt $\tau = 0$ im Gleichgewichtszustand A mit dem Kontrollparameter $\lambda(\tau = 0) = \lambda_A$ befindet. Durch eine externe Störung $\lambda(\tau)$ wird es ins Nichtgleichgewicht getrieben und endet nach der Zeit $\tau = t$ und anschließender Relaxation in einem Gleichgewichtszustand B mit $\lambda(\tau = t) = \lambda_B$. Für jeden Prozess, der das System aus dem Gleichgewicht treibt, kann man sich einen zeitlichen Umkehrprozess mit $\tilde{\lambda}(\tau) = \lambda(t - \tau)$ vorstellen, der ebenfalls aus einem Gleichgewichtszustand starten soll. Nach Crooks [59] gilt dann:

$$\langle I \rangle_F = \left\langle \tilde{I} \exp\left(-\frac{W_{dis}}{k_B T}\right) \right\rangle_R. \quad (2.4)$$

$\langle I \rangle$ ist der Mittelwert einer Funktion I entlang des Weges (z.B. Arbeit oder Wärme), die durch die Trajektorie des Systems im Phasenraum gegeben ist. Der Mittelwert entspricht dem Mittel über ein passend gewähltes Ensemble von Wegen. Der Index F steht für den Vorwärtsprozess und bezieht sich auf das englische Wort „forward“. \tilde{I} bezeichnet die zeitliche Umkehrfunktion von I und der Index R den Umkehrprozess (vom englischen „reverse“). Sonstige Definitionen sind entsprechend Gleichung (2.3) gewählt. Gleichung (2.4) besagt, dass das Mittel einer Wegfunktion über ein bestimmtes Ensemble von Wegen, dem Mittel über die Wege des zeitlichen Umkehrprozesses einer sehr ähnlichen Größe entspricht. Die exakte Herleitung des Fluktuationstheorems enthält den Nachweis, dass für das oben beschriebene System zeitliche Umkehrtrajektorien existieren [59]. Aus dem Quotient der Wahrscheinlichkeiten für Vorwärts- und Umkehrtrajektorien kann das FT direkt abgeleitet werden. Häufig wird statt Gleichung (2.4) die äquivalente Version

$$\left\langle I \exp\left(-\frac{W_{dis}}{k_B T}\right) \right\rangle_F = \langle \tilde{I} \rangle_R \quad (2.5)$$

geschrieben. Ein Spezialfall des FT nach Crooks ist die Jarzynski Gleichung. Wählt man für die Wegfunktion eine Konstante der Bewegung z.B. $I = \tilde{I} = 1$, dann ergibt Gleichung (2.4)

$$\langle 1 \rangle_F = 1 = \left\langle \exp\left(-\frac{W_{dis}}{k_B T}\right) \right\rangle_R. \quad (2.6)$$

Aufgrund der Normierung von Wahrscheinlichkeitsverteilungen ergibt die linke Seite 1. Da man in diesem Fall nur noch ein Wegensemble hat, wird der Index R überflüssig und man erhält direkt die zweite Version der Jarzynski Gleichung (2.3).

Wählt man für I eine δ -Funktion der dissipierten Arbeit, ergibt sich ein weiterer interessanter Spezialfall. Mit $I = \delta\left(\frac{1}{k_B T}(W_{dis} - W_{dis}[\lambda])\right)$ und $\tilde{I} = \delta\left(\frac{1}{k_B T}(W_{dis} + W_{dis}(\tilde{\lambda}))\right)$ eingesetzt in (2.5) erhält man:

$$\left\langle \delta \left(\frac{1}{k_B T} (W_{dis} - W_{dis}[\lambda]) \right) e^{-\frac{W_{dis}}{k_B T}} \right\rangle_F = \left\langle \delta \left(\frac{1}{k_B T} (W_{dis} + W_{dis}(\tilde{\lambda})) \right) \right\rangle_R$$

$$\Rightarrow P_F \left(\frac{W_{dis}}{k_B T} \right) e^{-\frac{W_{dis}}{k_B T}} = P_R \left(-\frac{W_{dis}}{k_B T} \right).$$

$P_F \left(\frac{W_{dis}}{k_B T} \right)$ ist die Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Betrag an Arbeit im Vorwärtsprozess zu dissipieren, und $P_R \left(-\frac{W_{dis}}{k_B T} \right)$ die Wahrscheinlichkeit, das Negative dieses Betrags im Umkehrprozess zu verbrauchen. Ist $P_R \left(-\frac{W_{dis}}{k_B T} \right) \neq 0$, ergibt sich durch Umstellen die (2.1) sehr ähnliche Gleichung:

$$\frac{P_F \left(\frac{W_{dis}}{k_B T} \right)}{P_R \left(-\frac{W_{dis}}{k_B T} \right)} = \exp \left(+\frac{W_{dis}}{k_B T} \right). \quad (2.7)$$

Im Gegensatz zur Jarzynski Gleichung (2.2) handelt es sich um eine Bedingung an die einzelnen Werte von W_{dis} und deren Häufigkeit. Das Theorem ist demnach restriktiver als die integrale Version nach Jarzynski.

In der Literatur wird eine dieser Gleichung verwandte Relation mit „Transient Fluctuation Theorem“ [51] manchmal aber auch mit „Crooks Fluctuation Theorem“ [60] bezeichnet. In dieser Arbeit soll es sich hierbei um das FT nach Crooks (FTC) handeln.

An dieser Stelle lohnt sich ein zusammenfassender Blick auf die Fluktuationstheoreme für zeitlich getriebene Systeme im Kontakt mit einem Wärmebad.

Bei einem gegebenen Protokoll machen sie exakte Angaben für die dissipierte Arbeit zwischen einem Gleichgewichtszustand (Zustand A) und einem Endzustand fern des Gleichgewichts (Zustand B'). Da sich bei der anschließenden Relaxation in das dazu korrespondierende Gleichgewicht (Zustand B) die Arbeit nicht mehr ändert, lässt sich so die Differenz der Freien Energien der beiden Gleichgewichtszustände bestimmen.

Bisher wurde W_{dis} als die fluktuierende Größe bezeichnet, genaugenommen beschreibt aber $\frac{W_{dis}}{T}$ die Fluktuationen. Betrachtet man die Entropiedifferenz der beiden dynamischen Gleichgewichtszustände ergibt sich für dieses System:

$$\Delta S_{Bad} = -\frac{\Delta Q}{T} \text{ für die Änderung der Entropie des Wärmebades und}$$

$\Delta S_{\text{sys}} = \frac{\Delta U}{T} - \frac{\Delta F}{T}$ für die Änderung der Entropie des Systems.

ΔQ ist die abgegebene Wärmemenge des Bades an das System und ΔU die Änderung der inneren Energie. Die Änderung der gesamten Entropie beträgt nach einem solchen Prozess demnach:

$$\Delta S_{\text{tot}} = \frac{1}{T}(-\Delta Q + \Delta U - \Delta F) = \frac{1}{T}(W - \Delta F) = \frac{W_{\text{dis}}}{T}. \quad (2.8)$$

Die Relationen können daher auch als Fluktuationen der Entropieproduktion betrachtet werden. Die Proportionalität zwischen Entropieproduktion und dissipierter Arbeit gilt allerdings nur für das relaxierte System. Es handelt sich hierbei um keine Definition der Entropie für das Nichtgleichgewicht und es kann demnach keine Aussage über die Entropie entlang einer Trajektorie gemacht werden.

Für kleine Systeme erhält man analog zu Trajektorien negativer Arbeit nun Trajektorien negativer Entropieproduktion. Dies wird manchmal als eine transiente Verletzung des 2. Hauptsatzes der Wärmelehre bezeichnet [43,50]. Für den Mittelwert und damit für den makroskopischen Grenzfall gilt aber nach wie vor:

$$\left\langle \frac{W_{\text{dis}}}{T} \right\rangle = \langle \Delta S_{\text{tot}} \rangle \geq 0.$$

Eine Zusammenfassung der bekannten Fluktuationstheoreme bieten Ref. [61] und Ref. [62].

2.1.1.3 Das FT für eine Mastergleichung mit zeitabhängigen Raten

Die bisher erwähnten FT wurden typischerweise für ein an ein Wärmebad gekoppeltes System abgeleitet. Ein Wärmebad einer Temperatur T und das damit verbundene thermische Rauschen ist jedoch für diese Fluktuationstheoreme nicht zwingend erforderlich. Tatsächlich werden sie durch das Verhalten des Systems für ein zeitumgekehrtes Protokoll bestimmt und können daher auch für Prozesse definiert werden, die durch Mastergleichungen beschreibbar sind. Ein solch nonthermales (ohne angekoppeltes Wärmebad) FT wurde von Seifert hergeleitet [63] und im Rahmen dieser Arbeit experimentell getestet.

Gegeben sei ein System mit N Zuständen. Die Übergänge zwischen den einzelnen Zuständen seien Markovprozesse und das System sei beschreibbar durch die Mastergleichung

$$\partial_{\tau} p_n(\tau) = \sum_m^N w_{mn} p_m(\tau) - w_{nm} p_n(\tau). \quad (2.9)$$

Hierbei ist $p_n(\tau)$ die Wahrscheinlichkeit zum Zeitpunkt τ im Zustand n zu sein und w_{mn} die Übergangsrate vom Zustand m in den Zustand n . Die Übergangsraten seien zeitabhängig und durch den Kontrollparameter $\lambda(\tau)$ extern steuerbar $\Rightarrow w_{mn} = w_{mn}(\lambda(\tau))$. Für zeitunabhängige Raten, sprich für ein konstantes λ , sei die Forderung nach einer „Detailed Balance“

$$\frac{p_n^s(\lambda)}{p_m^s(\lambda)} = \frac{w_{mn}(\lambda)}{w_{nm}(\lambda)} \quad (2.10)$$

erfüllt. p_n^s ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit im dynamischen Gleichgewicht (s steht für „Steady State“).

Die stochastische Größe R

Das System sei zum Zeitpunkt $\tau = 0$ im dynamischen Gleichgewicht und befinde sich mit der Aufenthaltswahrscheinlichkeit $p_{n_0}^s$ im Zustand n_0 . Es wird im Zeitraum $0 \leq \tau \leq t$ mit dem Protokoll $\lambda(\tau)$ von $\lambda(0)$ nach $\lambda(t)$ getrieben und endet nicht notwendigerweise in einem Zustand des dynamischen Gleichgewichts. Dann ist $P[n(\tau)]$ die Wahrscheinlichkeit für die Trajektorie $n(\tau) = (n_0, n_1, \dots, n_k)$ mit k Sprüngen zwischen den Zuständen des Systems. Die Trajektorie startet bei n_0 springt dann zum Zeitpunkt τ_1 in den Zustand n_1 , zum Zeitpunkt τ_2 in n_2 ... und in den Zustand n_k zum Zeitpunkt τ_k , um dort bis zum Ende $\tau = t$ zu verweilen. Die Wahrscheinlichkeit lässt sich schreiben als:

$$\begin{aligned} P[n(\tau)] = & p_{n_0}^s(\lambda(0)) \times \exp \left[- \int_0^{\tau_1} \sum_{m \neq n_0}^N w_{n_0 m}(\lambda(\tau)) d\tau \right] \times w_{n_0 n_1}(\lambda(\tau_1)) \\ & \times \exp \left[- \int_{\tau_1}^{\tau_2} \sum_{m \neq n_1}^N w_{n_1 m}(\lambda(\tau)) d\tau \right] \times w_{n_1 n_2}(\lambda(\tau_2)) \times \dots \\ & \times \exp \left[- \int_{\tau_k}^t \sum_{m \neq n_k}^N w_{n_k m}(\lambda(\tau)) d\tau \right]. \end{aligned} \quad (2.11)$$

$p_{n_0}^s(\lambda(0))$ ist die Wahrscheinlichkeit zu Beginn im Zustand n_0 zu sein. Die Rate $w_{n_0 n_1}(\lambda(\tau_1))$ gibt die Sprungwahrscheinlichkeit von n_0 nach n_1 zum Zeitpunkt τ_1 (genauge-

nommen handelt es sich hierbei um ein Integral über ein infinitesimales Zeitintervall). Wie wahrscheinlich das Verhalten des Systems ist, zwischen den gewollten Übergängen in keinen der $N-1$ anderen Zustände zu springen, geben die exponentiellen Integralterme an.

Betrachtet man nun die zeitumgekehrte Trajektorie mit $\tilde{n}(\tau) = n(t-\tau) = (n_k, n_{k-1}, \dots, n_0)$, die aus dem relaxierten Endzustand des Vorwärtsprozesses starten soll und unter dem Protokoll $\tilde{\lambda} = \lambda(t-\tau)$ mit $0 \leq \tau \leq t$ durchgeführt wird. Dann ergibt sich die Wahrscheinlichkeit $P[\tilde{n}(\tau)]$ folgerichtig zu:

$$\begin{aligned}
 P[\tilde{n}(\tau)] &= p_{n_0}^s(\tilde{\lambda}(0)) \times \exp \left[- \int_0^{\tau_1} \sum_{m \neq n_0}^N w_{n_0 m}^- (\tilde{\lambda}(\tau)) d\tau \right] \times w_{n_0 n_1}^- (\tilde{\lambda}(\tau_1)) \\
 &\quad \times \exp \left[- \int_{\tau_1}^{\tau_2} \sum_{m \neq n_1}^N w_{n_1 m}^- (\tilde{\lambda}(\tau)) d\tau \right] \times w_{n_1 n_2}^- (\tilde{\lambda}(\tau_2)) \times \dots \quad (2.12) \\
 &\quad \times \exp \left[- \int_{\tau_k}^t \sum_{m \neq n_k}^N w_{n_k m}^- (\tilde{\lambda}(\tau)) d\tau \right].
 \end{aligned}$$

Das Fluktuationstheorem kann nun aus dem Quotienten der beiden Wahrscheinlichkeiten direkt abgeleitet werden. Da die Umkehrtrajektorie eine zeitliche Spiegelung des Vorwärtsprozesses ist, lassen sich die Integralterme paarweise kürzen. Weiterhin existiert für jeden Sprung von n_i nach n_{i+1} ein Sprung von n_{i+1} nach n_i bei gleichem Kontrollparameter λ , gegeben durch Trajektorie und Umkehrtrajektorie. Mit der Bedingung der „Detailed Balance“ (2.10) können daher die Quotienten der Raten ebenfalls paarweise zu Quotienten der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten $p_n^s(\lambda(\tau))$, abhängig vom Kontrollparameter zur Sprungzeit, umgeschrieben und zu folgendem Term zusammengefasst werden:

$$\frac{P[\tilde{n}(\tau)]}{P[n(\tau)]} = \exp \left(\int_0^t d\tau \lambda(\tau) \frac{\partial \ln p_{n(\tau)}^s}{\partial \lambda} \right).$$

Die Normierung der Summe der Wahrscheinlichkeiten aller möglichen Trajektorien führt schließlich zu:

$$1 = \sum_{n(\tau)} P[\tilde{n}(\tau)] = \sum_{n(\tau)} P[n(\tau)] = \sum_{n(\tau)} \exp\left(\int_0^t d\tau \lambda(\tau) \frac{\partial \ln p_{n(\tau)}^s}{\partial \lambda}\right) P[n(\tau)]$$

$$1 = \left\langle \exp\left(\int_0^t d\tau \lambda(\tau) \frac{\partial \ln p_{n(\tau)}^s}{\partial \lambda}\right) \right\rangle = \left\langle \exp\left(-\frac{R(n(\tau))}{k_B}\right) \right\rangle.$$

Hierbei wurde die stochastische Größe R als

$$R(n(\tau)) = k_B \ln \left(\frac{P[n(\tau)]}{P[\tilde{n}(\tau)]} \right) = -k_B \int_0^t d\tau \lambda \frac{\partial \ln p_{n(\tau)}^s}{\partial \lambda} \quad (2.13)$$

definiert. Die spitzen Klammern stehen für die Mittelung über unendlich viele Trajektorien und man spricht erneut von einem integralen FT.

Um sich die physikalische Bedeutung von R besser vorstellen zu können, ist es hilfreich für das System Energielevel $E_n(\lambda)$ und Freie Energie $F(\lambda)$ zu definieren und es an ein Wärmebad der Temperatur T zu koppeln. Durch die Wahl

$$p_n^s(\lambda) = \exp\left(-\frac{1}{k_B T} (E_n(\lambda) - F(\lambda))\right)$$

ergibt sich für R die anschauliche Größe $R = \frac{W_{dis}}{T}$ und das Fluktuationstheorem wird identisch mit der Jarzynski Gleichung (2.3). Ordnet man den Anfangszuständen des Vorwärts- und des Umkehrprozesses Entropiewerte zu, dann ist R die Differenz der Gesamtentropie dieser zwei Zustände im dynamischen Gleichgewicht (siehe Gleichung (2.8)) für ein gegebenes Protokoll. Es ist auch hier wichtig daran zu denken, dass es sich nicht um eine Definition der Entropie für das Nichtgleichgewicht handelt.

Für ein oben definiertes System das sich zum Zeitpunkt $\tau = 0$ im dynamischen Gleichgewicht befindet und mit dem Kontrollparameter $\lambda(\tau)$ von $\lambda(0)$ nach $\lambda(t)$ getrieben wird gilt das integrale FT:

$$\left\langle \exp\left(-\frac{R(n(\tau))}{k_B}\right) \right\rangle = 1. \quad (2.14)$$

Hierbei handelt es sich um eine Verallgemeinerung der Jarzynski Gleichung auf nonthermale Systeme. R kann für einzelne Trajektorien negative Werte annehmen. In den meisten Fällen

ist die Forderung nach diesen Trajektorien sogar zwingend, aber analog zur dissipierten Arbeit gilt für den Mittelwert:

$$\langle R \rangle \geq 0. \quad (2.15)$$

Weiterhin lässt sich abgeleitet aus Gleichung (2.7) für dieses nonthermale System das folgende restriktivere FT von nichtintegraler Form aufstellen:

$$\frac{P_F \left(\frac{R}{k_B} \right)}{P_R \left(-\frac{R}{k_B} \right)} = e^{+\beta/k_B}. \quad (2.16)$$

Die Indizes F und R stehen für Vorwärts- und Umkehrprozess.

Die Entropie entlang einer Trajektorie

Am Anfang des Kapitel 2 wurde darauf hingewiesen, dass die makroskopischen Größen der klassischen Thermodynamik lediglich für die Beschreibung von Gleichgewichtszuständen definiert sind. Eine Definition für die Entropie entlang einer Trajektorie des nonthermalen Systems aus 2.1.1.3 muss demnach sinnig für das mikroskopische Nichtgleichgewicht und stimmig für den Übergang zu einem makroskopischen Gleichgewichtssystem sein. Im Folgenden wird die Entropie eines mikroskopischen Systems mit Kleinbuchstaben, die Mittelwerte und damit der Übergang zum makroskopischen System mit Großbuchstaben notiert.

Nach dem informationstheoretischen Ansatz von Shannon [64] beträgt die zur Beschreibung eines Zustandes n nötige Information: $I(n) = -k_B \ln p(n)$. p steht für die Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Zustand n . Die Entropie des Ensembles ist der Mittelwert über alle Zustände N des Systems: $S = -k_B \sum_N p(n) \ln p(n)$. Eine sinnvolle Definition der Entropie eines einzelnen Zustandes des Ensembles ist die dafür nötige Information: $s(n) = I(n)$ [59]. Die Entropie des Systems einer einzelnen zeitabhängigen Trajektorie eines Systems im Nichtgleichgewicht $n(\tau) = (n_0, n_1, \dots, n_k)$ aus 2.1.1.3 lässt sich demnach zu

$$s_{\text{sys}}(\tau) = -k_B \ln p_n(\tau)$$

schreiben [65], wobei $p_n(\tau)$ die Lösung der Mastergleichung (2.9) für das Protokoll $\lambda = \lambda(\tau)$ ist. Einen besseren Einblick in die zeitliche Entwicklung dieser so definierten Entropie gibt deren Änderung

$$\frac{ds_{\text{sys}}(\tau)}{d\tau} = -k_B \left. \frac{\partial_\tau p_n(\tau)}{p_n(\tau)} \right|_{n(\tau)} - k_B \sum_{j=1}^k \delta(\tau - \tau_j) \ln \frac{p_{n_j^+}(\tau)}{p_{n_j^-}(\tau)}. \quad (2.17)$$

Der linke Term der rechten Seite liefert einen Beitrag während das System in einem der Zustände verweilt. Für ein zeitabhängiges $\lambda = \lambda(\tau)$, und damit ein zeitabhängiges $p_n(\tau)$, oder für einen Start aus dem Nichtgleichgewicht ist er verschieden von Null.

Der rechte Term beschreibt hingegen die Entropieänderung für die k Sprünge der Trajektorie mit dem jeweiligen Sprungindex j und der Sprungzeit τ_j . Die Bezeichnungen $p_{n_j^+}(\tau_j)$ bzw. $p_{n_j^-}(\tau_j)$ stehen für die momentanen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten zu den Sprungzeiten der zwei beteiligten Zustände. $+$ markiert den Zielzustand und $-$ den Zustand vor dem Sprung.

Neben der Entropie des Systems muss noch dem umgebenden Medium eine Entropie zugeschrieben werden. Nach [65] ist Mediumsentropie einer Trajektorie als

$$s_{\text{med}} = -k_B \sum_{j=1}^k \ln \frac{w_{n_j^+ n_j^-}(\tau_j)}{w_{n_j^- n_j^+}(\tau_j)} \quad (2.18)$$

definiert, wobei k erneut die Gesamtzahl der Sprünge, j der Sprungindex, τ_j die Sprungzeit und $w_{n_j^+ n_j^-}$ bzw. $w_{n_j^- n_j^+}$ die Raten zwischen den beteiligten Zuständen sind. $+$ markiert erneut den Zielzustand und $-$ den Zustand vor dem Sprung. Würde das System von Zustand n in Zustand m springen, dann wäre z.B. $w_{n_j^+ n_j^-} = w_{mn}$. Die Mediumsentropie ändert sich nur im Fall eines Sprunges. Die Ableitung

$$\frac{ds_{\text{med}}(\tau)}{d\tau} = -k_B \sum_{j=1}^k \delta(\tau - \tau_j) \ln \frac{w_{n_j^+ n_j^-}(\tau)}{w_{n_j^- n_j^+}(\tau)} \quad (2.19)$$

gibt die Änderung für jeden dieser Sprünge. Die gesamte Entropieänderung von System und Medium setzt sich nun als einfache Summe von (2.17) und (2.19) zusammen.

$$\begin{aligned}
\frac{ds_{tot}(\tau)}{d\tau} &= \frac{ds_{sys}(\tau)}{d\tau} + \frac{ds_{med}(\tau)}{d\tau} \\
&= -k_B \left. \frac{\partial_\tau p_n(\tau)}{p_n(\tau)} \right|_{n(\tau)} - k_B \sum_{j=1}^k \delta(\tau - \tau_j) \ln \frac{p_{n_j^+}(\tau) w_{n_j^+ n_j^-}(\tau)}{p_{n_j^-}(\tau) w_{n_j^- n_j^+}(\tau)}.
\end{aligned} \tag{2.20}$$

Bildet man den Mittelwert über sehr viele einzelne Trajektorien, erhält man die Entropie für ein makroskopisches System das nicht notwendigerweise im Gleichgewicht ist. Durch die Mittelung verschwindet der von den Sprüngen unabhängige Term der System- und Gesamtentropie. Für die Bildung des Mittelwerts benötigt man noch die mittlere Sprungwahrscheinlichkeit $p_{n_j^-}(\tau_j) w_{n_j^- n_j^+}(\tau_j)$ zur Zeit τ_j von n_j^- nach n_j^+ .

$$\begin{aligned}
\frac{dS_{sys}(\tau)}{d\tau} &= \left\langle \frac{ds(\tau)}{d\tau} \right\rangle = k_B \sum_{n,j} p_n w_{nj} \ln \frac{p_n}{p_j}, \\
\frac{dS_{med}(\tau)}{d\tau} &= \left\langle \frac{ds_{med}(\tau)}{d\tau} \right\rangle = k_B \sum_{n,j} p_n w_{nj} \ln \frac{w_{nj}}{w_{jn}}, \\
\frac{dS_{tot}(\tau)}{d\tau} &= \left\langle \frac{ds_{tot}(\tau)}{d\tau} \right\rangle = k_B \sum_{n,j} p_n w_{nj} \ln \frac{p_n w_{nj}}{p_j w_{jn}}.
\end{aligned}$$

Hierbei wurden die Abhängigkeiten der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten und der Raten von der Zeit in der Notation weggelassen. Für diese Definitionen der mikroskopischen Entropie [65] gilt für die Mittelwerte die globale Bilanz $\dot{S}_{tot}(\tau) = \dot{S}_{sys}(\tau) + \dot{S}_{med}(\tau)$ mit $\dot{S}_{tot}(\tau) \geq 0$ auch jenseits des dynamischen Gleichgewichts [47].

Ausgehend vom Quotienten der Wahrscheinlichkeiten für eine Trajektorie und deren zeitumgekehrtem Pendant erhält man ein Fluktuationstheorem für Δs_{tot} . Die Herleitung ist ähnlich der Herleitung der stochastischen Größe R und im Detail in [65] nachzulesen.

Der entscheidende Unterschied zu R ist, dass nun der Anfangszustand des zeitlichen Umkehrprozesses dem Endzustand des Vorwärtsprozesses ohne anschließende Relaxation entspricht. Mit anderen Worten, auch wenn der Vorwärtsprozess aus dem dynamischen Gleichgewicht startet gilt dies nicht notwendigerweise für den Umkehrprozess.

Darüber hinaus ist für die Entropie einer Trajektorie auch ein Start aus dem Nichtgleichgewicht möglich. Um jedoch die beiden Größen R und Δs_{tot} vergleichen zu können, beschränkt sich die Auswertung in Kapitel 2.4 im Allgemeinen auf Trajektorien, die aus dem dynami-

schen Gleichgewicht starten. Einzige Ausnahme bildet die Verifizierung des FTs nach Crooks für Δs_{tot} .

Für ein System, das durch eine Mastergleichung beschreibbar ist und dessen Übergänge zwischen den Zuständen Markovprozesse sind, erhält man das integrale FT

$$\left\langle \exp\left(-\frac{\Delta s_{tot}}{k_B}\right) \right\rangle = 1. \quad (2.21)$$

Δs_{tot} ist hierbei die Änderung der Gesamtentropie entlang der Trajektorie $n(\lambda(\tau))$ mit $0 \leq \tau \leq t$ und dem zeitabhängigen Kontrollparameter $\lambda = \lambda(\tau)$. In dieser Arbeit soll das System weiterhin die „Detailed Balance“ (2.10) erfüllen, was aber nicht grundsätzlich erforderlich ist [65].

Starten und enden die Trajektorien im dynamischen Gleichgewicht, so wird Δs_{tot} identisch mit der stochastischen Größe R , die der Entropieproduktion zwischen dem Anfangszustand und dem relaxierten Endzustand entspricht. Die mikroskopische Entropie des Nichtgleichgewichts geht bei Relaxation in die mikroskopische Entropie des Gleichgewichts und durch Mittelwertbildung in die makroskopische Entropie des Gleichgewichts über.

Ist zwar der Startzustand aber nicht der Endzustand der Trajektorien im dynamischen Gleichgewicht, sind die beiden Größen für den gleichen Satz von Messungen verschieden und erfüllen dennoch die Fluktuationstheoreme:

$$\left\langle \exp\left(-\frac{R}{k_B}\right) \right\rangle = 1 \quad \text{und} \quad \left\langle \exp\left(-\frac{\Delta s_{tot}}{k_B}\right) \right\rangle = 1.$$

Analog zu (2.7) bzw. (2.16) lässt sich auch für die Entropie ein weiteres nichtintegrales FT aufstellen:

$$\frac{P_F\left(\frac{\Delta s_{tot}}{k_B}\right)}{P_R\left(-\frac{\Delta s_{tot}}{k_B}\right)} = e^{+\Delta s_{tot}/k_B}. \quad (2.22)$$

Die Indizes F und R stehen erneut für Vorwärts und Umkehrprozess. Hierbei ist nun zu beachten, dass der Endzustand des Vorwärtsprozesses bzw. des Umkehrprozesses der Anfangszustand des jeweils anderen ist. Im Fall eines Endzustandes des Vorwärtsprozesses im Nichtgleichgewicht bedeutet dies, dass sowohl Vorwärts- als auch Umkehrprozess aus

gleichgewicht bedeutet dies, dass sowohl Vorwärts- als auch Umkehrprozess aus dem Nichtgleichgewicht starten müssen.

2.2 Das verwendete System

Um die in Kapitel 2.1.1 hergeleiteten Fluktuationstheoreme experimentell zu testen, benötigt man ein System, das sehr ausgefallene Anforderungen erfüllen muss. Es muss zwei oder mehr eindeutig unterscheidbare Zustände einnehmen können und bei den Übergängen zwischen diesen Zuständen soll es sich um Markovprozesse handeln. Es muss möglich sein, mindestens eine der Raten durch einen externen Kontrollparameter λ zu steuern, und bei konstantem λ soll sich ein dynamisches Gleichgewicht einstellen, das den Bedingungen der „Detailed Balance“ (2.10) genügt. Es darf keine Wärme mit einem Wärmebad austauschen und schlussendlich muss es sich um ein sehr kleines System handeln. Ideal wäre ein einziges ~~Ein~~ spezielles Defektzentrum eines Diamanten erfüllt all diese Anforderungen.

2.2.1 Das Photochrome Zentrum

Es gibt über 500 bekannte Defektzentren in Diamant und es werden regelmäßig weitere Zentren klassifiziert [66]. Im Gegensatz zu reinem Diamant, der für das sichtbare Licht keine Absorption aufweist, absorbieren und emittieren die Defekte in Diamant die unterschiedlichsten Wellenlängen des sichtbaren Spektrums. Eine umfangreiche Zusammenstellung von Defektzentren und deren optischen Eigenschaften findet sich in Ref. [66].

Beim Photochromen Zentrum (PZ) handelt es sich aufgrund der spektralen Position der Absorptions- und Emissionsmaxima wahrscheinlich um einen Nickeldefekt in natürlichem Diamant. Da seine genaue Struktur bis heute nicht bekannt ist, dienen die hervorstechenden optischen Eigenschaften der Charakterisierung. Im Folgenden sollen diese Eigenschaften und eine mögliche elektronische Struktur vorgestellt werden.

Bei entsprechender Defektdichte ist es mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops und passend gewählten Filtern möglich, einzelne Zentren optisch zu adressieren und zu detektieren. Abb. 2.1 zeigt das bei Raumtemperatur aufgenommene Fluoreszenzspektrum des PZ. Neben einer ausgeprägten Phononenstruktur kann man bei 751nm die „Zero-Phonon Line“ (ZPL) erkennen. Mit der roten gestrichelten Linie ist die spektrale Position des in den Experimenten verwendeten Langpassfilters markiert (vgl. Kapitel 1.3.2).

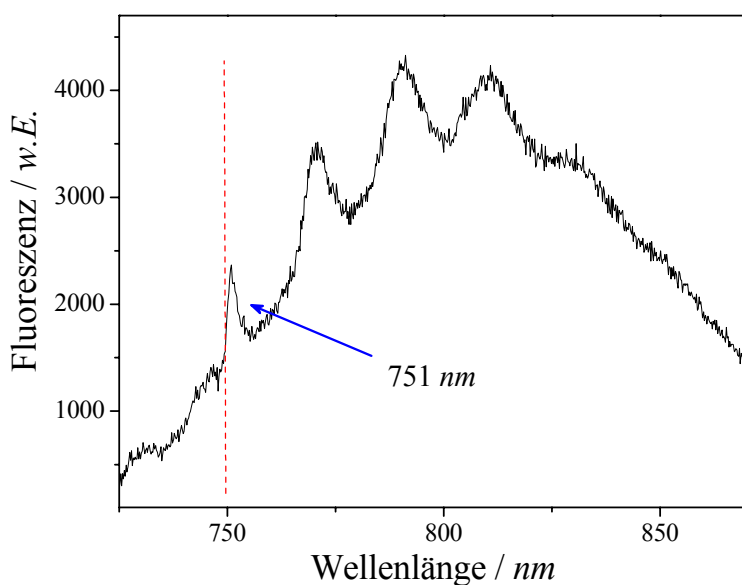


Abb. 2.1: Fluoreszenzspektrum des Photochromen Zentrums bei Raumtemperatur. Angeregt wurde mit 670nm. Bei 751nm befindet sich die ZPL. Jenseits der gestrichelten roten Linie detektiert der RT-Aufbau.

An anderer Stelle [19] wurde durch Antibunching-Experimente nachgewiesen, dass es sich bei der Fluoreszenz dieser Zentren um die Fluoreszenz eines einzelnen Quantensystems handelt. Wie die Namensgebung vermuten lässt, treten besondere Effekte abhängig von der Wellenlänge des Anregungslichtes auf. In diesem Fall handelt es sich um den Wechsel zwischen einem fluoreszierenden und einem fluoreszenzlosen (dunklen) Zustand des Zentrums, regulierbar durch die Wellenlängen 670nm (rot) und 514nm (grün). Die Farben rot bzw. grün des Anregungslichtes sollen in diesem Kapitel diesen Wellenlängen zugeordnet sein.

2.2.1.1 Der Timetrace

Das Setup bei Raumtemperatur (Kapitel 1.3.2) ermöglicht die Aufnahme sogenannter Timetraces einzelner Defekte. Dabei wird die von einem festen Punkt detektierte Fluoreszenz über den Zeitpunkt der Detektion aufgetragen. Abb. 2.2 zeigt jeweils Timetraces einer Länge von 4 Sekunden von ein und demselben einzelnen PZ bei monochromer Anregung mit rot (A) bzw. grün (B) und bei zeitgleicher Einstrahlung des roten und des grünen Lasers (C). Aufgetragen sind die detektierten Photonen in $w.E.$ über der Zeit in ms . Angeregt wurde mit $150\mu W$ roter und $34\mu W$ grüner Leistung vor dem Objektiv.

Während man bei rein grüner Anregung lediglich die Untergrundfluoreszenz detektiert, erhält man bei der Anregung mit rotem Licht seltene kurze, aber intensive Fluoreszenzereignisse. Ein vollkommen anderes Bild bietet sich bei zeitgleicher Anregung mit beiden Farben. Das Zentrum springt kontinuierlich zwischen einem Zustand hoher Intensität (Hellzustand) und einem Zustand, bei dem nur noch die Untergrundfluoreszenz zu detektieren ist (Dunkelzu-

stand), hin und her. Die Übergänge zwischen diesen Zuständen werden offensichtlich von den beiden Anregungswellenlängen beeinflusst.

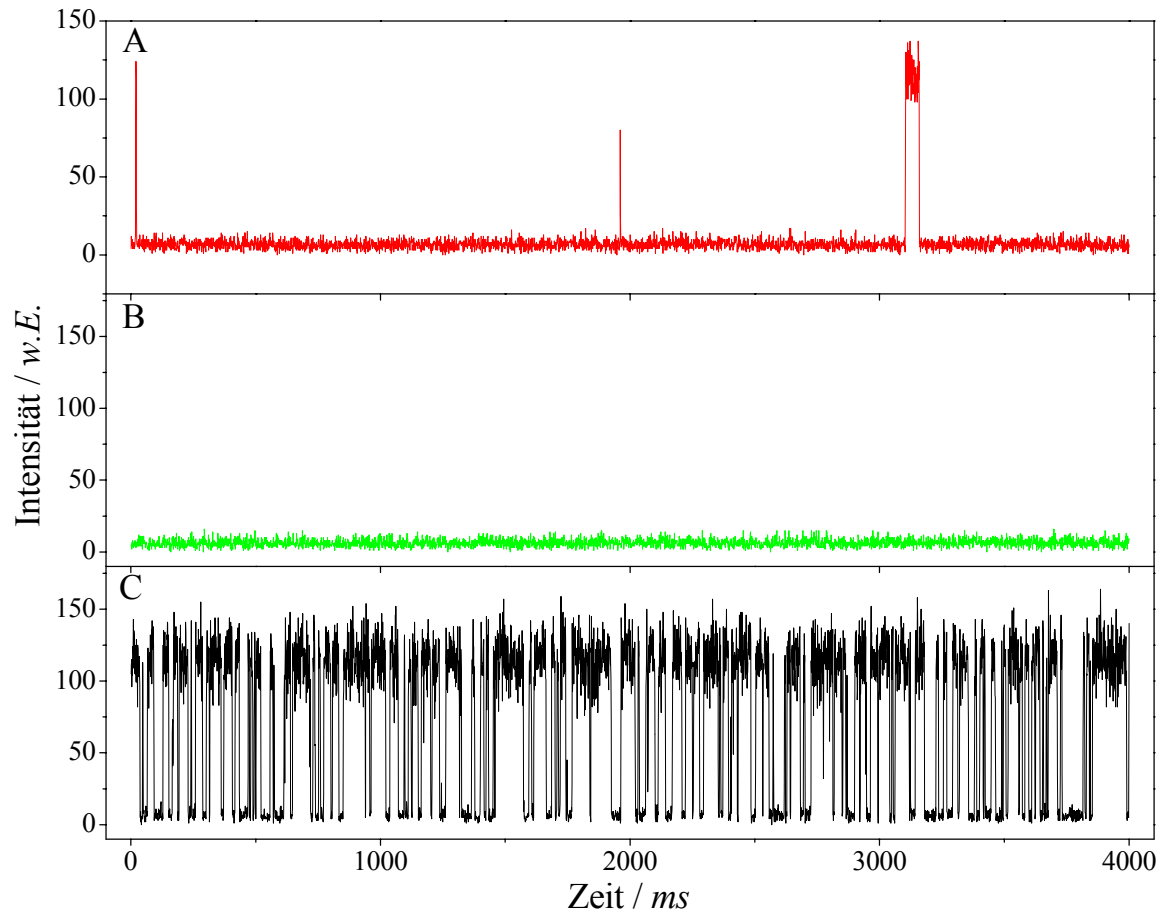


Abb. 2.2: Timetraces eines einzelnen PZ bei roter (A), grüner (B) und zeitgleicher rot-grün-Anregung (C). Aufgetragen ist die Intensität in w.E. über der Zeit in ms. Die Anregungsleistungen vor dem Objektiv wurden zu $150\mu\text{W}$ für den roten Laser und $34\mu\text{W}$ für den grünen Laser gewählt. Gezeigt ist jeweils nur der Ausschnitt eines längeren Timetraces.

2.2.1.2 Die Übergangsraten

Trägt man die Intervalllängen des Hellzustandes und des Dunkelzustandes jeweils in ein Histogramm ein, lassen sich monoexponentielle Zerfallsfunktionen anfitten. Die Raten, mit denen das Zentrum von einem Zustand in den anderen wechselt, sind die Zerfallskonstanten der entsprechenden Funktionen. In Abb. 2.3 sind die Histogramme für die Intervalllängen des Dunkelzustandes (A) und des Hellzustandes (B) aus Abb. 2.2C aufgetragen. Die Fitfunktionen sind in die Schaubilder dunkelgelb eingezeichnet. Die Raten ergeben sich zu $(18,4\text{ms})^{-1}$

für „dunkel nach hell“ und zu $(26,1\text{ms})^{-1}$ für „hell nach dunkel“. Zur Auswertung wurde der gesamte Timetrace aus Abb. 2.2C mit einer Länge von zwei Minuten verwendet.

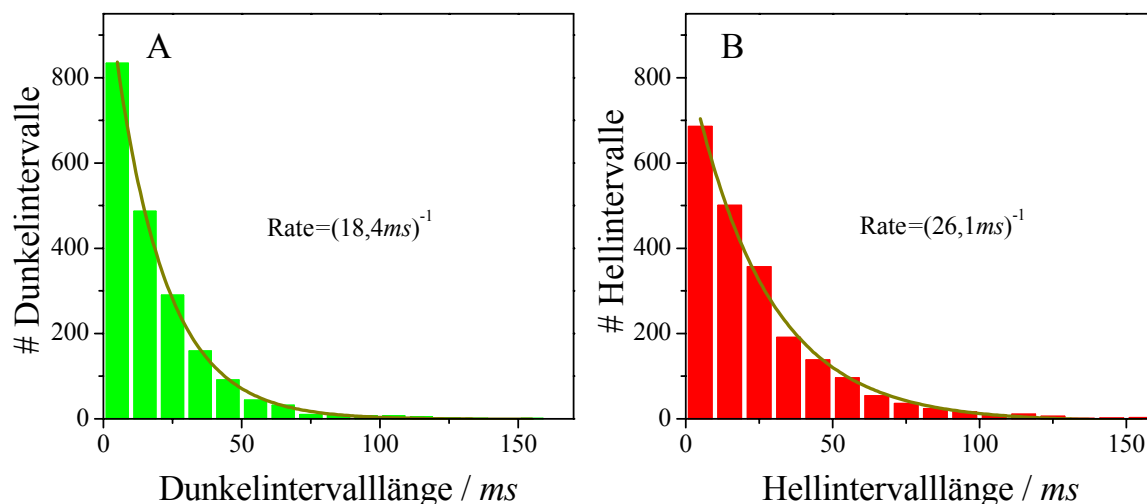


Abb. 2.3: Histogramme der Intervalllängen des Dunkelzustandes (A) und des Hellzustandes (B). Dunkelgelb ist jeweils die monoexponentielle Fitfunktion. Die daraus bestimmten Raten sind in das zugehörige Schaubild eingetragen.

Um nun den Einfluss der Anregungswellenlängen auf das Verhalten des Defekts zu untersuchen, wird die Anregungsintensität einer Farbe bei konstanter Leistung der zweiten Anregungswellenlänge variiert. Die Abhängigkeit der Raten von diesem Messprotokoll kann man der Abb. 2.4 entnehmen. Bei konstanten $150\mu\text{W}$ des roten Anregungslichtes wurde die Leistung des grünen Lasers in 12 Schritten von $18\mu\text{W}$ auf $52\mu\text{W}$ erhöht (Abb. 2.4A). Abb. 2.4B zeigt den schrittweisen Anstieg der roten Intensität von $100\mu\text{W}$ nach $400\mu\text{W}$ bei $34\mu\text{W}$ grüner Leistung. Die in ms^{-1} eingetragenen Raten lassen sich aus den Fitfunktionen der hier nicht gezeigten Histogramme ermitteln. Alle Zahlenwerte für die Intensität beziehen sich auf die Leistung vor dem Objektiv.

Die Messpunkte der „dunkel nach hell“ Rate sind durch die grünen, die der „hell nach dunkel“ Rate durch die roten Quadrate gegeben. In dunklem gelb sind die Fitgeraden eingezeichnet. Im gewählten Messbereich ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Intensität des grünen Anregungslichtes und der „dunkel nach hell“ Rate, sowie zwischen der Intensität des roten Lasers und der „hell nach dunkel“ Rate, während die jeweils andere Rate ein konstantes Verhalten zeigt. Das rote Licht regt das Zentrum zur Fluoreszenz an, ist gleichzei-

tig aber Ursache für den Übergang in den Dunkelzustand, aus dem es durch Absorption von Photonen des grünen Anregungslichtes wieder in den fluoreszierenden Zustand gelangen kann.

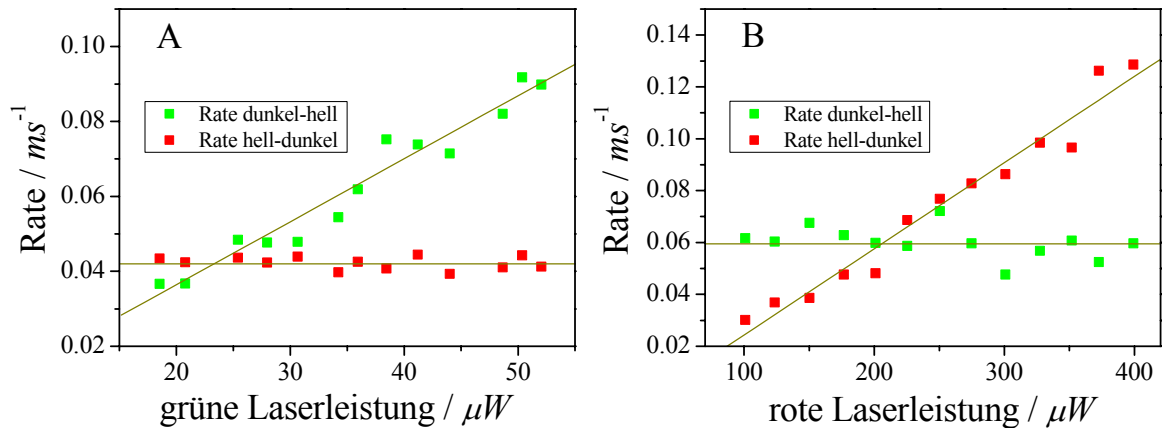


Abb. 2.4: Abhängigkeit der Raten in ms^{-1} von der variierten grünen (A) und roten (B) Anregungsleistung in μW bei konstanter Leistung des jeweils anderen Lasers. Die gemessene Rate „dunkel nach hell“ ist durch grüne, „hell nach dunkel“ durch rote Quadrate gegeben. Dunkelgelb sind die linearen Fitfunktionen. Es zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen „dunkel nach hell“ und grün, sowie zwischen „hell nach dunkel“ und rot.

2.2.1.3 Das elektronische Modell

Erklären kann man diese Eigenschaften z.B. durch das in Abb. 2.5 gezeigte elektronische Modell. Aufgrund der beobachtbaren Fluoreszenz des Defekts, muss es elektronische Übergänge geben, deren Niveaus innerhalb der Bandlücke des umgebenden Diamantgitters liegen. Um die Dunkelzustände zu erklären, benötigt man darüber hinaus einen Fallenzustand für das Elektron, bei dem das Zentrum nicht emittiert. Die Übergänge zwischen diesen Zuständen werden durch die Absorption von Photonen des roten bzw. des grünen Lasers ermöglicht. Das Modell schlägt für den Defekt einen Elektronendonator (z.B. Nickel) mit einem benachbarten Elektronenakzeptor (z.B. Bor) vor. Befindet sich das Elektron beim Elektronendonator, so kann es durch Absorption eines roten Photons angeregt werden. Spontane Emission aus diesem Zustand wird vom Detektor registriert und das PZ ist im Hellzustand. Zu dieser spontanen Emission, mit einer Lebensdauer von wenigen Nanosekunden, existiert ein Konkurrenzprozess, bei dem das Elektron in einen angeregten Zustand des Akzeptors abgegeben wird und

anschließend strahlungslos rekombiniert (das PZ ist nun in seinem Dunkelzustand). Aufgrund der gemessenen Übergangsrate von einigen Hertz ist die Wahrscheinlichkeit für diesen Konkurrenzprozess um ca. 7 Größenordnungen kleiner als die spontane Emission eines Photons. Die Absorption eines grünen Photons hebt das Elektron aus dem Grundzustand des Akzeptors in einen höheren angeregten Zustand und kann von dort wieder zurück an den Donor gegeben werden. Nach Abb. 2.4 liegt die Übergangsrate für diesen Prozess ebenfalls im Bereich von einigen Hertz.

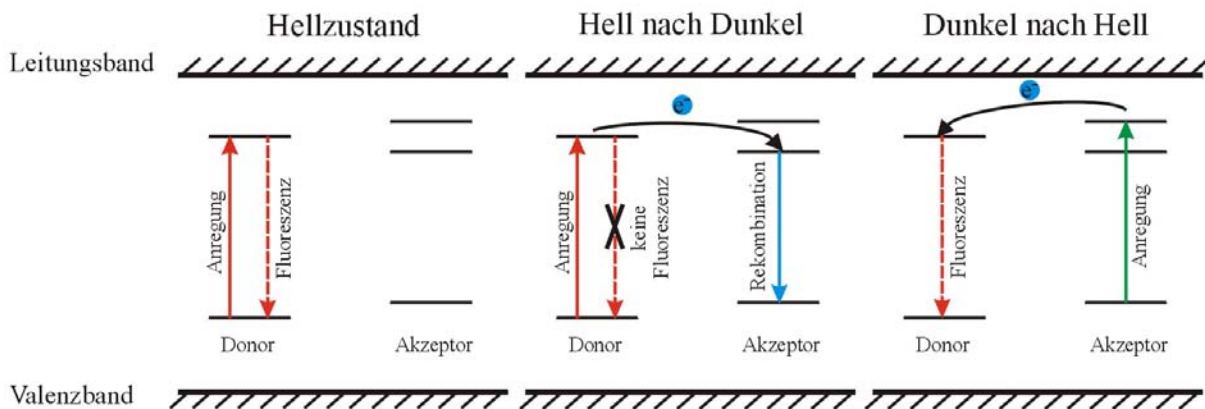


Abb. 2.5: Elektronisches Modell des Photochromen Zentrums. Ein Elektron kann durch Photonen unterschiedlicher Wellenlängen zwischen einem Elektronendonator (Hellzustand) und dem benachbarten Elektronenakzeptor (Dunkelzustand) hin und her gepumpt werden.

Je höher die Photonendichte, d.h. je höher die Intensitäten der eingestrahlten Laser sind, desto mehr Photonen werden absorbiert und desto größer werden die Übergangsraten zwischen den Zuständen „dunkel“ und „hell“. Nach Abb. 2.4 ist der Zusammenhang zwischen Laserleistungen und Raten für die dort gezeigten Bereiche linear.

2.2.1.4 Geltungsbereich der linearen Näherung

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass diese linearen Zusammenhänge nur für passend gewählte Laserleistungen erfüllt sind. Zum einen kann man Abb. 2.2A entnehmen, dass auch bei rein roter Anregung ein geringer Rückpumpeffekt aus dem Dunkelzustand zu beobachten ist. Für nicht zu hohe rote und nicht zu geringe grüne Laserintensitäten ist dieser Beitrag zur „dunkel-nach-hell“ Rate jedoch näherungsweise vernachlässigbar. Zum zweiten stellen sich bei sehr hohen Leistungen Sättigungseffekte ein, die zu einem Abflachen der Kurve führen. Für eine moderate rote Laserintensität spielt dieser Effekt jedoch keine Rolle.

Fazit

Das PZ ist ein optisch detektier- und ansteuerbares einzelnes Quantensystem, das alle Anforderungen erfüllt, um die Fluktuationstheoreme aus Kapitel 2.1.1.3 zu testen. Es besitzt zwei einfach unterscheidbare Zustände („dunkel“ und „hell“) und bei den Übergängen zwischen diesen handelt es sich um Markovprozesse. Die Übergangsraten können durch Veränderung der Laserintensitäten extern gesteuert werden. Für konstante Intensitäten erhält man konstante Raten und das PZ befindet sich im dynamischen Gleichgewicht.

In den folgenden Experimenten ist das PZ allein durch seine optischen Eigenschaften definiert. Es wurde bisher stillschweigend davon ausgegangen, dass die eigentlichen Übergänge instantan ablaufen. Selbstverständlich hängen sie von den Lebensdauern der angeregten Zustände (wenige Nanosekunden) ab, die aber um ca. 6 Größenordnungen kleiner sind, als die im Experiment mögliche Zeitauflösung. Aus dem selben Grund kann die Emission der Photonen nicht in Einzelereignisse zerlegt werden und das Experiment kann lediglich zwischen dem Hell- und dem Dunkelzustand des PZ unterscheiden. Demnach ist eine Beschreibung durch das in Abb. 2.6 dargestellte Schema eines effektiven Zwei-Niveau-Systems ausreichend.

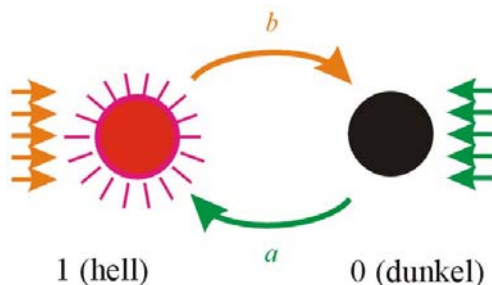


Abb. 2.6: Einfaches Schema der optischen Eigenschaften des PZ. Die Raten a und b zwischen dem Dunkelzustand 0 und dem Hellzustand 1 hängen von der Leistung des grünen bzw. des roten Lasers ab.

Um eine vereinfachte Notation zu erhalten, wird ab jetzt der Dunkelzustand mit Zustand 0, der Hellzustand mit Zustand 1, die Rate von dunkel nach hell mit a und die Rate von hell nach dunkel mit b bezeichnet. Rate a hängt von der Intensität des grünen und Rate b von der Intensität des roten Anregungslichtes ab

2.3 Messungen und Verarbeitung

Aus einem Diamant mit den Photochromen Zentren wurde mittels des konfokalen Raumtemperaturaufbaus (siehe Kapitel 1.3.2) ein einzelner Defekt ausgewählt, der die in Kapitel 2.2

beschriebenen Eigenschaften zeigte. Alle weiter unten vorgestellten Messungen wurden am gleichen Defekt durchgeführt.

Wie man der Beschreibung des Raumtemperaturaufbaus entnimmt, bleibt die Intensität des roten Lasers konstant, während die Intensität des grünen Lasers mittels eines AOMs mit angeschlossenen Funktionsgenerator sinusförmig moduliert werden kann. Aufgrund des linearen Zusammenhangs zwischen den Raten und den Intensitäten (siehe Abb. 2.4) bedeutet dies für die Raten a und b des Experiments:

$$\begin{aligned} a &= a_0 (1 + \gamma \lambda(\tau)) \\ b &= b_0 = \text{const.} \end{aligned} \quad (2.23)$$

mit dem Kontrollparameter

$$\lambda(\tau) = \sin \frac{2\pi\tau}{T_{\text{mod}}}. \quad (2.24)$$

a_0 und b_0 sind die Raten ohne Modulation, T_{mod} die Periodendauer und γ steht für die Modulationstiefe der Sinusfunktion.

Das aufgezeichnete Fluoreszenzsignal bestimmt den Zustand des Zentrums. Gleichzeitig wird ein weiterer Detektor ausgelesen, der die Intensität des grünen Lasers misst. Gestartet wird eine einzelne Messung immer aus dem dynamischen Gleichgewicht mit den Raten $a = a_0$ und $b = b_0$. Der grüne Laser wird für eine festgelegte Anzahl an Perioden p mit der Periodendauer T_{mod} moduliert und endet bei der Rate $a = a_0$. Um dem System die Möglichkeit zur Relaxation zu geben, wird bei konstanten Laserintensitäten eine gewisse Zeit τ_{relax} gewartet, bevor die nächste Modulation gestartet wird. τ_{relax} ist groß gegen die Kehrwerte der Raten gewählt. Die während der Modulation und der anschließenden Relaxationszeit mit einer Zeitauflösung von einer Millisekunde aufgezeichneten Photonen seien ein Trace dieser Messung. Das Fluoreszenzsignal eines Traces ohne die Intensität des Lasers sei eine Trajektorie. Ein Ausschnitt eines solchen Traces ist in Abb. 2.7 abgebildet. Die Fluoreszenz des Defekts ist in roter, die Intensität des Lasers in grüner Farbe eingezeichnet. Die Abbildung zeigt die zehn letzten Perioden der Modulation mit $T_{\text{mod}} = 50\text{ms}$ und den Übergang in die Relaxation. Aufgetragen ist die Intensität in willkürlichen Einheiten über der Zeit in Millisekunden.

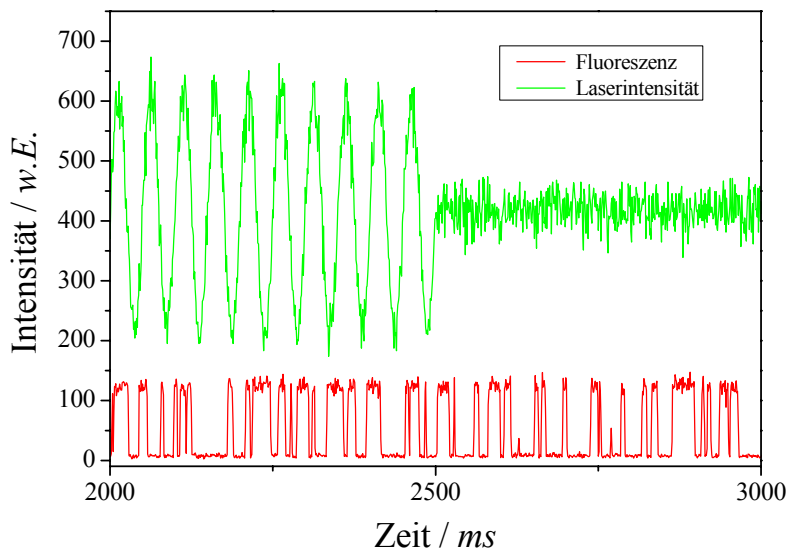


Abb. 2.7: Ausschnitt eines Traces einer Messung. Gezeigt ist der Übergang von Modulation zu Relaxation. Grün ist die gemessene Laserintensität und rot das Fluoreszenzsignal des Defekts, die Trajektorie. Aufgetragen ist die Intensität über der Zeit in ms.

Theoretisch gilt das Fluktuationstheorem für unendlich viele Messungen. In der Praxis wurde eine große Anzahl von Traces unter identischen Bedingungen aufgezeichnet. Aus diesem Grund wurde die Auswertung der Rohdaten automatisiert.

2.3.1 Glätten des Traces und Bestimmung der Sprungzeiten

Aus der Höhe des Fluoreszenzsignals lässt sich der Zustand des Zentrums bestimmen. Mit der Zeitauflösung des Aufbaus von einer Millisekunde ist das detektierte Signal allerdings der Mittelwert über eben diese vorangegangene Millisekunde. Findet ein Sprung von Zustand 1 in den Zustand 0 statt, so wird das gemessene Signal in den seltensten Fällen von einem maximalen auf einen minimalen Wert fallen. Vielmehr wird es sich von einem maximalen über einen mittelhohen zu einem minimalen Messwert hangeln. Die genaue Sprungzeit liegt irgendwo zwischen den Messpunkten.

Eine Erhöhung der Zeitauflösung des Experiments war aus technischen Gründen nicht möglich. Um dem Zentrum für jeden Messpunkt dennoch einen möglichst exakten Zustand zuschreiben zu können, wird pro Trajektorie ein Korridor zwischen die Maximal- und Minimalwerte gelegt. Für einen Wert innerhalb des Korridors war das Zentrum in der vergangenen Millisekunde anteilig in den Zuständen 1 und 0.

Abb. 2.8 zeigt ein Histogramm aller Intensitätsmesswerte einer Trajektorie. Fittet man die Verteilungen geringer (Zustand 0) und hoher Fluoreszenz (Zustand 1) jeweils mit einer Gaußfunktion (grün) an, kann man mögliche Grenzen des Korridors mittels der Lage der Maxima und der Breite der Fitfunktionen festlegen.

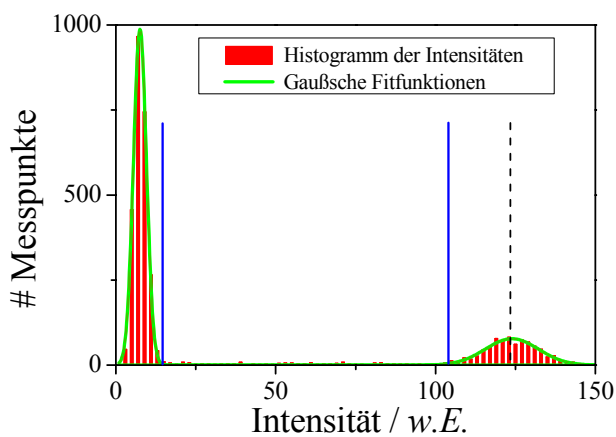


Abb. 2.8: Histogramm der Messwerte einer Trajektorie. Blau sind die Grenzen des Korridors. Sie ergeben sich aus der Lage der Maxima und der Breite der Fitfunktionen (grün). Die schwarz gestrichelte Linie markiert die mittlere Intensität des Zustands hoher Fluoreszenz (Zustand 1).

Für die Auswertung aller Trajektorien wurden die Grenzen mit dem Abstand der doppelten Standardabweichung der Gaußverteilung (2σ) von deren Maximum gewählt. Die Grenzen für das Beispiel in Abb. 2.8 sind in blau eingezeichnet.

Einem Messwert außerhalb des Korridors wird in der geglätteten Trajektorie der Wert 1 im Fall hoher bzw. 0 im Fall geringer Fluoreszenz zugeordnet. Fällt er in den Korridor wird der Wert der Messkurve genormt auf die mittlere Intensität des Zustands 1 der Trajektorie (vgl. die schwarz gestrichelte Linie in Abb. 2.8) geschrieben. Eine geglättete Trajektorie mit dem Wert von z.B. 0,8 während eines Sprunges von Zustand 1 in Zustand 0 bedeutet: Die ersten 0,2ms war das System in Zustand 1, die folgenden 0,8ms in Zustand 0.

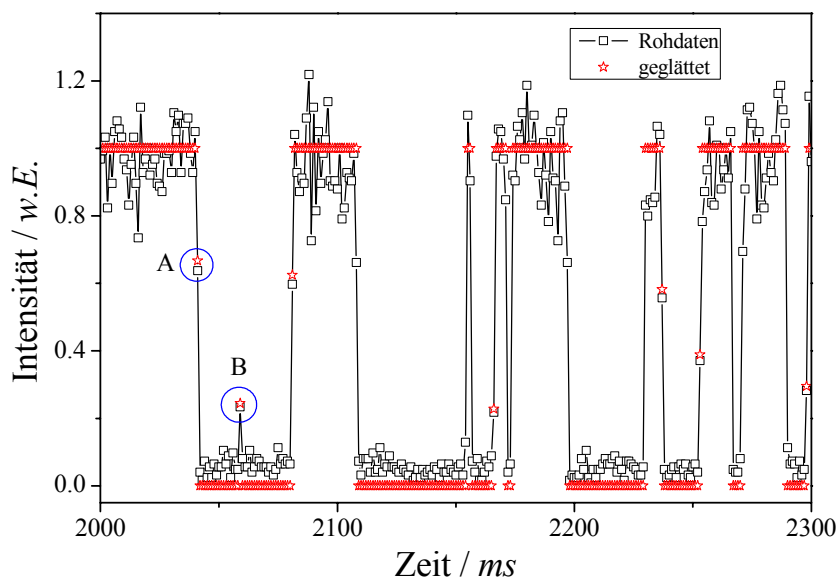


Abb. 2.9: Ausschnitt einer Trajektorie der Rohdaten (schwarz) und der geglätteten Version (rot). Es können Sprungzeiten (A) als auch Aufenthaltsdauern (B) kleiner als die Zeitauflösung von 1ms erkannt werden.

In Abb. 2.9 ist ein Ausschnitt der Rohdaten (schwarz) als auch die daraus gewonnene geglättete Kurve (rote Sterne) eingezeichnet. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Rohdaten

ebenfalls auf das Maximum der oberen Gaußverteilung normiert. Im Mittel können die Sprungzeiten durch diese Auswertung genauer als die Zeitauflösung (eine Millisekunde) bestimmt werden. Ein Beispiel dafür ist in der Graphik mit dem Buchstaben A markiert. Eine ungefähre Abschätzung für die Genauigkeit gibt das Verhältnis der Breite (2σ) zur Position der Fitfunktion des Zustandes 1. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bedeutet dies einen Wert von ca. $0,2ms$. Zusätzlich lassen sich durch die Auswertungsmethode auch sehr schnelle Doppelsprünge, mit einer Aufenthaltsdauer zwischen den Sprüngen kleiner als die Zeitauflösung, erkennen. Der mit B gekennzeichnete Messpunkt ist ein Beispiel für einen solchen Doppelsprung.

Zur weiteren Datenverarbeitung werden nur noch die geglätteten Trajektorien verwendet.

2.3.2 Bestimmung der Raten a_0 und b_0

Für die Messungen wurde die Länge des Relaxationsteils ca. 40 mal größer als der Kehrwert der Raten gewählt. Nimmt man nun die zweite Hälfte dieses Teils der Trajektorie, sprich nach der halben Relaxationszeit τ_{relax} , ist dort das dynamische Gleichgewicht erreicht.

Für diesen Abschnitt der Trajektorie werden von allen unter identischen Bedingungen aufgenommenen Traces die Intervalllängen der beiden Zustände in jeweils ein Histogramm aufgetragen. Die Zerfallskonstanten der monoexponentiellen Fitfunktionen (vgl. Abb. 2.3) sind die Raten a_0 bzw. b_0 .

2.3.3 Bestimmung der Modulationstiefe γ

Die Modulationstiefe des grünen Lasers und damit die der Rate a ist durch den Sinus des Funktionsgenerators gegeben. Direkt messbar wird zumindest die Intensität des Lasers durch das Signal des zweiten Detektors. In Abb. 2.10A ist dieses Signal für die ersten 10 Perioden eines Traces eingezeichnet. Mittelwertbildung über sehr viele Messungen unter identischen Bedingungen eliminieren das Rauschen. Eine solche Mittelwertskurve von 1000 Messungen ist in Abb. 2.10B durch die grünen Kreise gegeben. Im gleichen Schaubild ist in roter Farbe die sinusförmige Fitfunktion eingezeichnet. Die Modulationstiefe für das Experiment kann den Fitparametern entnommen werden.

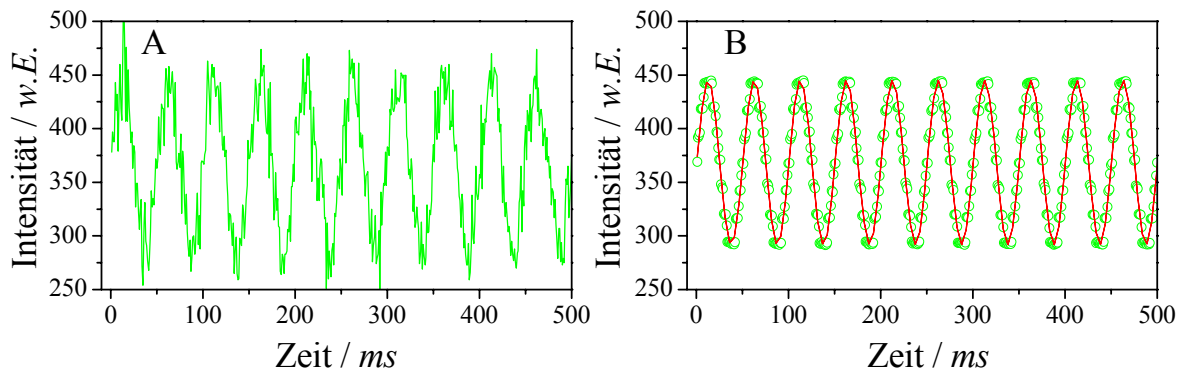


Abb. 2.10: Bestimmung der Modulationstiefe aus der detektierten Intensität des grünen Lasers. In A ist das Lasersignal über 10 Perioden eines einzelnen Traces dargestellt, die grünen Kreise in B sind der Mittelwert über viele identische Messungen. Rot ist die angefittete Sinusfunktion.

2.3.4 Bestimmung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten $p_0(\tau)$ und $p_1(\tau)$

Für das dynamische Gleichgewicht sind die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der Zustände 0 und 1 für ein Zwei-Niveau-System durch das Gesetz der „Detailed Balance“ (2.10) gegeben. Durch die Modulation des grünen Lasers wird das System aus dem Gleichgewicht getrieben und $p_0(\tau)$ und $p_1(\tau)$ sind durch die Lösung der Mastergleichung (2.9) beschrieben. Experimentell lassen sie sich aus einer großen Anzahl M unter identischen Bedingungen durchgeführten Messungen ermitteln. Hierzu werden für einen festen Zeitpunkt die Zustände aller M Trajektorien der Messung bestimmt. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für den Zustand 0 ergibt sich dann zu $p_0(\tau) = M_0/M$, wobei M_0 für die Anzahl der sich in Zustand 0 befindlichen Trajektorien steht. Für den Zustand 1 gilt folgerichtig: $p_1(\tau) = M_1/M = M - M_0/M = 1 - p_0(\tau)$.

In Abb. 2.11 sind die zeitlichen Entwicklungen der Wahrscheinlichkeit für Zustand 0 (grün) und für Zustand 1 (rot) eines Experiments mit 2000 gemessenen Trajektorien eingezeichnet. Sie starten aus dem dynamischen Gleichgewicht und laufen nach einem Einschwingvorgang periodisch, zueinander gegenphasig mit der Frequenz des treibenden Lasers. Nach Ende der Modulation bei $\tau = 2500\text{ms}$ stellt sich im Relaxationsteil erneut das dynamische Gleichgewicht ein. Die genaue Form der Kurven hängt von den Gleichgewichtsraten, der Modulationstiefe und der Periodendauer ab.

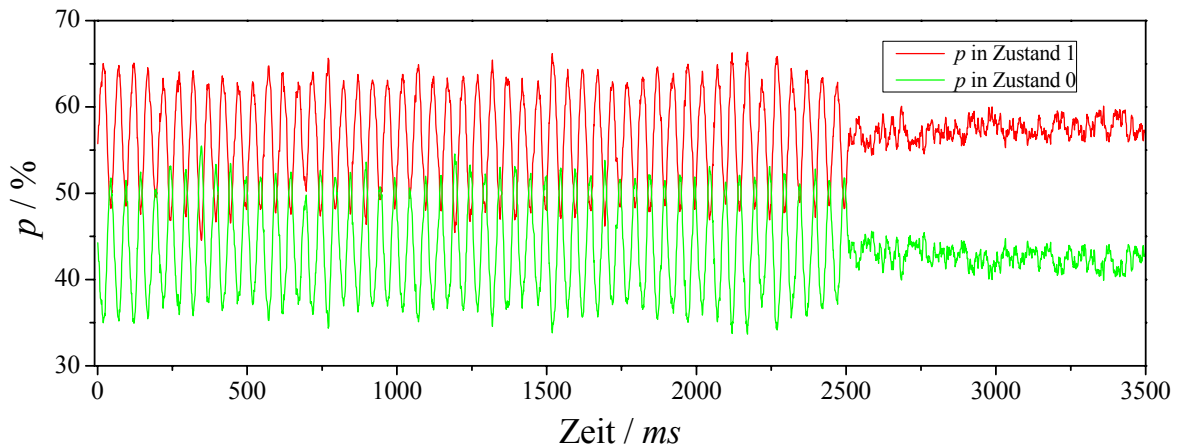


Abb. 2.11: Aufenthaltswahrscheinlichkeit in Zustand 0 (grün) und in Zustand 1 (rot) in % über der Zeit in ms aus einem Experiment mit 2000 gemessenen Trajektorien. Das System startet aus dem dynamischen Gleichgewicht und wird durch die modulierte Intensität des grünen Lasers ins Nichtgleichgewicht getrieben. Nach einem Einschwingvorgang variieren beide Kurven mit der Frequenz des treibenden Lasers um nach der Modulation wieder ins dynamische Gleichgewicht zu relaxieren.

2.3.5 Parameterwahl

Wie in den vorangegangenen Unterkapiteln angesprochen, unterliegt die Wahl der experimentellen Parameter gewissen Einschränkungen. Darüber hinaus soll ihre Variation möglichst aussagekräftige Ergebnisse liefern.

Um den Fehler durch die Bestimmung der Sprungzeit (siehe Kapitel 2.3.1) zumutbar zu gestalten, muss die Periodendauer T_{mod} deutlich größer als die maximale Zeitauflösung von 1ms gewählt werden. Nach oben ist die Periodendauer vor allem durch den ansteigenden Zeitaufwand für das Experiment beschränkt. In den für die Arbeit verwendeten Datensätzen betrug T_{mod} immer 50ms.

Ein Ziel des Experiments war es, ein starkes Treiben des Systems aus dem dynamischen Gleichgewicht zu beobachten. Starkes Treiben bedeutet eine sichtbar zeitverzögerte Reaktion des Systems auf die Veränderung. Hierfür müssen die Kehrwerte der Raten a_0 und b_0 in der Größenordnung der Periodendauer liegen. Die Fluoreszenz des Defekts und damit die Unterscheidbarkeit der beiden Zustände hängt von der Intensität des Lasers und damit von der Rate b_0 ab, die demzufolge nach unten beschränkt ist. Die Rate a wird während der Messungen durch den grünen Lasers geändert. Im linearen Bereich der Abhängigkeit zwischen Rate und

Laserleistung kann von der gemessenen Intensität auf die momentane Rate geschlossen werden und a soll daher auf diesen Bereich eingeschränkt sein. Für Raten a_0 und b_0 zwischen $(10ms)^{-1}$ und $(40ms)^{-1}$ sind die obigen Anforderungen erfüllt.

Weiterhin gilt: Je stärker die Modulationstiefe bei gleicher Periodendauer und gleichen Raten, desto stärker wird das System getrieben. Da die Modulationstiefe nur durch den begrenzten linearen Bereich des AOM beschränkt war, konnte sie bis zu $\gamma = 0,5$ frei gewählt werden.

Die Zahl der Perioden eines Traces wurde zu $p = 50$, die Relaxationszeit zu $\tau_{relax} = 1000ms \gg a_0^{-1}, b_0^{-1}$ festgelegt. Mit 1000 und mehr durchgeführten Messungen pro Experiment, wurde versucht der Anforderung nach sehr vielen Messungen Rechnung zu tragen.

Die in dieser Arbeit ausgewerteten 4 Datensätze sind in Tabelle 2-1 aufgelistet. Es wurden jeweils Blocks von 100 Messungen durchgeführt und anschließend wurde der Aufbau nachjustiert. Die Farben hinter der Datensatzbezeichnung werden im Auswertungskapitel in den dortigen Bildern verwendet.

Datensatz (Farbcode)	a_0 in ms^{-1}	b_0 in ms^{-1}	T_{mod} in ms	γ	p	τ_{relax} in ms	# Messungen
1 (rot)	1/15,6	1/21,8	50	0,46	50	1000	2000
2 (grün)	1/24,6	1/34,2	50	0,20	50	1000	1000
3 (blau)	1/21,3	1/31,0	50	0,135	50	1000	1100
4 (schwarz)	1/23,6	1/28,9	50	0,07	50	1000	1000

Tabelle 2-1: Parameter der in dieser Arbeit ausgewerteten Datensätze. Alle Daten wurden an ein und demselben System gemessen. Die Farben hinter den Datensätzen stehen für die Codierung der Graphiken im Auswertungskapitel.

Die Verknüpfung der Parameter lässt sich in den Gleichungen (2.23) und (2.24) nachlesen.

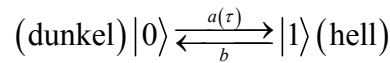
2.4 Auswertung und Diskussion

In diesem Kapitel werden zunächst die an das System angepassten Formeln abgeleitet. Es folgt die Anwendung der experimentellen Datensätze auf die Fluktuationstheoreme aus Kapi-

tel 2.1.1.3. Weiterhin werden die Verteilungen der stochastischen Größe R und der Entropie präsentiert und auf deren Unterschiede eingegangen.

2.4.1 Größen für das Zwei-Niveau-System („Two-Level System“ TLS)

Wie in Abb. 2.6 veranschaulicht, kann man das PZ als effektives TLS mit den Zuständen 0 und 1 und den Übergangsraten a und b auffassen.



In diesem Experiment wurden die Raten nach Gleichung (2.23) und (2.24) mit einem sinusförmigen Protokoll geändert ($a = a(\lambda(\tau))$) bzw. konstant gehalten ($b = b_0$). Für die Mastergleichung (2.9) dieses Systems ergibt sich dadurch

$$\begin{aligned} \partial_\tau p_0(\tau) &= b_0 p_1(\tau) - a(\lambda(\tau)) p_0(\tau) \\ \partial_\tau p_1(\tau) &= a(\lambda(\tau)) p_0(\tau) - b_0 p_1(\tau) \end{aligned} \quad (2.25)$$

und die „Detailed Balance“ (2.10) des dynamischen Gleichgewichts lautet

$$p_0^s(\lambda(\tau)) = 1 - p_1^s(\lambda(\tau)) = \frac{b_0}{a(\lambda(\tau)) + b_0}, \quad (2.26)$$

mit

$$\begin{aligned} a &= a_0 (1 + \gamma \lambda(\tau)) \\ b &= b_0 = \text{const.} \\ \lambda(\tau) &= \sin 2\pi\tau / T_{\text{mod}}. \end{aligned}$$

Die stochastische Größe R

Nach (2.13) benötigt man zur Berechnung von R den Kontrollparameter λ und die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des dynamischen Gleichgewichts. Einsetzen in (2.13), Ableiten und Integrieren dieser Größen für das TLS ergibt

$$R(n=0) = k_B \left[\ln(a(\tau) + b_0) \right]_{\tau_x}^{\tau_y},$$

falls sich die Trajektorie zwischen τ_x und τ_y im Zustand 0 befindet und

$$R(n=1) = k_B \left[\ln(a(\tau) + b_0) \right]_{\tau_x}^{\tau_y} - k_B \left[\ln a(\tau) \right]_{\tau_x}^{\tau_y},$$

falls sie sich in diesem Zeitintervall im Zustand 1 befindet. Die eckigen Klammern umschließen die integrierte Funktion mit den Grenzen τ_x und τ_y . Der Übersichtlichkeit halber wurde der Rate a eine direkte Abhängigkeit von der Zeit zugeschrieben.

Eine elegante Zusammenfassung der beiden obigen Formeln für die gesamte Trajektorie mit $0 \leq \tau \leq t$ führt zu

$$R[n(\tau)] = -k_B \sum_{j=0}^k n_j \ln \frac{a(\tau_{j+1})}{a(\tau_j)} + k_B \ln \frac{a(t) + b_0}{a(0) + b_0}, \quad (2.27)$$

mit der Gesamtsprungzahl k , dem Sprungindex j und den entsprechenden Sprungzeiten τ_j . $a(0)$ und $a(t)$ stehen dabei für die Raten zu Beginn und zum Ende der Trajektorie und n_j ist 0 oder 1 je nach Zustand zwischen den Sprüngen j und $j+1$.

Der zweite Term der rechten Seite berücksichtigt Unterschiede zwischen den Start und Endwerten des jeweiligen Messprotokolls. Dagegen summiert der erste Term die Beiträge der einzelnen Sprünge auf und zeigt darüber hinaus noch eine Abhängigkeit vom Anfangs- ($a(\tau_0) = a(0)$) und Endzustand ($a(\tau_{k+1}) = a(t)$) der Trajektorie.

Die Entropie s

Nach (2.17), (2.19) und (2.20) benötigt man zur Berechnung der Entwicklung der Entropie entlang einer Trajektorie die momentanen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten ($p_0(\tau)$ und $p_1(\tau)$) und die Raten ($a = a(\lambda(\tau))$ und $b = b_0$). Die Entropie des Systems, des Mediums und die Gesamtentropie einer Trajektorie von $0 \leq \tau \leq t$ ergeben sich durch Integration zu

$$\Delta s_{\text{sys}} = s_{\text{sys}}(t) - s_{\text{sys}}(0) = -k_B \ln \frac{p_n(t)}{p_n(0)} \quad (2.28)$$

für das System,

$$\Delta S_{med} = -k_B \sum_{j=1}^k \begin{cases} \ln \frac{b_0}{a(\tau_j)} = \ln \frac{p_0^s(\tau_j)}{p_1^s(\tau_j)} & \text{für } 0 \rightarrow 1 \\ \ln \frac{a(\tau_j)}{b_0} = \ln \frac{p_1^s(\tau_j)}{p_0^s(\tau_j)} & \text{für } 1 \rightarrow 0 \end{cases} \quad (2.29)$$

für das Medium und

$$\Delta S_{tot} = \Delta S_{sys} + \Delta S_{med} \quad (2.30)$$

für die Gesamtentropie. Erneut ist k die Gesamtzahl der Sprünge, j der Sprungindex und τ_j die Sprungzeit.

2.4.2 Die stochastische Größe R

2.4.2.1 Das integrale Fluktuationstheorem

Durch Einsetzen der Sprungzeiten und der entsprechenden Parameter aus Tabelle 2-1 (Seite 53) in die Gleichung (2.27) erhält man für jede einzelne Trajektorie einen Wert für R . Da nach (2.12) die Messung aus dem dynamischen Gleichgewicht starten muss, ist der Anfangspunkt vorbestimmt, das Ende der Auswertung jedoch im Rahmen der maximalen Länge der Trajektorien von 50 Perioden frei wählbar. Ist die Endzeit t das Vielfache einer Halbperiode, so ergibt sich $a(t) = a(0) = a_0$ und der zweite Term der rechten Seite von (2.27) fällt weg.

Zum Test des integralen Fluktuationstheorems einer Mastergleichung mit zeitabhängigen Raten wird R bei einer festen Länge für alle Trajektorien eines Datensatzes berechnet und das nichtlineare Mittel gebildet. Nach (2.14) soll der so ermittelte Wert bei einer beliebigen Auswertelänge der Trajektorien exakt eins ergeben.

$$\left\langle \exp\left(-\frac{R}{k_B}\right) \right\rangle = 1.$$

In Abb. 2.12 ist das Ergebnis der 4 Datensätze aus Tabelle 2-1 zu sehen. Aufgetragen ist die Mittelung des Exponentialterms über die Länge der Trajektorien. Es wurden lediglich Trajektorien der Länge eines Vielfachen einer Halbperiode ausgewertet. Die Messpunkte sind durch farbige Kreise gekennzeichnet, wobei die einzelnen Farben den Datensätzen für dieses Kapitel fest zugeordnet sind. Die Einfügung zeigt die Entwicklung bis zur maximalen Länge von 100 Halbperioden, das Hauptbild ist auf die ersten 40 Halbperioden beschränkt.

Für die beiden Datensätze geringer Modulationstiefe γ (schwarz und blau) ergibt sich eine Horizontale mit dem y-Achsenabschnitt von 1 über den vollen Bereich. Hier ist das Fluktuationstheorem für jede ausgewertete Länge erfüllt.

Anders sieht es bei den beiden Datensätzen mit höherer (grün) und sehr hoher (rot) Modulationstiefe aus. Wie man dem Hauptbild entnehmen kann ist das Theorem für kurze Trajektorien noch erfüllt. Mit zunehmender Länge (siehe Einfügung) weichen diese Daten jedoch vom erwarteten Wert ab und im Fall der roten Kurve zeigen sich große Sprünge zwischen benachbarten Messwerten.

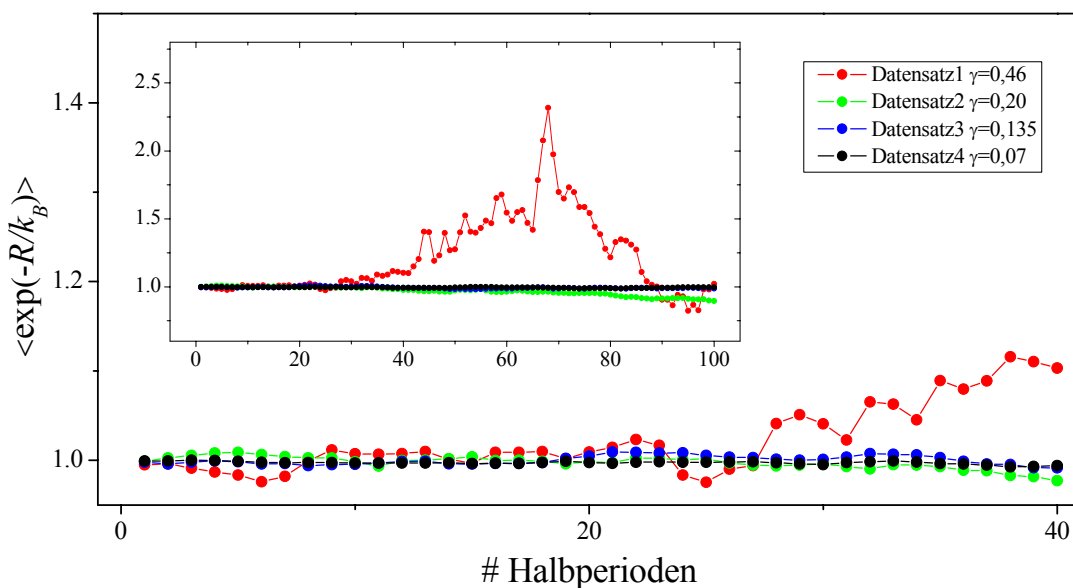


Abb. 2.12: Test des Fluktuationstheorems für eine Mastergleichung mit zeitabhängigen Raten. Aufgetragen ist der Mittelwert des exponentiellen Ausdrucks über die Länge der Trajektorien in # Halbperioden. Jeder farbcodierte Kreis steht für die ausgewerteten Trajektorien eines der 4 Datensätze. Die Einfügung zeigt die Entwicklung über alle 100 Halbperioden. Das Hauptbild ist auf 40 Halbperioden beschränkt. Für kurze Trajektorien ist das Theorem für alle Datensätze erfüllt.

Das Theorem ist exakt gültig für ein Mittel über unendlich viele Messungen. Man kann nun nicht davon ausgehen, dass 1000 oder 2000 Wiederholungen bei entsprechender Parameterwahl statistisch ausreichend sind. Wie weiter unten gezeigt wird, hängt die notwendige Anzahl an Messungen von der Modulationstiefe und der mittleren Anzahl an Übergängen in einer Trajektorie und damit von deren Länge ab. Für kurze Trajektorien (siehe Hauptbild Abb.

2.12) genügt die begrenzte Statistik dieser Datensätze der Forderung nach ausreichend vielen Messungen und das Theorem ist erfüllt.

Diese Daten bilden den ersten experimentellen Nachweis des integralen Fluktuationstheorems für eine Mastergleichung mit zeitabhängigen Raten [63,67].

2.4.2.2 Die Verteilungen von R

Neben der Überprüfung des integralen Fluktuationstheorems, das eine Forderung an einen gemittelten Wert stellt, sind die eigentlichen Verteilungen ebenfalls von großem Interesse. Für ein besseres Verständnis sind in Abb. 2.13A jeweils die Mittelwerte von R in Vielfachen von k_B aller Trajektorien eines Datensatzes über die ausgewertete Länge in Anzahl an Halbperioden aufgetragen. Mit rot, grün, blau und schwarz sind wiederum die Datensätze 1-4 farbcodeiert.

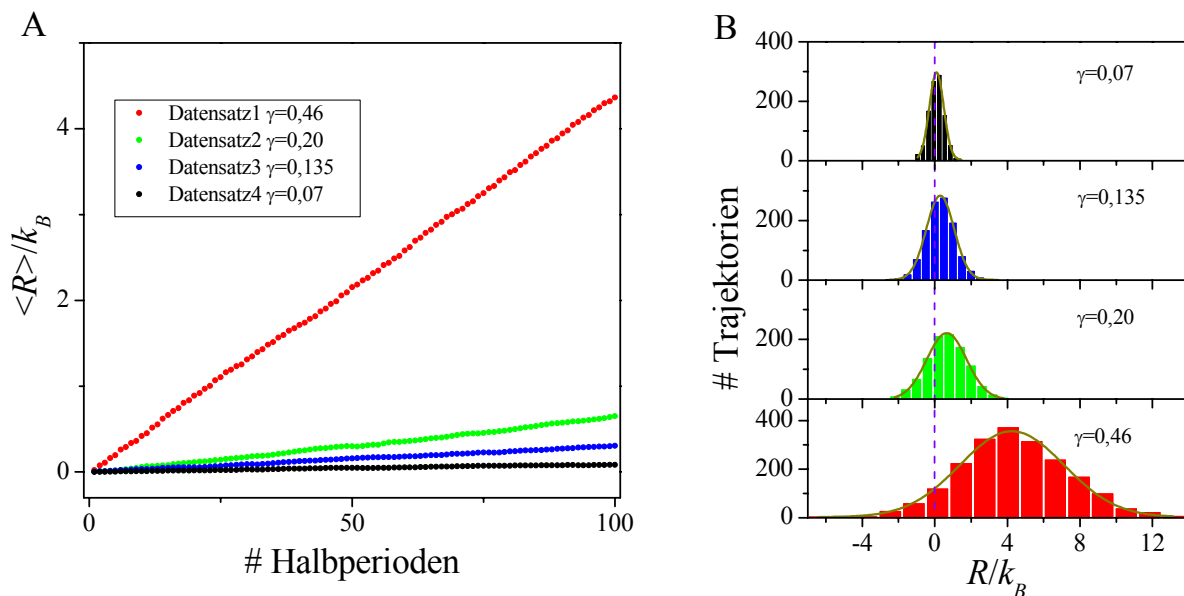


Abb. 2.13A: Mittelwerte von R für die vier Datensätze aus Tabelle 2-1. Aufgetragen sind die Mittelwerte in Einheiten von k_B über die ausgewertete Anzahl an Halbperioden. Je größer die Modulationstiefe, desto steiler ist die Gerade. B zeigt ein Beispiel für die Verteilungen von R für Trajektorien der Länge von 100 Halbperioden. Der Farbcode gibt wie in A den zugehörigen Datensatz an. Die gestrichelte Vertikale markiert den Nullpunkt für jedes der Histogramme, die jeweils durch eine Gaußfunktion (dunkles gelb) angefitet sind. Je tiefer die Modulation, desto breiter wird die Verteilung.

Zunächst fällt auf, dass, wie nach (2.15) erwartet, die Bedingung $\langle R \rangle \geq 0$ für alle Datensätze und für alle ausgewerteten Längen der Trajektorien erfüllt ist. Weiterhin hängt der Mittelwert linear von der Anzahl der Halbperioden und damit von der Anzahl der durchschnittlichen Sprungzahl ab. Dies ist ebenso einleuchtend wie die Abhängigkeit der Steigung der Geraden von der Modulationstiefe γ . Je größer die Modulationstiefe, desto größer ist der mittlere Beitrag eines Sprunges.

In Abb. 2.13B sind exemplarisch die Verteilungen von R/k_b der Trajektorien maximaler Länge (100 Halbperioden) für die 4 Datensätze zu sehen. Wie in A kann anhand des Farbcodes der Datensatz identifiziert werden. Der Nullpunkt jedes der Histogramme ist durch die gestrichelte violette Senkrechte markiert. Zusätzlich zu den für tiefere Modulationen größer werdenden Mittelwerten von R kann dieser Darstellung auch die sich ändernde Breite der Verteilung entnommen werden. Je weiter sich der Mittelwert vom Nullpunkt entfernt, desto breiter wird die Verteilung. Dies ist essentiell für die Erfüllung des Fluktuationstheorems (2.14), da bei einem Mittelwert größer Null Trajektorien mit negativen Werten von R zwingend notwendig sind. Wie man unschwer erkennt, ist zwar die relative Anzahl der Trajektorien mit negativem R geringer je breiter die Verteilung ist, aber die Anzahl mit betragslich hohen negativen Werten steigt und bei einer Mittelung über eine Exponentialfunktion haben diese hohen Werte ein starkes Gewicht. Dies bedeutet gleichzeitig, dass die experimentelle Überprüfung des Fluktuationstheorems für breite Verteilungen anfälliger auf eine schlechte Statistik reagiert als für die schmalen Verteilungen. Diese Betrachtung erklärt die Abweichungen in Abb. 2.12 für lange Trajektorien mit starker Modulation. Gore et al. [68] bestimmen eine Abschätzung des rein statistischen mittleren Fehlerquadrats für eine endlich Anzahl an Wiederholungen eines Experiments, welches die Jarzynski Relation erfüllt. Um den Fehler konstant zu halten, erhöht sich die Anzahl der zu messenden Trajektorien exponentiell mit dem Mittelwert der fluktuierenden Größe. Die nach dieser Abschätzung zu erwartenden Fehler sind den hier beobachteten Abweichungen sehr ähnlich und lassen auf geringe experimentelle Messfehler schließen.

Für ausreichend langsames Treiben eines diffusiven Systems mit nichtlinearen Bewegungsgleichungen ist die Verteilung eine Gaußfunktion, was sowohl theoretisch bewiesen wurde [69] als auch das Ergebnis experimenteller Untersuchungen war [40]. Ausreichend langsames Treiben bedeutet in diesem Zusammenhang eine Relaxationszeit des Systems, die klein gegen die zeitliche Ableitung des Kontrollparameters λ ist. Übertragen auf das TLS müssen die Kehrwerte der Raten a und b klein gegen die Periodendauer der Modulation T_{mod} sein. Für

Messprotokolle, die kein langsames Treiben garantieren, macht die Theorie keine Angaben über die Form der Verteilungsfunktion [62]. Eine mögliche Abweichung von der Gaußverteilung sollte am deutlichsten bei einem sehr stark aus dem Gleichgewicht getriebenen System beobachtbar sein, einem System, das in kurzer Zeit weit ins Nichtgleichgewicht getrieben wird und lange für die Relaxation benötigt. In Kapitel 2.3.5 wurden die gewählten experimentellen Parameter unter anderem mit der Forderung nach einem starken Treiben begründet. Im Fall des TLS bedeutet dies zunächst Periodendauer und Kehrwerte der Raten in der gleichen Größenordnung zu wählen. Zusätzlich wird das System umso stärker getrieben, je größer die Modulationstiefe γ ist. Obwohl die Messprotokolle die Bedingungen nach einem stark getriebenen System erfüllen, sind die Histogramme in Abb. 2.13B dennoch von gaußscher Form und können durch die entsprechende Funktion angepasst werden (dunkelgelb). Dies bedarf einer genaueren Erklärung.

Die obigen Definitionen für starkes und langsames Treiben beziehen sich in unserem Experiment auf ein Messprotokoll mit nur einer Periode. Durch Messung über viele Perioden kann man den Effekt des starken Treibens, wenige Sprünge pro Trajektorie zu erhalten, negieren. Im Fall eines periodischen Messprotokolls ist es also nötig, Trajektorien der Länge weniger Perioden den Bedingungen für starkes Treiben hinzuzufügen. Die Verteilungen aus Abb. 2.13B mit einer Länge von 50 Perioden erfüllen diese Bedingung nicht.

Um die Auswirkungen des starken Treibens zu beobachten, ist es angeraten, Trajektorien unterschiedlich kurzer Längen mit möglichst großer Modulationstiefe zu untersuchen. Hierfür wurden die Verteilungen von R/k_B (in rot) für Trajektorien mit der Länge von 1, 2, 4, 6, 8 und 12 Halbperioden (in Abb. 2.14) des Datensatzes 1 mit $\gamma = 0,46$ ausgewertet und dargestellt. Ist bei einer Länge von 8, aber vor allem von 12 Halbperioden, schon eine gaußähnliche Verteilungsfunktion zu erkennen (Abb. 2.14E+F), so zeigen die Verteilungen kürzerer Trajektorien eine auffällige Peakstruktur (Abb. 2.14A-D). Das ausgeprägte Maximum für $R = 0$ lässt sich durch viele Trajektorien ohne Sprung erklären und damit durch unsere Wahl der Periodendauer T_{mod} im Verhältnis zu den Raten a_0 und b_0 . In Bild A ist dieses Maximum noch sehr ausgeprägt und umfasst nahezu ein Drittel der 2000 Messpunkte, um dann für längere Trajektorien immer mehr in der breiter werdenden Verteilung zu verschwinden. Es handelt sich hierbei um das direkte Ergebnis der weiter oben formulierten Anforderung an ein stark getriebenes System.

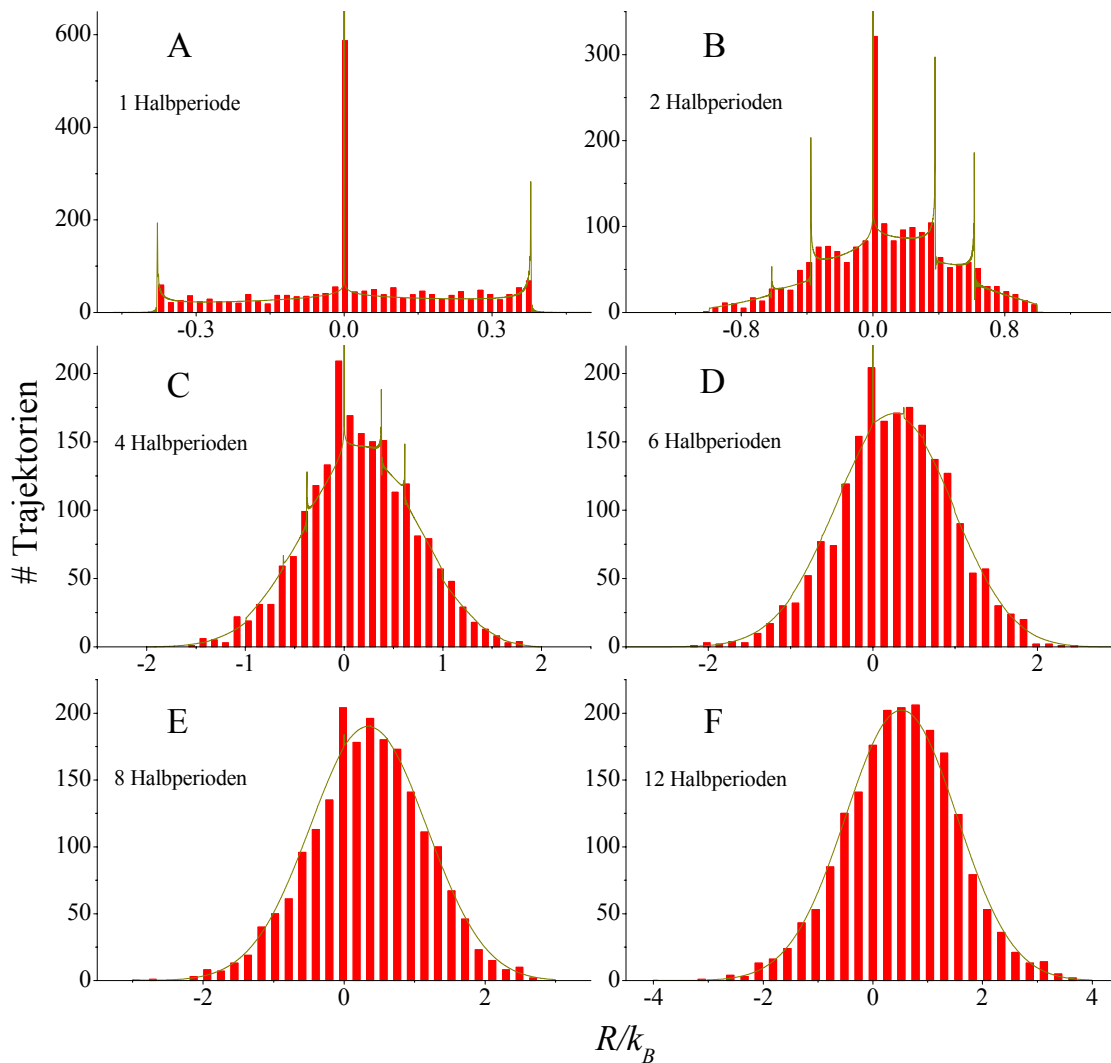


Abb. 2.14: Verteilungen von R (rot) für kurze Trajektorien des Datensatzes 1 mit $\gamma = 0.46$. Aufgetragen ist die Häufigkeit der Ereignisse eines Wertes R/k_B für Trajektorien der Längen (A) 1 Halbperiode, (B) 2 Halbperioden, (C) 4 Halbperioden, (D) 6 Halbperioden, (E) 8 Halbperioden und (F) 12 Halbperioden. In A-D kann man eine auffällige Peakstruktur erkennen, während E und vor allem F einer Gaußfunktion ähneln. In gelb sind die numerischen Lösungen der Chapman-Kolmogorov-Gleichung in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen in jedes Bild zugezeichnet.

Die weniger ausgeprägten Seitenpeaks sind dagegen eine Folge der gewählten sinusförmigen Modulation. Für Trajektorien mit nur einem einzigen Sprung ist es wahrscheinlich, dass dieser Sprung zu einem Zeitpunkt mit nahezu maximaler oder nahezu minimaler grüner Laserintensität bzw. Rate a stattfindet. Ersichtlich wird dies, wenn man sich die Umkehrfunktion

eines Sinus vor Augen führt. Dies führt zu Häufungen um $R/k_B = \pm \ln(1 + \gamma)$ für eine einzige Halbperiode. Nimmt man eine ganze Periode (oder mehrere) und damit das Minimum des Sinus hinzu, ergeben sich noch zwei weitere Häufungspunkte und man erhält $R/k_B = \pm \ln(1 \pm \gamma)$. Für unsere Modulationstiefe von $\gamma = 0.46$ sind das $R/k_B = \pm 0,38$ und $R/k_B = \pm 0,58$, was gut mit den Häufungspunkten der Verteilungen übereinstimmt.

Zusätzlich zu dieser anschaulichen Erklärung kann man die Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P(R)$ durch das numerische Lösen eines Differentialgleichungssystems berechnen. Hierfür ist es nötig, die zeitabhängige Funktion $\rho_n \equiv \rho_n(R, \tau)$ einzuführen. Sie gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass sich das System zum Zeitpunkt τ im Zustand n befindet und bis dahin den Betrag R akkumuliert hat. Ausgehend von der Mastergleichung (2.9) ist die zeitliche Entwicklung von $\rho_n(R, \tau)$ dann durch die Chapman-Kolmogorov-Gleichung [69,70] gegeben und lautet für das TLS

$$\begin{aligned} \frac{\partial \rho_0}{\partial \tau} &= -a(\tau) \rho_0 + b_0 \rho_1 + k_B \lambda \frac{\partial \ln p_0^s}{\partial \lambda} \frac{\partial \rho_0}{\partial R} \\ \frac{\partial \rho_1}{\partial \tau} &= a(\tau) \rho_0 - b_0 \rho_1 + k_B \lambda \frac{\partial \ln p_1^s}{\partial \lambda} \frac{\partial \rho_1}{\partial R}. \end{aligned} \quad (2.31)$$

Setzt man die Raten aus (2.23), den Kontrollparameter aus (2.24) und die Wahrscheinlichkeiten aus (2.26) ein und wählt als Bedingung $\rho_n(R, \tau) = p_n^s(0) \delta(R)$ für den Start aus dem dynamischen Gleichgewicht, lässt sich das gekoppelte Gleichungssystem numerisch lösen. Die Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P(R)$ für Trajektorien der Länge τ ergeben sich dann als Summe der Endzustände, $P(R, \tau) = \rho_0(R, \tau) + \rho_1(R, \tau)$.

Die Ergebnisse der Rechnungen sind in Abb. 2.14 in dunklem gelb eingezeichnet. Hierfür wurden die Parameter entsprechend des ausgewerteten Datensatzes 1 gewählt und die berechneten Funktionen anschließend auf die Anzahl der Messungen normiert. Die so bestimmten Werte ergeben eine ähnliche Kurvenform wie die experimentellen Ergebnisse mit deutlich ausgeprägten Seitenpeaks für kurze Trajektorien (Abb. 2.14A-D). Deren Lage stimmt mit den oben abgeschätzten Werten R/k_B überein. Für längere Trajektorien (Abb. 2.14E+F) verschwinden zunächst die Seitenpeaks, schließlich auch das zentrale Maximum und es ergibt sich eine gaußähnliche Funktion.

Vergleicht man die experimentellen Daten mit den berechneten Ergebnissen, so kann das zentrale Maximum sehr gut aufgelöst werden, wohingegen die Seitenpeaks in der Rechnung deutlich schärfer als im Experiment sind. Dies ist auf die begrenzte Statistik und die damit eingeschränkte Binbreite der Histogramme zurückzuführen. Der Ort der Häufungspunkte und der Übergang zu einer gaußähnlichen Verteilung wird durch das Experiment nahezu perfekt bestätigt.

Für ein stark aus dem Gleichgewicht getriebenes TLS ist die Verteilung der fluktuierenden Größe keine Gaußfunktion mehr. Die genaue Form hängt vom gewählten Messprotokoll ab, zeigt aber grundsätzlich ein Maximum bei $R = 0$ für sehr kurze Trajektorien. Dies konnte mit Hilfe dieser Daten erstmalig experimentell nachgewiesen werden [67].

2.4.2.3 Das Fluktuationstheorem nach Crooks

Die Bezeichnung FT nach Crooks (FTC) soll sich in dieser Arbeit auf die Gleichung (2.7) beziehen. Im Vergleich zu den integralen Versionen ist das FTC restriktiver, da nicht nur an den Mittelwert der fluktuierenden Größe, sondern auch an die Form der Verteilung eine Bedingung gestellt wird.

Experimentell wurde das dem FTC verwandte Transient Fluctuation Theorem erstmals 2004 verifiziert [51] (an einem kolloidalen Teilchen, gefangen in einer Laserpinzette). Später konnten Collin et al. [60] das hier mit FTC bezeichnete Theorem durch die Entfaltung und anschließende Faltung eines Proteins für den Vorwärts- bzw. den Umkehrprozess erfolgreich testen.

Im Fall unseres stochastischen TLS schreibt sich das FTC für die Größe R nach Gleichung (2.16). Um einen Vorwärts- und einen entsprechenden Umkehrprozess zu erhalten, bedienen wir uns eines symmetrischen Messprotokolls, definiert durch $\tilde{\lambda}(\tau) = \lambda(t - \tau) = \lambda(\tau)$. Für ein symmetrisches Messprotokoll und damit für ein identisches Protokoll für den Vorwärts- und Umkehrprozess ergibt sich das FTC zu:

$$\frac{P_1\left(\frac{R}{k_B}\right)}{P_2\left(-\frac{R}{k_B}\right)} = \exp\left(+\frac{R}{k_B}\right). \quad (2.32)$$

Die Indizes 1 und 2 beschreiben hierbei zwei unterschiedliche Ensembles von Trajektorien, die symbolisch für die beiden Prozesse aus (2.16) stehen. Um die Datensätze aus Tabelle 2-1 (Seite 53) für die Verifizierung zu verwenden, müssen die ausgewerteten Trajektorien dem-

nach auf ein ungerades Vielfaches einer Halbperiode enden. Für jeweils die Hälfte der ausgewerteten Trajektorien eines Datensatzes werden die Verteilungen von R bestimmt. $P_2(-R/k_B)$ ergibt sich als Spiegelung einer der Verteilungen an der y-Achse.

Abb. 2.15 zeigt diese beiden Wahrscheinlichkeitsverteilungen für den Datensatz 1 mit einer ausgewerteten Trajektorienlänge von 25 Halbperioden. Aus den ersten 1000 Messungen des Datensatzes wurde $P_1(R/k_B)$ aus den zweiten 1000 $P_2(-R/k_B)$ errechnet. Sie sind in hell- bzw. dunkelgrau dargestellt. Nach Gleichung (2.32) muss nun für den Überlappungsbereich der beiden Verteilungen der Logarithmus des Quotienten aus Höhe des hellgrauen und Höhe des dunkelgrauen Balkens für jeden Wert von R/k_B eben diesem Wert entsprechen. Dafür wurde der Überlapp in 11 Binbereiche unterteilt. Für jeden dieser Bins wurden die Höhen der Verteilungen bestimmt, deren Quotient berechnet und dieser anschließend logarithmiert.

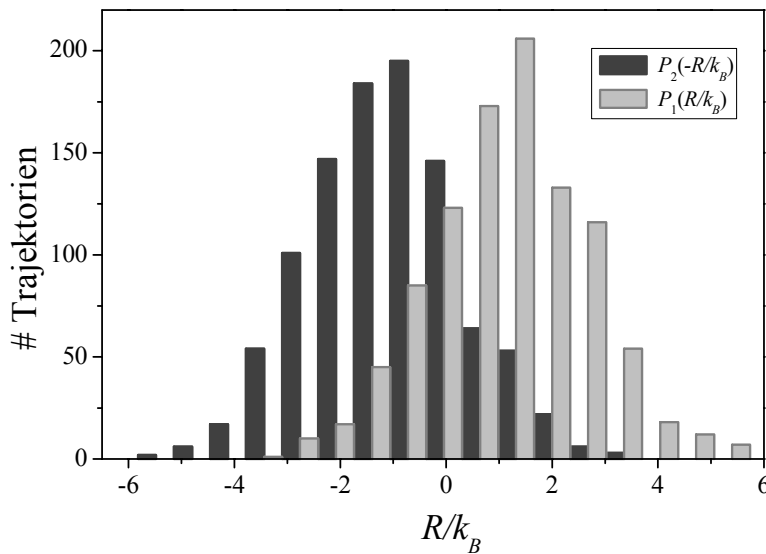


Abb. 2.15: Verteilungen zur Verifizierung des FTC für den Datensatz 1. Die ersten 1000 Trajektorien der Länge von 25 Halbperioden wurden zur Erstellung von $P_1(R/k_B)$ (hellgrau) und weitere 1000 zur Erstellung von $P_2(-R/k_B)$ (dunkelgrau) verwendet.

In Abb. 2.16A sind die so ermittelten Werte über das entsprechende R/k_B für das Beispiel aus Abb. 2.15 in rot aufgetragen. Wie von der Theorie erwartet, liegen sie auf einer Geraden. Ein linearer Fit (dunkelgelb) der 11 Datenpunkte ergibt eine Steigung von $0,99 \pm 0,04$ und stimmt damit nahezu exakt mit der theoretischen Voraussage von 1 überein.

Abb. 2.16B zeigt die analog ermittelten Steigungen der Fitgeraden für Trajektorienlängen zwischen 1 und 39 Halbperioden des Datensatzes 1. Im Gegensatz zur integralen Version des FT zeigt sich hier die größte Abweichung vom theoretisch erwarteten Wert von 1 für die kürzesten Trajektorien (vgl. Abb. 2.12). Ruft man sich die Verteilungen von R für kurze Trajek-

torien ins Gedächtnis (vgl. Abb. 2.14), erklärt sich dieses Verhalten. Kurze Trajektorien zeigen häufig keinen Sprung und führen im Histogramm zu sehr vielen Ereignissen mit $R = 0$. Im Fall des integralen FT fallen diese Trajektorien bei der Bildung des Mittelwerts entsprechend stark ins Gewicht. Auf der Geraden ist der Wert von $R/k_B = 0$ aber nur ein einziger Punkt unter vielen und die Statistik für die restlichen Werte ist relativ klein und demnach schwankungsanfällig. Für breitere Verteilungen ab einer Länge von 5 Halbperioden und damit auch für eindeutig nicht gaußförmige Verteilungen ist das FTC sehr gut erfüllt. Der Mittelwert der 20 berechneten Steigungen beträgt hierbei 1,02 mit einer Standardabweichung von 0,09.

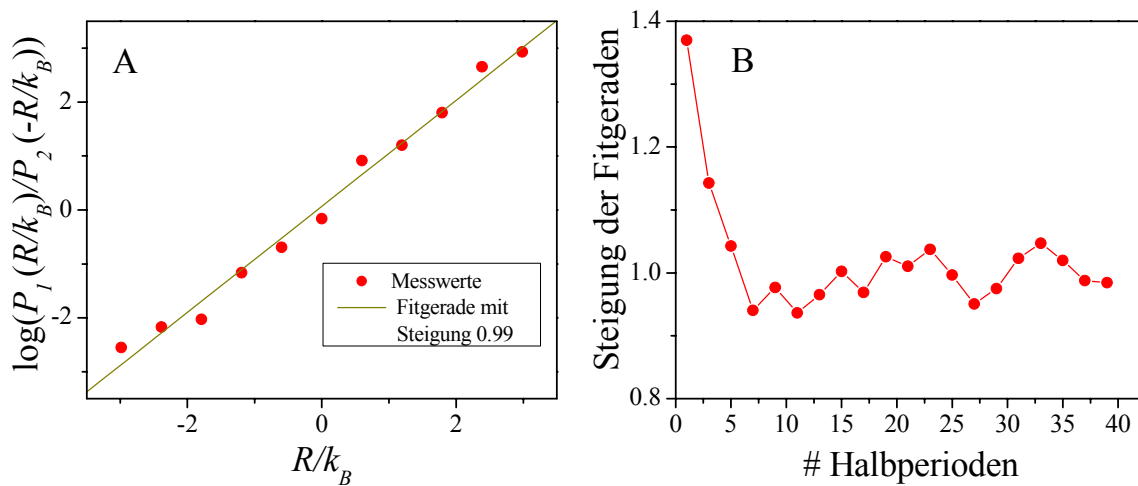


Abb. 2.16: In A sind die logarithmierten Werte der Quotienten über R/k_B für das Beispiel aus Abb. 2.15 in rot aufgetragen. Dunkelgelb ist die Fitgerade mit einer Steigung von $0,99 \pm 0,04$. B zeigt die Steigungen der Fitgeraden für weitere ausgewertete Trajektorienlängen des Datensatzes 1. Ab einer Länge von 5 Halbperioden ist das FTC sehr gut erfüllt.

Abschließend zu den Ausführungen der Messergebnisse noch einige Überlegungen zur Bedeutung dieser stochastischen Größe für das hier behandelte TLS:

In Kapitel 2.1.1.3 wurde R als Maß für die gesamte Entropiedifferenz zwischen dem Anfangszustand und dem Zustand nach Ende des Protokolls und nach vollständiger Relaxation vorgestellt. Kann man demnach ein getriebenes System als Abfolge von dynamischen Gleichgewichtszuständen, als reversiblen Prozess beschreiben, ist R und somit die gesamte Entropieproduktion für alle möglichen Trajektorien exakt Null. Der offensichtliche Spezialfall sind konstante Laserleistungen und damit konstante Raten. Die Verbreiterung der Verteilung und das Wandern des Maximums zu positiven Werten für ein getriebenes System entspringt der

verzögerten Reaktion auf das Treiben und bedeutet im Mittel einen effektiven Zuwachs der Gesamtentropie.

Hier sei noch einmal darauf hingewiesen, dass R zwar die Entropiedifferenz zwischen zwei Gleichgewichtszuständen bei gegebenem Protokoll bestimmt, aber keine Aussage über die Entropie entlang des Weges und damit für das Nichtgleichgewicht macht.

2.4.3 Die Entropie s

Für die Bestimmung der Entropie entlang einer Trajektorie werden ebenfalls die Messungen aus Tabelle 2-1 (Seite 53) herangezogen. Anhand einiger Beispieltrajektorien wird die mögliche Entwicklung der Entropie des Systems und des Mediums vorgestellt. Anschließend werden die Unterschiede für das TLS zwischen R und Δs_{tot} veranschaulicht und die Fluktuationstheoreme getestet.

2.4.3.1 Die Entropie entlang einer Trajektorie

Nach der Definition von Seifert [65] kann man die Entropie im Nichtgleichgewicht in Entropie des Systems und Entropie des umgebenden Mediums unterteilen. Für eine einzelne Trajektorie unseres Experiments lassen sich Δs_{sys} und Δs_{med} nach den Gleichungen (2.28) und (2.29) bestimmen. Das Einsetzen der Sprungzeiten, der Parameter aus Tabelle 2-1 und der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten $p_0(\tau)$ und $p_1(\tau)$ (vgl. Kapitel 2.3.4) entlang der Trajektorie ergibt die Differenzen der Teilentropien und damit die Änderung der Gesamtentropie $\Delta s_{tot} = \Delta s_{sys} + \Delta s_{med}$. Da es sich bei dieser Definition der Entropie um eine Eigenschaft entlang der Trajektorie handelt, ist es für eine anschauliche Darstellung sinnvoll, diese Änderung nach jedem Messwert zu berechnen und nicht nur für Vielfache einer halben Periodendauer. Das Δ steht für die Differenz zwischen Startpunkt der Trajektorie und dem aktuellen Auswertzeitpunkt (τ). Für $\tau = 0$ sind demnach die Änderungen der Teilentropien Null.

Abb. 2.17 zeigt anhand einer Beispieltrajektorie des Datensatzes 1 aus Tabelle 2-1 (Seite 53) die zeitliche Entwicklung der Entropie des Systems und des umgebenden Mediums über eine Länge von 4 Perioden. Für eine verständliche Darstellung sind zusätzlich die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten, die Rate $a(\tau)$ und die geglättete Version der Trajektorie eingezeichnet. Die gestrichelten, weinroten Linien markieren zeitlich Sprünge zwischen den Zuständen 0 und 1.

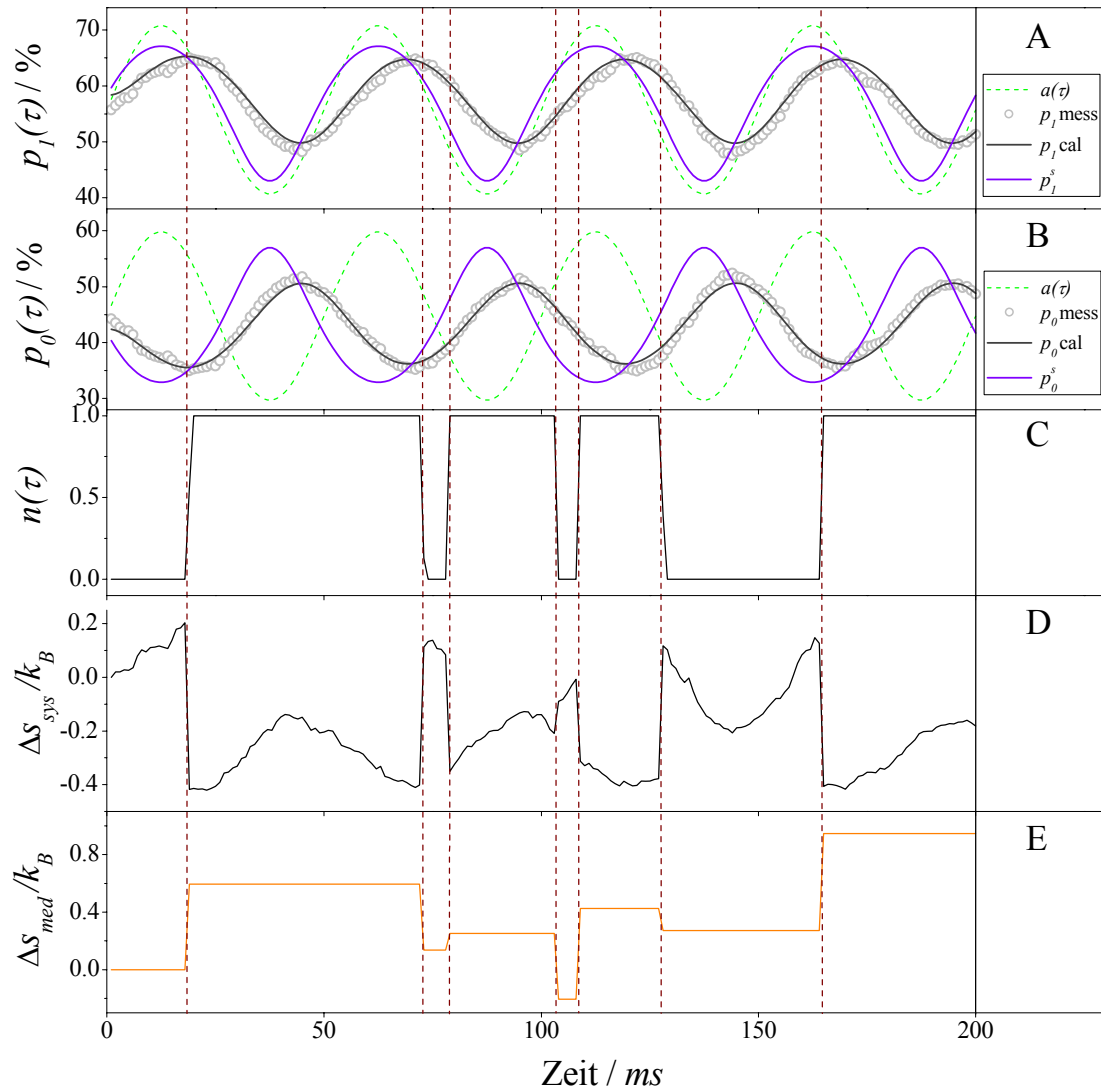


Abb. 2.17: In A und B sind die Rate $a = a(\tau)$ (in grün) in willkürlichen Einheiten, die gemessenen (hellgraue Kreise) und berechneten (dunkelgraue Linie) Aufenthaltswahrscheinlichkeiten $p_n(\tau)$ sowie die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten $p_n^s(\tau)$ des relaxierten Systems für die Zustände 1 (A) und 0 (B) jeweils in % über der Zeit eingezeichnet. C ist die geglättete Version einer Trajektorie $n(\tau)$ des Datensatzes 1 mit einer Länge von 4 Perioden. Die zeitlichen Entwicklungen der Entropie des Systems (D) und des Mediums (E) sind für diese Beispieltrajektorie in den zwei unteren Teilschaubildern dargestellt. Beide Teilentropien wurden in Vielfachen von k_B über der Zeit aufgetragen. Während ΔS_{sys} sowohl einen kontinuierlichen Anteil als auch einen Sprungbeitrag besitzt, ändert sich ΔS_{med} lediglich zu Sprungzeiten, die durch weinrote gestrichelte Linien markiert sind.

Die gestrichelten grünen Kurven in Abb. 2.17A und B stehen für die modulierte Rate $a = a(\tau)$. Die Skala der y-Achse (%) gilt für die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten, während die Rate in willkürlichen Einheiten über der Zeit aufgetragen ist. Das Teilschaubild A enthält die nach Kapitel 2.3.4 aus 2000 Messungen extrahierte Aufenthaltswahrscheinlichkeit für den Zustand 1 (hellgraue Kreise). Diese experimentell erlangten Werte stimmen sehr gut mit der theoretischen Erwartung, der numerischen Lösung der Mastergleichung (2.25) für $p_1(\tau)$ (dunkelgraue Linie) überein. Die violette Kurve ist das nach Gleichung (2.26) bestimmte $p_1^s(\tau)$, das zu jedem $a(\tau)$ die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für das relaxierte System in Zustand 1 darstellt. Anzumerken ist, dass bei einer sinusförmigen Änderung der Rate $a(\tau)$, $p_1^s(\tau)$ zwar periodisch, aber keine Sinusfunktion ist. Allerdings schwingen $p_1^s(\tau)$ und $a(\tau)$ immer in Phase. Das Teilschaubild B zeigt die entsprechenden Wahrscheinlichkeiten in der gleichen Farbcodierung für den Zustand 0. $p_0^s(\tau)$ und $a(\tau)$ laufen wie erwartet genau gegenphasig zueinander.

Hier wird zum ersten Mal die schon mehrfach angesprochene verzögerte Reaktion des Systems auf den treibenden Parameter, die Rate $a(\tau)$, anschaulich sichtbar gemacht. Beispielsweise hat eine erhöhte Rate a ein stärkeres Leerpumpen des Zustandes 0 und damit eine größere Aufenthaltswahrscheinlichkeit in Zustand 1 zur Folge. In Abb. 2.17A erkennt man, dass sich nach einem Einschwingvorgang eine deutliche Phasenverschiebung zwischen der Rate und der Antwort des Systems (größeres $p_1(\tau)$) ergibt. Der genaue Betrag der Phasenverschiebung hängt von der Periodendauer T_{mod} und den Raten a_0 und b_0 ab. Da für $p_0(\tau)$ die Bedingung $p_0(\tau) = 1 - p_1(\tau)$ gilt, ist $p_0(\tau)$ gegenüber $p_0^s(\tau)$ um den selben Betrag phasenverschoben wie $p_1(\tau)$ gegen $p_1^s(\tau)$ (siehe Abb. 2.17B).

Abb. 2.17C ist die geglättete Version einer gemessenen Trajektorie des Datensatzes 1. Es sind 7 Sprünge innerhalb der vier gezeigten Perioden zu erkennen.

Abb. 2.17D und E zeigen schließlich die zeitliche Entwicklung der Entropie des Systems bzw. des Mediums entlang dieser Trajektorie. Die Division durch die Boltzmannkonstante ergibt einheitenlose y-Achsen. Eine Betrachtung der Entropie des Systems liefert zwei unterschiedliche, nach (2.17) erwartete, Beiträge. Es existiert ein kontinuierlicher Beitrag während das System in einem Zustand verweilt und ein diskreter Beitrag, der nur zu Sprungzeiten auftritt. Starten wir wie hier für $\tau = 0$ im Zustand 0, ändert sich die Systementropie zunächst mit

$-k_B \frac{\partial_\tau p_0(\tau)}{p_0(\tau)}$. Die integrierte Funktion $-k_B \ln p_0(\tau) + k_B \ln p_0(0)$ gibt die akkumulierte Systementropie nach der Zeit τ in Zustand 0 an. Der zweite Term ist die Entropie beim Start der Trajektorie und ermöglicht uns die Betrachtung der Änderung entlang der Trajektorie. Nach dem ersten Sprung (von Zustand 0 nach Zustand 1) ergibt sich die bis zu einem Zeitpunkt τ

akkumulierte Systementropie aus $-k_B \ln p_1(\tau) + k_B \ln p_0(0)$. Der Beitrag $-k_B \ln \frac{p_1(\tau_{\text{Sprung}})}{p_0(\tau_{\text{Sprung}})}$

durch den Sprungterm ist hierbei exakt die Differenz der beiden integrierten Funktionen. Dies setzt sich für die weiteren Sprünge entsprechend fort. Die Änderung der Systementropie pendelt demnach immer zwischen durch $p_0(\tau)$ und $p_1(\tau)$ gegebene Grenzen und kann abhängig vom Messzeitpunkt sowohl positiv als auch negativ sein.

Im Fall der Entropie des Mediums existieren nur diskrete Beiträge durch die einzelnen Sprünge. Starten wir erneut, wie in der Beispieltrajektorie, im Zustand 0, so bleibt die Änderung der Entropie des Mediums bis zum ersten Sprung zunächst Null. Mit dem Übergang von Zustand 0 nach 1 geht ein diskreter Sprung in der Mediumsentropie einher. Der Beitrag

$-k_B \ln \frac{b_0}{a(\tau_{\text{Sprung}})} = -k_B \ln \frac{p_0^s(\tau_{\text{Sprung}})}{p_1^s(\tau_{\text{Sprung}})}$ des Sprungterms hängt von den Raten des Sprungzeit-

punktes ab bzw. von den Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des dynamischen Gleichgewichts, die diesen Raten zugeordnet sind. Für weitere Sprünge setzt sich dies mit den entsprechenden Sprungtermen nach (2.29) fort. Es zeigen sich hier deutlich die zwei fundamentalen Unterschiede der beiden Teilentropien:

1. Die Entropie des Mediums besitzt keinen kontinuierlichen Anteil, sie ist zwischen den Sprüngen konstant.
2. Die Höhe der diskreten Beiträge hängen für Δs_{sys} von den Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des Nichtgleichgewichts ($p_0(\tau)$ und $p_1(\tau)$) und für Δs_{med} von den Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des dynamischen Gleichgewichts ($p_0^s(\tau)$ und $p_1^s(\tau)$) ab und diese Größen zeigen nach Abb. 2.17 eine deutliche Phasenverschiebung.

Obwohl die Sprungterme der beiden Teilentropien tendenziell gegenläufig sind, wird sich deren Summe aufgrund der Phasenverschiebung meistens nicht negieren und $\Delta s_{tot} = \Delta s_{sys} + \Delta s_{med}$ wird für längere Trajektorien im Allgemeinen ungleich Null sein.

Der Grenzfall einer Phasenverschiebung von Null und damit $p_n(\tau) = p_n^s(\tau)$ ist die Beschreibung der Trajektorie als eine Abfolge von Zuständen des dynamischen Gleichgewichts, was man auch als ungetriebenes System bezeichnen kann. Hierfür sind die Beiträge der Sprungterme beider Teilentropien betragsmäßig identisch mit entgegengesetztem Vorzeichen. Weiterhin bedeutet das dynamische Gleichgewicht eine unendlich langsame zeitliche Änderung der Raten und der kontinuierliche Anteil von Δs_{sys} geht somit gegen Null und es gilt $\Delta s_{sys} = -\Delta s_{med}$ und damit $\Delta s_{tot} = 0$ für alle Trajektorien.

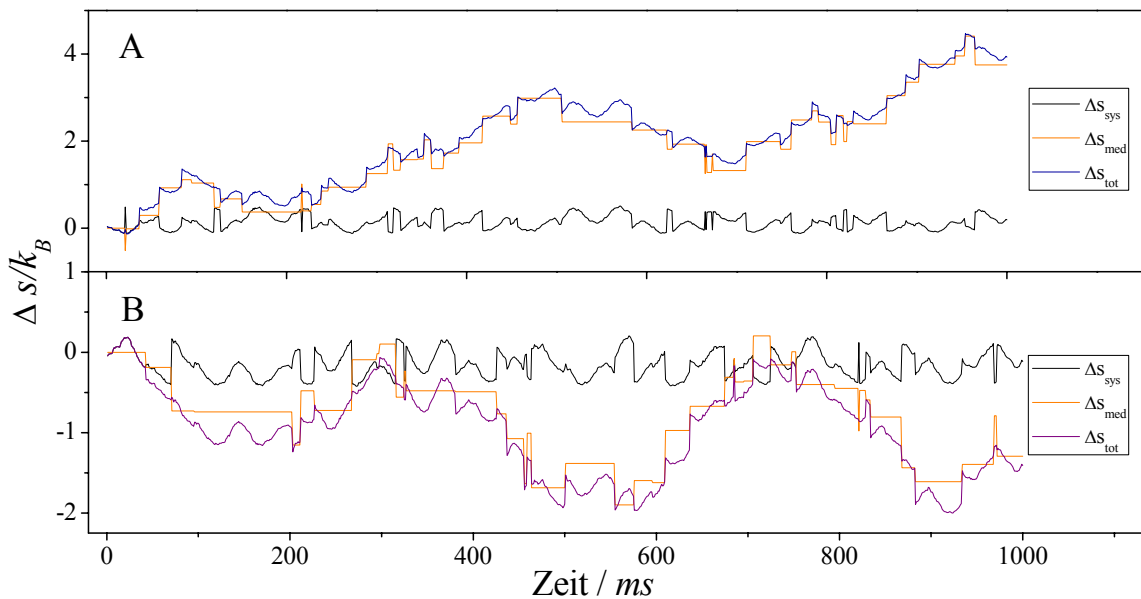


Abb. 2.18: Beispiele für die Produktion (A) und die Vernichtung (B) von Entropie entlang einer Trajektorie: Δs_{sys} (schwarz), Δs_{med} (orange) und Δs_{tot} (purpurn) sind in Vielfachen von k_B über der Zeit aufgetragen. Die Entropie des Systems pendelt um Null, während die Änderung der Mediumsentropie einen deutlich größeren positiven oder negativen Betrag akkumuliert und damit das Verhalten der Gesamtentropie dominiert.

Wenden wir uns nun wieder dem zeitlich getriebenen System zu. Abb. 2.18 zeigt die zeitliche Entwicklung der Teilentropien und der Gesamtentropie zweier Beispieltrajektorien einer Länge von 40 Halbperioden des Datensatzes 1. Aufgetragen ist die jeweilige Entropieänderung

als Vielfaches von k_B über der Zeit in ms . Schwarz ist die Entropie des Systems, orange die des Mediums und die purpurne Kurve steht jeweils für die Gesamtentropie.

Wie anhand der Abb. 2.18 erklärt, pendelt die Entropie des Systems um Null, eingegrenzt durch Funktionen der Größen $p_0(\tau)$ und $p_1(\tau)$. Anders verhält es sich mit der Entropie des Mediums. Das Teilschaubild A zeigt eine Beispieltrajektorie mit einer effektiven Entropieproduktion für das Medium von $\sim 3,5k_B$. Neben den Entropie produzierenden existieren allerdings auch Entropie vernichtende Trajektorien ($\Delta s_{med} < 0$). Die relative Anzahl hängt bei sonst identischen Parametern von der ausgewerteten Länge und damit von der Anzahl der Sprünge ab. Je mehr Sprünge, desto seltener treten diese Ereignisse auf. Ein Beispiel für eine effektive Vernichtung von $\sim 1,0k_B$ an Mediumsentropie ist im Teilschaubild B zu sehen. Für diese beiden Trajektorien und grundsätzlich für Trajektorien mit einer großen Entropieänderung dominiert die Entropie des Mediums offensichtlich das Verhalten der Gesamtentropie.

An dieser Stelle lohnt sich ein Blick auf die Verteilungen der Entropie für den Datensatz 1. Hierzu wurden für die 2000 Trajektorien nach einer Länge von 40 Halbperioden Δs_{sys} , Δs_{med} und Δs_{tot} berechnet, durch die Boltzmannkonstante dividiert und in Histogramme eingezeichnet. In Abb. 2.19A ist die Verteilung der Systementropie, in B die der Entropie des Mediums und in C die Summe, die Gesamtentropie, dargestellt.

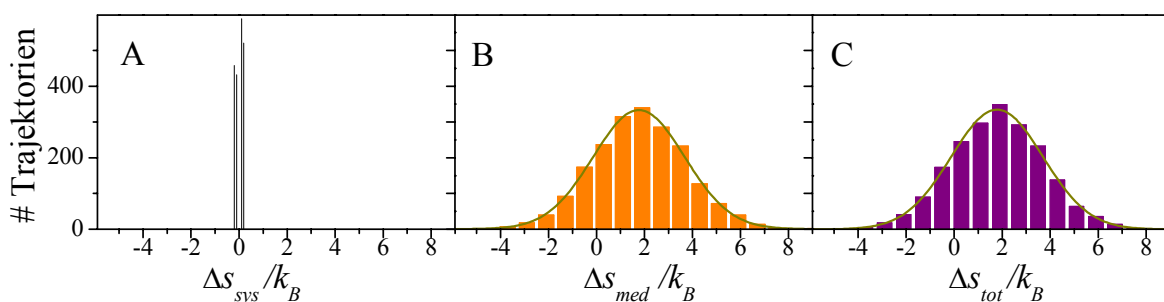


Abb. 2.19: Beispielhafte Verteilungen von Δs_{sys} (A), Δs_{med} (B) und Δs_{tot} (C) für Trajektorien der Länge 40 Halbperioden. Die Systementropie zeigt nur 4 mögliche Ergebnisse. Mediumsentropie und Gesamtentropie sind sehr viel breiter verteilt und lassen sich durch Gaußfunktionen anfitzen (dunkles gelb).

Die Achsen der Histogramme wurden jeweils identisch skaliert, um die Verhältnisse zu verdeutlichen. Hierbei ist es wichtig zu betonen, dass die Verteilung der Gesamtentropie keine

Addition der Histogramme aus A und B ist, sondern ein Histogramm, entstanden aus der Addition jeweils eines Wertes von A und B (vgl Gleichung (2.30)).

Die 4 Balken in Teilschaubild A sind auf den ersten Blick erstaunlich. Führt man sich jedoch die Berechnung nach Gleichung (2.28) $\Delta s_{\text{sys}} = -k_B \ln \frac{p_n(t)}{p_n(0)}$ vor Augen und bedenkt, dass die Reaktion des Systems verzögert ist, erkennt man, dass für einen festen Endpunkt $\tau = t$ genau 4 Ergebnisse für eine Trajektorie möglich sind. Start in Zustand 1 mit Ende in Zustand 1, Start in Zustand 1 mit Ende in Zustand 0 usw.. Für den Spezialfall $p_n(t) = p_n(0)$ fallen zwei der Ergebnisse zusammen. Die den 4 Balken zugeordneten genauen Werte hängen vom Endzeitpunkt der Trajektorie, der Modulationstiefe γ und von der Phasenverschiebung zwischen $p_n^s(\tau)$ und $p_n(\tau)$ ab.

Ein anderes Bild bietet sich für die Entropie des Mediums und damit auch für die Gesamtentropie. Die Verteilungen erinnern sehr stark an die Verteilungen von R für lange Trajektorien aus Kapitel 2.4.2.2 und können beide durch eine Gaußfunktion mit jeweils sehr ähnlichen Parametern angefitet werden. In diesem Fall ein Mittelwert von $\sim 1,8k_B$ bei einer Standardabweichung von $\sim 1,9k_B$. Für diese Trajektorien mit vielen Sprüngen ist das Histogramm der Gesamtentropie wie schon in Abb. 2.18 sehr stark von Δs_{med} dominiert.

Bevor wir uns intensiver den Verteilungen der Entropien widmen, bietet sich eine Diskussion über die Unterschiede zwischen der stochastischen Größe R (aus Kapitel 2.4.2) und Δs_{tot} an.

2.4.3.2 Die Größen R und Δs_{tot}

In diesem Kapitel sollen die Unterschiede von R und Δs_{tot} für das gleiche Ensemble ausgewerteter Trajektorien dargestellt werden. Hierbei beschränken wir uns beispielhaft auf Trajektorien der Länge eines Vielfachen einer halben Periode. Die Beobachtungen sind jedoch auf Trajektorien beliebiger Länge übertragbar.

Wie schon mehrfach erwähnt, ist die Größe R ein Maß für die Entropiedifferenz zwischen dem Startzustand und der relaxierten Version des Endzustandes, wohingegen Δs_{tot} die Differenz der Gesamtentropie zwischen dem Startzustand und dem unrelaxierten Endzustand beschreibt. Der Unterschied bei Start aus dem dynamischen Gleichgewicht ist demnach die Änderung der Entropie während des Relaxationsvorgangs.

Für das TLS lässt sich die Größe R nach Gleichung (2.27) berechnen. Enden die Trajektorien auf ein Vielfaches einer Halbperiode ergibt sich daraus:

$$R = -k_B \sum_j^k \begin{cases} \ln \frac{b_0}{a(\tau_j)} = \ln \frac{p_0^s(\tau_j)}{p_1^s(\tau_j)} & \text{für } 0 \rightarrow 1 \\ \ln \frac{a(\tau_j)}{b_0} = \ln \frac{p_1^s(\tau_j)}{p_0^s(\tau_j)} & \text{für } 1 \rightarrow 0 \end{cases} + B. \quad (2.33)$$

Hierbei wurde die Zusammenfassung von jeweils zwei Sprüngen aus (2.27) aufgehoben. k ist erneut die Gesamtzahl der Sprünge, j der Sprungindex und $a(\tau_j)$ bzw. $p_n^s(\tau_j)$ die veränderliche Rate bzw. die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des „Steady State“ zur Sprungzeit τ_j . Der Randterm B (für „Boundary“) hängt vom Start- und Endzustand des Systems ab und lässt sich mit der obigen Bedingung für die Länge der Trajektorien schreiben als:

$$B = -k_B \begin{cases} \ln \frac{b_0}{a_0} = \ln \frac{p_0^s(a_0)}{p_1^s(a_0)} & \text{für } n(0) = 1 \wedge n(t) = 0 \\ \ln \frac{a_0}{b_0} = \ln \frac{p_1^s(a_0)}{p_0^s(a_0)} & \text{für } n(0) = 0 \wedge n(t) = 1. \end{cases} \quad (2.34)$$

Für die übrigen zwei Fälle ist er exakt Null.

Die Schreibweise von R nach Gleichung (2.33) erleichtert den Vergleich zu Δs_{tot} und zeigt deutlich die Verwandtschaft dieser beiden Größen. Man erkennt sofort, dass (2.33) ohne den Randterm B identisch mit der Berechnung für die Änderung der Entropie des Mediums nach (2.29) ist. Da $\Delta s_{tot} = \Delta s_{sys} + \Delta s_{med}$ ist, entspricht demnach der Unterschied zwischen R und Δs_{tot} dem Unterschied zwischen dem Randterm B von R und der Änderung der Systementropie. Nach Gleichung (2.28) hängt Δs_{sys} ebenfalls nur vom Start- und Endzustand des Systems ab und kann als eine Art Randterm der Gesamtentropie bezeichnet werden.

Der Unterschied zwischen R und Δs_{tot} ist demzufolge ein reines Randproblem und unabhängig von der Länge der eigentlichen Trajektorie. Dies impliziert einen schwindenden Einfluss auf Trajektorien mit vielen Sprüngen.

Für Trajektorien, die auf ein Vielfaches einer Halbperiode enden, ergibt sich die Differenz zwischen R und Δs_{tot} für die 4 Fälle, Start in Zustand 1 Ende in Zustand 1, Start in Zustand 1 Ende in Zustand 0 usw., zu:

$$R - \Delta s_{tot} = B - \Delta s_{sys} = k_B \begin{cases} 0 + \ln \frac{p_1(t)}{p_1^s(0)} = \ln \frac{p_1(t)}{p_1^s(0)} & \text{für } n(0)=1 \wedge n(t)=1 \\ -\ln \frac{p_0^s(0)}{p_1^s(0)} + \ln \frac{p_0(t)}{p_1^s(0)} = \ln \frac{p_0(t)}{p_0^s(0)} & \text{für } n(0)=1 \wedge n(t)=0 \\ 0 + \ln \frac{p_0(t)}{p_0^s(0)} = \ln \frac{p_0(t)}{p_0^s(0)} & \text{für } n(0)=0 \wedge n(t)=0 \\ -\ln \frac{p_1^s(0)}{p_0^s(0)} + \ln \frac{p_1(t)}{p_0^s(0)} = \ln \frac{p_1(t)}{p_1^s(0)} & \text{für } n(0)=0 \wedge n(t)=1. \end{cases} \quad (2.35)$$

In diese Schreibweise ist der Start aus dem dynamischen Gleichgewicht und damit $p_n(0) = p_n^s(0)$ eingebracht. Wie man sieht, fallen je zwei der Ergebnisse zusammen und die Differenz ist lediglich vom Endzustand der Trajektorie und den Aufenthaltswahrscheinlichkeiten nach (2.35) abhängig, nicht aber vom Startzustand. Dies geht konform mit der Betrachtung der Differenz $R - \Delta s_{tot}$ als Entropieänderung während der Relaxation.

In Abb. 2.20A ist die Differenz zwischen R und Δs_{tot} für alle Trajektorien des Datensatzes 1 mit einer Länge von 40 Halbperioden in ein Histogramm eingezeichnet. Zum Vergleich sind zusätzlich die Verteilungen von R (Abb. 2.20B) und Δs_{tot} (Abb. 2.20C) mit identischer Skalierung für die gleichen Daten dargestellt.

Wie nach (2.35) erwartet, erkennt man für die Differenz lediglich zwei mögliche Ergebnisse, jeweils relativ nahe Null. In diesem Fall ergeben Trajektorien mit dem Endzustand 1 eine negative, diejenigen mit dem Endzustand 0 eine positive Differenz zwischen R und Δs_{tot} . Die Höhe der Balken hängt von der Aufenthaltswahrscheinlichkeit für den jeweiligen Zustand am Ende der Trajektorie, zur Zeit $\tau = t$, ab.

Der Vergleich des Teilschaubildes A mit den Verteilungen in B und C bestätigt den geringen Beitrag der Relaxationsentropie zur Gesamtentropie für die meisten Trajektorien.

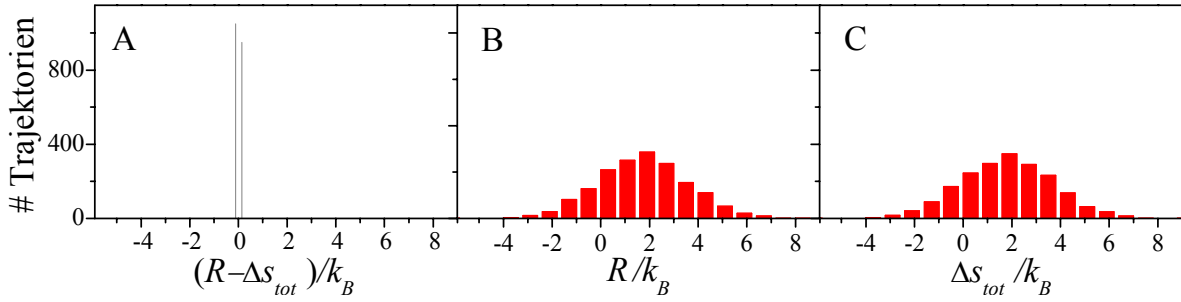


Abb. 2.20: Differenz zwischen R und Δs_{tot} für Trajektorien von 40 Halbperioden Länge des Datensatzes I. A zeigt ein Histogramm der Differenzen der einzelnen Trajektorien mit nur zwei möglichen Ergebnissen nahe Null. Die entsprechenden Verteilungen von R (B) und Δs_{tot} (C) sind zum Vergleich identisch skaliert eingezeichnet.

Fazit

Die Größen R und Δs_{tot} sind für identische Trajektorien im Allgemeinen nicht gleich. Der Unterschied wird eindeutig durch den Endzustand und den Endzeitpunkt unabhängig vom Anfangszustand bestimmt und kann als Entropieänderung der Relaxation bezeichnet werden. Für ein periodisches Protokoll zeigt sich dabei ein periodisches Verhalten. Je länger die Trajektorie, sprich je größer die Zahl der Sprünge, desto geringer ist der Einfluss des Relaxationsteils auf die Änderung der Gesamtentropie Δs_{tot} und desto ähnlicher werden sich die beiden Größen R und Δs_{tot} , um für unendlich lange Trajektorien zusammen zu fallen.

2.4.3.3 Das integrale Fluktuationstheorem für Δs_{tot}

In diesem Kapitel wird die Verifizierung des integralen Fluktuationstheorems (2.21) für die Änderung der Gesamtentropie entlang einer Trajektorie vorgestellt. Um die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu R herauszuarbeiten, ist es sinnvoll, die Beobachtungen in Relation zu den Ergebnissen aus Kapitel 2.4.2.1 zu setzen. Weiterhin bietet sich ein Vergleich zur Entropieänderung des Mediums Δs_{med} an. Diese zu R und Δs_{tot} verwandte Größe unterscheidet sich von R nur durch den fehlenden Randterm B aus Gleichung (2.34).

$$\begin{aligned}\Delta s_{tot} &= \Delta s_{med} + \Delta s_{sys} \\ R &= \Delta s_{med} + B.\end{aligned}\tag{2.36}$$

Für eine verständliche Darstellung folgt zunächst eine Betrachtung der Mittelwerte der drei Größen (Abb. 2.21).

Hierfür wurden die Ergebnisse der Datensätze 1-4 in die Teilschaubilder Abb. 2.21A-D eingezeichnet. In der oberen Hälfte eines jeden Teilschaubildes sind die Mittelwerte in Vielfachen von k_B über die ausgewertete Länge der Trajektorien in Halbperioden dargestellt. Die Mittelwerte von R sind hierbei jeweils mit Kreisen, die von Δs_{tot} mit einem x und die von Δs_{med} mit einem + markiert. Für R und Δs_{tot} wurde der Farbcode des entsprechenden Datensatzes (siehe Tabelle 2-1 auf Seite 53), für Δs_{med} immer grau gewählt.

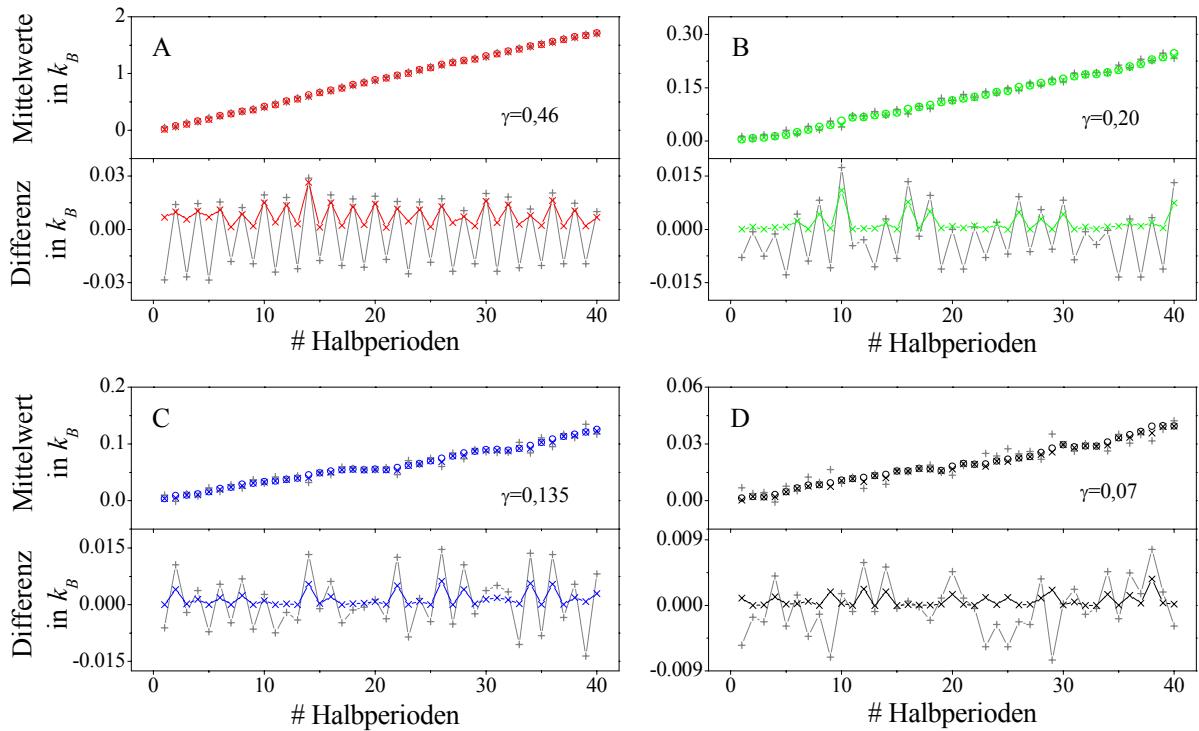


Abb. 2.21 Mittelwerte von R (o), Δs_{tot} (x) und Δs_{med} (+) und ihre Differenzen für die Datensätze aus Tabelle 2-1. Die obere Hälfte jedes Teilschaubildes A-D zeigt die Mittelwerte der 3 Größen in k_B über die Länge der Trajektorien in Halbperioden für die Datensätze 1-4. R und Δs_{tot} sind dem Datensatz entsprechend farbcodiert, während Δs_{med} immer in grau gehalten ist. In der unteren Hälfte jedes Teilschaubildes sind jeweils die Differenzen $\langle R - \Delta s_{tot} \rangle$ (farbcodiert mit x) und $\langle R - \Delta s_{med} \rangle$ (grau mit +) dargestellt. Die Unterschiede der Mittelwerte sind für alle Datensätze sehr gering und im Fall von $\langle R - \Delta s_{tot} \rangle$ immer positiv.

Die untere Hälfte der Teilschaubilder zeigt die Differenzen zwischen R und den beiden Entropiewerten ebenfalls als Vielfaches von k_B über die ausgewertete Länge der Trajektorien. Im bekannten Farbcode des Datensatzes und mit einem x für die tatsächlich ausgewerteten Längen erkennt man $\langle R - \Delta s_{tot} \rangle$. $\langle R - \Delta s_{med} \rangle$ ist erneut in grau und mit einem + versehen dargestellt. Aufgrund der begrenzten Statistik wurde die ausgewertete Länge auf 40 Halbperioden beschränkt (vgl. Abb. 2.13).

Zunächst fällt auf, dass die Mittelwerte der 3 unterschiedlichen Größen für alle Datensätze und für alle Trajektorienlängen sehr ähnlich sind. Um Aussagen über die Unterschiede zu machen, muss man daher die unteren Graphen der 4 Teilschaubilder betrachten. Nach Gleichung (2.34) und (2.35) sollten sich sowohl für $R - \Delta s_{tot}$ als auch für $R - \Delta s_{med}$ bei einem festen Endzeitpunkt $\tau = t$ der Trajektorien genau zwei mögliche Ergebnisse (für Endzustand 0 oder Endzustand 1) mit jeweils einer exakt definierten Wahrscheinlichkeit ergeben. Der Mittelwert dieser Differenzen für diesen Zeitpunkt als auch für die Zeitpunkte $\tau = t + nT_{mod}$ ist exakt definiert und konstant für ganzzahlige n und die Periodendauer T_{mod} . In unserer Auftragung bedeutet dies einen festen Wert für die Differenz bei einer ungeraden Anzahl an Halbperioden und einen zweiten Wert bei einer geraden Anzahl an Halbperioden, je für $\langle R - \Delta s_{tot} \rangle$ und $\langle R - \Delta s_{med} \rangle$ pro Datensatz. Für den Datensatz 1 (Abb. 2.21A) entsprechen die experimentellen Ergebnisse den theoretischen Erwartungen. $\langle R - \Delta s_{tot} \rangle$ springt zwischen ca. 0 und $0,015k_B$ je nach Länge der Trajektorien und $\langle R - \Delta s_{med} \rangle$ bewegt sich zwischen $-0,03$ und $0,015k_B$. Die Abweichungen von der theoretischen Erwartung entsprechen den Abweichungen der experimentell bestimmten Aufenthaltswahrscheinlichkeiten $p_n(\tau)$ (vgl. Kapitel 2.4.3.1) von der exakten Lösung der Mastergleichung (2.25).

Dies ist einmal mehr ein statistisches Problem. Geht man davon aus, dass die absoluten Schwankungen bei der Bestimmung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten unabhängig von der Modulationstiefe γ sind, dann erklärt dies das gute Ergebnis des Datensatzes 1 mit seinen 2000 Messungen. Weiterhin bedeuten gleiche absolute Schwankungen einen größeren relativen Beitrag bei kleinen Modulationstiefen und damit eine schlechtere Übereinstimmung. Der Datensatz 4 mit der kleinsten Modulationstiefe von $\gamma = 0,07$ zeigt die größten Abweichungen. Die Unterschiede der Mittelwerte sind unabhängig vom Mittelwert selbst. Für größere Mittelwerte, sprich für längere Trajektorien, wird der Einfluss der Randterme daher immer geringer. Im Grenzfall unendlich langer Trajektorien fallen alle 3 Größen zusammen.

$\langle R - \Delta s_{tot} \rangle$ ist für alle Datensätze und alle Auswertelängen niemals kleiner als Null und erfüllt damit die Anforderungen an die Entropie eines relaxierenden Systems ohne äußere Manipulation. Im Gegensatz dazu kann $\langle R - \Delta s_{med} \rangle$ positive und negative Werte annehmen.

Für eine Trajektorie endlicher Länge lassen sich die eindeutig unterschiedlichen Größen R , Δs_{tot} und Δs_{med} experimentell bestimmen. Die Differenzen der Mittelwerte eines Ensembles von Trajektorien $\langle R - \Delta s_{tot} \rangle$ und $\langle R - \Delta s_{med} \rangle$ hängen nur von den Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des Endzeitpunktes $p_n(t)$ bzw. $p_n^s(t)$ und nicht von der tatsächlichen Länge der Trajektorien ab und sind im Allgemeinen nicht Null.

Trotz der Unterschiede gilt nach (2.14) und (2.21)

$$\left\langle \exp\left(-R/k_B\right) \right\rangle = 1 \quad \text{und} \quad \left\langle \exp\left(-\Delta s_{tot}/k_B\right) \right\rangle = 1$$

für das gleiche Ensemble ausreichend vieler Trajektorien. Dies wurde in Kapitel 2.4.2.1 für R erfolgreich getestet.

Abb. 2.22 zeigt die nichtlinearen Mittelwerte von R/k_B (o), $\Delta s_{tot}/k_B$ (x und Linien) und $\Delta s_{med}/k_B$ (+ und Linien) über die Trajektorienlänge der 4 Datensätze. Die zur Gesamtentropie und zu R gehörigen Werte sind in der Farbe des jeweiligen Datensatzes, die zu Δs_{med} gehörigen immer in grau in das entsprechende Teilschaubild eingetragen. Erneut wurde die Auswertung auf Trajektorien mit einer maximalen Länge von 40 Halbperioden beschränkt (vgl. Kapitel 2.4.2.1).

Wie schon mittels Abb. 2.12 diskutiert, ist das integrale Fluktuationstheorem für R erfüllt. Die Abweichungen von Eins des Datensatzes 1 in Teilschaubild A für lange Trajektorien wurden durch die begrenzte Statistik erklärt. Die Werte $\langle \exp(-\Delta s_{tot}/k_B) \rangle$ sind für alle Datensätze und für alle Trajektorienlängen beinahe identisch mit $\langle \exp(-R/k_B) \rangle$ und das integrale Fluktuationstheorem nach Gleichung (2.21) ist demnach auch für diese Größe erfüllt.

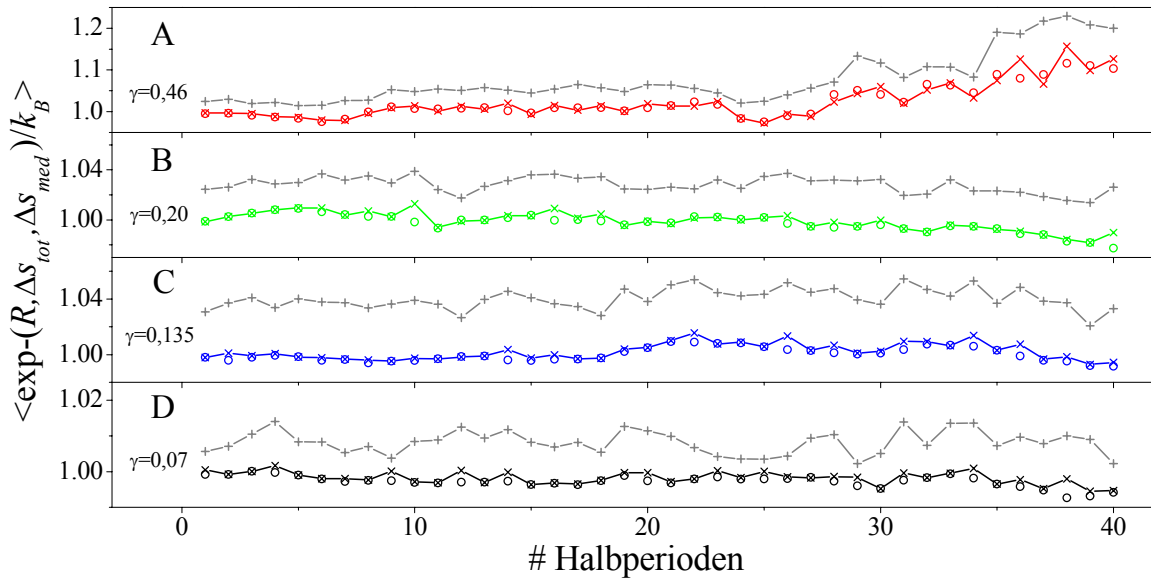


Abb. 2.22: Das integrale Fluktuationstheorem für Δs_{tot} . Die Teilschaubilder A-D zeigen den nichtlinearen Mittelwert von Δs_{tot} (x und Linie), R (o), und Δs_{med} (+ und Linie) dividiert durch k_B über die Länge der ausgewerteten Trajektorien in Halbperioden der Datensätze 1-4. $\langle \exp(-\Delta s_{tot} / k_B) \rangle$ und $\langle \exp(-R / k_B) \rangle$ (jeweils den Datensätzen entsprechend farbcodiert) haben einen nahezu identischen Verlauf und erfüllen das integrale Fluktuationstheorem, während $\langle \exp(-\Delta s_{med} / k_B) \rangle$ (jeweils in grau eingezeichnet) deutlich oberhalb der beiden anderen Kurven liegt.

Obschon der Mittelwert der Änderung der Mediumsentropie nach Abb. 2.21 ein zu R und Δs_{tot} sehr ähnliches Verhalten aufweist, verläuft das Mittel der Exponentialfunktion $\langle \exp(-\Delta s_{med} / k_B) \rangle$ (Abb. 2.22A-D in grau) hingegen deutlich oberhalb der beiden anderen Kurven für alle Datensätze und für alle hier ausgewerteten Trajektorienlängen. Erwartungsgemäß erfüllt diese Größe keine zu (2.14) oder (2.21) vergleichbare Relation. Dies soll illustrieren, dass die Mittelung über eine Exponentialfunktion auch bei kleinen Abweichungen zwischen den Exponenten durchaus deutlich abweichende Ergebnisse produzieren kann. Um ein identisches Resultat der Mittelung für zwei verschiedene Größen zu erhalten, muss ein leicht geänderter Mittelwert durch eine entsprechend geänderte Verteilung ausgeglichen werden. Für Trajektorien endlicher Länge ist das nach den Ergebnissen dieses Experiments für R verglichen mit Δs_{tot} der Fall, jedoch nicht für R verglichen mit Δs_{med} .

Es bleibt festzuhalten, dass die für einzelne Trajektorien endlicher Länge verschiedenen Größen R und Δs_{tot} bei einer Mittelung über das gleiche Ensemble die Fluktuationstheoreme

$$\left\langle \exp\left(-R/k_B\right) \right\rangle = 1 \quad \text{und} \quad \left\langle \exp\left(-\Delta s_{tot}/k_B\right) \right\rangle = 1$$

exakt erfüllen. Dies wurde in diesem Kapitel experimentell bestätigt.

2.4.3.4 Die Verteilungen von Δs_{tot}

Analog zu Kapitel 2.4.2.2 erfolgt die Diskussion der Verteilungen für ein stark getriebenes System anhand kurzer Trajektorien des Datensatzes 1. In Abb. 2.23 sind die zu Abb. 2.14 vergleichbaren Verteilungen von Δs_{tot} in Einheiten von k_B abgebildet. Trajektorien von der Länge 1 Halbperiode, von 2, 4, 6, 8 bzw. 12 Halbperioden sind in den Teilbildern A bis F eingezeichnet. Für kurze Auswertelängen bilden sich Maxima aus, die für lange Trajektorien in einer gaußähnlichen Funktion verschwinden.

Der in Kapitel 2.4.3.2 ausführlich erklärte Unterschied zwischen R und Δs_{tot} führt zu leicht geänderten Verteilungen der beiden Größen, die vor allem für die kürzesten Trajektorien deutlich an den Lagen der Peaks erkennbar sind. Abhängig vom Endzustand wird von jedem R ein bestimmter Wert abgezogen oder dazugezählt, um Δs_{tot} zu erhalten. Dadurch wird jeder Peak der Verteilungen aus Abb. 2.14 in zwei, in diesem Fall unterschiedlich gewichtete Maxima aufgespalten. Besonders gut ist dies anhand der Trajektorien ohne jeden Sprung ersichtlich, die sich für das zentrale Maximum von R verantwortlich zeigen. Die unterschiedliche Wichtung der beiden höchsten Peaks in den Teilschaubildern A und B ist auf die unterschiedlichen Werte der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten p_0 und p_1 nach einer Halbperiode, verglichen mit denen nach zwei Halbperioden, zurückzuführen. Die ohnehin weniger stark ausgeprägten seitlichen Peaks sind durch die Aufspaltung schlechter zu erkennen als bei den entsprechenden Verteilungen von R .

Wie erwartet zeigen die Histogramme von Δs_{tot} für kurze Trajektorien eine deutliche Abweichung von einer Gaußfunktion, um für längere Trajektorien immer gaußähnlicher zu werden. Eine Bewegungsgleichung ähnlich zu (2.31) konnte für die Gesamtentropie nicht gelöst werden.

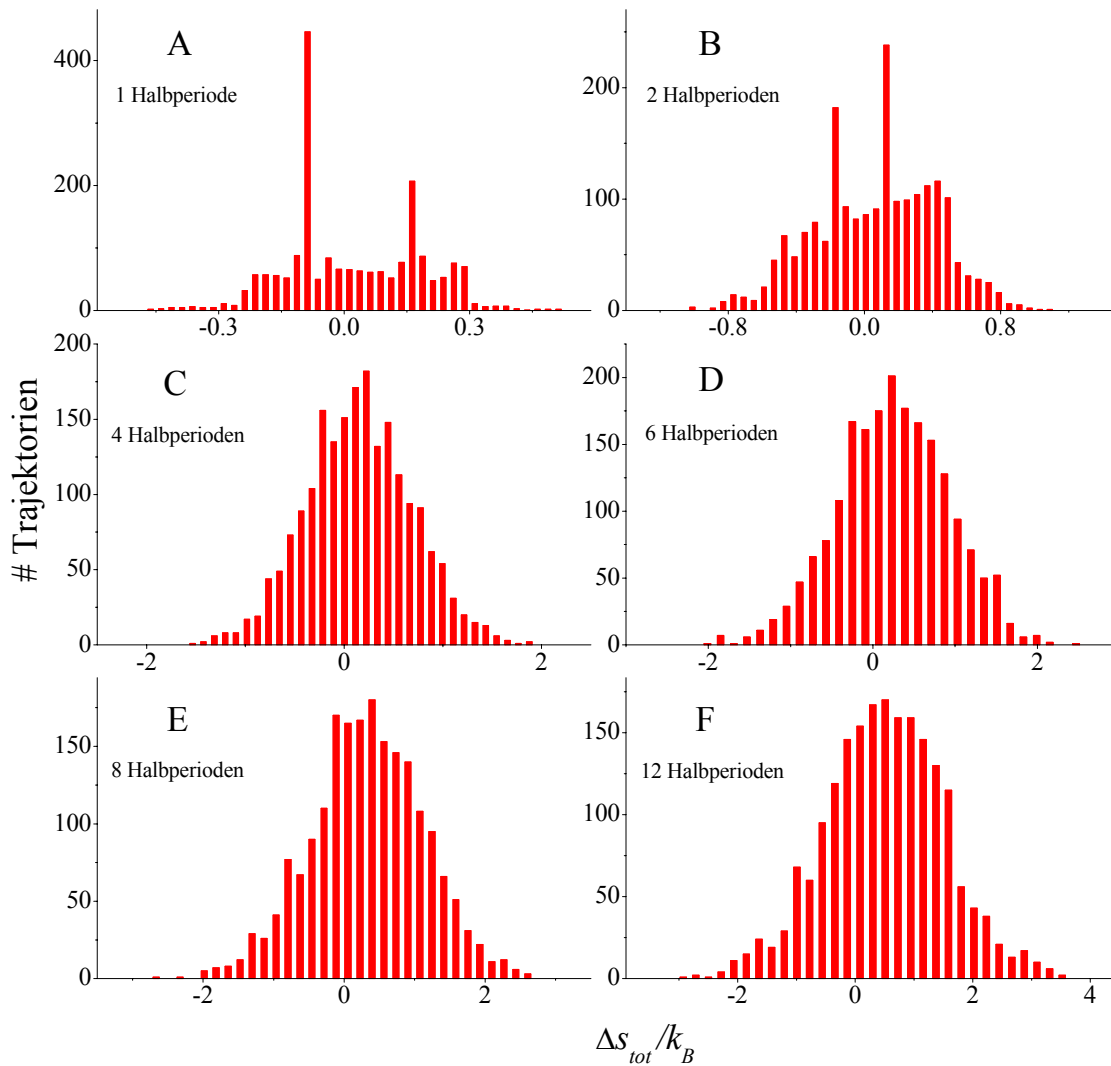


Abb. 2.23: Verteilungen von Δs_{tot} (rot) für kurze Trajektorien des Datensatzes 1 mit $\gamma = 0,46$. Aufgetragen ist die Häufigkeit der Ereignisse eines Wertes $\Delta s_{tot}/k_B$ für Trajektorien der Längen (A) 1 Halbperiode, (B) 2 Halbperioden, (C) 4 Halbperioden, (D) 6 Halbperioden, (E) 8 Halbperioden und (F) 12 Halbperioden. Wie in Abb. 2.14 kann man in den Teilbildern der kürzesten Trajektorienlängen eine Peakstruktur erkennen, die mit zunehmender Länge in der breiter werdenden Verteilung untergeht. Der weiter oben erklärte Unterschied zwischen R und Δs_{tot} zeigt sich in der Aufspaltung des Maximums bei Null in zwei deutlich getrennte Häufungspunkte. Die seitlichen Peaks, verursacht durch das Messprotokoll, werden ebenfalls aufgespalten und sind dadurch, verglichen mit den Verteilungen von R , weniger stark ausgeprägt.

2.4.3.5 Das Fluktuationstheorem nach Crooks

Für die Gesamtentropie Δs_{tot} schreibt sich das FTC nach Gleichung (2.22). Erneut wird ein symmetrisches Protokoll ($\tilde{\lambda}(\tau) = \lambda(t - \tau) = \lambda(\tau)$) gewählt, um den Vorwärts- und den Umkehrprozess durch identische Messungen bestimmen zu können. Verglichen mit dem Vorgehen in Kap. 2.4.2.3 besteht der Unterschied darin, dass der Endzustand des Vorwärtsprozesses per Definition kein Gleichgewichtszustand sein muss. Da für Crooks der Endzustand des Vorwärtsprozesses bzw. des Umkehrprozesses der Anfangszustand des jeweils anderen ist, bedeutet dies für ein symmetrisches Protokoll: Sowohl Anfangs- als auch Endzustand liegen im „gleichen“ Nichtgleichgewicht. Für die Trajektorien muss demnach $p_n(0) = p_n(t)$ gelten. Dies impliziert, dass der Einschwingvorgang von p_n beim Start der Auswertung beendet ist.

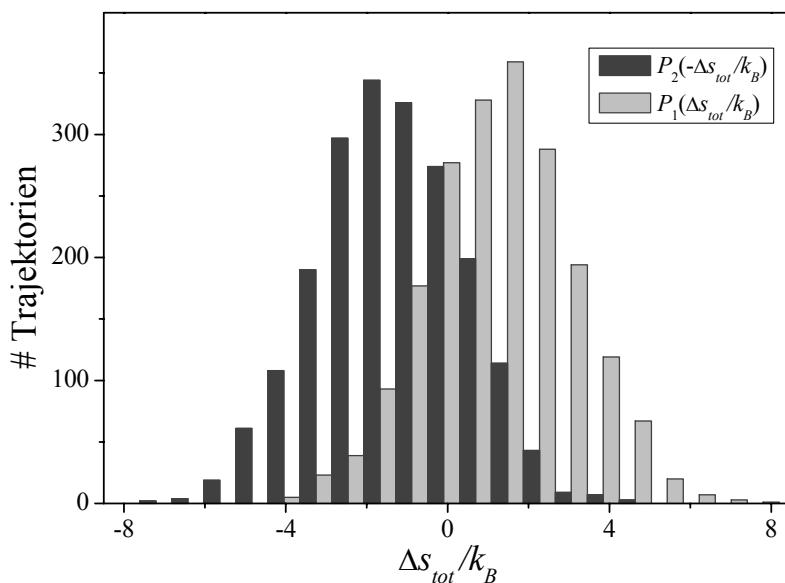


Abb. 2.24: Beispiel der Verteilungen zur Verifizierung des FTC für $\Delta s_{tot}/k_B$ von jeweils 2000 Trajektorien mit einer Länge von 19 Perioden. $P_1(\Delta s_{tot}/k_B)$ ist in hellgrau, $P_2(-\Delta s_{tot}/k_B)$ in dunkelgrau gehalten.

Für unser TLS bedeutet dies konkret ein Abwarten von 9,25 Perioden nach Beginn der Modulation (was bei den gewählten Raten reichlich Zeit für den Einschwingvorgang lässt), Akquisition einer bestimmten Anzahl von Perioden für den Vorwärtsprozess und die anschließende Messung des Umkehrprozesses identischer Länge. Angewandt auf den Datensatz 1 aus Tabelle 2-1 (Seite 53) ergeben sich für dieses symmetrische Protokoll jeweils 2000 Trajektorien, für deren Verteilungen

$$\frac{P_1\left(\frac{\Delta s_{tot}}{k_B}\right)}{P_2\left(-\frac{\Delta s_{tot}}{k_B}\right)} = \exp\left(+\frac{\Delta s_{tot}}{k_B}\right) \quad (2.37)$$

gilt, wobei die Indizes 1 und 2 symbolisch für die beiden Prozesse und jeweils für ein Ensemble von Trajektorien stehen. Abb. 2.24 zeigt diese beiden Wahrscheinlichkeitsverteilungen mit einer ausgewerteten Trajektorienlänge von 19 Perioden in hellgrauen ($P_1\left(\frac{\Delta s_{tot}}{k_B}\right)$) bzw. dunkelgrauen Balken ($P_2\left(-\frac{\Delta s_{tot}}{k_B}\right)$).

Analog zu Abb. 2.15 wird nun der Überlappungsbereich der beiden Histogramme verglichen. Nach Gleichung (2.37) muss für diesen Bereich der Logarithmus des Quotienten aus der Höhe des hellgrauen und der Höhe des dunkelgrauen Balkens für jeden Wert von $\Delta s_{tot}/k_B$ eben diesem Wert entsprechen. Die Binbreite wurde so gewählt, dass innerhalb des Überlapps 12 Balken, folgerichtig 12 Messwerte zur Verfügung stehen. Der Logarithmus des Quotienten von $P_1\left(\frac{\Delta s_{tot}}{k_B}\right)$ und $P_2\left(-\frac{\Delta s_{tot}}{k_B}\right)$ dieses Beispiels ist in Abb. 2.25A über die Position des Messwertes in rot aufgezeichnet. Die zugehörige Fitgerade in dunklem gelb weist eine Steigung von $1,00 \pm 0,02$ auf und das FTC ist für diesen Satz von Trajektorien exakt erfüllt.

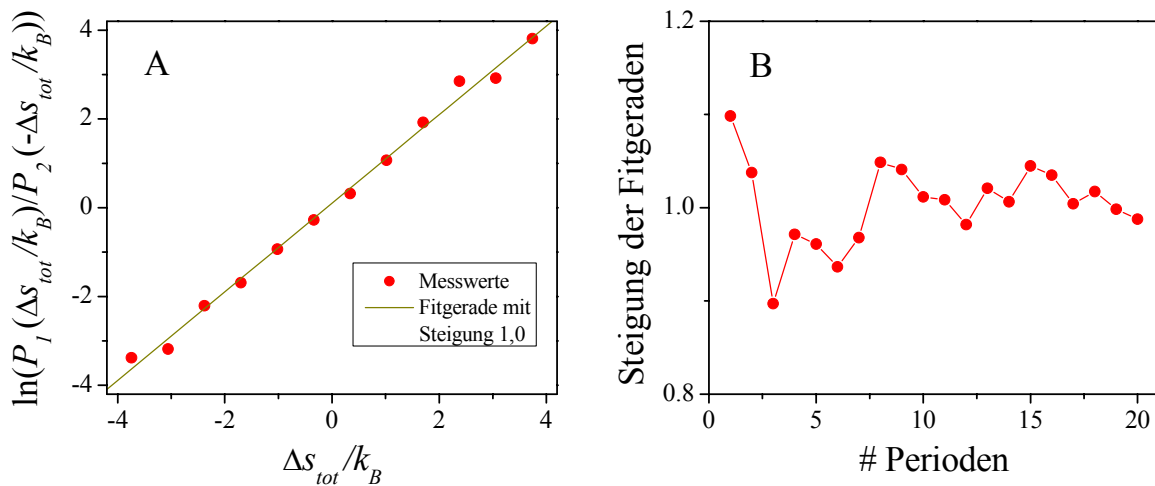


Abb. 2.25: In A sind die logarithmierten Werte der Quotienten der Wahrscheinlichkeiten über $\Delta s_{tot}/k_B$ für das Beispiel aus Abb. 2.24 in rot aufgetragen. In dunkelgelb ist die Fitgerade mit einer Steigung von $1,00 \pm 0,02$ eingezeichnet. B zeigt die Steigungen der Fitgeraden für weitere ausgewertete Trajektorienlängen des Datensatzes 1. Die unterschiedlichen Trajektoriensätze erfüllen die theoretische Forderung des FTC nach einer Steigung von 1.

In Abb. 2.25B sind die Steigungen der Fitgeraden über die Länge der ausgewerteten Trajektorien in # Perioden des Datensatzes 1 dargestellt. Aufgrund der Form der Verteilungen zeigen die Trajektorien mit kurzen Auswertelängen eine etwas schlechtere Übereinstimmung mit dem theoretisch erwarteten Wert von 1.

Dennoch erreicht im gesamten Bereich die Abweichung maximal 10%. Das Mittel der 20 angegebenen Steigungswerte beträgt 1,00 bei einer Standardabweichung von 0,04. Damit erfüllt die Größe Δs_{tot} neben dem integralen FT auch das restriktivere FT nach Crooks.

2.4.3.6 Bedeutung der Entropie

Eine wichtige Frage ist: Kann man eine komplette thermodynamische Betrachtung des gewählten Systems durchführen? Dies würde den hier als Entropie bezeichneten Größen eine tatsächliche physikalische Bedeutung zukommen lassen.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Bedeutung der Definition der Entropie entlang einer Trajektorie nach Seifert [63] und damit einer Entropie im Nichtgleichgewicht nicht unumstritten ist [71,72] und eine experimentelle Untersuchung von mehr als der nackten Definition sehr wünschenswert wäre. Im Fall dieses TLS würde das eine Verknüpfung der Entropie des Mediums und des Systems mit absorbierten und emittierten Photonen bedeuten. Dies wird jedoch nicht gelingen.

Betrachtet man den Fall des dynamischen Gleichgewichts, so werden dort kontinuierlich Photonen absorbiert und im Fall des Hellzustandes auch emittiert, ohne einen Übergang zwischen dem Hell- und dem Dunkelzustand zur Folge zu haben. Dennoch ändern sich System- und Mediumsentropie nur bei Übergängen zwischen den beiden beobachtbaren Zuständen. Die Gesamtentropie einer Trajektorie im dynamischen Gleichgewicht und die stochastische Größe R ändern sich dagegen nicht einmal während eines Übergangs, solange sich das System im dynamischen Gleichgewicht befindet.

Der Grund hierfür ist die Natur des Photochromen Zentrums, das als effektives TLS aufgefasst wird. Wie aber anhand von Abb. 2.5 erklärt, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um ein Vier-Niveau-System, von dessen vier Zuständen aber lediglich zwei beobachtbar sind. Es existieren nicht nur ein Hin- und Rückprozess zwischen dem Hell- und Dunkelzustand, sondern es bildet sich ein Ringprozess mit mehr als zwei beteiligten Zuständen aus (stationärer Nichtgleichgewichtszustand), der auch im dynamischen Gleichgewicht zu stetigen Entropieänderungen führt. Um diese Entropieänderungen messen zu können, muss man allerdings alle beteiligten Zustände eindeutig unterscheiden können und das ist bisher in diesem System nicht möglich.

Die Reduzierung auf ein effektives TLS verhilft daher zu einer sehr schönen experimentellen Bestätigung der theoretischen Erwartung, kann aber darüber hinaus keine Aussage über die physikalische Bedeutung der zentralen Größe, der Entropie, des tatsächlich verwendeten Systems machen. Ein experimentell zugängliches System für eine solche Untersuchung zu finden sollte sich als äußerst gewinnbringend erweisen.

Kapitel 3 : Der Antennenkomplex LHC-II

Der zweite Teil der Arbeit widmet sich der Spektroskopie an einzelnen Lichtsammelkomplexen (englisch „Light-Harvesting Complexes“) des Typs LHC-II. Nach einer Einführung in die Photosynthese und den aktuellen Stand der Forschung wird auf die Präparation der Proben eingegangen. Einem Kapitel über die Auswertetechnik schließen sich die Ergebnisse der Fluoreszenz- und Emissionsspektroskopie an monomerischen und trimerischen Komplexen an.

3.1 Einführung

Photosynthese ist die Umwandlung von Lichtenergie in chemisch gebundene Energie innerhalb verschiedener Bakterienarten, Algen und Pflanzen. Pflanzliche Zellen besitzen hierfür spezielle Photosyntheseorganellen, die Chloroplasten. In Abb. 3.1 ist ein Chloroplast und sein innerer Aufbau schematisch abgebildet. Zwei geschlossene Membranen trennen das Zellinnere (Cytoplasma) vom Inneren der Chloroplasten (Stroma). Innerhalb der Grenzmembranen befindet sich eine weitere Struktur, die Thylakoidmembran. Dieses komplizierte, in das Stroma eingebettete Gebilde, besteht vermutlich aus einer einzigen Membran [73] und gliedert sich üblicherweise in zwei Bereiche: Die Stapel nennt man Granathylakoide (ein einzelner Beutel ist ein Granum), die großflächigen Verbindungen dazwischen heißen Stromathylakoide. Das durch die Thylakoidmembran eingeschlossene Volumen ist das Lumen.

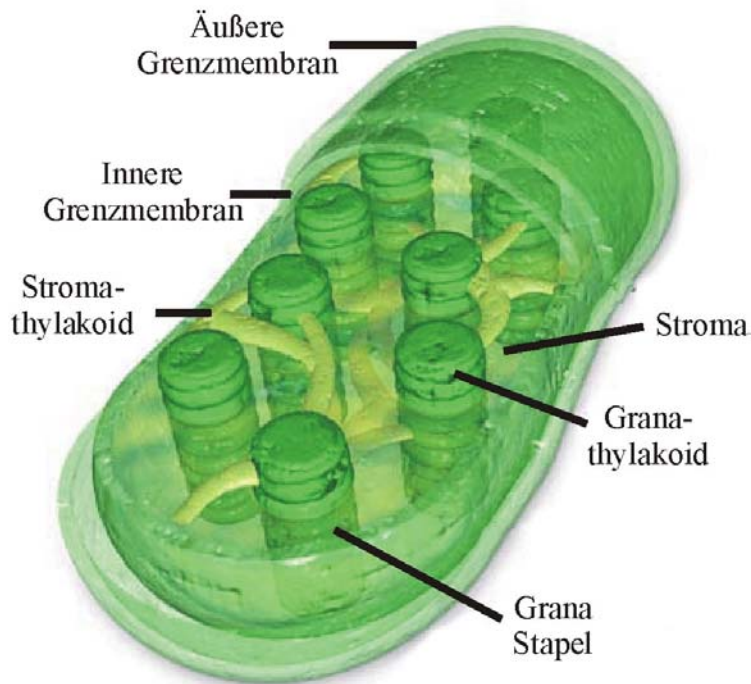


Abb. 3.1: Chloroplast einer grünen Pflanze. Die Grenzmembranen trennen das Innere des Chloroplasten (Stroma) von der Zelle. In das Stroma ist die Thylakoidmembran eingebettet, eine komplizierte Struktur aus gestapelten Bereichen (Granathylakoide) und den flächigen Membranverbindungen dazwischen, den Stromathylakoiden [74].

Die Thylakoidmembran ist der Ort der photosynthetischen Lichtreaktionen. Umgeben von den Membranlipiden sind die Hauptkomplexe der Photosynthese, die beiden Photosysteme I und II (PS-I und PS-II), in die Membran integriert [75].

Die absorbierte Lichtenergie wird in eine elektronische Anregung umgewandelt und im Falle des PS-II zur Spaltung von Wasser, im Falle von PS-I zur Reduktion von NADP^+ zu NADPH verwendet. Abb. 3.2 zeigt das sogenannte Z-Schema dieser beiden miteinander gekoppelten Prozesse. P680 und P700 stehen für die Wellenlängen der unterschiedlichen Absorptionsmaxima der Photosysteme.

Nach Absorption eines Photons im PS-II und der anschließenden Ladungstrennung findet ein Elektronentransport zum PS-I statt. Das angeregte PS-I kann die Elektronen zur Reduktion von NADP^+ zu NADPH verwenden. Der durch die beiden Prozesse quer zur Membran aufgebaute Protonengradient dient der ebenfalls in der Thylakoidmembran eingebetteten ATPase zur Produktion von ATP aus ADP. Eine ausführliche Darstellung der Photosynthesezyklen findet sich in Ref. [76]. Im Folgenden beschränkt sich diese Einführung auf das Photosystem II und seine Bestandteile.

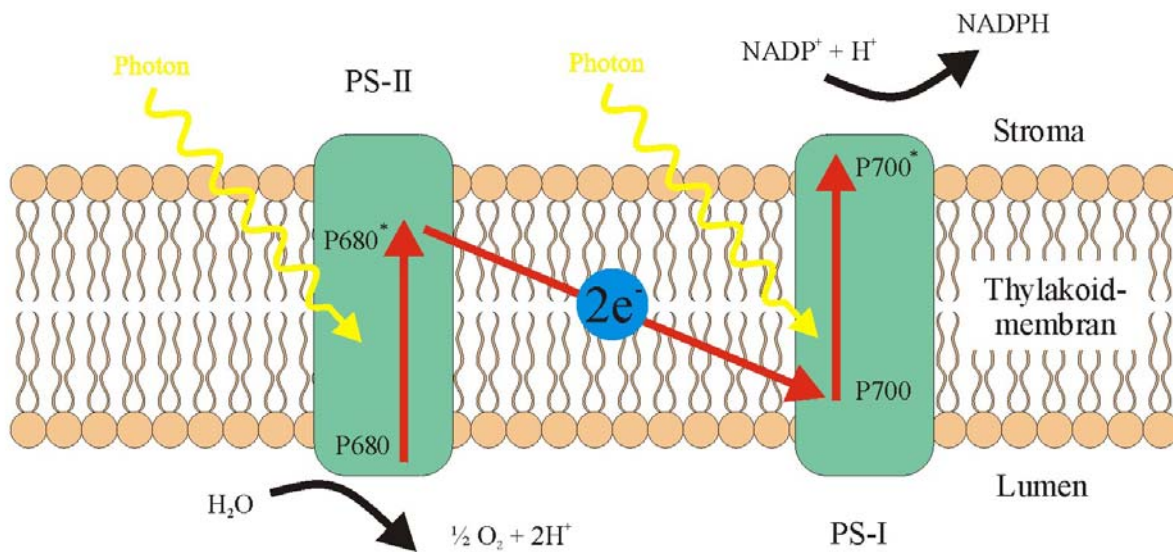


Abb. 3.2: Z-Schema des Tandems PS-II/PS-I. Die Anregung des PS-II führt zur Spaltung von Wasser. Über eine Kette von Redoxreaktionen gelangen die Elektronen zum PS-I, das damit im angeregten Zustand NADP⁺ zu NADPH reduzieren kann.

Das PS-II setzt sich aus zahlreichen Proteinen zusammen und wird in der Literatur oftmals als PS-II-Superkomplex bezeichnet. Es konnte als symmetrisches Dimer isoliert werden und besteht aus dem sogenannten Kernkomplex („Core“) sowie den minoren und majoren Antennen. Abb. 3.3 zeigt eine schematische Darstellung eines Teils des PS-II Dimers.

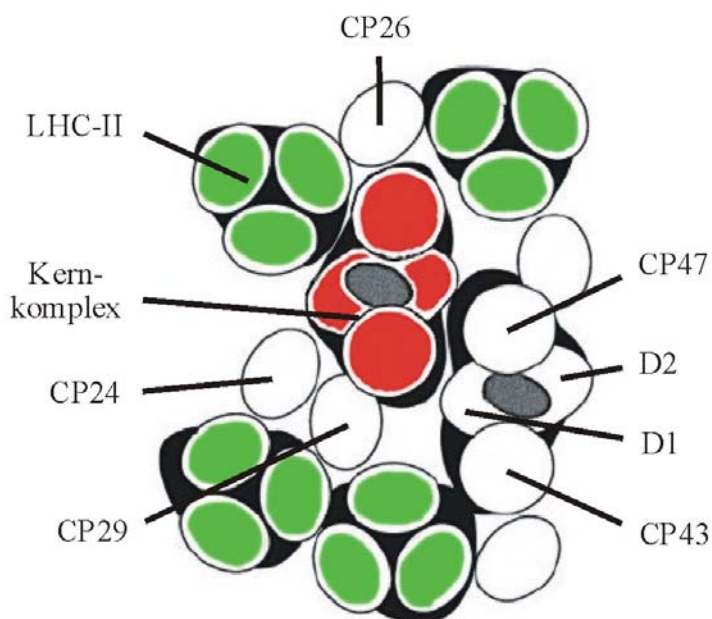


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des PS-II. An den Kernkomplex (in rot), bestehend aus den Proteinen D1 und D2 des Reaktionszentrums sowie den internen Antennen CP47 und CP43, schließen sich die minoren (CP24, CP26, CP29) und die majoren (LHC-II in grün) Antennenkomplexe an.

Die Ladungstrennung erfolgt in den Proteinen D1 und D2 des Reaktionszentrums, die zusammen mit den internen Antennenkomplexen CP47 und CP43 den Kernkomplex (in rot) bilden. Die eingebetteten Chlorophyllmoleküle sind vom Typ Chl *a*. Eine detaillierte Beschreibung der Struktur des PS-II Kernkomplexes ist in Ref. [77] zu finden. Weiter außen schließen sich die minoren Antennenkomplexe CP24, CP26 und CP29 an, die sowohl Chl *a* als auch Chl *b* binden und in monomerischer Form vorliegen. Die majoren, Chl *a/b*-bindenden Antennenkomplexe LHC-II („Light-Harvesting Complex II“) befinden sich in trimerischer Form (Zusammenschluss dreier monomerischer Untereinheiten) am äußersten Rand des PS-II und sind in der Abbildung grün eingefärbt. Neben den 4 LHC-II pro PS-II gibt es Membranteile, die nur LHC-II in Aggregaten von 7 Trimeren enthalten [77-79]. Daraus ergibt sich ein Verhältnis von trimerischen LHC-II zu PS-II Dimeren von ca. 8:1 [80].

Die Hauptaufgabe der Antennenkomplexe, auch Lichtsammelkomplexe genannt, besteht in der Absorption des Sonnenlichtes und der Weiterleitung der Anregungsenergie an das Reaktionszentrum. Auf jedes Reaktionszentrum kommt eine Vielzahl von Antennen. Abb. 3.4 zeigt schematisch die Überführung der Anregungsenergie nach Absorption eines Photons zur energetischen Falle des Photosystems. Um diesen Energietransfer zum Reaktionszentrum effektiv zu halten, müssen die Transferzeiten zwischen den einzelnen Teilnehmern deutlich geringer als die der Konkurrenzprozesse, z.B. der Fluoreszenz sein. Transferzeiten zwischen den Antennen von einigen zehn Pikosekunden verglichen mit einer Fluoreszenzlebensdauer von einigen Nanosekunden einer isolierten Antenne [81] ergeben eine Effizienz von mehr als 95%.

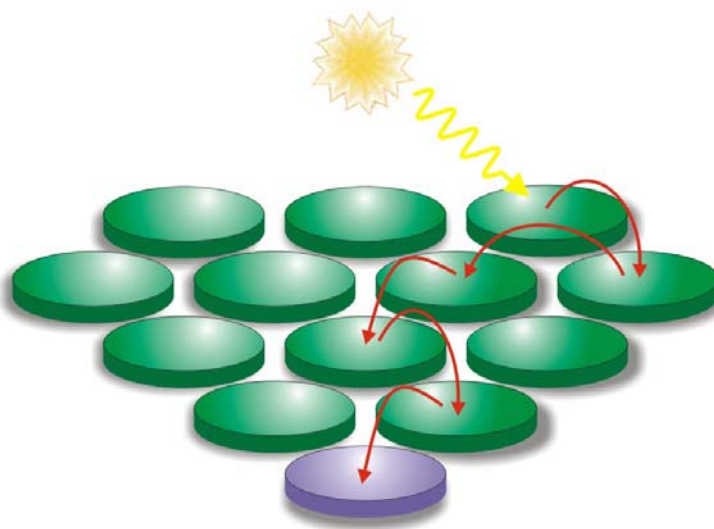


Abb. 3.4: Schema des Photosystem II. Eine Vielzahl an Lichtsammelkomplexen (grün) umgibt das Reaktionszentrum (violett). Die Anregungsenergie eines absorbierten Photons wird durch Transferprozesse zwischen den Antennen zur energetischen Falle, dem Reaktionszentrum, geführt.

Die große Zahl der Antennen pro Reaktionszentrum dient der Erhöhung des Wirkungsgrades der Photosynthese bei schwach einfallendem Licht. Bei starkem Sonnenlicht werden mehr Photonen absorbiert und es wird mehr Anregungsenergie aufgenommen als das Reaktionszentrum des PS-II verarbeiten kann. Ein Sättigungseffekt stellt sich ein. Die Umlagerung der majoren Lichtsammler LHC-II des PS-II hin zum PS-I führt zu einem effektiveren Abbau der für die Photosysteme gefährlichen Überschussenergie [82]. Dies illustriert die Flexibilität und Anpassungsfähigkeit des gesamten Photosyntheseapparates. Eine ausführliche Darstellung der strukturellen Aufgaben des LHC-II in der Thylakoidmembran findet sich in Ref. [83].

Die majoren Lichtsammler LHC-II stellen etwa ein Drittel aller Proteine der Thylakoidmembran und binden ca. 50% des in Pflanzen vorkommenden Chlorophylls. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die spektroskopischen Eigenschaften einzelner isolierter Komplexe diskutiert werden.

3.2 Die Struktur des LHC-II

In seiner natürlichen Umgebung bildet der Pigment-Protein-Komplexe LHC-II eine Trimerstruktur aus, einen Zusammenschluss dreier nahezu identischer Untereinheiten, den Monomeren. Sein Grundgerüst ist das Protein, eine kompliziert gefaltete Kette aus 232 Aminosäuren, in das an nichtkovalente Bindungsstellen die Pigmente (Chlorophylle und Carotinoide) eingebracht sind. Es existieren 3 in ihrer Abfolge der Aminosäuren leicht unterschiedliche Apoproteine, die in der Literatur mit Lhcb1-3 [84,85] bezeichnet werden.

Einen ersten großen Schritt zur Strukturaufklärung stellte die Untersuchung zweidimensionaler Kristalle mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie 1994 von Kühlbrandt et al. [20] dar, die zu Strukturdaten des LHC-II Trimers mit einer Auflösung von 3,4 Å führten. Hierbei konnte die Lage von ca. 80% der Aminosäuren, 12 Chl-Molekülen und zwei Carotinoiden bestimmt werden. Die Auflösung reichte jedoch nicht aus, um zwischen den Chlorophyllvarianten Chl *a* und *b* zu unterscheiden, die mit einem Verhältnis von ca. 1,3:1 vom LHC-II gebunden werden [86,87]. Da Chl *a* und *b* deutlich verschiedene spektroskopische Eigenschaften aufweisen, wurde versucht, die von Kühlbrandt vorgenommene phänomenologische Zuordnung der aufgelösten Chlorophylle, mit unterschiedlichen spektroskopischen und biochemischen Methoden zu ergänzen [23,88-91]. Dies führte zu vielen neuen, teilweise sich widersprechenden Erkenntnissen.

2004 gelang es Liu et al. [21] mittels Röntgenbeugung an dreidimensionalen Kristallen, zusammengesetzt aus Trimeren der Spinatpflanze, eine Verbesserung der Auflösung auf $2,72 \text{ \AA}$ zu erreichen. Dies ermöglichte die Bestimmung der Lage von 94% der Aminosäuren und die Lokalisierung von 14 Chlorophyllen und 4 Carotinoiden, sowie der entsprechenden Bindungsstellen pro monomerischer Untereinheit. Darüber hinaus konnte zwischen Chl *a* und *b* unterschieden und die Orientierung der Übergangsdipolmomente bestimmt werden. 2005 wurde die ebenfalls durch Röntgenbeugung ermittelte Struktur von Trimeren der Erbse mit einer Auflösung von $2,5 \text{ \AA}$ veröffentlicht [92] und eine sehr gute Übereinstimmung mit den Daten von Liu et al. [21] festgestellt.

Abb. 3.5 zeigt die Struktur eines Trimers mit Blickrichtung von der stromalen Seite auf die Membranoberfläche (Abb. 3.5A) und entlang der Thylakoidmembran (Abb. 3.5B). Neben den Chlorophyllen (in grün) und den Carotinoiden (in braun) ist das Proteingerüst (silbern) dargestellt. Für eine monomerische Untereinheit lässt es sich durch 3 transmembrane Helices, 2 kurze luminalen Helices, dem N-terminalen sowie dem C-terminalen Ende beschreiben. Der gesamte Komplex hat einen Durchmesser von ca. 7 nm bei einer Höhe von ungefähr 5 nm und ein Proteingewicht von ca. 80 kDa .

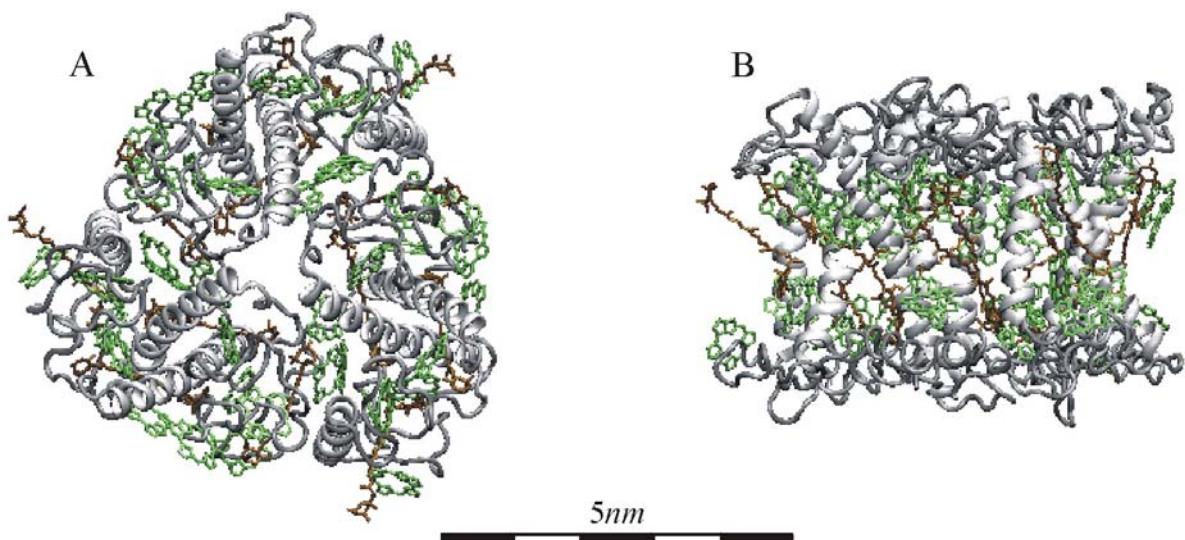


Abb. 3.5: Räumliche Struktur des LHC-II Trimers nach Liu [21] in Aufsicht auf die Membran von der stromalen Seite (A) sowie parallel zur Membran (B). Das Protein eines jeden Monomers (silbern) besteht aus 3 membranspannenden und 2 kurzen, sich im Lumen befindenden Helices. Pro Monomer sind 14 Chlorophylle (in grün) und 4 Carotinoide (in braun) in das Protein eingebaut.

3.2.1 Die Chlorophylle

Die Chlorophylle der Pflanzen sind zyklische Tetrapyrrole mit einem zentralen Magnesiumatom. Die strukturellen Unterschiede zwischen Chl *a* und *b* führen neben geänderten Bindungseigenschaften zu einem geänderten spektroskopischen Verhalten. So absorbiert in Methanol gelöstes Chl *a* bei 660nm und emittiert bei 671nm im Gegensatz zu Chl *b*, das Werte von 625nm und 645nm aufweist [93]. Da die Hauptaufgabe der Chlorophylle neben der Kanalisation der Anregungsenergie die Absorption des Lichtes ist, ermöglicht dies den Pflanzen aus einem erheblich größeren Bereich des Sonnenlichtes Energie aufzunehmen.

Von den 14 Chlorophyllmolekülen eines LHC-II Monomers wurden 8 als Chl *a* und 6 als Chl *b* identifiziert und bestätigen das Chlorophyllverhältnis von 1,3:1 [86,87]. Nach Liu [21] sind die jeweiligen Bindungsstellen spezifisch. Damit konnten die von Remelli [89] vorgeschlagenen gemischten Bindungsstellen, die statistisch mit Chl *a* oder *b* besetzt sind, nicht bestätigt werden.

Für eine übersichtliche Darstellung der Anordnung der Chlorophylle im LHC-II sind in Abb. 3.6 das Proteingerüst und die Carotinoide ausgespart. Abb. 3.6A zeigt die modellierten Pyrrolringe der Chlorophylle eines Trimers in einer Ansicht parallel zur Thylakoidmembran (Blickrichtung identisch zu Abb. 3.5B). Die Chlorophylle (Chl *a* in rot, Chl *b* in blau) sind in zwei Schichten (graue Balken in Abb. 3.6A), eine nahe dem Stroma und eine nahe dem Lumen, angeordnet. Die stromale Schicht besteht dabei je Monomer aus 5 Chl *a* und 3 Chl *b*, die luminal Schicht hingegen aus lediglich 3 Chl *a* und ebenfalls 3 Chl *b*.

In Abb. 3.6B ist die Darstellung noch einmal vereinfacht: Die Chlorophylle werden durch 3 Atome, das zentrale Magnesiumatom und zwei Stickstoffatome, repräsentiert. Hierbei gibt die Verbindungslinie zwischen den beiden Stickstoffatomen die Orientierung des Übergangsdipolmoments des tiefsten elektronischen Übergangs, des sogenannte Q_y -Übergangs, an. Das obere Teilbild zeigt die Chlorophylle nahe dem Stroma mit Blick von der stromalen Seite, das untere die nahe dem Lumen, ebenfalls mit Blick von der stromalen Seite. Die farbigen Ellipsen umschließen die Chlorophylle des gleichen Monomers. Die Bindungsstellen eines Monomers wurden analog zu Liu [21] nummeriert.

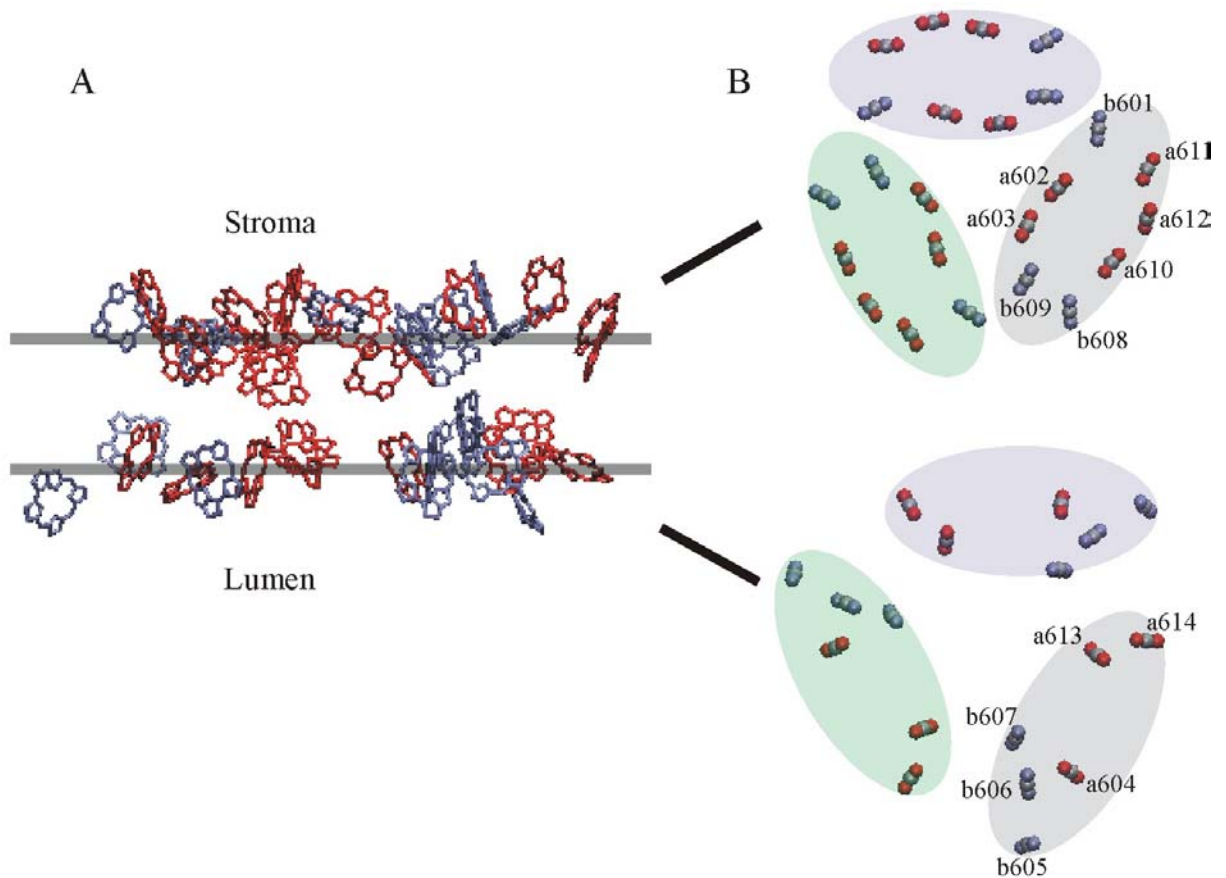


Abb. 3.6: Anordnung der Chlorophylle innerhalb eines LHC-II Trimers. A zeigt die Pyrrrolringe (rot für Chl a und blau für b) mit Blick parallel zur Thylakoidmembran. Die Chlorophylle können einer stromalen (mit 5 Chl a und 3 Chl b) und einer luminalen (mit je 3 Chl a und b) Schicht zugeteilt werden (markiert durch graue Linien). B ist die Darstellung der beiden Chlorophyllschichten jeweils mit Blick von der stromalen Seite auf die stromale (oberes Teilbild) und auf die luminale Schicht (unteres Teilbild). Die Chl sind nur noch durch das zentrale Magnesiumatom und zwei Stickstoffatome symbolisiert. Die Verbindungslinie zwischen den beiden Stickstoffatomen ist die Orientierung des Übergangsdipolmoments. Chlorophylle eines Monomers sind farbig unterlegt. Beispielsweise sind für ein Monomer die Bindungsstellen nach Liu [21] eingetragen.

Die Abstände der Magnesiumatome zweier benachbarter Chlorophylle innerhalb der einzelnen Schichten eines Monomers von ca. 11 \AA sind verglichen mit den Abständen zwischen den Schichten (ca. 14 \AA) relativ gering. Dies deutet auf eine Relaxation der Anregungsenergie zuerst innerhalb und anschließend zwischen den Chlorophyllschichten hin. Weiterhin sieht man, dass die Abstände ausgewählter Chlorophylle unterschiedlicher Monomere ähnlich den Abständen nächster Nachbarn innerhalb eines Monomers sind. Dies sollte zu durchaus sicht-

barer Kopplung zwischen den Untereinheiten führen. Da darüber hinaus auch sehr viele Chlorophylle am Rande des Trimers eingebaut sind, wird der Energietransfer zwischen dicht liegenden, benachbarten Trimeren möglich.

3.2.2 Die Carotinoide

Neben den 14 Chlorophyllen bindet jedes Monomer 4 Carotinoide. In Abb. 3.7 sind diese 4 Pigmente eines Monomers und zusätzlich dessen Chlorophylle mit Blickrichtung entlang der Membran eingezeichnet. Die beiden zentralen Carotinoide (in braun) konnten von Liu als Luteine identifiziert werden. Bei den zwei im Randbereich des Monomers gebundenen Carotinoiden handelt es sich um ein Neoxanthin (in purpur) und ein Carotinoid des Xanthophyllzyklus (in cyan). Damit ist an dieser Stelle eine gemischte Bindung der Formen Violaxanthin, Zeaxanthin und Antheraxanthin (Xanthophyllzyklus) bezeichnet [21].

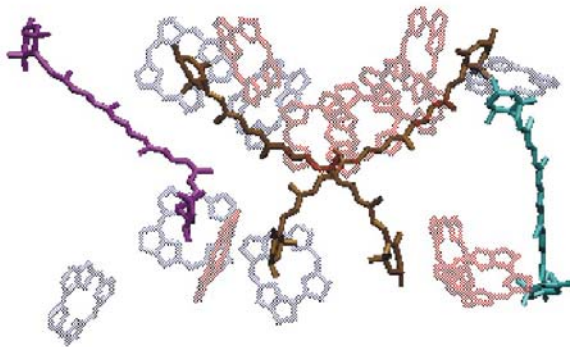


Abb. 3.7: Carotinoide eines Monomers mit Blickrichtung entlang der Membran. Braun sind zwei zentrale Luteine, purpur das Neoxanthin und cyan das Carotinoid des Xanthophyllzyklus.

Die Aufgaben der Carotinoide sind vielfältig. Durch die Absorption im Bereich um 500nm und der Weiterleitung dieser Energie schließen die Carotinoide die sogenannte Grünlücke der Chlorophylle, die bei dieser Wellenlänge keine Absorption zeigen. Weiterhin sind die beiden Luteine essentiell für die Stabilität des Komplexes. Eine Faltung des LHC-II ohne diese Pigmente ist nicht möglich [94]. Eine dritte wichtige Funktion ist der effektive Schutz der Komplexe. Chlorophylle im Triplettzustand, kombiniert mit Sauerstoff, führen zu einer Bildung von extrem reaktivem Singulett-Sauerstoff. Dieser kann Chlorophylle und damit den gesamten Komplex durch Oxidation zerstören. Eine Schutzfunktion der Carotinoide besteht im Quenchen des Triplettzustandes der Chlorophylle. Darüber hinaus schlägt Liu ein Quenchingmodell für Überschussenergie vor, das sowohl Chlorophylle als auch Carotinoide verschiedener Trimere benötigt [21].

3.2.3 Spektroskopie an LHC-II

Werden die LHC-II aus der Thylakoidmembran extrahiert und mit Licht angeregt, so kann die absorbierte Energie nicht mehr an das Reaktionszentrum abgegeben werden. Einer der Konkurrenzprozesse der Energieweiterleitung ist die Fluoreszenz. In der Thylakoidmembran hat dieser eine deutlich größere Lebensdauer als der Energietransfer zum Reaktionszentrum. Durch das Fehlen eines Akzeptors senden isolierte LHC-II nach Anregung charakteristische Fluoreszenzphotonen aus. In Abb. 3.8 sind die Spektren der Absorption und Emission in Detergenz gelöster LHC-II Trimere in Wasser bei Raumtemperatur abgebildet. Aufgetragen ist die auf eins normierte relative Absorption (in rot) bzw. Emission (in schwarz) der Komplexe über die Wellenlänge in nm . Das Maximum der Emissionskurve bei $680nm$ ist vornehmlich die Fluoreszenz der Chl a und zeugt vom Energietransfer innerhalb des Komplexes. In der Absorptionskurve sind die charakteristischen Maxima sowohl den elektronischen Übergängen der Chl a ($435nm$ und $670nm$) als auch denen der Chl b ($465nm$ und $650nm$) zuzuordnen. Die Absorption der Carotinoide liegt zwischen der Peakstruktur der Chlorophylle und ist vergleichsweise gering. Im Gegensatz zu isolierten Chlorophyllen sind die Maxima der Absorption und der Emission zu langwelligeren Werten verschoben. Diese Verschiebung stammt von der Interaktion mit der Proteinumgebung und von benachbarten Pigmenten untereinander.

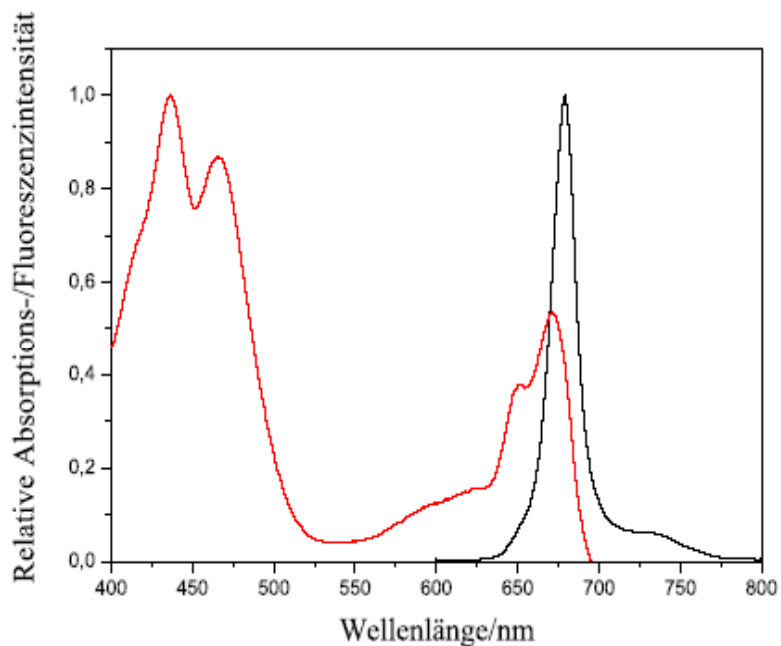


Abb. 3.8: Absorptions- (rot) und Emissionsspektrum (schwarz) gelöster LHC-II Trimere bei Raumtemperatur. Aufgetragen ist jeweils die genormte Intensität über die Wellenlänge in nm . Während die Fluoreszenz hauptsächlich den Chl a zuzuschreiben ist, kann man die Peaks der Absorption Chl a und b zuordnen.

Die Spektroskopie erlaubt den experimentellen Zugriff auf die elektronische Struktur des LHC-II. Neben der spektralen Position eines Übergangs ist es möglich, dessen Lebensdauer sowie die Orientierung des zugehörigen Übergangsdipolmoments zu bestimmen. Darüber hinaus kann man Energietransferprozesse zwischen wechselwirkenden Zuständen untersuchen.

Schon kurz vor der Veröffentlichung der räumlichen Struktur durch Kühlbrandt et al. [20] konnten Reddy et al. [26] durch Lochbrennexperimente zeigen, dass der energetisch tiefste Zustand eines Trimers bei einer Wellenlänge von 680nm absorbiert. Dies wurde in einer ausführlichen Studie mit derselben Methode von Pieper et al. [88] bestätigt. 1997 wurde die Fluoreszenz der elektronischen Nullphononenlinie und deren Phononenbande sowie der vibronischen Nullphononenlinien mittels schmalbandiger Anregung bei 4K gemessen [95]. Die daraus ermittelte spektrale Position des energetisch tiefsten Zustandes ergab eine Wellenlänge von $679,4\text{nm}$.

Grosse Erfolge verzeichnete die Spektroskopie in der Aufklärung des Energietransfers innerhalb eines Komplexes. Verschiedene zeitaufgelöste Studien an Trimeren schreiben dem Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* drei dominierende Halbwertszeiten von ca. 300fs , 600fs und einigen Pikosekunden zu [22,23,91,96,97]. Die entsprechenden Messungen an Monomeren ergaben lediglich zwei Transferzeiten von 200fs und 3ps . Die fehlende Rate wurde mit dem Verlust oder der Verschiebung der Absorption von einigen Chl *a* bei der Monomerisierung begründet [24]. Weiterhin wurde in dieser Veröffentlichung postuliert, dass die obigen Halbwertszeiten des trimerischen Komplexes den Energietransfer innerhalb einer monomerischen Untereinheit widerspiegeln. Der Energietransfer zwischen Chl *a* Molekülen weist ebenfalls schnelle und langsame Komponenten auf. Für trimerische LHC-II wurden hierbei Zeiten von 400fs , 2ps und 15ps ermittelt [91]. Ähnliche Werte ergaben sich für monomerische Komplexe [98]. Mittels Annihilationsexperimenten ermittelten Barzda et al. [99] und Bittner et al. [22] die Raten der Äquilibration zwischen den monomerischen Subeinheiten eines Trimers zu einigen zehn Pikosekunden.

Die Art des Energietransfers ist mit dem Charakter der angeregten Zustände verknüpft. Hier stehen sich die Extreme der starken Lokalisierung auf einzelnen Chlorophyllen und der Delokalisierung der Anregung über viele Pigmente gegenüber. Durch nichtlineare Spektroskopiemethoden konnten Schubert et al. [100] eine starke exzitonische Kopplung von zwei Chlorophyllen nachweisen.

Mit Hilfe der spektroskopischen Ergebnisse und der räumlichen Strukturdaten kann die elektronische Struktur des LHC-II berechnet werden. Novoderezhkin et al. [101] stellten kürzlich eine umfassende Studie vor, die auf den räumlichen Strukturdaten von Liu et al. [21] und verschiedensten spektroskopischen Untersuchungen aufbaut. Die spektroskopischen Daten werden hierbei zur Bestimmung der elektronischen Umgebung der Chlorophylle eingesetzt, der sogenannten „Site Energy“. Nach dieser Studie zeigen die angeregten Zustände einen exzitonen Charakter, d.h. sie sind über mehrere Chlorophylle delokalisiert. Weiterhin reagieren sowohl die angeregten Zustände als auch die Energietransferzeiten sehr sensitiv auf geringe Änderungen der „Site Energies“, was zu einer stark heterogenen elektronischen Struktur des LHC-II führt.

Neben den Fluoreszenzeigenschaften werden in dieser Arbeit die Energietransferprozesse (ausgehend von den Chl *b*) von Monomeren und Trimeren untersucht. Die Spektroskopie einzelner Komplexe sollte mögliche Unterschiede innerhalb des Ensembles zugänglich machen.

3.3 Probenpräparation

Das Ziel der spektroskopischen Untersuchungen einzelner LHC-II ist die Bestimmung von Lebensdauer und Orientierung der elektronischen Übergangsdipolmomente. Um die spektrale Diffusion so gering wie möglich zu halten und die Photostabilität der Komplexe sowie die Struktur der Spektrallinien zu erhöhen, wurde in allen anstehenden Spektroskopieexperimenten die Temperatur $T = 2K$ gewählt. Wünschenswert für eine erfolgreiche Auswertung der komplexen Daten ist die orientierte Immobilisierung der einzelnen Moleküle. Es handelt sich hierbei um keine völlig identische Orientierung aller Komplexe sondern z.B. um die Einschränkung der Freiheitsgrade auf die Rotation in einer Ebene.

Um diesen Ansprüchen gerecht zu werden, wurden verschiedene Anstrengungen unternommen, sowohl native LHC-II Trimere als auch künstlich gefaltete Trimere und Monomere dahingehend zu präparieren.

3.3.1 LHC-II in Polyvinylalkohol (PVA)

Eine 1% Lösung von PVA in Wasser, aufgebracht auf ein Deckglas und sofort durch schnelles Drehen desselben gleichmäßig verteilt („Spin-coating“), ergibt eine einige hundert *nm* dicke Polymerschicht. Da LHC-II kein wasserlösliches Protein ist, muss man ein Detergenz beimischen, damit die Aggregation der Komplexe vermieden wird.

Gibt man der PVA-Wasser-Mischung in Detergenz gelöstes LHC-II in passender Konzentration zu, erhält man im Polymer immobilisierte Komplexe mit wohldefiniertem Abstand.

Auf diese Weise hergestellte Proben mit den bakteriellen Antennen LH2, weisen eine bevorzugte Orientierung parallel zur Fläche des Substrates auf [11,37]. Im Falle des LHC-II konnten mit dieser Probenpräparation einzelne Komplexe bei tiefen Temperaturen untersucht werden [102]. Allerdings ergaben sich keine Hinweise auf eine Orientierung der Moleküle. Dies könnte an der geringeren Symmetrie im Vergleich zum LH2 liegen.

3.3.2 Immobilisierung von Liposomen mit inserierten LHC-II

Eine globuläre, geschlossene Doppelmembran wird in der Literatur als Lipidvesikel oder Liposom bezeichnet. Hergestellt werden sie aus den unterschiedlichsten Lipidzusammensetzungen und in den unterschiedlichsten Größen. Naturgemäß sind alle Lipidvesikel in Wasser löslich, unterscheiden sich, je nach verwendeten Lipiden, jedoch in der Fähigkeit entsprechende Proteine einzubauen.

In seiner ursprünglichen Umgebung ist der LHC-II in der Thylakoidmembran eingebettet. Eine logische Wahl für die Lipide einer künstlichen Membran ist eine Zusammensetzung möglichst analog der natürlichen Membran. Die Thylakoidmembran besteht hauptsächlich aus den beiden Galaktolipiden MGDG (Monogalactosyl-Diacyl-Glycerin) und DGDG (Digalactosyl-Diacyl-Glycerin), die einen Anteil von 50% bzw. 30% der Gesamtlipide stellen. Allerdings ist die Verteilung innerhalb der Membran nicht homogen. So findet sich DGDG hauptsächlich in der Nähe des PS-II und MGDG in der Umgebung des PS-I [103]. Neben diesen beiden Lipiden konnten SL (Sulfochinovosyl-Diacyl-Glycerin) und das Phospholipid PG (Phosphatidylglyzerin) zu jeweils ca. 10% nachgewiesen werden [104].

Die hergestellten Liposomen setzen sich aus 60% DGDG, 22% PG und 18% SL zusammen, haben einen Durchmesser von ca. 50–200nm und sind damit kleiner als die Auflösung des konfokalen Mikroskops. Einzelne Komplexe können sich demnach nur im Fokus befinden, wenn pro Liposom maximal ein Protein inseriert ist und die Liposomen mit inserierten Proteinen einen größeren Abstand als die Auflösung des Aufbaus aufweisen. Hierfür muss das Protein-Lipidverhältnis so gering gewählt werden, dass in den meisten Liposomen gar kein LHC-II enthalten ist.

Im Rahmen einer Kollaboration mit der Universität Mainz gelang es, sowohl native Trimere, gewonnen aus den Blättern der Erbse, als auch künstliche, aus dem Apoprotein Lhcb1 gefaltete Trimere (sogenannte rekonstituierte Komplexe) einzeln in Liposomen zu inserieren. Eine Insertion intakter einzelner Monomere war nicht möglich. Hier ging nach der Insertion regel-

mäßig der Energieübertrag von Chl *b* auf *a* verloren, was auf eine Zerstörung der Komplexe zurückzuführen ist.

Eine ausführliche Beschreibung der Herstellung der Liposomen und der erfolgreichen Insertion der Komplexe findet sich in [105]. Das Ergebnis sind in Puffer gelöste Liposomen mit einem Durchmesser von 50–200nm, einer Konzentration von 10^{12} pro Milliliter und einem Verhältnis von Liposomen zu inserierten Komplexen von ca. 10:1.

Je nach Lipidzusammensetzung tragen die Liposomen negative, keine oder positive Ladung und können abhängig davon an verschiedenen Oberflächen haften. Eine einfache Bindung der Liposomen an eine Oberfläche genügt unseren Anforderungen nach einer orientierten Immobilisierung jedoch nicht. In der Literatur ist bekannt, dass Liposomen unter bestimmten Bedingungen an der Oberfläche aufplatzen und diese mit einer Doppelmembranschicht überziehen [106,107]. Dadurch wäre die Orientierung der Komplexe für uns ausreichend eingeschränkt.

Die in dieser Arbeit untersuchten Liposomen sind aufgrund des Lipids SL schwach negativ geladen. Bedingt durch die speziellen Lipide muss zunächst die Interaktion zwischen Substrat und Liposomen untersucht werden.

3.3.2.1 Immobilisierung auf Quarz

Die auf eine zuvor gereinigte Quarzoberfläche aufgebrachte Liposomenlösung wirkt einige Sekunden bis wenige Minuten ein. Die überschüssige Flüssigkeit wird durch schnelle Rotation des Substrates entfernt und die Probe wird anschließend im Kryostaten eingefroren. Das Einfrieren innerhalb weniger Sekunden liefert eine Momentaufnahme der Komplexe in der flüssigkristallinen Phase der Liposomen [108].

Anstatt die Probe direkt einzufrieren, kann eine genauere Untersuchung der Bindung der Liposomen an die Oberfläche mit Hilfe eines AFMs durchgeführt werden. Dazu wird die Probe für einige Minuten in den Exsikkator eingebracht, um nach der Präparation verbliebenes Wasser zu verdampfen. Die nun wasserfreie Probe wird im Tappingmode vermessen.

Abb. 3.9 fasst die Ergebnisse dieser Messungen zusammen. A zeigt die Höhen eines $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ Ausschnittes der untersuchten Proben und B die Schwingungsamplitude des Cantilevers des identischen Flächenausschnittes. Die Amplitude als Ableitung der Höhe lässt Stufen auf der untersuchten Probe sehr deutlich hervortreten. Die Höhe bzw. die Größe der Amplitude sind

durch eine Farbskala gegeben. Abb. 3.9D zeigt als Negativtest das Höhenbild einer $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ gereinigten leeren Quarzoberfläche nahezu ohne Konturen.

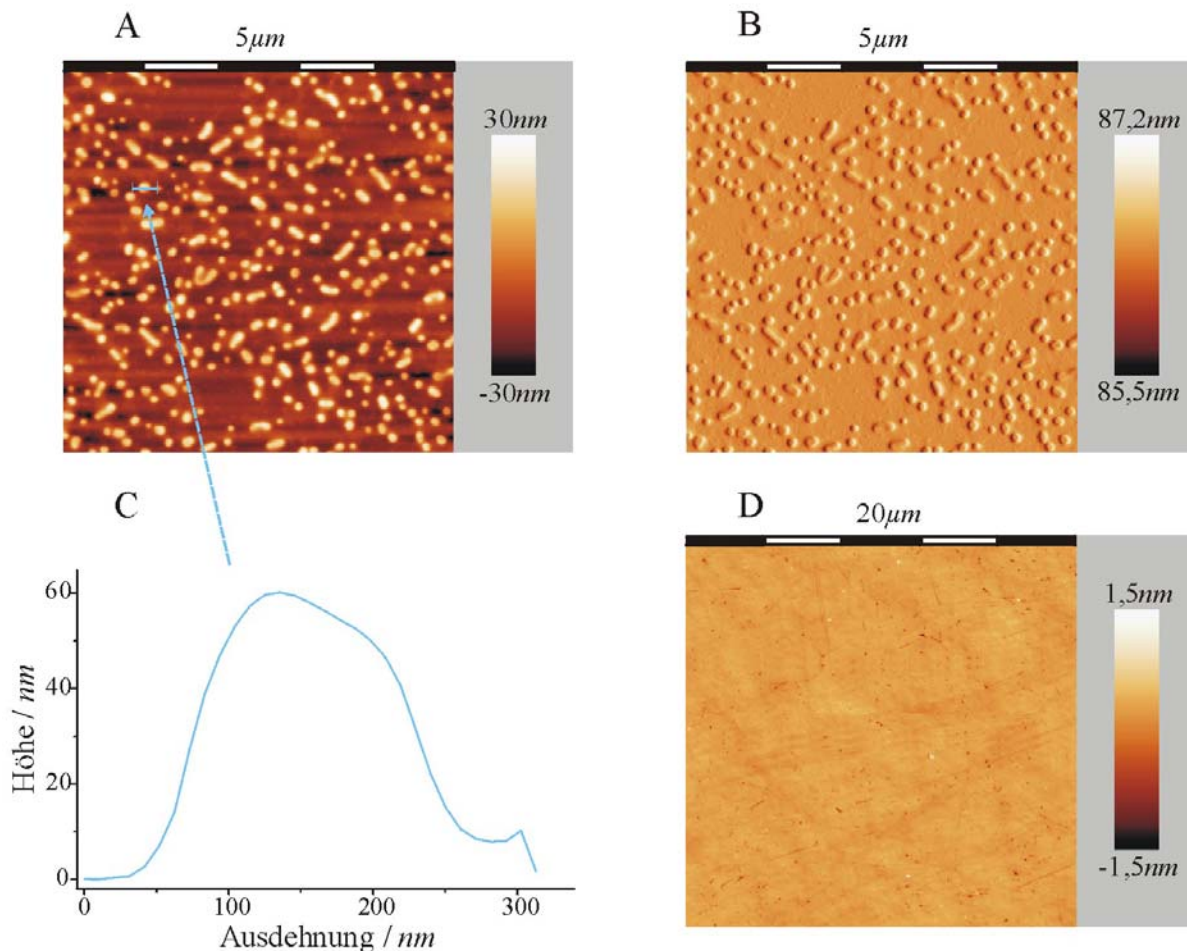


Abb. 3.9: Ergebnisse der AFM Untersuchungen von auf einer Quarzoberfläche immobilisierten Liposomen. In A und B sind die Höhen bzw. die Amplitude des jeweils gleichen $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ Ausschnittes der Probe dargestellt. D ist das Höhenbild einer leeren Quarzoberfläche und C zeigt den Linescan durch eine typische Struktur. Die Erhebungen in A und B sind einzelne Liposomen, die aufgrund der großen Höhe nicht aufgeplatzt sein können.

Bei den Strukturen in den Teilbildern A und B handelt es sich um an der Oberfläche haftende Liposomen. Der Ausschnitt eines Linescans in Abb. 3.9C gibt die Abmessungen einer typischen Erhebung an. Eine Ausdehnung in x-Richtung von knapp 200 nm , eine Höhe von 60 nm und die deutlich sichtbare Rundung bedeutet, dass diese Liposomen zwar auf der Oberfläche haften aber nicht aufplatzen. LHC-II in den Liposomen können daher, je nach Lage

zum Zeitpunkt des Einfrierens, deutlich unterschiedliche Winkel zur Oberfläche des Substrates einnehmen.

Das konfokale Bild einer identisch präparierten Probe, die sofort nach dem Spinningvorgang in den Kryostaten ($T = 2K$) eingebracht wurde, ist in Abb. 3.10 dargestellt. Die Intensität jedes Bildpunktes des Ausschnittes von $25 \times 25 \mu m^2$ wird durch die Farbskala gegeben. Einzelne helle Punkte entsprechen der Fluoreszenz immobilisierter LHC-II. Die Anzahl der Liposomen mit inserierten Komplexen ist deutlich kleiner als die absolute Zahl der auf der Oberfläche haftenden. Dies geht konform mit der Intention der Probenpräparation und soll die Untersuchung einzelner Komplexe im fokalen Volumen sicherstellen.

Die Probe wurde mit der Wellenlänge $640nm$ des Farbstofflasers bei einer Leistung von $20 \mu W$ vor dem Objektiv angeregt. Dabei betrug die Belichtungszeit pro Bildpunkt $10ms$. Der exakte Aufbau ist in Kapitel 1.3.1 beschrieben.

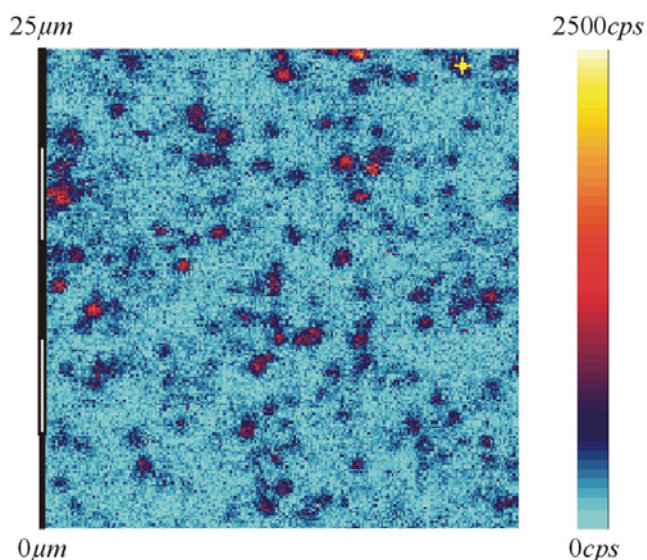


Abb. 3.10: Konfokales Bild einer zu Abb. 3.9 identisch präparierten Probe bei $T = 2K$. Verglichen mit den Abbildungen des AFM ist der Ausschnitt mit $25 \times 25 \mu m^2$ deutlich größer gewählt. Die Intensität wird durch die Farbskala wiedergegeben. Helle Punkte können der Fluoreszenz von LHC-II zugeordnet werden. Es zeigt sich, dass nur wenige Liposomen Komplexe enthalten.

3.3.2.2 Immobilisierung auf Glimmer

Glimmer liefert kurz nach der Spaltung eine sehr glatte Oberfläche. Die Oberflächeneigenschaften sind kompliziert, ebenso die Wechselwirkung mit benetzenden Flüssigkeiten. So weist die Glimmeroberfläche eine vom pH-Wert und den gelösten Salzen der aufgetragenen Lösung abhängige Oberflächenladung auf, was die Affinität für die Liposomen erheblich beeinflusst [109]. Die besten Ergebnisse für die Immobilisierung ergaben sich, wenn vor dem Kontakt mit den negativ geladenen Liposomen die frisch gespaltene Oberfläche des Glimmer mit einer 2-wertige Kationen enthaltenden Lösung benetzt wurde.

Für die Probenpräparation wird Glimmer der Firma Goodfellow mit Hilfe eines scharfen Messers gespalten, sofort mit einer 80mmol MgCl_2 -Lösung benetzt und nach zwei Minuten mit der Pipettenspitze trockengesaugt. Die Liposomenlösung lässt man anschließend eine Minute einwirken und spült sie abschließend intensiv mit mehreren Millilitern Pufferlösung. Für die spektroskopischen Untersuchungen wird die Probe sofort in den tiefkalten Kryostaten eingebracht, wo die Liposomen und damit die LHC-II ausfrieren.

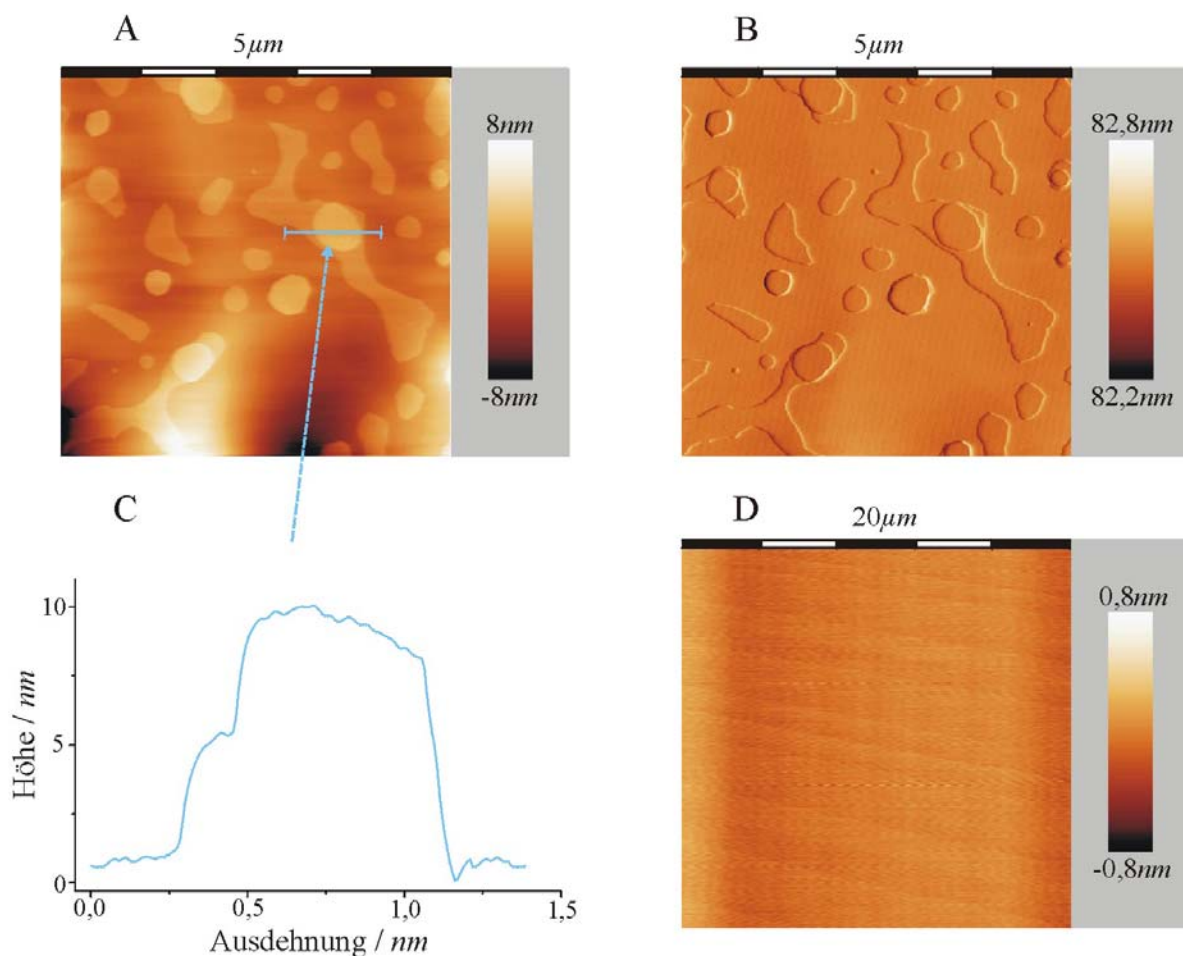


Abb. 3.11: AFM Untersuchungen immobilisierter Liposomen auf Glimmer. In A ist das Höhenbild eines $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, in B das Amplitudenbild des selben Ausschnittes zu sehen (skaliert durch die Farbbalken). Die Strukturen sind plattgedrückt und unförmig. C zeigt den Linescan durch zwei übereinanderliegende Schichten mit einer Höhe von jeweils ca. 5nm , was der Höhe einer Doppelmembranschicht entspricht. Zusammen mit der leeren Oberfläche der Negativkontrolle in Teilbild D spricht dies für geplatze Liposomen, deren Doppelmembranen teilweise zusammengeschmolzen sind.

Für die Kontrolluntersuchungen mit dem AFM muss zunächst das Salz des Puffers mit klarem Wasser abgespült und die dann verbliebene Flüssigkeit durch den Exsikkator entfernt werden. Abb. 3.11 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der AFM Untersuchungen in der gleichen Darstellung wie Abb. 3.9. A und B sind das Höhen- bzw. das Amplitudenbild eines identischen $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ Ausschnittes der Probe, C der Schnitt durch eine der darauf sichtbaren Strukturen und D das $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ Höhenbild einer frisch gespaltenen Glimmeroberfläche als Negativkontrolle. Die Farbskalen geben die Höhen und die Größe der Schwingungsamplitude. Im Linescan ist die Höhe der Struktur über ihre räumliche Ausdehnung in x-Richtung eingezeichnet.

Die Strukturen in A und B sind die auf dem Glimmer haftenden Liposomen. Verglichen mit Abb. 3.9 sind sie weiter ausgedehnt, deutlich unförmiger und weniger hoch mit einer plattgedrückten Oberfläche. Die Höhe lässt sich aus C entnehmen, das einen Schnitt durch zwei übereinander gestapelte Liposomen zeigt. Die erste Stufe ist bei ca. 5 nm , beide zusammen bringen es auf eine Höhe von 10 nm . Die Stufenhöhe entspricht den Erwartungen für die Höhe einer Doppelmembranschicht [106,107] und lässt den Schluss auf geplatzte, immobilisierte Liposomen zu. Die Form der auf dem Glimmer liegenden Doppelmembranen könnte am Zusammenfließen mehrerer geplatzter Liposomen zu einer größeren Struktur liegen. Dies würde die größere Breite sowie die nicht runden Formen erklären. Insetierte LHC-II können für den Beobachter folgerichtig innerhalb der Membran beliebig rotiert sein, zeigen aber mit der stromalen Seite entweder zum Beobachter oder zum Substrat.

Eine zu oben identisch präparierte Probe wurde ohne den abschließenden Spülvorgang mit Wasser im Kryostaten eingefroren. Sie zeigt ein konfokales Bild ähnlich Abb. 3.10 und sollte damit ebenfalls die Untersuchung einzelner inserierter Komplexe ermöglichen.

Zusammenfassend ergibt sich für die Immobilisierung der Liposomen ein gemischt erfolgreiches Bild. Die Immobilisierung auf Quarz ist relativ einfach zu erreichen, liefert jedoch keine weitreichende Aussage über die Orientierung der inserierten Komplexe. Die Verwendung des Glimmers ist deutlich komplizierter, führt aber zu geplatzten Liposomen und damit zu orientierten LHC-II. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Wechselwirkung mit der Glimmeroberfläche und damit die Haft- und Platzeigenschaften sehr sensibel von der Lipidzusammensetzung und dem verwendeten Puffer abhängig sind. Es ist daher ratsam, immer zwei identische Proben zu präparieren und eine spektroskopisch, die andere zur Kontrolle mit dem AFM zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil der Insertion der LHC-II in die natürliche

Umgebung sollte ein stabilisierender Effekt auf die spektroskopischen Eigenschaften der Komplexe sein [108].

Der größte offensichtliche Nachteil dieser Präparationsmethode ist die fehlende Insertion intakter monomerischer LHC-II in die Liposomen. Das Trimer ist mit seinen 42 Chlorophyllen spektroskopisch ein sehr komplexes System. Eine zusätzliche Untersuchung der Monomere mit nur 14 Chlorophyllen war in Liposomen nicht möglich.

3.3.3 Immobilisierung mutierter LHC-II auf einer selektiv bindenden Oberfläche

LHC-II können über den sogenannten His6-tag (Abfolge von sechs Histidin-Imidazolringen), der durch Mutation an das Proteingerüst gefügt werden kann, an einen Nickelkomplex gebunden werden. Der Nickelkomplex benötigt wiederum einen Bindungspartner zur Oberfläche des Trägers. In unserem Fall wird eine Nickel-Nitrilotriessigsäureverbindung (Ni-NTA) über das Protein „Horse-Radish Peroxidase“ (HRP) an eine Quarzoberfläche gebunden.

3.3.3.1 Die Oberfläche

Ziel ist es, eine mit HRP-Ni-NTA gleichmäßig belegte Oberfläche zu schaffen. Die Firma Qiagen bietet hierfür ein Kit an, das bei korrekter Behandlung eine Quarzoberfläche mit einer Schicht aus HRP mit angebundener Ni-NTA belegen soll. Nach Reinigung des Quarzglases und Einwirken der gelieferten Lösung muss mit verschiedenen Puffern gespült werden. Für eine AFM Untersuchung der so behandelten Oberfläche wurde sie anschließend noch mit Wasser gereinigt und einige Minuten in den Exsikkator gelegt.

In Abb. 3.12 werden die Höhen- und Amplitudenbilder einer Quarzoberfläche nach der Behandlung (A und B) und einer gereinigten Quarzoberfläche (C und D) miteinander verglichen. Alle Teilbilder zeigen einen Ausschnitt von $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ mit durch Farben skalierten Größen. Die Höhenbilder weisen jeweils sehr wenig ausgeprägte Strukturen im Bereich einiger *nm* auf, wobei die leere Oberfläche einen homogenen Eindruck vermittelt. Deutlicher stellen sich die Amplitudenbilder dar: Hier zeigt sich die leere Oberfläche als größtenteils glatt mit wenigen Erhebungen und einigen Kratern, wohingegen die mit HRP behandelte Oberfläche eine rauere Struktur aufweist.

Bedenkt man, dass die HRP-Proteine ca. $3 - 4 \text{ nm}$ in die Höhe ragen, ist die Oberfläche in den Abb. 3.12A und B dicht und relativ gleichmäßig mit diesen Proteinen belegt.

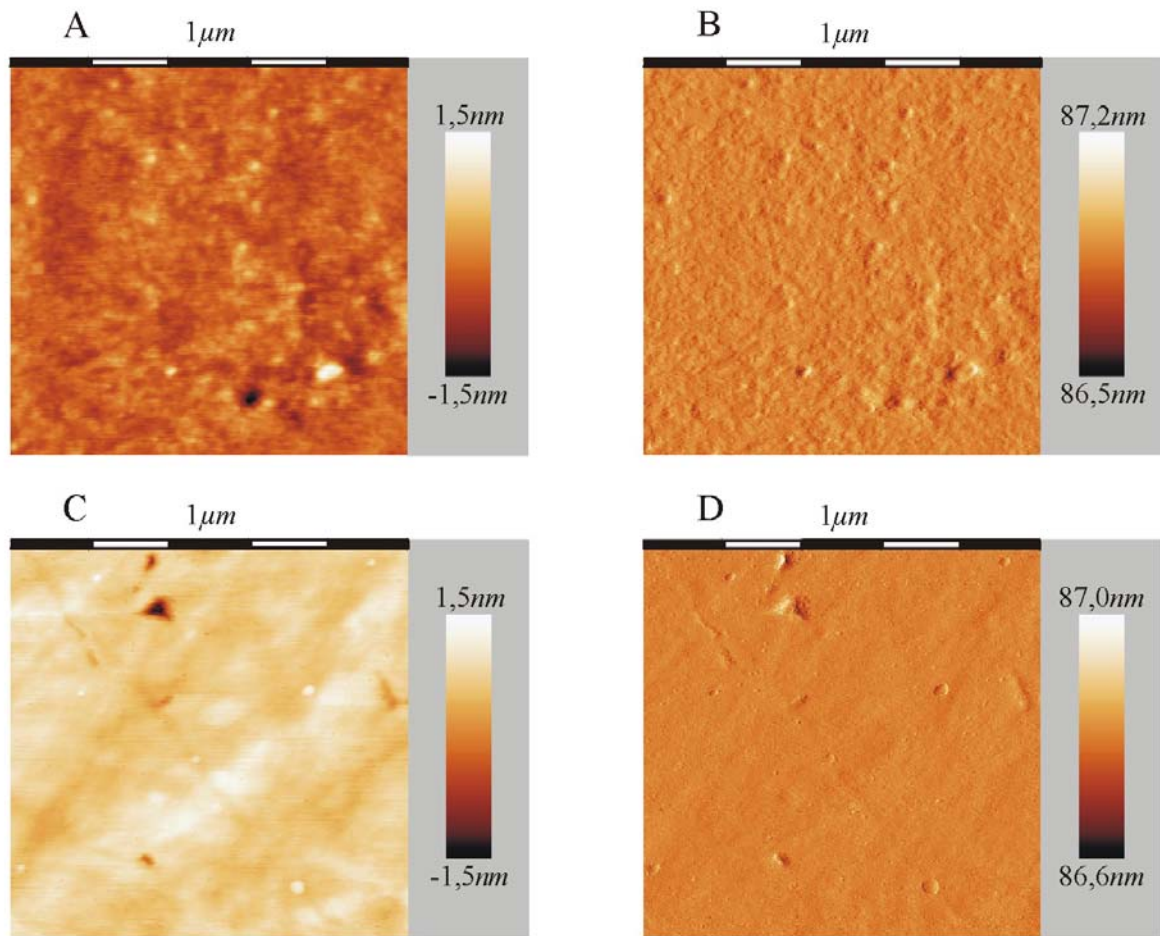


Abb. 3.12: AFM Aufnahmen einer mit HRP behandelten Oberfläche (A Höhenbild und B Amplitudenbild) und einer gereinigten Quarzoberfläche (C Höhenbild und D Amplitudenbild). Die Teilbilder A und B bzw. C und D zeigen einen identischen Ausschnitt von $1 \times 1 \mu\text{m}^2$. Die Farbskala gibt die Höhe bzw. die Amplitude an. Die größere Rauigkeit der beschichteten Oberfläche ist vor allem im Amplitudenbild deutlich zu sehen und lässt auf eine dichte und relativ gleichmäßige Belegung mit HRP-Ni-NTA schließen.

3.3.3.2 Bindung der Proteine

Der bindende Gegenpart zur Ni-NTA der HRP ist ein His6-tag am Proteingerüst des LHC-II. Abb. 3.13 zeigt schematisch die Interaktion zweier Histidin-Imidazolringe des Tags mit dem Nickelion der Ni-NTA. Um das LHC-II mit dem His6-tag auszustatten, wird die Aminosäuresequenz des Apoproteins vor der Rekonstitution entsprechend abgeändert [110]. Man spricht in solch einem Fall von einer Mutante des LHC-II.

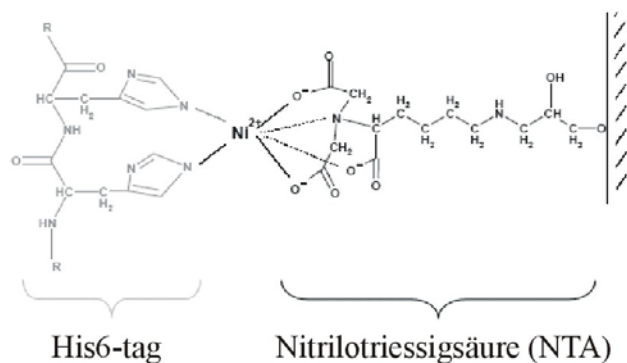


Abb. 3.13: Schematische Darstellung der Bindung des His6-tags mit Ni-NTA. Der Tag besteht aus einer Kette von sechs Histidin-Imidazolringen, von denen zwei an das Nickelion binden (nach Qiagen, 2005).

Monomere

Das für die Faltung zu LHC-II Monomeren verwendete Apoprotein wurde um zwei His6-tags, jeweils einen am N- bzw. C-Terminus, erweitert. Durch die Wahl zweier Ankerstellen soll der rekonstituierte Komplex orientiert auf der funktionalisierten Oberfläche haften. Eine Abschätzung der Qualität der Orientierung unter der Annahme, dass beide Tags auf einer gleichmäßig beschichteten Oberfläche binden, liefert eine einfache Simulation des Systems Monomer-Tag-Ni-NTA-HRP:

Da die Ni-NTA nicht notwendigerweise eine feste Ausrichtung bezüglich der Oberfläche aufweisen muss, ist der Abstand zwischen den beiden Bindungsstellen der Tags eines Proteins variabel. Für die Molekulardynamiksimulation wurden die in der Struktur nicht aufgelösten Aminosäuren an das Protein modelliert und die beiden Enden mit je einem His6-tag versehen. Eine energetische Äquilibrierung des Protein-Tagssystems liefert mögliche Bindungskonformationen auf der Oberfläche. Unterschiede ergeben sich hierbei vor allem durch unkorreliertes „Herumschlackern“ der beiden Tags.

In Abb. 3.14 sind zwei extreme Konformationsbeispiele dargestellt. Das Proteingerüst des Monomers ist in silber, die Chl *a* und *b* in rot bzw. blau und die beiden His6-tags jeweils als gelbes Band eingezeichnet. Die grünen und orangen Kugeln markieren die Enden der Tags. Die Sichtrichtung wurde im rechten als auch im linken Bild identisch entlang der Oberfläche des Substrats gewählt. Man erkennt, dass der Komplex im rechten Bild um ca. 45° nach links verkippt ist. Verdeutlicht wird dies durch die hellblau gestrichelte Achse, die in beiden Bildern vergleichbar durch das Monomer schneidet. Eine Betrachterrichtung auf die Oberfläche würde in diesen beiden Fällen deutlich unterschiedliche relative Orientierungen der Übergangsdipole für ansonsten identische Monomere liefern.

Diese Simulation erhebt keinen Anspruch auf Genauigkeit, da die Beschaffenheit der Oberfläche vollständig ignoriert wurde. Dennoch deutet sie trotz der Verwendung zweier Anker auf eine wahrscheinlich nicht vernachlässigbare Verkippung der Monomere hin.

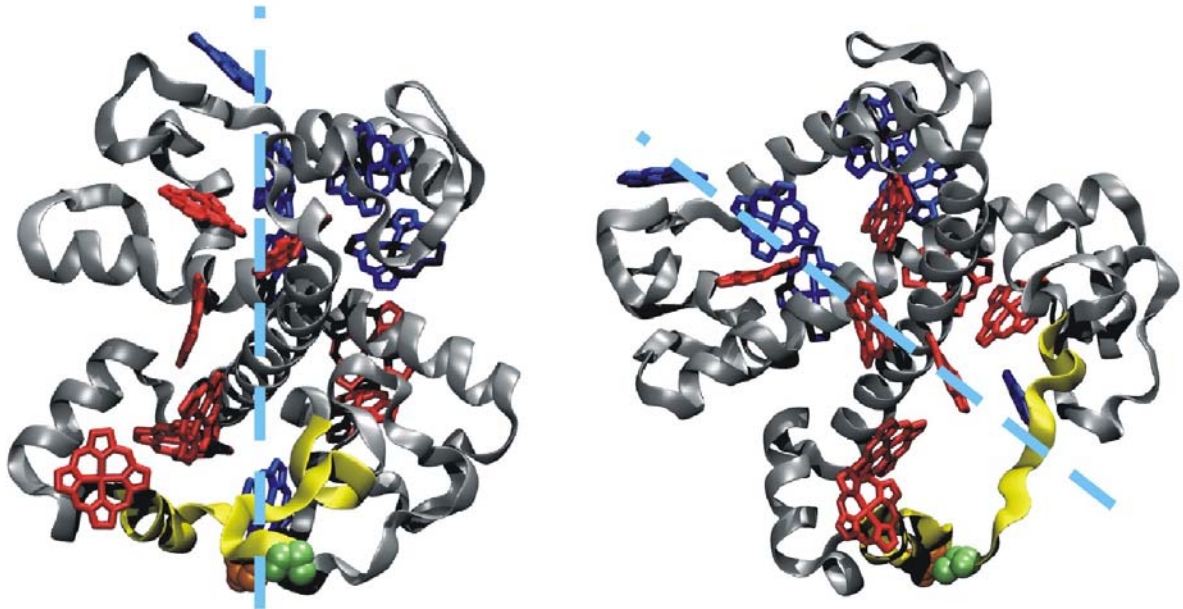


Abb. 3.14: Beispiele für mögliche Orientierungen eines immobilisierten Monomers mit jeweils einem His6-tag an N- und C-Terminus auf einer Ni-NTA-Oberfläche. Silberfarben ist das Protein, in rot und blau sind die Chl a bzw. b und in gelb die beiden Tags dargestellt. Die Enden der Tags werden durch grüne und orange Kugeln markiert. Durch die geänderte Konformation ist die Achse durch das Monomer (hellblau gestrichelt) um ca. 45° verkippt.

Trimere

Im Fall der Trimere des LHC-II wird dem Apoprotein jeder monomerischen Untereinheit vor der Faltung ein His6-tag am Ende des C-Terminus angefügt. Anschließende Rekonstitution und Trimerisierung führen zu Trimeren mit 3 Tags auf der luminalen Seite des Komplexes. Noji et al. konnten 1997 mit Hilfe einer sehr ähnlichen Immobilisierungsmethode die Funktionsweise der ATPase in aufrechtem Zustand untersuchen [8]. LHC-II Trimere, identisch zu den hier eingesetzten, wurden 2002 von Gerken et al. [111] untersucht. Hierbei zeigten 72% der Komplexe ein orientiert immobilisiertes Verhalten.

Eine schematische Darstellung der Bindung ist in Abb. 3.15 gezeigt. Eine solche Orientierung ist vergleichbar zur Ausrichtung der Komplexe in einer auf der Oberfläche geplatzten Thyla-

koidmembran mit einer zusätzlichen Beschränkung. Kleinere Verkippungen der Trimere bezüglich der Oberfläche des Substrats sind zu erwarten.

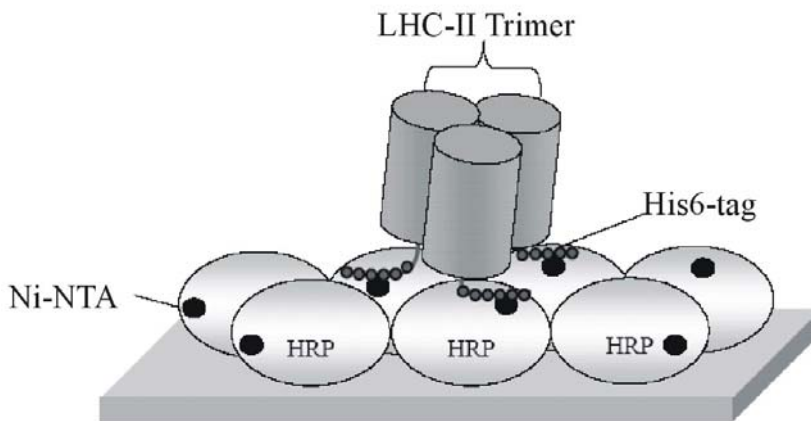


Abb. 3.15: Schematische Darstellung der Bindung eines LHC-II Trimers mit einem His6-tag je monomerischer Untereinheit auf einer mit Ni-NTA-HRP beschichteten Oberfläche.

3.3.3.3 Probenpräparation und Selektivität der Bindung

Eine Quarzoberfläche (Suprasil 2) wird mit den Lösungsmitteln Aceton und Methanol gesäubert und anschließend für einige Minuten in einen Plasmareiniger eingebracht.

Puffer A	Puffer B
20 mM MOPS/KOH, pH 7,0	20 mM MOPS/KOH, pH 7,0
50 mM KCl	50 mM KCl
5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂
	0,1% Laurylmaltoside
	0,2 M Saccharose

Tabelle 3-1: Verwendete Puffer zur Beschichtung der Quarzoberfläche und zur Immobilisierung der LHC-II Komplexe.

20 μ l einer 0,8 μ M HRP-Lösung in Puffer A (siehe Tabelle 3-1) werden auf die Oberfläche pipettiert, wirken 4 Minuten bei RT ein und werden dann abpipettiert. Die Prozedur wird einmal wiederholt und es schließt sich ein Waschgang mit Puffer A an, der die ungebundene HRP entfernt.

Nun werden 20 μ l einer 50 pM LHC-II Lösung (Monomere oder Trimere mit His6-tag) in Puffer B auf die beschichtete Oberfläche aufgebracht. Nach einer 4 minütigen Inkubation auf

Eis wird der Überstand abpipettiert und der Vorgang einmal wiederholt. Abschließend wird mit mehreren Millilitern Puffer B gespült, um ungebundenes LHC-II von der Oberfläche zu entfernen. Danach bringt man die Probe sofort in den tiefkalten Kryostaten ein.

Die Selektivität der Bindung an die beschichtete Oberfläche von Komplexen, die mit His6-tags ausgestattet sind, wurde für die hier verwendeten Trimere in Ref. [111] verglichen mit ankerlosen Komplexen nachgewiesen. In Abb. 3.16 ist dieser Vergleich für Monomere mit und ohne His6-tags dargestellt. Dieses Beispiel kann identisch auf Trimere übertragen werden.

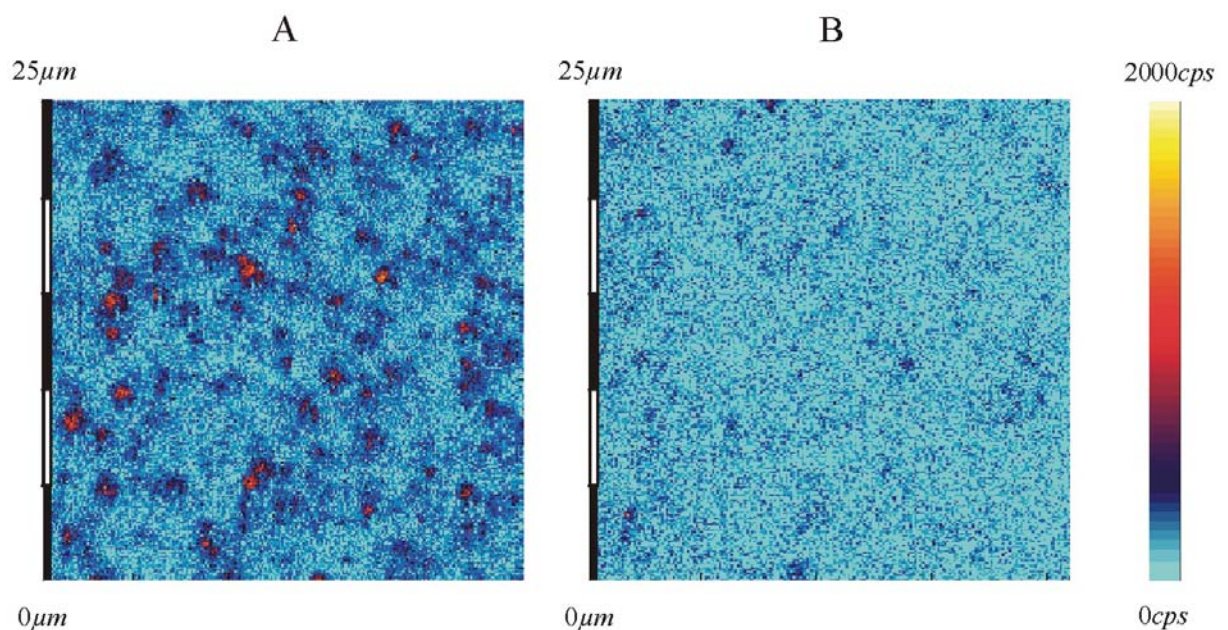


Abb. 3.16: Vergleich einer Probe von Monomeren mit (A) und ohne (B) His6-tags bei $T = 2K$. Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt von $25 \times 25 \mu m^2$, wobei die Intensität der Probe durch die Farbskala gegeben ist. Die Anregungsleistung des bei $640nm$ betriebenen Farbstofflasers betrug $20 \mu W$. Die Fluoreszenzpunkte in A können einzelnen LHC-II Komplexen zugeordnet werden.

Abb. 3.16A und B zeigen jeweils einen $25 \times 25 \mu m^2$ Ausschnitt einer konfokalen Aufnahme bei $T = 2K$. In A wurden Monomere mit je einem His6-tag am N- und C-Terminus auf die beschichtete Oberfläche aufpipettiert, in B Monomere gleicher Konzentration ohne jeden Anker. Angeregt wurde jeweils bei $640nm$ mit einer Leistung von $20 \mu W$ vor dem Kryostaten. Die Intensität der Probe ist durch die Farbskala gegeben. Während B einer leeren, mit HRP

beschichteten Oberfläche gleicht, sind in A einzelne Punkte höherer Intensität sichtbar, deren Fluoreszenzspektren einzelnen LHC-II Komplexen zugeordnet werden können.

Die Bindung auf der funktionalisierten Oberfläche ist sowohl für Trimere als auch für Monomere bei den hier verwendeten Konzentrationen nur mit angebrachten His6-tags möglich.

Diese Immobilisierungsmethode erlaubt nun auch Monomere selektiv an eine Oberfläche zu binden, allerdings ohne deren genaue Orientierung zu kennen. Dem entgegen ist die Mehrzahl der Trimere mit der luminalen Seite zum Substrat ausgerichtet.

3.4 Messung und Datenverarbeitung

In diesem Kapitel werden die erfassten Daten inklusive der Messparameter anhand von einigen Beispielen vorgestellt und deren elektronische Weiterverarbeitung dargelegt. Die Daten lassen sich grob in Fluoreszenzspektren und Anregungsspektren einteilen.

3.4.1 Fluoreszenzspektren

Mit Hilfe der Fluoreszenzspektren einzelner Komplexe sollen Aussagen über die emittierenden Zustände getroffen werden. Hierfür wird die spektrale Position der Fluoreszenz sowie deren Polarisierung und Linienbreite bestimmt.

Um ein Fluoreszenzspektrum bei $T = 2K$ aufzunehmen, wird mit der Scanvorrichtung des Tieftemperaturaufbaus (vgl. Kapitel 1.3.1) ein Punkt auf der Probe ausgewählt und die Fluoreszenz auf den Gitterspektrographen mit angeschlossener CCD-Kamera geleitet. Alle in dieser Arbeit vorgestellten Fluoreszenzspektren wurden mit einem Strichgitter (1200 Linien pro Millimeter) und einer zentralen Wellenlänge von $680nm$ auf dem CCD-Chip aufgenommen. Dadurch wird der spektrale Bereich von $651nm$ bis $708nm$ auf die 1340 Pixel des Chips abgebildet und die Auflösung von $\Delta\nu \approx 2cm^{-1}$ des Spektrographen lässt eine Fokussierung auf minimal zwei dieser Pixel zu.

Linienbreite

In Abb. 3.17 ist beispielhaft das Spektrum eines einzelnen LHC-II Monomers dargestellt. Der Komplex wurde hierbei für 3 Sekunden mit unpolarisiertem Laserlicht einer Leistung von $20\mu W$ bei einer Wellenlänge von $640nm$ angeregt. Aufgetragen ist die Intensität in willkürlichen Einheiten über die Wellenlänge. Das Hauptbild zeigt eine einzelne sehr schmale Linie

bei ca. 681nm auf einem gleichmäßigen Untergrund. Die Einfügung stellt eine starke Vergrößerung der Linie dar. Deren gesamte Intensität konzentriert sich in ungefähr zwei Pixeln des CCD-Chips. Die Linienbreite des Fluoreszenzübergangs ist in diesem Fall so schmal, dass sie mit der Messanordnung nicht aufgelöst werden kann.

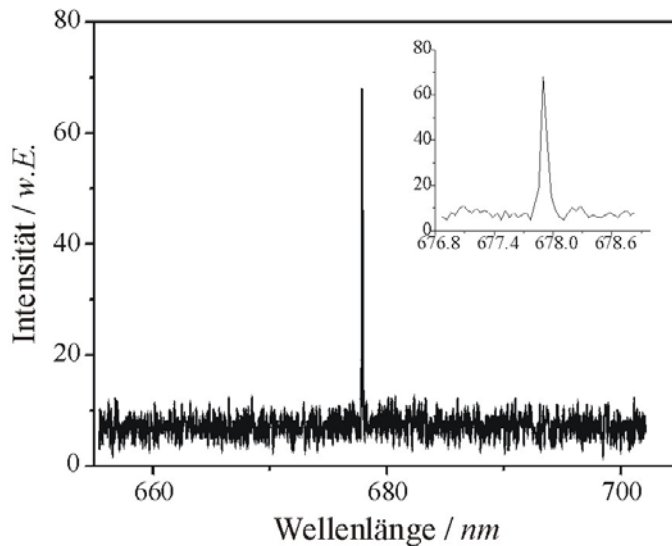


Abb. 3.17: Beispiel für das Fluoreszenzspektrum eines einzelnen Monomers bei $T = 2\text{K}$, mit einer Belichtungszeit von 3s , einer Anregungsleistung von $20\mu\text{W}$ und einer Wellenlänge von 640nm . Es zeigt sich eine einzelne sehr schmale Linie.

Polarisation und spektrale Position

Ein vor dem Spektrographen eingebrachtes Wollastonprisma spaltet das emittierte Licht in zwei zueinander senkrechte Polarisationsrichtungen auf, die zeitgleich auf zwei Bereiche (Kanal 1 und Kanal 2) der Kamera abgebildet werden. Stammt die Fluoreszenz einer Linie von einem einzigen Dipolübergang, kann aus dem Verhältnis der Intensitäten die Lage des emittierenden Dipols relativ zur Ausrichtung des Prismas bestimmt werden.

Hierbei ist zu beachten, dass im Allgemeinen eine Intensitätsmessung der Dipolstrahlung zwei entgegengesetzt orientierte Dipolmomente nicht voneinander unterscheiden kann, das Dipolmoment demnach eine C_2 -Symmetrie aufweist. Weiterhin macht das emittierte Licht lediglich eine Aussage über die Projektion des Übergangsdipolmoments auf die Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Anregungs- bzw. Fluoreszenzstrahles. Bei senkrechter Beleuchtung/Detektion der Probe handelt es sich um eine Ebene parallel zu deren Oberfläche. Dies wird durch Abb. 3.18 anschaulich gemacht.

Das tatsächliche Übergangsdipolmoment (Teilbild A, schwarz) wird auf die Ebene senkrecht zur Richtung des emittierten Strahles (gelb) projiziert. Diese Projektion (rot) wird durch das Wollastonprisma anteilig aufgespalten (Teilbild B). Aus der Länge des blauen und des grünen

Pfeils, gegeben durch die detektierten Intensitäten in Kanal 1 bzw. 2, kann die Orientierung der Projektion relativ zur Orientierung der Kanäle berechnet werden.

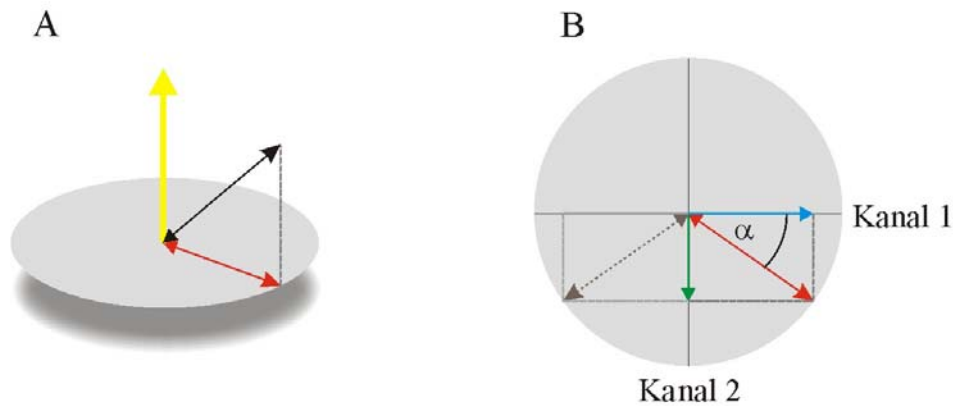


Abb. 3.18: Informationsgewinn über die Polarisierung durch das Wollastonprisma. In A wird der Dipol (schwarzer Pfeil) auf die Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des emittierten Lichtstrahls (gelb) projiziert. Teilbild B zeigt die Zerlegung der Projektion (roter Pfeil) in senkrecht zueinander liegende Polarisationsrichtungen. Die detektierte Intensität in Kanal 1 bzw. 2 korreliert mit der Länge des blauen bzw. grünen Pfeils. Der braune Pfeil in B zeigt eine Dipolorientierung, die ein dem roten Pfeil identisches Messergebnis liefert.

Der Winkel α berechnet sich zu

$$\alpha = \arctan\left(\sqrt{\frac{I_2}{I_1}}\right) \quad (3.1)$$

mit I_1 und I_2 für die detektierten Intensitäten, die proportional zum Quadrat der entsprechenden Amplitude des elektrischen Feldes sind. Wie weiter oben erklärt, erwartet man für den Winkel α Werte zwischen 0° und 180° . Die hier verwendete Messmethode liefert allerdings lediglich Winkel zwischen $0^\circ \leq \alpha \leq 90^\circ$. Den Grund verdeutlicht der braune Pfeil in Teilbild B, der innerhalb des Bereichs von 180° ein identisches Messergebnis wie die Orientierung des roten Dipolmoments anzeigen würde. Zu jeder Messung existieren immer genau zwei mögliche Achsen eines Übergangsdipolmoments gleicher Oszillatorstärke. Der Unterschied zwischen den beiden Lösungen wird umso kleiner, je klarer die Intensität in einen der beiden Detektionskanäle fällt und geht in den Grenzfällen vollständiger Überdeckung mit nur einem Kanal gegen Null.

Abb. 3.19 zeigt die „Spectral Trails“ (vgl Kapitel 1.2.1) der beiden Kanäle von 100 Spektren des Monomers aus Abb. 3.17 bei $T = 2K$. Aufgetragen ist jeweils die Zeitentwicklung der Fluoreszenz über die Wellenlänge, wobei die Intensität in willkürlichen Einheiten an der zugehörigen Farbskala abgelesen werden kann. Die Parameter waren entsprechend Abb. 3.17 gewählt.

In den meisten Spektren erkennt man eine einzelne schmale Linie, deren Intensität nahezu ausschließlich in Kanal 2 der Kamera detektiert wird, was einem Polarisationswinkel $\alpha \approx 90^\circ$ entspricht. Darüber hinaus zeigen sich Sprünge der spektralen Position der Linie in der Größe von einigen nm , die auch zu mehreren Linien pro Spektrum führen können. Die Zeitskala der Sprungdynamik befindet sich demnach in der Größenordnung der zeitlichen Auflösung von 3 Sekunden. Eine teilweise Verbreiterung der einzelnen Linien auf einige Pixel des CCD-Chips ist ebenfalls häufig beobachtbar. Im Ergebniskapitel werden diese Sprünge der spektralen Diffusion durch Proteindynamik zugeordnet.

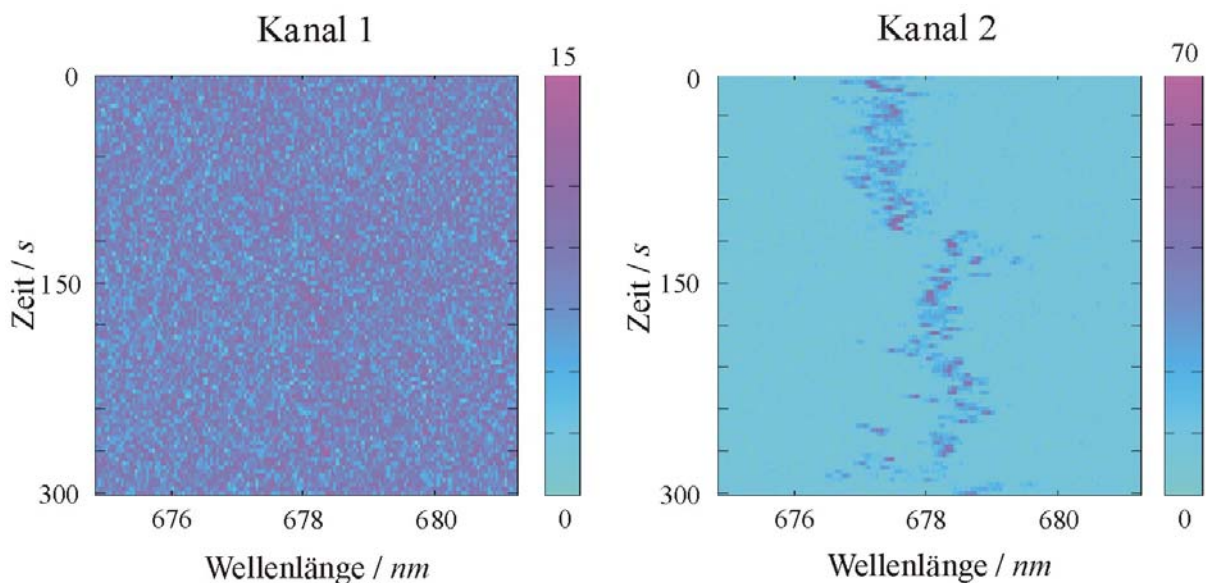


Abb. 3.19: „Spectral Trails“ von 100 Fluoreszenzspektren eines einzelnen LHC-II Monomers bei $T = 2K$ mit in den Strahl eingebrachtem Wollastonprisma. Aufgetragen ist die Zeit über die Wellenlänge mit einer farbcodierten Intensität pro Spektrum. Eine lediglich in Kanal 2 detektierbare Linie entspricht einem Polarisationswinkel des Dipolmoments von $\alpha = 90^\circ$. Die Linie zeigt spektrale Sprünge in der Größenordnung einiger nm auf einer Zeitskala vergleichbar der Belichtungszeit je Spektrum. Die Parameter der Messung entsprechen denen aus Abb. 3.17.

Nun lässt sich für jedes einzelne Spektrum die Position der vorhandenen Peaks ermitteln und aus dem Verhältnis der maximalen Peakintensitäten der beiden Kanäle der Polarisationswinkel nach Gleichung (3.1) errechnen. Hierfür wird zu jedem Spektrum der Untergrund aus einer Mittelung der jeweils ersten 20 Kanäle bestimmt und abgezogen. Dies ergibt zwangsläufig auch negative Intensitäten im lichtschwachen Kanal, deren Vorzeichen dann vor die Wurzel gezogen wurden und zu Winkeln $>90^\circ$ oder $<0^\circ$ führen. Es sei noch einmal betont, dass diese Messmethode für alle Orientierungen verschieden von 0° bzw. 90° keine eindeutige Lösung liefert (ein Wert von 95° ist daher identisch mit 85°). Mit der Auftragung von Winkeln $>90^\circ$ und $<0^\circ$ wird das Rauschen allerdings gleichmäßig in der graphischen Darstellung verteilt.

In Abb. 3.20A ist der errechnete Polarisationswinkel aller in Abb. 3.19 identifizierten Peaks über die spektrale Position derselben aufgetragen. Diese Darstellung gibt gleichzeitig einen Überblick über eine mögliche Polarisation einer Linie sowie deren spektrale Konstanz. Weiterhin lassen sich mögliche Korrelationen dieser beiden Größen erkennen.

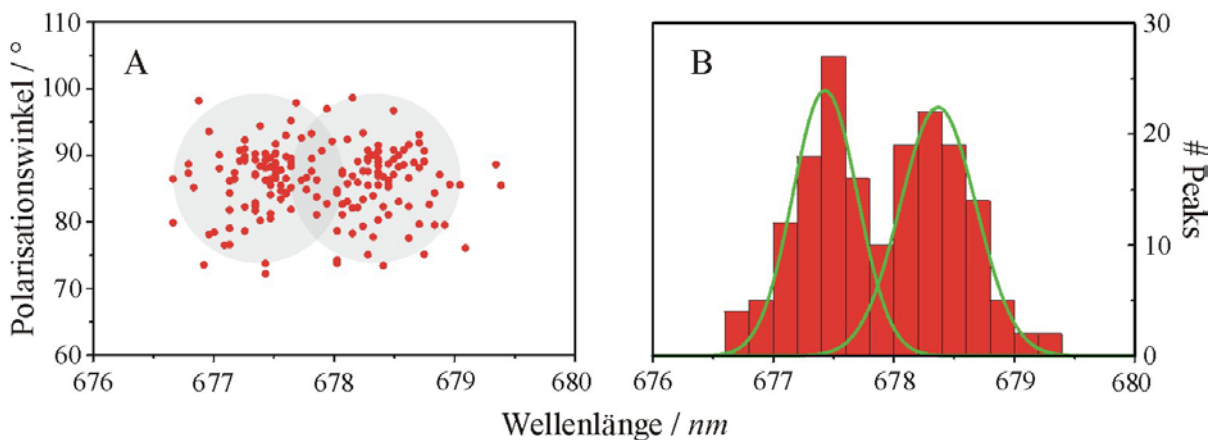


Abb. 3.20: In A ist die Polarisation über die spektrale Position für jeden der in Abb. 3.19 identifizierten Peaks aufgetragen. Man erkennt zwei Häufungspunkte (grau unterlegt) bei unterschiedlichen Wellenlängen aber gleicher Polarisation. Die Ausdehnung der Häufungspunkte ist ein Maß für die Messgenauigkeit (Polarisation) und die spektrale Konstanz (Peakposition). Die Verteilung der Peakpositionen in B lässt sich durch zwei Gaußfunktionen (grün) mit Standardabweichungen von $0,27\text{nm}$ und $0,31\text{nm}$ anpassen.

Das Beispiel zeigt zwei Häufungspunkte (grau unterlegt) bei unterschiedlichen Wellenlängen aber identischer Polarisation. Anhand der Verteilungen der beiden Größen für diese Häu-

fungspunkte kann man die Weite der spektralen Sprünge und die Genauigkeit der Polarisationsangabe abschätzen.

Da alle Punkte der obigen Verteilung von einem einzigen Übergangsdipolmoment stammen, liefert die Standardabweichung von ca. $4,0^\circ$ eines Gaußfits des Polarisationswinkelhistogramms ein Maß für die Genauigkeit der Messmethode. Die Ungenauigkeit entspringt hauptsächlich dem Rauschen im Kanal 1. Das Histogramm der Peakpositionen (Abb. 3.20B) kann man ebenfalls durch, in diesem Falle, zwei Gaußkurven (in grün) anpassen und erhält Standardabweichungen von ca. $0,27nm$ und $0,31nm$ für die beiden Häufungspunkte. Diese Werte entsprechen allerdings keiner Messungengenauigkeit (diese ist durch die Auflösung des Spektrometers gegeben, siehe oben), sondern spiegeln die Unbeständigkeit der spektralen Position der Linie wieder.

Um einen schnellen Vergleich zu ermöglichen, wurden die Messparameter für die Fluoreszenzspektren einzelner LHC-II Komplexe identisch gewählt. Diese in Tabelle 3-2 angegebenen Werte gelten im Allgemeinen für alle folgenden Fluoreszenzspektren dieser Arbeit. Bei Abweichungen wird ausdrücklich darauf hingewiesen.

Anregungswellenlänge	Anregungsleistung	Belichtungszeit der Kamera	Anzahl Spektren je Komplex	Anregungspolarisation
640nm	20 μ W	3,0s	100	unpolarisiert

Tabelle 3-2: Parameter für die Messung der Fluoreszenzspektren einzelner LHC-II Komplexe.

3.4.2 Anregungsspektren

Aus den Anregungsspektren sollen Informationen über die spektrale Position, die Lebensdauer und die Orientierung der Zustände gewonnen werden, die im gescannten Wellenlängenbereich absorbieren. Hierfür ändert man sukzessive die lineare Polarisation der Anregung und akquiriert für jede dieser Polarisierungen mehrere Spektren.

Für die Aufnahme eines Anregungsspektrums wird die Fluoreszenz eines ausgewählten Punktes von der APD detektiert. Währenddessen verändert der Steppermotor die Wellenlänge des Lasers in 662 gleichgroßen Schritten von $635nm$ nach $660nm$. Die Verweildauer zwischen den einzelnen Schritten ist hierbei gleich groß. Es ergibt sich eine Auflösung durch die

Schrittweite von $0,038\text{nm}$ bzw. $0,90\text{cm}^{-1}$. Für die tatsächliche Linienform der Spektren muss man noch die Linienbreite des Farbstofflasers von 1cm^{-1} berücksichtigen (vgl. Kapitel 1.3.1). Eine variable lineare Polarisation wird durch den drehbaren Polarisator erreicht, der in den unpolarisierten Anregungsstrahl eingebracht ist. Gemessen wird die Fluoreszenz des Komplexes als Funktion der Wellenlänge des Anregungslasers bei einer festen linearen Polarisation des Anregungslichtes.

Orientierung der absorbierenden Dipole

Ein Übergangsdipolmoment wird nur durch den zu seiner Achse parallelen Anteil des elektrischen Feldes angeregt. Ein Blick auf Abb. 3.18A zeigt, dass sich erneut lediglich die Projektion des Dipols auf die Ebene senkrecht zur Ausbreitung des Anregungslichtes anregen und damit messen lässt. Die Projektion eines Dipolmoments absorbiert immer bei derselben Wellenlänge maximal (eine hohe Fluoreszenz wird gemessen). Die Höhe dieses Maximums hängt aber von der Orientierung der linearen Anregungspolarisation ab. Ändert man kontinuierlich diese Orientierung, ergeben parallele Achsen des elektrischen Feldvektors des Anregungslichtes und der Projektion des absorbierenden Übergangsdipolmoments das Spektrum mit dem höchsten Maximum (bei einer festen spektralen Position). Für die Bestimmung der Orientierung der absorbierenden Dipole eines einzelnen LHC-II sind demnach Anregungsspektren bei unterschiedlichen Polarisationen des Anregungslichtes erforderlich.

Zunächst werden bei einer festen Orientierung des linear polarisierten Anregungslichts aufeinanderfolgend 5 Spektren aufgenommen. Anschließend wird durch den Polarisator im Anregungsstrahl die Polarisation um 30° gedreht und bei identischer Anregungsleistung werden 5 weitere Spektren akquiriert. Dies setzt sich fort bis zu einer Anregungspolarisation von einschließlich 180° .

In Abb. 3.21 sind die so gewonnenen Spektren für das Beispielmonomer aus Kapitel 3.4.1 dargestellt. Die Polarisation der Anregung charakterisiert die Pakete zu je 5 Spektren, die über die Wellenzahl in cm^{-1} aufgetragen sind. Einzelne Pakete sind durch einen dunkelblauen Balken voneinander getrennt. Die detektierte Intensität ist an der beigelegten Farbskala abzulesen. Einzelne Spektren wurden bei $T = 2\text{K}$ mit einer konstanten Anregungsleistung von 200nW und einer Verweildauer von 100ms je Messpunkt aufgenommen.

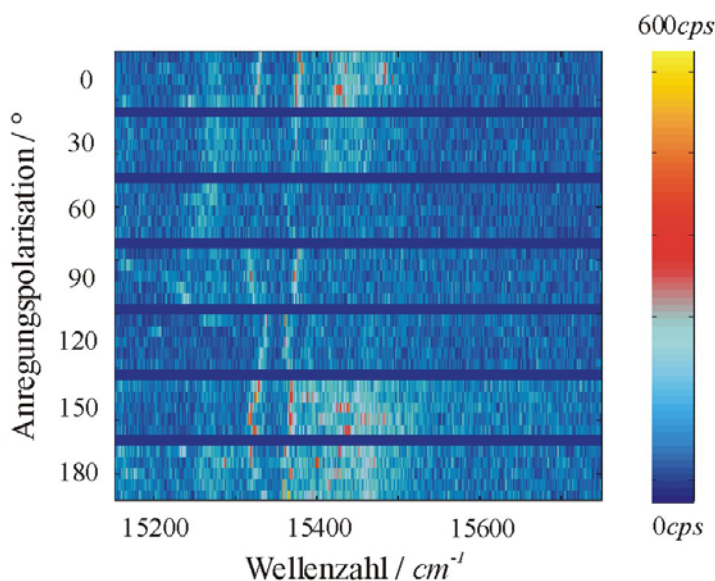


Abb. 3.21: Anregungsspektren des einzelnen LHC-II Monomers aus Kapitel 3.4.1. Aufgetragen ist der Winkel der linearen Anregungspolarisation über die Wellenzahl. Anregungsleistung (200nW), Verweildauer je Messpunkt (100ms) und Temperatur (2K) waren für alle Spektren identisch. Es zeigen sich einzelne Linien.

An unterschiedlichen spektralen Positionen kann man einzelne Absorptionslinien unterschiedlicher Breite identifizieren, deren Intensitäten von der Polarisation des Anregungslichtes abhängen. Die Aufgabe der Auswertung ist nun, diese Linien über die verschiedenen Spektren hinweg zu verfolgen, um letztlich die Orientierung der Anregungspolarisation mit dem höchsten Maximum für jede der Linien zu bestimmen. Die Zuordnung eines Maximums zu einer der sichtbaren Linien wurde anhand der Charakteristika Position und Breite vorgenommen. Ein sehr großes Hindernis bildet die auch hier deutlich erkennbare spektrale Unbeständigkeit. Die Auswahl der Maxima aller Spektren erfolgte von Hand mit anschließendem Lorentzfit an der markierten Position. Linien die nicht gefittet werden konnten ergeben keinen Beitrag für das jeweilige Spektrum. Das Ergebnis dieser Fitprozedur der obigen Anregungsspektren zeigt Abb. 3.22. Auf der linken Seite ist der „Spectral Trail“ der Lorentzfunktionen für die in diesem Beispiel vier identifizierten Linien in einer zu Abb. 3.21 entsprechenden Auftragung dargestellt. Das rechte Schaubild repräsentiert das erste gemessene Spektrum der Polarisation von 150° (schwarz), sowie die passenden Fitfunktionen der vier Spektrallinien (rot) in der Auftragung Intensität über Wellenzahl.

Es fällt auf, dass die gemessenen Spektren eine starke Struktur des Untergrundes besitzen, die durch das Fitten vollständig geglättet wird (daher auch die geringere maximale Intensität des gefitteten „Spectral Trails“). Es ist jedoch unmöglich, diese Strukturen elektronischen oder vibronischen Übergängen zuzuordnen. Je besser sich eine Absorptionslinie von diesem Untergrund abzeichnet, desto genauer sind die Aussagen, die durch die Fitfunktion gemacht werden. Für die Messung einzelner Dipolübergänge gilt dies vor allem für intensive und schmale Linien.

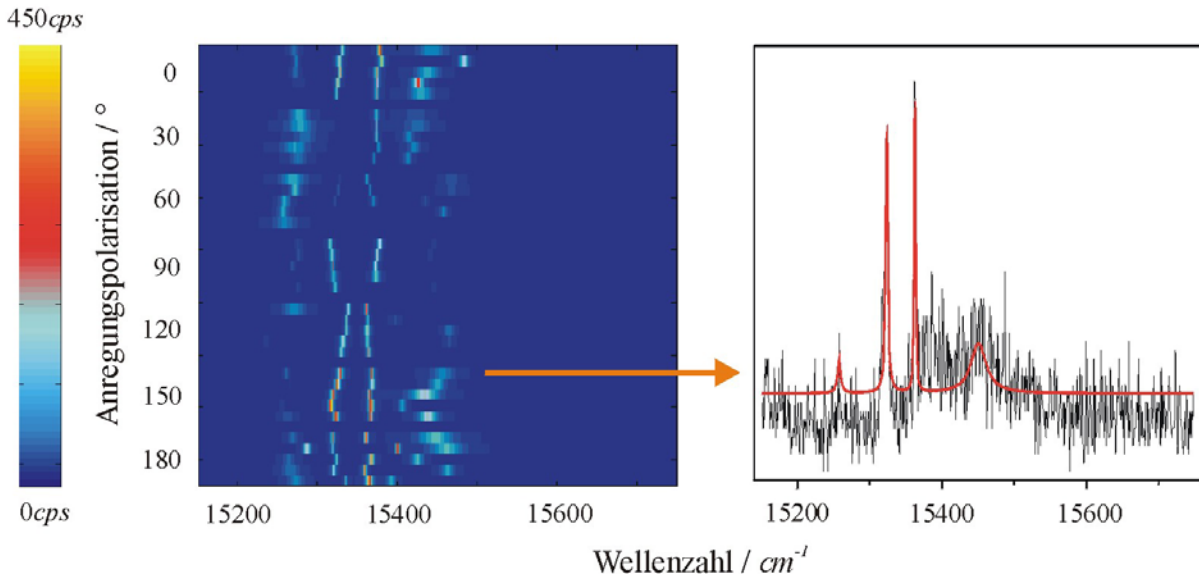


Abb. 3.22: Gefittete Version der Anregungsspektren aus Abb. 3.21. Links ist der „Spectral Trail“ der einzelnen Fitfunktionen als Funktion der Anregungspolarisation über die Wellenzahl mit farbcodierter Intensität dargestellt. Rechts das erste Spektrum der Anregungspolarisation von 150° in gemessener (schwarz) und gefitteter (rot) Version. Die Messparameter sind identisch zu Abb. 3.21. Die Untergrundstruktur der Messung wird durch die Fitfunktionen nicht berücksichtigt.

Für einzelne Dipolübergänge muss die gemessene Intensität I des Linienmaximums aufgrund der C_2 -Symmetrie der Dipolachse wie folgt vom Polarisationswinkel β des Anregungslichts abhängen:

$$I(\beta) = I_{\max} \cos^2 \left(\frac{\pi}{180^\circ} (\beta - \varphi) \right). \quad (3.2)$$

I_{\max} ist hierbei die Intensität bei optimaler Ausrichtung der Anregungspolarisation und $0^\circ \leq \varphi < 180^\circ$ die Phasenverschiebung zwischen der Anregungspolarisation von 0° und eben dieser optimalen Ausrichtung, d.h. der Winkel zwischen der Achse des Dipolmoments und der Polarisationsrichtung von 0° .

Die Frage ist nun, ob die gemessenen Spektrallinien dieser Anforderung genügen. Hierfür werden die Fitparameter der Spektren gleicher Anregungspolarisation zunächst gemittelt. Das Resultat dieser Mittelung ist auf der linken Seite in Abb. 3.23 als „Spectral Trail“ aufgetragen, mit einer zu Abb. 3.22 identischen Farbskala. Aufgrund der Schrittweite von 30° des Polarisors ergeben sich je 7 Intensitätswerte für die vier Linien, die durch \cos^2 -Funktionen angefit-

tet werden. Die Fitfunktion entspricht der Funktion aus Gleichung (3.2) mit einem zusätzlichen y-Achsenabschnitt y_0 . Die Ergebnisse (rot) und die gefitteten Werte (schwarz) sind im rechten Schaubild abgebildet, wobei die Nummer der Teilschaubilder der Linienzuweisung oberhalb des Trails entspricht. Die Intensität in cps ist durch die jeweilige y-Achse gegeben und über den Winkel der Anregungspolarisation aufgetragen. In jedem der vier Teilschaubilder sind die entscheidenden Fitparameter y_0 , I_{\max} und φ der \cos^2 -Funktionen zu finden. I_{\max} ist nun die Amplitude der Fitfunktion.

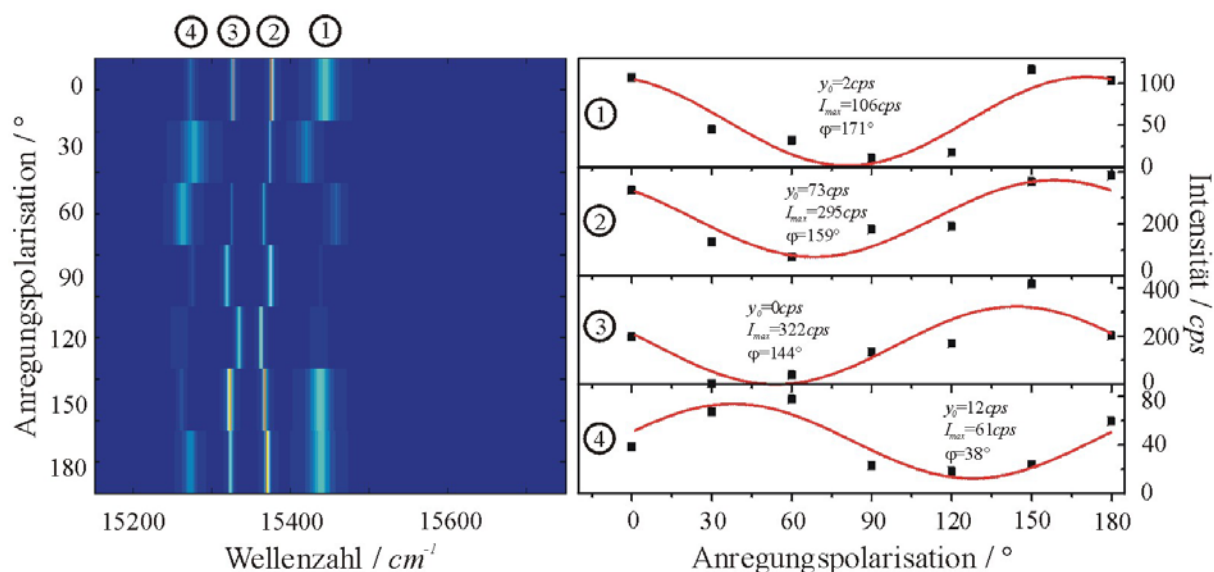


Abb. 3.23: Die linke Seite zeigt den „Spectral Trail“ der Mittelung der Fitfunktionen aus Abb. 3.22 für jede Anregungspolarisation mit identischer Auftragung und identischem Farbcode. Die Nummern über dem Trail ordnen die Teilschaubilder der rechten Seite den vier bekannten Linien zu. Auf der rechten Seite sind die jeweils 7 Intensitätswerte (schwarz) durch eine \cos^2 -Funktion (rot) angefitet. Die ermittelten Fitparameter können dem Schaubild entnommen werden. Alle vier Linien zeigen hohe Modulationstiefen.

Abb. 3.23 zeigt, dass sich die jeweils 7 Intensitätswerte für alle vier Linien gut durch die Fitfunktion beschreiben lassen. Aus y-Achsenabschnitt und maximaler Intensität errechnet sich die Modulationstiefe, die für ein einzelnes Übergangsdipolmoment im Idealfall exakt 1 ist. Für alle vier Linien ergab sich eine Modulationstiefe $> 80\%$.

Die Differenz zweier Phasenverschiebungswinkel entspricht, bei Zuordnung der Linien zu einem Übergangsdipolmoment, dem Winkel zwischen den Projektionen der Übergangsdipolmomente wie in Abb. 3.18A dargestellt.

Linienbreite

Zu jedem gefitteten Spektrum erhält man einen Fitparameter, der die volle Breite der Lorentzlinie bei halbem Maximum (FWHM) angibt. Für eine mittlere Linienbreite könnte man nun alle Spektren anteilig einfließen lassen. Da die Breiten aber mit sinkender maximaler Intensität immer fehlerbehafteter werden, wurden nur die 5 Spektren maximaler Intensität der Absorptionslinie zur Berechnung einer mittleren Linienbreite herangezogen. Für das Beispielmolekül dieses Kapitels ergeben sich dadurch die folgenden Werte (Nummerierung der Linien siehe Abb. 3.23):

$$\text{Linie1: } \gamma = 16 \pm 7 \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Linie2: } \gamma = 2,6 \pm 0,7 \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Linie3: } \gamma = 2,9 \pm 0,4 \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Linie4: } \gamma = 15 \pm 8 \text{ cm}^{-1}$$

Der angegebene Fehler ist die Standardabweichung des Mittelwertes von nur 5 gemittelten Werten. Tendenziell ist der Fit der schmalen Linien mit einem kleineren Fehler behaftet.

Spektrale Position

Die spektrale Position einer Linie ergibt sich als Mittel über die Positionen der Maxima aller zugehörigen Fitfunktionen.

Aufgrund der geringen Zahl an Anregungsspektren pro Komplex, beschränkt sich die Analyse der spektralen Sprünge der Absorptionslinien auf die Aussage, dass sie beobachtbar sind. Da die Aufnahme eines Anregungsspektrums weitaus mehr Zeit in Anspruch nimmt als die eines Fluoreszenzspektrums, steht der nötige Mehraufwand in keinem Verhältnis zum Gewinn.

Die Messparameter der Anregungsspektren einzelner Monomere und Trimere wurden für alle Komplexe identisch gewählt. Bei Abweichungen von den Werten in Tabelle 3-3 ist dies ausdrücklich erwähnt.

Wellenlängenbereich	Anregungsleistung	Verweildauer pro Schritt	Schrittweite der Polarisation	# Spektren je Polarisation
635 – 660nm	200nW	100ms	30°	5

Tabelle 3-3: Parameter für die Messung der Anregungsspektren einzelner LHC-II Komplexe.

3.4.3 Zusammenführung der Polarisationsaussagen und Fazit

Um die Orientierung der emittierenden mit der der absorbierenden Dipolübergänge in einen Zusammenhang zu setzen, muss man lediglich die Orientierung relativ zu einer festen linearen Polarisation bestimmen. Hierfür wurde die Anregungspolarisation von 0° immer so gewählt, dass sie vollständig in Kanal 1 des Wollastonprismas fällt. Damit können die Fluoreszenzpolarisation und die Polarisation der absorbierenden Übergangsdipole relativ zur Anregungspolarisation von 0° und damit relativ zueinander angegeben werden.

Anhand der gemessenen Einzelmolekülspektren kann (mit Einschränkung) die Orientierung der Fluoreszenzpolarisation bestimmt und eine Abschätzung der Größe der spektralen Sprungweiten vorgenommen werden. In den Anregungsspektren lassen sich einzelne Linien identifizieren, denen man eine spektrale Position, eine Linienbreite und im Fall einer linear polarisierten Absorption eine Orientierung des Übergangsdipolmoments zuordnen kann. Hier gilt als Faustregel: Je schmaler die Linie, desto höher die maximale Intensität und desto genauer die Erkenntnisse.

Alle Orientierungen der Übergangsdipolmomente sind Orientierungen einer Projektion des dreidimensional ausgerichteten Moments auf eine Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Anregungs- bzw. Fluoreszenzlichts.

Die Zuordnung der Fluoreszenzpunkte des konfokalen zweidimensionalen Bilds zu einzelnen intakten Komplexen erfolgte anhand folgender Kriterien:

- Emission bei ca. 680nm
- die Existenz weniger oder einzelner, sehr schmaler Linien
- eine absolute Intensität der Fluoreszenz von $1000-2000\text{cps}$ (Monomere) bzw. $2000-2500\text{cps}$ (Trimere) bei $20\mu\text{W}$ Anregungsleistung

Diese Auswahlkriterien werden im anschließenden Kapitel der Auswertung begründet.

3.5 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen einzelner LHC-II Komplexe vorgestellt und in den Stand der Wissenschaft eingeordnet. Da nur die Immobilisierungsmethode auf einer HRP Oberfläche Messungen an Monomeren ermöglichte, sind die Resultate dieser Probenpräparation an den Anfang gerückt. Dabei werden zunächst

die Ergebnisse der Monomere und anschließend die der Trimere präsentiert, jeweils unterteilt in ein Fluoreszenz- und ein Anregungskapitel. Hierbei sind elektronische Übergänge durchweg durch Dipolübergänge genähert. Am Anfang jedes Unterkapitels befinden sich kleine Einführungen, die einen Einblick über die Ziele und Erwartungen der Experimente geben.

Die Messungen an einzelnen LHC-II bei tiefen Temperaturen gestalten sich als ein sehr schwieriges Unterfangen. Dies liegt an der geringen Anzahl emittierter Photonen, die auch bei großen Anregungsleistungen lediglich wenige tausend *cps* in der Detektion ergeben. Monomere zeichnen sich dabei durch etwas geringere Photonenzahlen als Trimere aus.

3.5.1 Monomere mit zwei His6-tags auf einer HRP-Ni-NTA Oberfläche

Eine detaillierte Beschreibung der Präparation einer mit einzelnen Monomeren belegten Oberfläche ist in Kapitel 3.3.3 zu finden. Trotz der angebrachten His6-tags an den beiden Enden der Aminosäuresequenz, kann man nicht von einer festen Orientierung der Komplexe relativ zur Substratoberfläche ausgehen (Kapitel 3.3.3.2). Damit sind die Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten verschiedener Monomere auch nicht notwendigerweise von gleicher Größe. Darüber hinaus kann ein Dipolmoment, dessen Achse aufgrund der Orientierung des gesamten Komplexes parallel zur Richtung des Anregungsstrahles verläuft, weder angeregt noch detektiert werden.

Alle nachfolgenden Resultate sind das Ergebnis von Messungen an 16 einzelnen Monomeren. Es wurden jeweils Fluoreszenz- und Anregungsspektren aufgenommen und nach Kapitel 3.4 ausgewertet.

3.5.1.1 Fluoreszenzspektroskopie

Mittels der Fluoreszenzspektren einzelner Monomere sollen Aufschlüsse über die Anzahl und Orientierungen der emittierenden Zustände sowie zeitlichen Entwicklungen der spektralen Positionen gewonnen werden. Bevor die gemessenen Daten im Detail betrachtet werden, ist es sinnvoll, einige Überlegungen anhand der räumlichen Struktur und der Ergebnisse von Ensemblemessungen über mögliche Spektren eines einzelnen Moleküls anzustellen.

Isolierte LHC-II Monomere fluoreszieren, unabhängig von der Anregungswellenlänge, bei ca. 680nm (vgl. Abb. 3.8). Dies setzt einen Energietransfer zu den emittierenden Zuständen voraus, die stark von den Chl *a* dominiert werden [81,101]. Kühlt man die Umgebung der Monomere auf $T = 2\text{K}$ ($k_B T \approx 1,4\text{cm}^{-1}$) ab, erwartet man, dass zum Zeitpunkt der Emission aufgrund des Energietransfers nur noch der tiefste Zustand aller Chlorophyllmoleküle besetzt ist [90,101]. Die beobachtete Fluoreszenz eines einzelnen Monomers sollte demnach von einem

einigen angeregten Zustand emittiert werden. Handelt es sich hierbei um einen rein elektronischen Übergang, spricht man von der Nullphononenlinie („Zero-Phonon Line“ ZPL oder 0-0). Für die Breite $\Delta\nu$ (FWHM) einer Spektrallinie gilt

$$\Delta\nu = \frac{1}{\pi T_2} = \frac{1}{2\pi T_1} + \frac{1}{\pi T_2^*}, \quad (3.3)$$

wobei T_1 die natürliche Lebensdauer des angeregten Zustandes und T_2^* die reine Dephasierung ist. Die natürliche Lebensdauer eines isolierten LHC-II Komplexes wird in der Literatur mit Werten zwischen $3,5ns$ und $4,5ns$ angegeben [23,112]. Eine obere Grenze der reinen Dephasierung des rotesten Zustandes bei $T = 2K$ auf der Grundlage von Anregungsspektren an einzelnen Trimeren ist in [39] zu $T_2^* \approx 0,5ns$ abgeschätzt. Man würde demnach eine ZPL mit einer Breite erwarten, die deutlich kleiner als die Auflösung des hier verwendeten Spektrographen ist (siehe Kapitel 1.3). Der ZPL schließt sich eine rotverschobene Phononenbande („Phonon Wing“ PW) an. Die Intensität des PW hängt von der Stärke der Kopplung von Phononen der umgebenden Matrix (in diesem Fall des Proteins) an den elektronischen Übergang ab. Bei Heliumtemperaturen wird diese Kopplung als gering beurteilt [26,88,95] und wir erwarten in einem einzelnen Spektrum keinen sichtbaren PW.

Spektren einzelner Monomere

Für jedes der 16 untersuchten Monomere wurden jeweils 100 Spektren mit eingebrachtem Wollastonprisma aufgenommen. Das Beispielfluoreszenzspektrum eines Monomers aus Abb. 3.17 wird in Abb. 3.24A noch einmal aufgegriffen. Es zeigt eine einzelne Linie, deren komplette Intensität in lediglich zwei Pixeln der Kamera konzentriert ist. In B-D sind weitere ausgewählte Spektren des gleichen Monomers abgebildet. Die Messparameter aller Spektren können der Tabelle 3-2 (Seite 116) entnommen werden.

Im Vergleich zum Teilschaubild A ist in den 3 folgenden Bildern ein Springen der Emissionswellenlänge zu sehen. Ist die Spektrallinie in B lediglich verbreitert, kann man in C schon zwei getrennte Maxima erkennen, die in D ca. $1nm$ voneinander entfernt sind. Als Faustregel gilt: Je größer der Sprung in der Wellenlänge, desto seltener das Ereignis, d.h. desto länger die Zeit zwischen den Sprüngen.

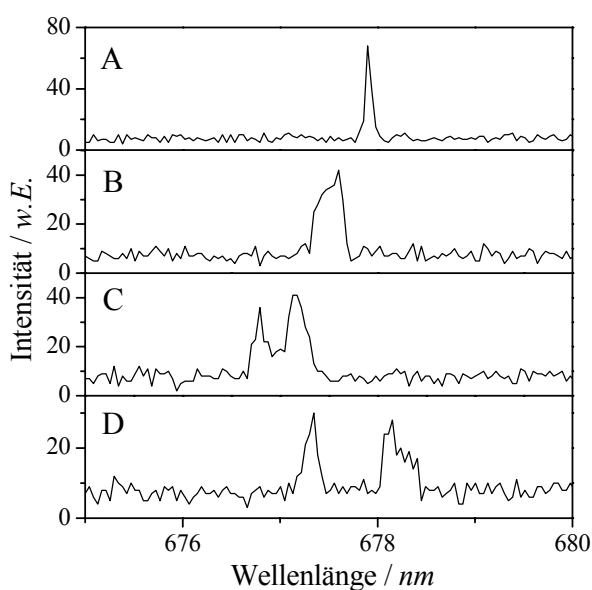


Abb. 3.24: Beispiele für Fluoreszenzspektren eines einzelnen Monomers mit den Messparametern aus Tabelle 3-2 auf Seite 116 bei $T = 2K$. In A liegt die gesamte Fluoreszenz in ca. zwei Pixeln des CCD-Chips. B zeigt eine durch spektrale Diffusion verbreiterte Linie, C einen kleinen Sprung des zentralen Maximums und damit zwei Peaks. In D ist ein Sprung über eine Distanz von ca. $1nm$ beobachtbar, der zwei deutlich getrennte Maxima zur Folge hat.

Diese spektrale Diffusion der Fluoreszenz begründet sich durch Übergänge zwischen verschiedenen Konformationen des Proteins. Ein Wechsel zwischen den Konformationen führt zu einer geänderten Umgebung der eingebetteten Pigmente und damit zu einer Änderung der optischen Übergänge (vgl. Kapitel 1.2). Die spektrale Diffusion ist demnach eine direkte Folge der Proteindynamik. Für die hier vorgestellten Messungen kann die Häufigkeit der spektralen Sprünge aufgrund der Zeitauflösung von 3 Sekunden lediglich abgeschätzt werden. Die Verbreiterung der Linie auf mehrere Pixel des Chips ist in den meisten Spektren beobachtbar und dürfte damit auf einer Zeitskala unter einer Sekunde liegen. Mehrere Linien in einem Spektrum treten seltener auf und deuten auf eine Zeitskala in der Größenordnung von einigen Sekunden für die Sprünge mit einer Weite um $0,5nm$ hin. Sprungweiten größer als $1nm$ treten sehr selten auf und lassen sich Zeiten von einigen 10 Sekunden zuordnen. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung spektraler Diffusion auf einer Zeitskala von $10^{-1} - 10^5 s$ bei $4K$ in Ref. [32]. Allerdings ist die Häufigkeit der spektralen Sprünge von der Leistung des Anregungslasers und damit von der in der Probe deponierten Energie abhängig.

Betrachtet man sowohl die Verbreiterung als auch das Auftreten mehrerer Linien als Auswirkung der Bewegung der Proteinmatrix, so bleibt als Fluoreszenzspektrum eines einzelnen Monomers eine sehr schmale, mit dem hier verwendeten Spektrometer nicht auflösbare ZPL. Die Phononenbande ist dabei im einzelnen Spektrum nicht vom Untergrund zu trennen.

Summenspektren aller 16 Monomere

Das Ensemblespektrum der Fluoreszenz sollte sich aus den Spektren vieler einzelner Monomere zusammensetzen lassen. Hierfür wurden die jeweils 100 Spektren pro Kanal für jedes Monomer aufsummiert, um schließlich zu einem Gesamtspektrum addiert zu werden.

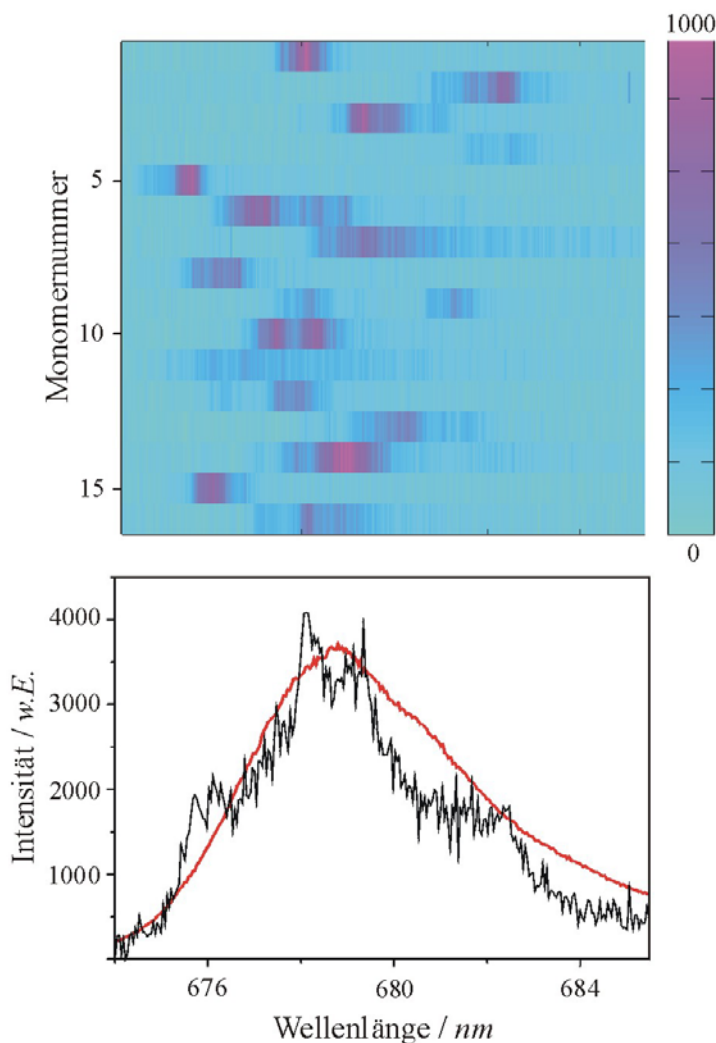


Abb. 3.25: Im oberen Teilbild sind die Summenspektren der 16 untersuchten Komplexe über die Wellenlänge aufgetragen. Die Intensität jedes Spektrums ist durch die Farbskala gegeben und die Messparameter der Einzelspektren sind in Tabelle 3-2 (Seite 116) zu finden. Neben der erkennbaren spektralen Diffusion von teilweise mehreren nm, zeigen die Monomere eine starke Heterogenität. Das untere Schaubild enthält die Summe aller Spektren (schwarz) und ein Ensemblespektrum (rot). Das Maximum von ca. 678,8nm und die Linienform des Summenspektrums, entsprechen dem Ergebnis der Ensemblemessung.

Das Ergebnis ist in Abb. 3.25 dargestellt. In der oberen Hälfte sind die Intensitäten der Summenspektren der 16 Monomere farbcodiert über die Wellenlänge in nm aufgetragen. Innerhalb eines jeden Spektrums kann man die Auswirkungen der spektralen Diffusion anhand der breiten Maxima ablesen. Einige Monomere (z.B. Nummer 9, 10 und 11) zeigen deutlich voneinander getrennte Maxima an verschiedenen spektralen Positionen. Im Falle von Monomer Nummer 9 beträgt die Differenz der zwei Peaks gut 3nm. Noch stärker als die spektrale Diffusion innerhalb der Spektren sticht jedoch die Heterogenität der Komplexe hervor. Offensichtlich werden deutlich unterschiedliche Konformationen des Proteingerüsts eingefroren,

die eine breite Verteilung der spektralen Position des emittierten Lichts zur Folge haben. Im unteren Schaubild der Abb. 3.25 ist die Intensität der Summe aller darüber liegenden Spektren über die Wellenlänge aufgetragen. Obwohl die Anteile der einzelnen Monomere noch eine deutliche Struktur zeigen, kann man qualitativ eine Linienform mit einer steileren blauen Flanke erkennen. Das bei $2K$ gemessene Ensemblespektrum (rot) zeigt sehr ähnliche Charakteristika und deckt sich gut mit der Summe der einzelnen Moleküle. Ensemblemessungen bei $77K$ ergeben ebenfalls eine asymmetrische Form der Emission [84,113], die auf eine schwache Kopplung an Phononen zurückgeführt wird. Die Wellenlänge maximaler Emission ist dort mit $679-680nm$ angegeben und entspricht annähernd dem hier ermittelten Wert von $678,8nm$.

Die Quintessenz ist eine trotz der geringen Statistik gute Übereinstimmung zwischen den Einzelmolekülexperimenten und den Ensemblemessungen. Dies spricht für intakte Monomere ohne geänderte spektrale Eigenschaften und einen repräsentativen Querschnitt der ausgewählten Komplexe.

Polarisation und spektrale Diffusion

Wie in der Einleitung erläutert wurde, erwartet man bei Heliumtemperaturen Fluoreszenz lediglich aus dem energetisch tiefsten Zustand zu beobachten. Wenn die Photonen immer vom gleich orientierten Übergangsdipolmoment emittiert werden, so muss die mittels des Wollastonprismas ermittelte Polarisation für alle Spektren im Rahmen der Messgenauigkeit identisch sein.

Um dies zu überprüfen, werden für alle 16 Moleküle die Polarisationswinkel der jeweils 100 Spektren nach Gleichung (3.1) berechnet und deren Auftragung über die Wellenlänge untersucht (vgl. Abb. 3.20). Es zeigt sich sehr schnell, dass den identifizierten Populationen verschiedene Polarisationswinkel zugeordnet werden können. Ein in diesem Sinn ausgeprägtes Verhalten zeigt das Monomer mit der Nummer 9 in Abb. 3.25. Die „Spectral Trails“ der beiden Kanäle dieses Komplexes sind in Abb. 3.26 auf der linken Seite dargestellt. Die 100 Spektren zeigen Fluoreszenzmaxima bei zwei deutlich verschiedenen spektralen Positionen ($678nm$ und $681,5nm$). Auffällig ist, dass die Linie bei $678nm$ nur in Kanal 1 zu sehen ist, wohingegen die Intensität der roteren Linie offensichtlich in beide Kanäle fällt. Wichtig ist ebenfalls das Verschwinden der Spektrallinien beim Auftauchen der jeweils anderen. Offensichtlich handelt es sich um einen Sprung in der Wellenlänge, der mit einem Sprung in der Orientierung des emittierenden Dipolmoments korreliert.

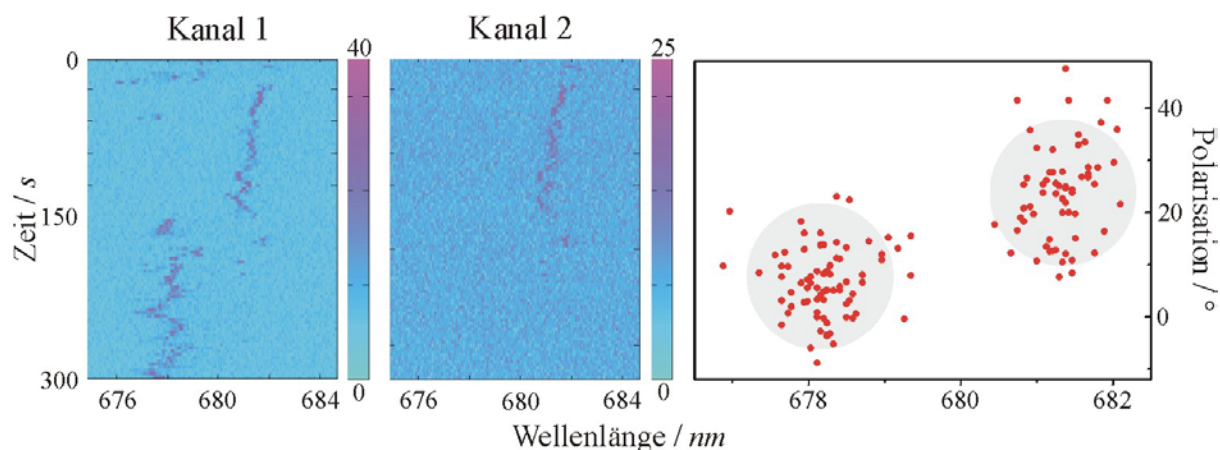


Abb. 3.26: „Spectral Trails“ (links) und Polarisationsverhalten abhängig von der Wellenlänge (rechts) des Monomers Nummer 9 aus Abb. 3.25. Schon im Trail erkennt man zwei Linien mit eindeutig unterschiedlicher Polarisation, die aber nicht zeitgleich in den Spektren auftreten. Dementsprechend deutlich sind zwei Populationen unterschiedlicher Polarisation und Wellenlänge im rechten Schaubild identifizierbar (grau unterlegt). Die Messparameter der einzelnen Spektren finden sich in Tabelle 3-2 (Seite 116).

Deutlicher wird dieser Zusammenhang im rechten Schaubild der Abb. 3.26, in dem die Polarisation jedes Fluoreszenzmaximums über die spektrale Position aufgetragen ist. Es sind eindeutig zwei Populationen zu sehen, die sowohl eine unterschiedliche Peakposition als auch unterschiedliche Polarisationswinkel aufweisen.

Da man zu einem festen Zeitpunkt offensichtlich nur die Fluoreszenz eines Übergangsdipolmoments detektiert, kann es sich nicht um zwei Monomere im Fokus des konfokalen Mikroskops oder um zwei zeitgleich emittierende Zustände eines Monomers mit gestörtem Energietransfer handeln. Eine Rotation eines Teiles oder gar des gesamten Komplexes kann bei Temperaturen von $2K$ mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Zieht man weiterhin in Betracht, dass die zwei rotesten Zustände des LHC-II innerhalb von ca. $2nm$ liegen [81,90,101], bietet sich folgende Erklärung an:

Durch spektrale Diffusion wird die Lage des bisher energetisch tiefsten Zustandes so stark ins Blaue verschoben, dass ein anders orientierter Zustand nun tiefer liegt und die Emission übernimmt. Die hier beobachteten spektralen Sprünge von $\sim 3nm$ und mehr sind dafür ausreichend.

Einen Eindruck von der Häufigkeit dieser Ereignisse erhält man, indem man alle Moleküle auf Populationen mit unterschiedlicher Polarisation untersucht. Von den 16 vermessenen Mo-

nomeren konnte bei fünf die Fluoreszenz eindeutig mindestens zwei verschiedenen orientierten Übergangsdipolmomenten zugeordnet werden. Bei zweien der fünf lässt sich noch eine dritte Population erahnen. Der Sprung in der Polarisation war jeweils mit einem Sprung in der Wellenlänge von $1nm$ und mehr verknüpft.

Bedenkt man nun, dass die spektrale Heterogenität zum Zeitpunkt des Einfrierens deutlich größer als die spektrale Diffusion ist (vgl. Abb. 3.25), so kann man davon ausgehen, dass es für verschiedene Monomere keinen bezüglich spektraler Lage und Polarisation gleichen emittierenden Zustand gibt. Die Orientierung des Übergangsdipolmoments der Fluoreszenz stellt somit keine Referenz für die Dipolmomente der Absorption dar.

In „Fluorescence Line-Narrowing“-Experimenten (FLN) bei $T = 4,2K$ am minoren Lichtsammler CP29, welcher strukturell dem LHC-II Monomer gleicht [114], wurden Beiträge von 3 verschiedenen Chl *a* zum Emissionsspektrum gemessen [115]. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit handelt es sich wahrscheinlich nicht nur um eine rein exzitonische Delokalisierung eines Zustandes auf 3 Chlorophylle, sondern zum Teil um eine Heterogenität der emittierenden Zustände.

In vielen Ensemblemessungen und Simulationen ist dennoch die Rede von einem rotesten Zustand [26,81,90,100,101], der mit einer exakten spektralen Position versehen ist. Gemeint ist damit ein Zustand, der im Mittel über viele Komplexe energetisch am tiefsten liegt. Dies bedeutet jedoch nicht, dass dieser Zustand in allen Komplexen und zu jedem Zeitpunkt der emittierende Zustand ist.

Die identifizierten Populationen der Monomere werden abschließend noch statistisch zusammengefasst. Zu jeder Population lässt sich ein Polarisationshistogramm, ebenso ein Histogramm der spektralen Positionen erstellen und durch eine Gaußfunktion anpassen. Wie anhand von Abb. 3.20 erklärt, geben die Breiten dieser Fitkurven Auskunft über die Genauigkeit der Polarisationsmessung und über die Weite der spektralen Sprünge. Da die sehr großen Sprünge im Allgemeinen zu einer neuen Population führen, sind sie in dieser Statistik nicht erfasst.

Insgesamt wurden in den Spektren der 16 Monomere 28 Populationen mit unterschiedlichen Wellenlängen identifiziert. Die Genauigkeit der Polarisationsangaben beträgt $6,3^\circ$, die durchschnittliche Weite der Sprünge innerhalb einer Population $0,38nm$, wobei jeweils das Mittel der Standardabweichungen der Gaußfunktionen angegeben ist

3.5.1.2 Anregungsspektroskopie

Das Augenmerk dieser Einführung liegt auf der möglichen Zuordnung der Linien der Anregungsspektren verschiedener Komplexe zur Absorption eines bestimmten Übergangsdipolmoments. Kriterien für eine Zuordnung sind die spektrale Position und die Breite der Linien. Dabei fließen die Erkenntnisse des obigen Kapitels 3.5.1.1 sowie die Ergebnisse von Ensemblemessungen, verknüpft mit der räumlichen Struktur der Komplexe, ein. Aufbauend auf der Charakterisierung der Übergangsdipolmomente sollen deren Orientierungen bestimmt werden.

Unter der Annahme, dass die Absorption eines Photons immer mit der gleichen Wahrscheinlichkeit zur Emission eines Photons führt, zeichnet das Anregungsspektrum ein genaues Bild der elektronischen Übergänge des untersuchten Monomers. Wie werden die Spektrallinien dieser Übergänge aussehen? Wie wir in Kapitel 3.5.1.1 gesehen haben, ist die reine Dephasierung des emittierenden Zustandes eines Monomers bei $T = 2K$ in der Größenordnung von Nanosekunden. Der Energietransfer innerhalb eines Monomers ist um ein Vielfaches schneller als die Emission eines Photons. Unter der Annahme einer reinen Dephasierung ähnlicher Größenordnung der emittierenden und absorbierenden Zustände erwarten wir daher einen geringen Einfluss auf die Linienform der hier gemessenen Anregungsspektren. Dies bedeutet, dass die Breite einer Absorptionslinie vornehmlich durch die Lebensdauer dieses angeregten Zustands bestimmt ist. Handelt es sich hierbei um die Übergangsdipolmomente der einzelnen Chlorophyllmoleküle oder um die resultierenden Dipolmomente exzitonisch gekoppelter Chlorophyllmoleküle? Für die eigentliche Messung ist diese Frage zwar unerheblich, für einen Abgleich mit der Struktur allerdings von großer Wichtigkeit. Bis Ende der 90er Jahre wurde von der Annahme schwacher Kopplungen zwischen den Chlorophyllen und daraus folgend von wenig ausgeprägten exzitonischen Wechselwirkungen ausgegangen [24,97,98,116]. Mittlerweile hat sich jedoch die Auffassung sehr heterogener Kopplungen durchgesetzt, sprich eine Mischung aus exzitonischen und lokalisierten Zuständen innerhalb eines Komplexes [100,101,117-120].

Die spektrale Position eines absorbierenden Dipolmoments hängt somit von der Chlorophyllsorte (a oder b), sowie der Proteinumgebung („Site Energy“) und der Kopplung jeweils aller beteiligten Chlorophylle ab. Aufgrund der in Kapitel 3.5.1.1 gezeigten Heterogenität der eingefrorenen Monomere bedeutet dies jedoch nicht, dass Anregungsspektren verschiedener Komplexe hohe Absorption an derselben spektralen Position aufweisen müssen. Die Heterogenität der Fluoreszenzspektren (siehe Abb. 3.25) lässt vielmehr auch für die Absorption auf deutliche Unterschiede in den spektralen Positionen schließen. Zur Charakterisierung eines

Übergangsdipolmoments ist demnach die Wellenlänge maximaler Absorption nur bedingt geeignet.

Bleibt als weiteres Charakteristikum einer Linie deren Breite. Bei Vernachlässigung der reinen Dephasierung ergibt sich aus der Breite nach Gleichung (3.3) direkt die Lebensdauer des angeregten Zustandes und damit eine Rate für den Energietransfer zum nächsten, energetisch niedriger gelegenen angeregten Zustand. Zur Berechnung der Transferraten existieren verschiedene Formalismen, die je nach Kopplungsstärke und Energiedifferenz der beteiligten Zustände angewendet werden können. Der bekannteste ist der Försterenergietransfer [121] für lokalisierte Zustände und schwache Kopplung, weiterhin gibt es verschiedene Dichtematrixansätze (Redfield und modified Redfield [101,118,122,123]), die exzitonische Zustände berücksichtigen. Entscheidend für eine Identifizierung der elektronischen Übergänge über die Linienbreite ist nun, wie stark die Heterogenität der Monomere die Energietransferzeiten beeinflussen wird. Die Struktur des LHC-II [21] spricht für immer gleiche Orientierungen und Abstände der Chlorophylle und damit für gleiche Kopplungsstärken verschiedener Komplexe. Bei starker Kopplung und ähnlichen Energien des 0-0 Übergangs, folglich bei einem schnellen Energietransfer, wird eine Heterogenität der „Site Energy“ besonders große Auswirkungen haben. Langsame Transferzeiten lassen jedoch auf schwach wechselwirkende Zustände schließen und sollten weniger von sich ändernden „Site Energies“ beeinflusst werden.

Die elektronische Anregungsenergie kann sowohl an energetisch tiefer gelegene („downhill“) wie auch an energetisch höher gelegene („uphill“) Zustände abgegeben werden. Da der „uphill“ Transfer mit sinkenden Temperaturen immer langsamer wird [124], werden alle hier beobachteten Transferzeiten dem „downhill“ Transfer zugeschrieben. Entscheidend für die Heterogenität einer Linienbreite ist demnach die Kopplung zu den energetisch tiefer liegenden Zuständen.

Die Anregungsspektren an einzelnen Monomeren wurden alle über den Wellenlängenbereich 635–660nm (vgl. Tabelle 3-3 Seite 121) aufgenommen. Es ist zu erwarten, dass innerhalb dieser 25nm die meisten der Chl *b* und eventuell auch das eine oder andere Chl *a* Molekül einen Beitrag zur Absorption leisten werden.

Durch „Pump and Probe“ Experimente an einem Ensemble von LHC-II Monomeren bei 77K wurden Transferzeiten von einigen hundert Femtosekunden bis hin zu einigen zehn Pikosekunden gemessen [24,98]. In dem für diese Arbeit interessanten Wellenlängenbereich ließen sich dabei die Zeiten 200fs und 3ps zu gleichen Teilen detektieren und jeweils einem Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* zuschreiben. Im Gegensatz zu Messungen an LHC-II Trime-

ren fehlt hier die zeitliche Komponente von 600 fs . Kleima et. al [24] erklären dies mit verlorren oder energetisch verschobenen Chl *a* bei der Monomerisierung.

Für die hier gemessenen Anregungsspektren würde man demnach mehrere Linien (eine für jedes Übergangsdipolmoment) mit mindestens zwei dominierenden Breiten erwarten.

Spektrale Position

Die Anregungsspektren der 16 Monomere wurden nach Kapitel 3.4.2 gefittet und die Auswertung ergibt die mittlere spektrale Position und die Breite der elektronischen Übergänge. Die Messparameter können in Tabelle 3-3 auf Seite 121 nachgeschlagen werden und waren für alle Moleküle identisch. In bezug auf die Ergebnisse der gedrehten Anregungspolarisation soll zunächst der Hinweis genügen, dass alle hier identifizierten Linien eine Modulationstiefe von $> 70\%$ aufweisen und damit eine Betrachtung als einzelne Übergangsdipolmomente rechtfertigen.

In den Anregungsspektren der 16 Monomere wurden insgesamt 55 absorbierende Linien eindeutig erkannt. Die Linienanzahl pro Monomer kann dem Histogramm Abb. 3.27A entnommen werden. Im Durchschnitt ergeben sich 3,4 pro Monomer, mindestens 2, niemals mehr als 5 und die Hälfte aller Komplexe weist 4 auf. Ensemblemessungen an mutierten LHC-II [90] und Messungen, kombiniert mit aufwändigen Simulationen [101], identifizieren 5 bzw. 6 Absorptionsbanden im hier untersuchten Wellenlängenbereich. Eine etwas höhere Zahl, als der hier gemessenen Wert von 3,4.

Es gilt jedoch zu beachten, dass aufgrund der geringen Photonenzahl pro Komplex vor allem breite Linien schwer vom strukturierten Untergrund (vgl. Abb. 3.21) zu trennen sind. Weiterhin spielt die Orientierung des Komplexes eine entscheidende Rolle für die Intensität bzw. die Sichtbarkeit der einzelnen Linien. Nach der Simulation aus Kapitel 3.3.3.2 kann die Orientierung einzelner Monomere durchaus verschieden sein und könnte, neben der Heterogenität durch das Einfrieren der Komplexe, die deutlich unterschiedliche Linienzahl pro Molekül erklären. In diesem Licht scheinen die 3,4 im Schnitt bzw. der Peak bei 4 Linien pro Monomer durchaus realistisch.

Abb. 3.27B zeigt ein Histogramm der spektralen Positionen aller 55 Übergänge. Wie erwartet ergibt sich eine Verteilung ähnlich dem Absorptionsspektrum eines LHC-II Ensembles, das im Bereich um 650 nm eine Schulter aufweist. Dieser Schulter, und damit auch unseren Absorptionslinien, wird ein starker Chl *b* Charakter zugeschrieben. Aus der Abbildung ist es jedoch unmöglich, einzelne Bereiche eines bestimmten Dipolübergangs eines Monomers zu identifizieren.

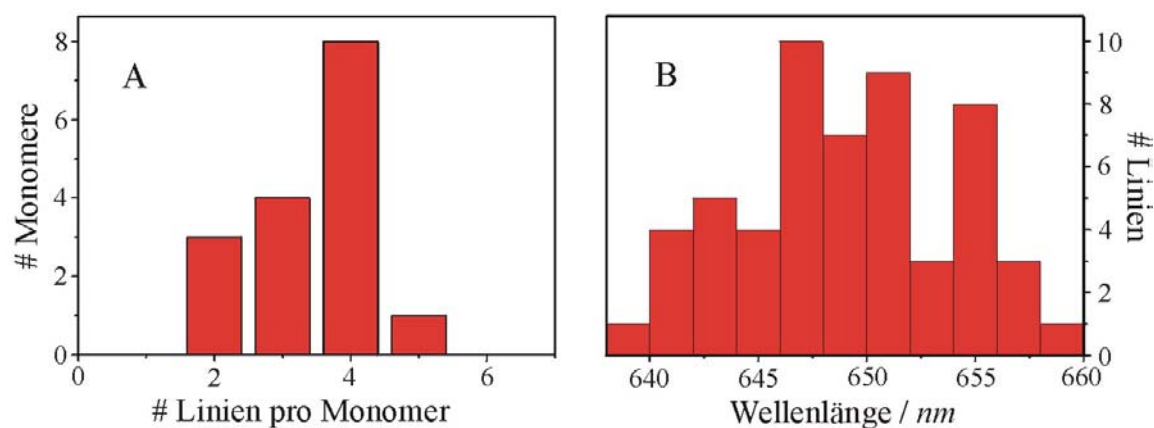


Abb. 3.27: Anzahl der Linien hoher Absorption pro Monomer aus den Anregungsspektren (A). Es konnten immer mindestens 2, aber nie mehr als 5 identifiziert und einzelnen Übergangsdipolmomenten zugeordnet werden. In B ist ein Histogramm der spektralen Position aller 55 Linien dargestellt. Das Maximum der Verteilung bei ca. 650nm stimmt mit dem Maximum der Absorption einer Ensemblemessung in diesem Wellenlängenbereich überein.

Die Linienbreiten

Die Verteilung der mittleren Breiten in cm^{-1} aller 55 Linien ist in Abb. 3.28A abgebildet. Oberhalb der Graphik sind die nach Gleichung (3.3) (unter Vernachlässigung der reinen Dephasierung) errechneten Lebensdauern der angeregten Zustände in ps angegeben. Die größte Häufung des Histogramms erkennt man für sehr schmale Linien mit Linienbreiten von $7cm^{-1}$ und weniger. Hiervon relativ klar getrennt schließen größere Linienbreiten an, denen man Maxima bei ca. $12cm^{-1}$ und $18cm^{-1}$ zuweisen kann. Die entsprechenden Lebensdauern betragen einige ps für die schmalen Linien, 400 und 300 fs für die Häufungen der breiteren Übergänge, was eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Ensemblemessungen ergibt [24]. Interessant wäre nun eine Zuordnung der Lebensdauern zu spektralen Positionen. Hierfür wurden in Abb. 3.28B die gemittelten Wellenlängen der identifizierten Übergänge über die Linienbreite bzw. die Lebensdauer aufgetragen. Offensichtlich sind die in A identifizierten Häufungen relativ homogen über die Wellenlängen verteilt. Lediglich bei den sehr breiten Linien scheint man eine Entvölkerung sowohl im langwelligen als auch im kurzwelligen Bereich zu erkennen. Jedoch verbietet die geringe Statistik ein quantitatives Urteil.

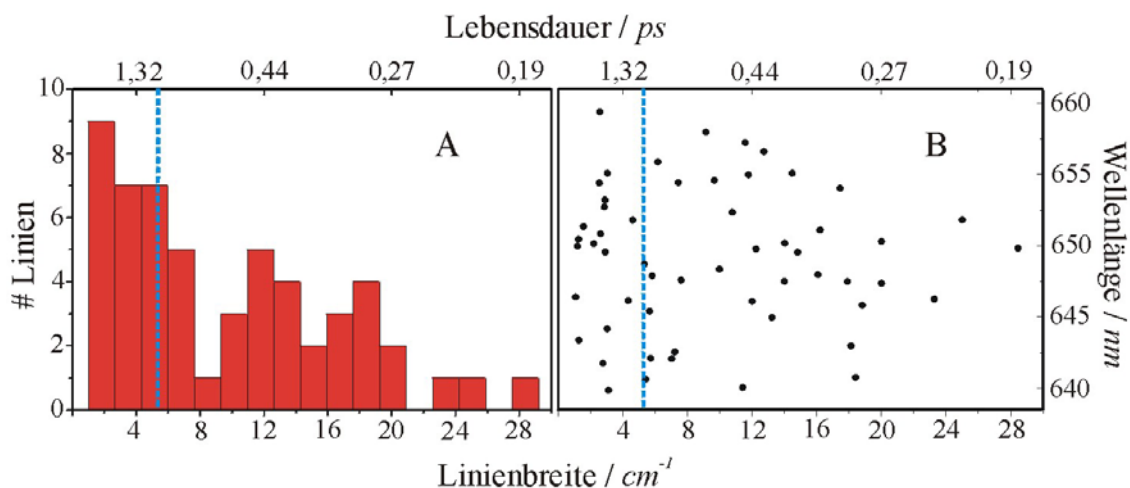


Abb. 3.28: In A sind die Verteilungen der gemittelten Linienbreiten in cm^{-1} (untere Achse) aller Linien der 16 Monomere dargestellt. Die Achse am Kopfende des Teilschaubildes gibt die daraus errechneten Lebensdauern in ps an. Es zeigt sich eine Häufung für schmale Linien, sowie zwei Maxima bei kürzeren Lebensdauern. In B sind die Breiten identisch zu A auf der x-Achse aufgetragen, auf der y-Achse die spektrale Position der Linien. Die blaue gestrichelte Linie ist jeweils die Cutofflebensdauer von 1 ps. Die Linienbreiten sind relativ homogen über den Wellenlängenbereich verteilt.

Im Folgenden wird die Bedeutung der ermittelten Linienbreiten genauer untersucht.

Grundsätzlich wurden nur Linien angefitet, die eine symmetrische Struktur aufwiesen, damit eine zu geringe Breite durch das Springen der Linie während der Akquisition vermieden wird. Allerdings kann der Fehler einer symmetrischen Verbreiterung der Linie durch spektrale Diffusion auf diese Weise nicht vermieden und auch quantitativ nicht bestimmt werden. Da aber Linien mit einer konstanten Breite von nur $2cm^{-1}$ über mehrere Spektren gemessen wurden, sollte er im Allgemeinen kleiner als diese Breite sein. (Diese Verbreiterung ist nicht zu verwechseln mit den Sprüngen der gesamten Linie zwischen den einzelnen Spektren von bis zu einigen zehn Wellenzahlen, was vor allem die Zuordnung der Maxima zu einer Linie erschwert). Darüber hinaus hat der verwendete Farbstofflaser selbst eine Linienbreite von $1cm^{-1}$. Die gemessene Linienform ist eine Faltung der Laser- und der Spektrallinie, was vor allem für schmale Linien zu geringeren Lebensdauern bzw. erhöhten Transferraten führt.

Beiden angeführten Punkten ist eines gemein: Sie führen zu einer Verbreiterung der gemessenen Spektrallinien. Für die daraus errechneten Lebensdauern bedeutet dies, dass sie eine untere Grenze für diesen angeregten Zustand angeben.

Da die breiten Linien leicht im Untergrund verschwinden, sind die Linienbreiten im Bereich weniger Wellenzahlen die beste Möglichkeit eine Verbindung zwischen den Einzelmolekülexperimenten und den Ensemblemessungen herzustellen. Dabei gilt es, die lange Komponente von $3ps$ einem oder mehreren elektronischen Übergängen zuzuweisen. Die Cutofflebensdauer (blaue gestrichelte Linien in Abb. 3.28) für die hierfür berücksichtigten Linien wurde willkürlich auf $\leq 5cm^{-1}$ festgelegt, was ziemlich exakt $\geq 1ps$ entspricht. Es ist gut möglich, dass dadurch einige verbreiterte Linien, mit eigentlich langen Lebensdauern, nicht berücksichtigt werden, allerdings ist es unmöglich, Übergänge mit sehr kurzen Lebensdauern in dieser Auswahl zu finden.

Von den ursprünglich 55 Linien bleiben 18, die mit großer Sicherheit eine Lebensdauer von $\geq 1ps$ besitzen. Die Verteilung der 18 Linien auf die 16 Moleküle ist überraschend. So zeigen 8 Monomere jeweils genau zwei, 2 Monomere je eine und 6 Monomere keine einzige dieser schmalen Linien. Ob die Ursache für fehlende Übergänge mit langen Lebensdauern bei einigen Monomeren deren Orientierung, die Verbreiterung der gemessenen Linien oder aber die Heterogenität der Komplexe ist, kann nicht festgestellt werden. Tatsache ist, dass offensichtlich 50% der Monomere innerhalb des Wellenlängenbereichs $635-660nm$ mindestens zwei angeregte Zustände mit einer langen Lebensdauer besitzen.

In Abb. 3.29 sind die Wellenlängen der 16 Übergänge der 8 Monomere über die Linienbreite aufgetragen. Dabei ist die kürzere Wellenlänge jedes Monomers durch jeweils einen blauen, die längere durch einen roten Punkt gekennzeichnet.

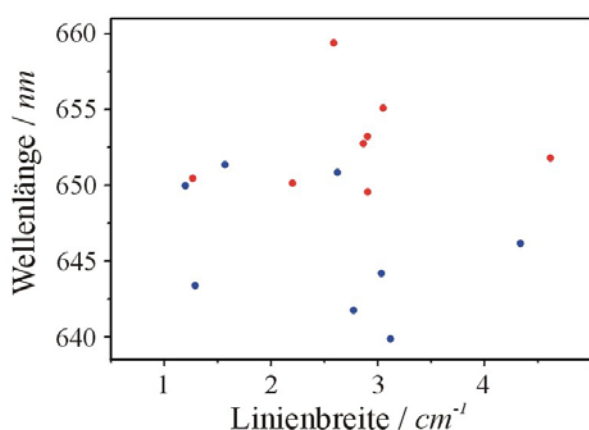


Abb. 3.29: Die spektralen Positionen der Monomere mit je zwei schmalen Linien aufgetragen über die Linienbreite in cm^{-1} . Blaue Punkte stehen für die Übergänge bei kürzerer, rote für die bei längerer Wellenlänge. Es zeigen sich keine erkennbaren Häufungspunkte.

In dieser Auftragung sind weder für die Wellenlängen noch für die Linienbreiten Häufungspunkte zu erkennen. Auch die Zuordnung der beiden Übergänge jedes Monomers zu einem blauerem und einem roteren ist nicht weiter aufschlussreich. Offensichtlich reicht die knappe

Statistik von 8 Molekülen mit je zwei langen Lebensdauer nicht aus, um in der Heterogenität der Monomere eine Zuordnung zu etablieren.

Polarisation

Wie zu Beginn des Kapitels erwähnt, weisen die untersuchten Linien eine Modulationstiefe von $\geq 70\%$ auf. Dabei wurden die Intensitäten eines jeden Übergangs für 7 verschiedene lineare Polarisationsrichtungen des Anregungslichtes ermittelt und durch eine \cos^2 -Funktion angefitet (vgl Kapitel 3.4.2). Die Modulationstiefe ergibt sich dabei aus der Amplitude und dem y-Achsenabschnitt der Fitfunktion und wird exakt 1 für ein linear absorbierendes Übergangsdipolmoment. Abb. 3.30 zeigt die Verteilung der ermittelten Werte, von denen keiner geringer als 0,7 ist. Der Großteil der identifizierten Linien weist sogar eine Tiefe von $\geq 80\%$ auf und die Zuordnung zu einzelnen Übergangsdipolmomenten ist gerechtfertigt.

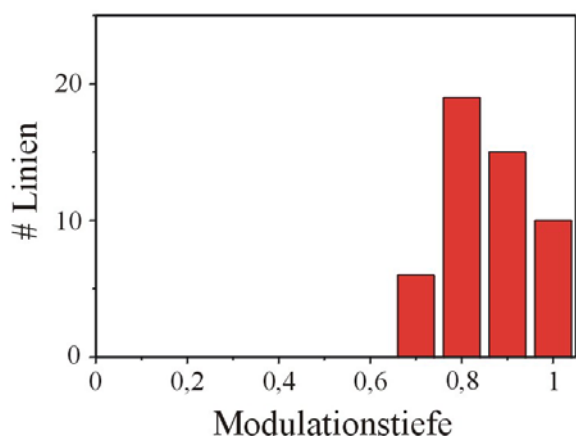


Abb. 3.30: Verteilung der Modulationstiefen der identifizierten Linien. Hierfür wurde die lineare Polarisation des Anregungslichtes gedreht und dabei die Intensität der Linien bestimmt. Die Tiefe ergibt sich aus der Amplitude und dem y-Achsenabschnitt der \cos^2 -Fitfunktion. Die Linien zeigen nahezu lineare Absorption.

Die Orientierung der absorbierenden Dipole eröffnet eine Überprüfung der orientierten Immobilisierung der Monomere. Sollten die Übergangsdipole verschiedener Monomere die gleiche relative Ausrichtung haben, so wäre der Winkel zwischen zwei festen Übergangsdipolen bei entsprechend orientierten Komplexen (vgl. Kapitel 3.3.3.2) immer identisch. Dabei bieten sich die 8 Monomere mit den jeweils zwei schmalen Linien an. Der nach Gleichung (3.2) bestimmte Winkel φ zwischen Übergangsdipol und Anregungslicht wird für jede der Linien berechnet und die Differenz zwischen den Linien des gleichen Monomers gebildet. Dabei ergeben sich Winkel von 0 bis 90° . Die Verteilung der Differenzen für die 8 Monomere ist in Abb. 3.31 dargestellt und es zeigen sich unterschiedliche Winkel für nahezu jedes der Monomere. Grund hierfür kann die in Kapitel 3.3.3.2 vermutete fehlende Orientierung oder aber

eine starke Heterogenität der Orientierung der Übergangsdipolmomente auch bei langen Lebensdauern der entsprechenden angeregten Zustände sein.

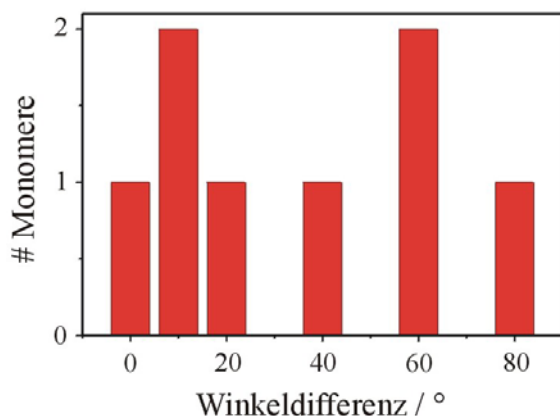


Abb. 3.31: Histogramm der Winkeldifferenzen zwischen den beiden schmalen Linien eines jeden der 8 Monomere aus Abb. 3.29. Die Übergangsdipole unterschiedlicher Moleküle weisen sehr verschiedene relative Winkel auf. Dies spricht für unorientiert immobilisierte Monomere auf der HRP-Oberfläche oder starke Heterogenität.

3.5.2 Trimere mit His6-tags am C-Terminus auf einer HRP-Ni-NTA Oberfläche

Die Probenpräparation ist in Kapitel 3.3.3.2 im Detail beschrieben. Wie dort gezeigt haften die rekonstituierten Trimere orientiert auf einem mit HRP beschichteten Deckglas, so dass die Detektion senkrecht zur Probenoberfläche eine Ausrichtung ergibt, die ähnlich der stromalen Ansicht eines Komplexes (vgl. Abb. 3.5) in der Thylakoidmembran ist. Im Rahmen der Arbeit wurden 16 Trimere mittels polarisationsabhängiger Fluoreszenz- und Anregungsspektroskopie bei $T = 2K$ untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Kapitel 3.4 und die Parameter der einzelnen Messungen können in den dortigen Tabellen (Seite 116 bzw. 121) nachgelesen werden.

3.5.2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Die einzelnen schmalen Fluoreszenzlinien der Monomere wurden in Kapitel 3.5.1.1 der ZPL eines einzelnen emittierenden Übergangsdipolmoments zugeschrieben, das den energetisch tiefsten Zustand des Komplexes bildet. Durch spektrale Diffusion können sich die angeregten Zustände gegeneinander verschieben und die Ausbildung eines neuen energetisch tiefsten Zustandes ist möglich, der dann die Emission übernimmt. Dennoch gibt es zu einem festen Zeitpunkt genau einen emittierenden Zustand. In dieser Erklärung ist impliziert, dass die Anregungsenergie innerhalb der Lebensdauer des Monomers auch bei dieser Temperatur immer die energetische Senke findet.

Im Fall der Trimere stellen sich nun die Fragen, ob zwischen den Untereinheiten eine so starke Kopplung besteht, dass ein eventuell roter Zustand gefunden wird oder ob die einzelnen Untereinheiten ungekoppelt sind und damit unabhängig voneinander fluoreszieren, bei möglicherweise verschiedenen Wellenlängen. Im ersten Fall würde man ein den Monomeren nahezu identisches Fluoreszenzspektrum erwarten: Eine einzelne linear polarisierte, durch die Auflösung des Spektrographen in der Breite begrenzte ZPL um 680nm . Im zweiten Fall sollten sich bis zu drei dieser schmalen Linien zeigen, die jeweils linear polarisiert wären. Durch die spektrale Diffusion und die Belichtungszeit von 3 Sekunden je Spektrum kann die Anzahl der Linien jedoch von der obigen Überlegung abweichen und die Unterscheidung zwischen diesen beiden Fällen wird erschwert.

Die Energietransferrate zwischen den Monomeren eines Trimers kann durch Annihilationsexperimente bestimmt werden [22,91,99]. Bei Raumtemperatur ergaben sich Werte von $(20-40\text{ps})^{-1}$ für die Raten, was sicher zu einer Äquilibration des Trimers innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer führt. Eine temperaturabhängige Studie zeigt allerdings, dass das Gleichgewicht bei $T=13\text{K}$ langsamer erreicht wird [124]. An nativen Trimeren wurde bei $T=4,2\text{K}$ mittels „Nonphotochemical Hole-Burning“ an der spektralen Position $679,8\text{nm}$ ein Loch eingebrannt, dessen Absorptionsstärke vergleichbar mit der eines Chl *a* Molekül ist [26,88]. Dies deutet stark auf einen einzigen emittierenden Zustand pro Trimer hin, entsprechend dem ersten Vorschlag weiter oben.

Spektren einzelner Trimere

Mit den Messparametern aus Tabelle 3-2 (Seite 116) wurden für jeden der 16 Komplexe jeweils 100 Spektren bei bestmöglicher Auflösung aufgenommen. Dabei konnte in den meisten Einzelspektren eine einzelne schmale Linie nahe 680nm beobachtet werden, in einigen aber auch zwei oder noch seltener deren drei. Insgesamt entstand ein den Spektren der Monomere sehr ähnlicher Eindruck. Um die Spektrallinien einzelnen oder mehreren Zuständen zuordnen zu können, wird die Polarisation jedes Peaks aus den beiden Kanälen des Wollastonprismas nach Gleichung (3.1) berechnet. In Abb. 3.32 sind die 100 Spektren eines Trimers für jeden der beiden Kanäle des Wollastonprismas als „Spectral Trails“ (links), sowie die berechnete Polarisation der darin identifizierten Peaks über deren Wellenlänge jeweils als rote Punkte (rechts) eingezeichnet. Dieses Beispiel wurde aus mehreren Gründen ausgewählt. Erstens zeigt es in vielen Spektren mehr als eine einzige Linie, zweitens zeigen diese Linien immer

die gleiche Polarisation und drittens ist die Intensität nahezu ausschließlich in einem Kanal des Wollastonprismas konzentriert.

Für diesen Komplex ergibt sich daher ein klares Bild: Es handelt sich aufgrund der Verteilung auf die beiden Kanäle mit Sicherheit um linear polarisiertes Licht, das zwar in seiner spektralen Position springt, aber eine konstante Polarisation behält. Dies kann man im rechten Teilschaubild anhand der zwei grau unterlegten Populationen deutlich erkennen. Zu jedem Zeitpunkt ist die Fluoreszenz mit großer Sicherheit die ZPL eines einzigen Übergangsdipolmoments.

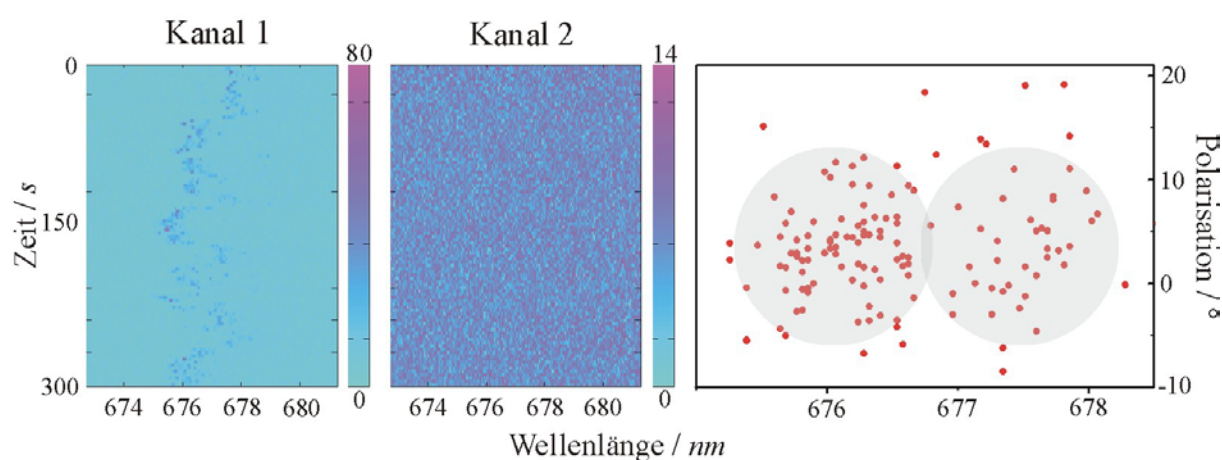


Abb. 3.32: Beispiel von 100 Fluoreszenzspektren eines einzelnen Trimers bei $T = 2K$. Die „Spectral Trails“ (links) der beiden Kanäle des Wollastonprismas zeigen eine einzelne ZPL, die durch starke spektrale Diffusion charakterisiert ist. Die lineare Polarisation erkennt man noch deutlicher in der Polarisations-Wellenlängen-Auftragung des rechten Teilschaubildes. Es handelt sich um zwei Populationen (grau unterlegt) unterschiedlicher Wellenlänge, aber mit gleichem Polarisationswinkel. Die Messparameter der Spektren können in Tabelle 3-2 (Seite 116) nachgeschlagen werden.

Von den 16 untersuchten Trimeren zeigten 9 eine konstante Polarisation aller erkennbaren Peaks. Nun kann das berechnete Ergebnis eines Polarisationswinkels von 45° aus der Messung mit dem Wollastonprisma auch durch völlig unpolarisiertes Licht erreicht werden. Allerdings müssten dazu mehrere Dipolmomente immer exakt die gleiche Wellenlänge emittieren. Weiterhin waren 5 der 9 „Spectral Trails“ mit nur einer Polarisationspopulation sehr stark in jeweils nur einem Kanal konzentriert und dadurch nahezu linear polarisiert. Linien konstanter Polarisation werden daher (nach der hier verwendeten Messmethode) immer der Emission eines einzelnen Zustandes zugeordnet.

In den Spektren der restlichen 7 Trimere konnten eindeutig zwei Populationen von Peaks mit unterschiedlicher Polarisierung identifiziert werden. Geht man davon aus, dass es sich hierbei pro Polarisierung um einen emittierenden Dipol handelt, stellt sich die Frage nach einer möglichen Gleichzeitigkeit der Fluoreszenz. Gleichzeitigkeit bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Linien der verschiedenen Populationen in einem einzelnen Spektrum gemessen werden. Diese Frage kann für die Mehrzahl der Spektren mit nein beantwortet werden. Abb. 3.33 zeigt die Fluoreszenzdaten eines Beispieltrimers mit zwei Populationen (grau unterlegt), die unterschiedliche Polarisationswinkel aufweisen. In den „Spectral Trails“ erkennt man, dass die Spektrallinien der beiden Populationen nicht gleichzeitig auftreten.

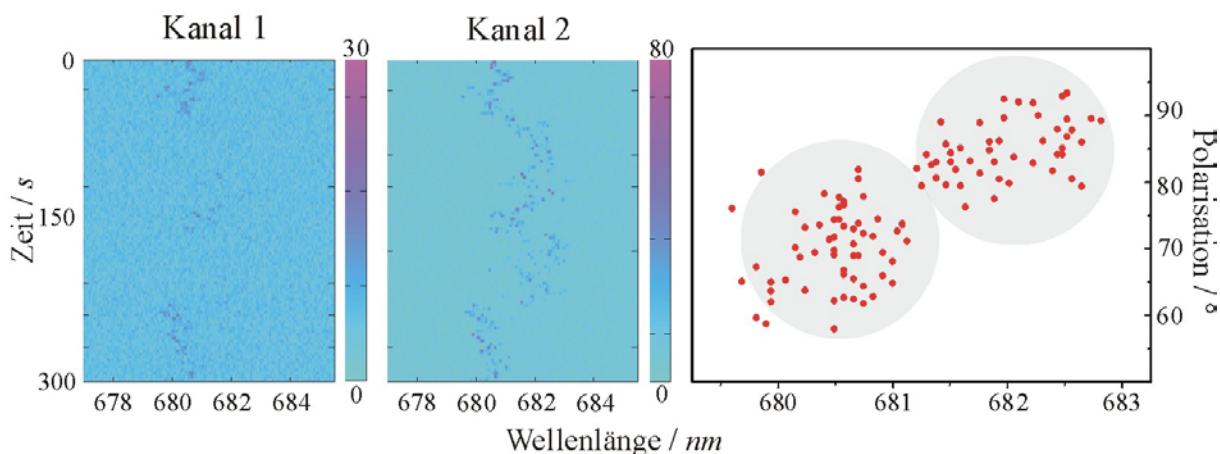


Abb. 3.33: Links sind die beiden „Spectral Trails“ eines einzelnen Trimers dargestellt. Die Auftragung der Polarisierung über die Wellenlänge (rechts) zeigt zwei Populationen (grau unterlegt) mit verschiedenen Polarisationswinkeln. Die Messparameter der Spektren können in Tabelle 3-2 (Seite 116) nachgeschlagen werden.

Begründen lassen sich die beobachteten Populationen verschiedener Polarisierung erneut durch starke spektrale Diffusion (vgl. Kapitel 3.5.1.1), die zu einer Änderung des energetisch tiefsten und damit emittierenden Zustandes des einzelnen Komplexes führen kann.

Die hier untersuchten Trimere zeigen demnach ein sehr ähnliches Fluoreszenzverhalten wie die Monomere. Absorbierte Energie gelangt durch Energietransferprozesse innerhalb des gesamten Komplexes zu einem einzigen, energetisch tiefsten Zustand, der anschließend ein Photon emittiert. Durch spektrale Diffusion können sich die Energien der angeregten Zustände verschieben und ein anderes Übergangsdipolmoment übernimmt die Fluoreszenz. Die ZPL des elektronischen Übergangs ist schmäler als die Auflösung des Spektrographen und in einem einzelnen Spektrum ist kein PW erkennbar. Ordnet man den Übergängen jeweils eine

ungefähre Oszillatorstärke von einem Chl *a* zu, lässt sich das in den emittierenden Zustand eingebrannte Loch mit einer Absorptionsstärke von ca. einem Chl *a* pro Trimer [26,88] erklären. Darüber hinaus können mit diesen Messergebnissen auch die Ergebnisse einer FLN Studie bei $T = 4,2K$ begründet werden, die von vibronischen Streckenschwingungen mindestens zweier verschiedener Chl *a* Moleküle in der Emission eines Trimers berichten [95].

Da schon das emittierende Übergangsdipolmoment eines einzelnen Trimers nicht konstant in der Zeit ist, gibt es für unterschiedliche Trimere bezüglich Polarisierung und spektraler Position keinen gleichen emittierenden Zustand. Damit ist die Polarisierung der Fluoreszenz eines Trimers keine Referenz für die Orientierung der absorbierenden Übergangsdipolmomente.

Abschließend noch ein qualitativer Vergleich der Spektren einzelner Monomere und Trimere. Die Fluoreszenz beider Komplexe ist durch einzelne Nullphononenlinien charakterisiert, wobei die Identität des emittierenden Zustands in der Zeit und von Komplex zu Komplex wechseln kann.

Nun liegen die elektronischen Übergänge der Trimere sehr viel dichter als die der Monomere. Es wäre zu vermuten, dass die durchschnittliche spektrale Sprungweite für einen Wechsel des emittierenden Zustandes und deren Häufigkeit verschieden sein sollte. Die Statistik von jeweils 16 untersuchten Molekülen erlaubt keine quantitative Analyse. Allerdings zeigen mehr Trimere (7 Komplexe) als Monomere (5 Komplexe) mindestens zwei emittierende Zustände. Darüber hinaus waren die Emitterwechsel bei den Monomeren immer mit einem Sprung von $\geq 1nm$ verbunden, während zwei der Trimere bei nahezu gleichbleibender Wellenlänge Populationen verschiedener Polarisierung aufweisen. Beides Tendenzen, die mit den angestellten Überlegungen vereinbar sind.

In Kapitel 3.5.1.1 werden am Ende noch die mittleren Sprungweiten der spektralen Diffusion und eine Abschätzung der Messgenauigkeit der Polarisationsbestimmung angegeben. Die Werte der Trimere fallen mit $0,34nm$ für die Sprungweiten und $6,6^\circ$ für die Polarisierung recht ähnlich zu jenen der Monomere mit $0,38nm$ und $6,3^\circ$ aus.

Summenspektren aller 16 Trimere

Erneut sollen Einzelmolekülspektren mit den Ergebnissen von Ensemblemessungen verglichen werden. Dafür werden die je 100 Spektren jedes Trimers aufsummiert und aus den einzelnen Summenspektren wird ein Gesamtspektrum gebildet. Die farbcodierte Auftragung der

Summenspektren (oben) sowie das Gesamtspektrum (unten schwarz) sind in Abb. 3.34 dargestellt.

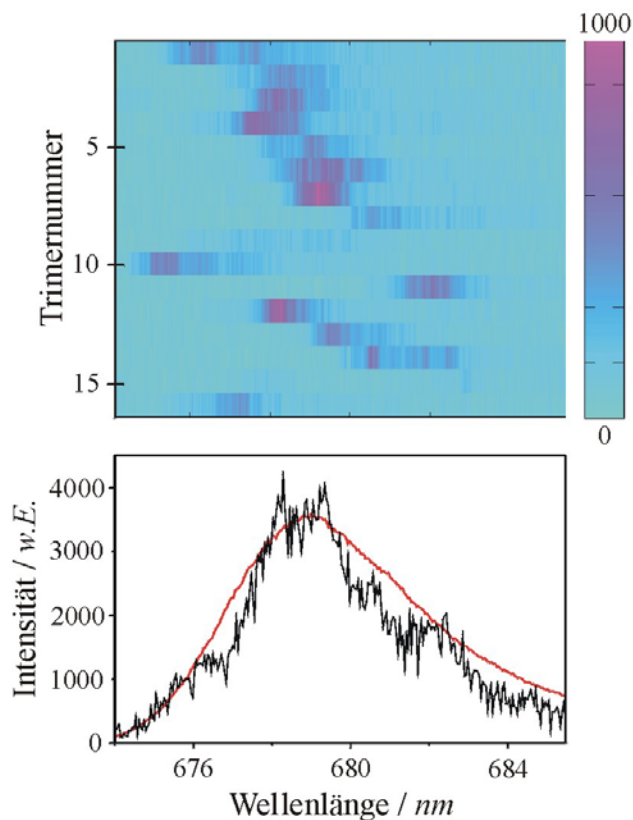


Abb. 3.34: Summenspektren eines jeden der 16 gemessenen Trimere mit farbcodierter Intensität (oben). Die Komplexe zeigen spektrale Diffusion und eine noch stärkere Heterogenität. Das Gesamtspektrum (unten schwarz) aller Trimere ist leicht asymmetrisch und stimmt qualitativ in Linienform und Maximum der Emission (679,2nm) mit dem Messergebnis im Ensemble (rot) überein.

Die Heterogenität der einzelnen Komplexe zeigt sich ebenso wie die spektrale Diffusion innerhalb eines Komplexes in den Summenspektren der 16 Trimere. Das Gesamtspektrum weist immer noch deutliche Strukturen der einzelnen Moleküle auf. Dennoch kann man die etwas steilere blaue Flanke erkennen. Sowohl die leichte Asymmetrie als auch das Maximum von ca. 679,2nm decken sich mit dem gemessenen Ensemblespektrum (rot). In Ensemblemessungen an nativen Trimeren bei $T = 4K$ [26,95] wurde das Maximum der Emission zu ca. 680nm bestimmt.

Die gemessenen Komplexe bilden demnach eine repräsentative Auswahl von offensichtlich intakten Trimeren.

3.5.2.2 Anregungsspektroskopie

Die Linien der Anregungsspektren einzelner Monomere konnten in Kapitel 3.5.1.2 als einzelne elektronische 0-0 Übergänge des Komplexes identifiziert werden. Für die Anregungsspektren der Trimere stellt sich die Frage, welche spektralen Auswirkungen der Zusammenschluss der monomerischen Untereinheiten hat.

In der Literatur wird die maximale Kopplung der Chlorophylle verschiedener monomerischer Untereinheiten mit 34cm^{-1} [101] angegeben. Verglichen mit den Wechselwirkungen innerhalb der Monomere von bis zu 120cm^{-1} ein geringerer, aber nicht zu vernachlässigender Wert. Für den Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* in trimerischen Komplexen wurden in verschiedenen Ensemblemessungen drei dominierende Lebensdauern beobachtet: 300fs mit einem Anteil von 40%, 600fs ebenfalls mit 40% und $4-9\text{ps}$ mit 20% [22,23,91,96]. Die angegebenen Werte beziehen sich auf eine Temperatur von 77K , allerdings wird die Temperaturabhängigkeit allgemein als gering beurteilt. Aus Energietransferstudien an Monomeren schließen Kleima et al. [24] für den Energietransfer von Chl *b* zu Chl *a* auf einen, auch in Trimeren, innermonomerischen Prozess. Da in dieser Arbeit die Chl *b* dominierte Region untersucht wurde, sollten die Anregungsspektren der Trimere der Summe von 3 Monomeren entsprechen. Die mit großer Sicherheit vorhandene Orientierung der Komplexe (vgl. Kapitel 3.3.3.2) und die damit verbundene C_3 -Symmetrie sprechen für eine Symmetrie in der Polarisationsanalyse. Dem entgegen steht die beträchtliche Heterogenität der monomerischen Untereinheiten, die zu völlig unterschiedlichen „Site Energies“ und damit zu verschobenen spektralen Positionen und geänderten Energietransferzeiten innerhalb der einzelnen Monomere eines Trimers führen können.

Ausgehend von einer durchschnittlichen Linienzahl von 3,4 pro Monomer, erwartet man für die Trimere ca. 10 pro Komplex zu finden. Die Zuordnung der einzelnen Maxima zu einer Linie über die verschiedenen Einstellungen der Anregungspolarisation wird durch die nun höhere Liniendichte erheblich erschwert werden.

Wie schon bei den Monomeren sollten die schmalen Linien der Zustände langer Lebensdauern am einfachsten zuzuordnen und von der Heterogenität der Monomere am wenigsten beeinflusst sein.

Spektrale Position

Die Anregungsspektren der 16 untersuchten Trimere wurden nach Kapitel 3.4.2 bearbeitet und ausgewertet. Die daraus ermittelten Werte der Linienzahl jedes Komplexes sind im Histogramm der Abb. 3.35A dargestellt. Die eindeutige Zuordnung der Maxima unterschiedlicher Spektren zu einer Linie wurde hierbei erheblich durch den strukturierten Untergrund erschwert (vgl. Kapitel 3.4.2). Erstaunlicherweise konnten pro Trimer im Schnitt nur 4,3 Linien, also nur knapp eine Linie mehr als bei den Monomeren, identifiziert werden, was deut-

lich unter der erwarteten Anzahl von ca. 10 liegt. Die Gründe hierfür werden im nächsten Unterkapitel erläutert.

Die spektralen Positionen aller 69 Linien zeigen im Histogramm auf der rechten Seite von Abb. 3.35, wie schon bei den Monomeren, eine starke Häufung um 650nm . Die Verteilung gibt damit die Absorptionskurve im untersuchten Wellenlängenbereich qualitativ wieder.

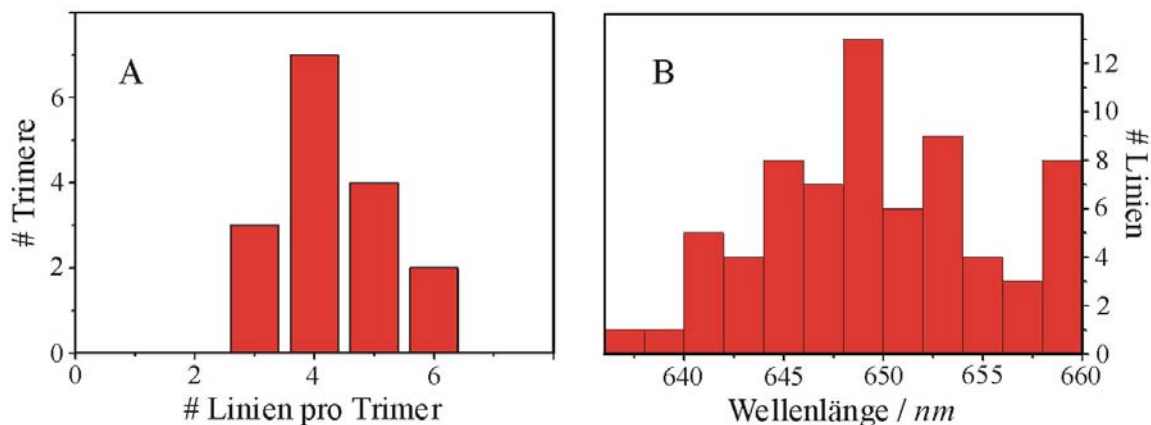


Abb. 3.35: Histogramm der identifizierten Linien pro Trimer (A). Durchschnittlich ergeben sich 4,3 Linien pro Komplex und damit mehr als bei den Monomeren, aber weniger als die erwartete 3-fache Anzahl. In B ist die Verteilung der spektralen Positionen aller 69 Linien dargestellt. Es zeigt sich eine Häufung bei ca. 650nm , entsprechend der Absorption der Chl b Schulter des LHC-II.

Polarisation und Linienbreite

Um eine Begründung für die zu geringe Anzahl an Linien zu finden, hilft eine Betrachtung der Polarisation. Hierfür wird die Intensität der einzelnen Linien als Funktion der Anregungspolarisation aufgenommen und durch eine \cos^2 -Funktion gefittet (vgl. Kapitel 3.4.2). Das Histogramm der Abb. 3.36 enthält die Modulationstiefen der Fitfunktion aller 69 identifizierten Linien. Der erwartete Wert von exakt 1 für ein einzelnes Übergangsdipolmoment wird im Gegensatz zu den Monomeren (vgl. Abb. 3.30) sehr häufig deutlich unterboten. Anhand einer Beispiellinie mit einer Modulationstiefe von 0,4 wird die Ursache für dieses Verhalten erläutert.

Die beiden „Spectral Trails“ aus Abb. 3.36 entstehen durch Auftragung von jeweils 5 Spektren bei einem von 7 festen Winkeln der Anregungspolarisationen über einen kleinen Bereich der durchgestimmten Wellenlänge. Die farbcodierte Intensität zeigt die Maxima, die in der Auswertung einer Linie zugeordnet wurden. Der linke Trail wurde aus den Originalmessda-

ten, der rechte aus den Daten der Lorentzfitfunktionen zusammengesetzt. In den gemessenen Daten sind im abgebildeten Bereich Maxima an sehr unterschiedlichen spektralen Positionen mit gleichzeitig sehr wechselhaften Intensitäten zu erkennen, die durch die Auswertung nur einer Linie zugewiesen werden. Bei genauerem Hinsehen ist es sehr wohl möglich den Messdaten zwei oder sogar drei verschiedene Linien zuzuordnen. Durch die im Vergleich zu den Monomeren erhöhte Liniendichte ist anzunehmen, dass die Maxima spektral benachbarter Übergänge ähnlicher Linienbreite häufiger spektral zusammenfallen. Weiterhin heben sich in den Spektren miteinander verschmolzene Linien großer Breite noch weniger vom unruhigen Untergrund ab und werden erst gar nicht registriert. Schreibt man den Modulationstiefen von 0,5 und weniger jeweils mehr als einen Übergang zu, ergeben sich für die Anregungsspektren der Trimere verglichen mit jenen der Monomere ungefähr doppelt so viele Übergangsdipolmomente.

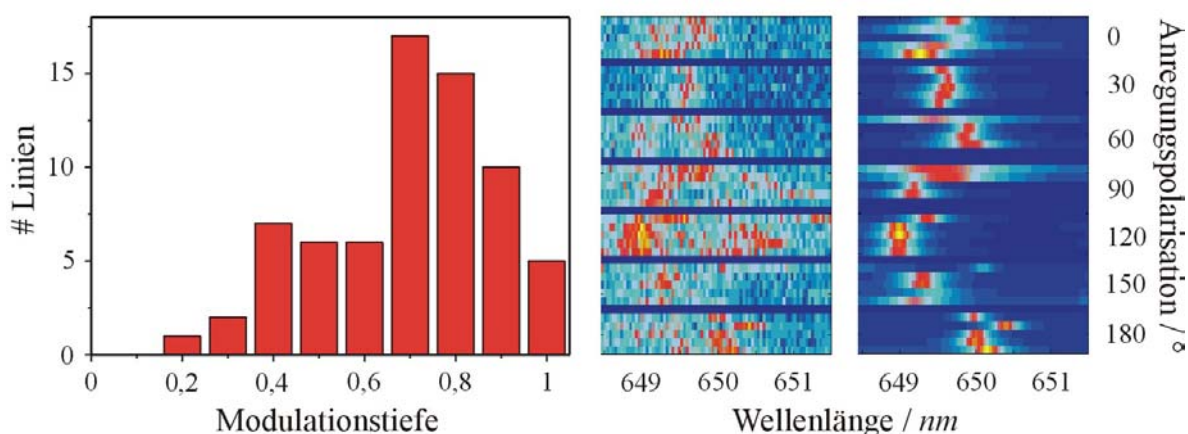


Abb. 3.36: Das Histogramm zeigt die Modulationstiefen der Intensitätsfits der unterschiedlichen linearen Anregungspolarisationen aller 69 Linien. Die Absorption einer nicht zu vernachlässigenden Anzahl ist dabei eindeutig nicht linear und beschreibt damit keinen einzelnen Übergangsdipol. Die „Spectral Trails“ einer Beispiellinie mit einer Modulationstiefe von 0,4 beinhalten die Originalmessdaten (links) und das Ergebnis nach der Lorentzfitroutine (rechts), wobei die Pakete zu je 5 Spektren der gleichen Polarisation über die Wellenlänge aufgetragen sind. Die Maxima der Messung könnten von zwei oder drei Übergängen stammen, werden aber durch die Auswertung zu einer Linie zusammengefasst.

Nach dieser Erklärung sind vor allem die Übergänge mit kurzen Lebensdauern, die zu breiten Linien führen, mögliche Kandidaten für eine Nichtberücksichtigung oder eine falsche Zuord-

nung. Dem entgegen sollten die sehr schmalen Linien sehr viel seltener von diesen unvermeidbaren Fehlern der Auswertung betroffen sein.

In der Tat erkennt man in Abb. 3.37, dass die Linien mit einer Breite von $\leq 5\text{cm}^{-1}$ immer eine Modulationstiefe von mindestens 0,6 aufweisen. Die sehr geringen Modulationstiefen werden von relativ großen Breiten dominiert. Aufgetragen ist in dieser Abbildung neben der Linienbreite in cm^{-1} die nach Gleichung (3.3) berechnete Lebensdauer in ps (mit einer vernachlässigten reinen Dephasierung) über die Modulationstiefe. Jeder Punkt repräsentiert eine der identifizierten Linien. Die Lebensdauer reicht erneut von einigen Pikosekunden bis zu einigen hundert Femtosekunden und deckt einen zu den Ensemblemessungen identischen Bereich ab. Allerdings sind vor allem die kurzen Zeiten im Vergleich zu den Monomeren noch stärker fehlerbehaftet, da sie nun auch noch ein Gemisch oder eine Addition verschiedener Lebensdauern sein können.

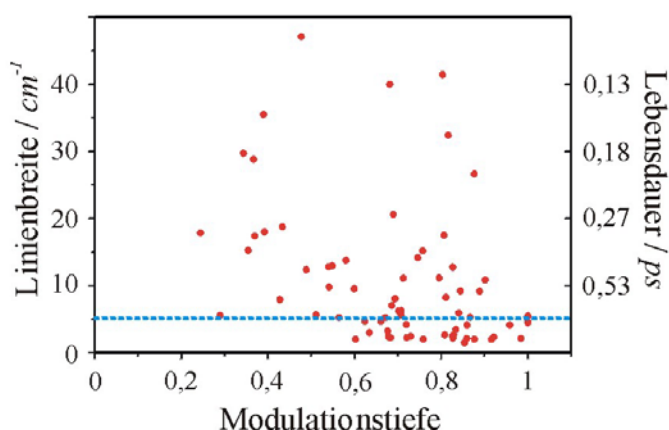


Abb. 3.37: Dargestellt ist die Breite aller ermittelten Linien über die Modulationstiefe. Auf der rechten Achse ist zusätzlich die errechnete Lebensdauer aufgetragen. Blau gestrichelt ist die Cutofflebensdauer von 1ps eingezeichnet. Linien geringer Breite zeigen tendenziell eine größere Modulationstiefe.

Beschränken wir uns im Folgenden auf die Tatsache, dass Übergänge mit sehr kurzen Lebensdauern beobachtet werden können und wenden uns nun den sehr schmalen Linien zu. Die Grenze für sehr schmale Linien wird erneut willkürlich bei $1\text{ps} \hat{=} 5\text{cm}^{-1}$ gezogen (blaue gestrichelte Linie in Abb. 3.37). Wie anhand der Monomere erläutert, handelt es sich bei den angegebenen Lebensdauern um eine Abgrenzung nach unten und alle so ausgewählten Linien werden sicher eine Lebensdauer $\geq 1\text{ps}$ aufweisen. Weiterhin wird eine Modulationstiefe von 0,6 und mehr als ausreichendes Kriterium für einen einzelnen Dipolübergang gewertet.

Von den 69 Linien fallen 26 in diese Auswahl, bei einer ungleichmäßigen Verteilung auf die 16 Trimere. So zeigen 3 Moleküle keinerlei Linien dieser Art, 5 genau eine, 4 deren zwei, 3

Komplexe drei Linien und genau einer zeigt vier sehr schmale Linien im untersuchten Wellenlängenbereich. Dies ist in zweierlei Hinsicht überraschend: (1) Geht man davon aus, dass sowohl bei den Monomeren als auch bei den Trimeren ein ähnlicher Prozentsatz der schmalen Linien tatsächlich detektiert wurde, so ergeben sich für die Trimere mit 1,6 Linien pro Molekül nur marginal mehr als für die Monomere (1,1 pro Molekül). (2) Die Anzahl der schmalen Linien pro Trimer ist trotz der festen Orientierung der Komplexe nicht konstant. Damit ist die unorientierte Immobilisierung der Monomere (siehe Kapitel 3.5.1.2) nicht die alleinige Erklärung für die heterogene Verteilung ihrer schmalen Linien.

Nimmt man die in Kapitel 3.3.3.2 vorgeschlagene feste Orientierung der Trimere an, bleibt zunächst die Erkenntnis, dass die absorbierenden Linien der monomerischen Untereinheiten sehr heterogen sind, sprich: Die C_3 -Symmetrie einzelner Trimere ist in den Anregungsspektren nicht beobachtbar.

In Abb. 3.38 sind die 26 Linien jeweils als farbige Punkte in der Auftragung mittlere Wellenlänge in nm über die Breite in cm^{-1} dargestellt. Die einzelnen Farben markieren die Linienposition ausgehend von der kleinsten Wellenlänge innerhalb eines Trimers. Blau ist die erste spektrale Position (kleinste Wellenlänge), cyan die zweite, orange die dritte und der rote Punkt markiert die einzige vierte Linie eines Komplexes. Wie man unschwer erkennen kann, sind die absorbierenden Dipolübergänge relativ gleichmäßig sowohl über die Wellenlänge als auch über die Linienbreite verteilt und lassen somit keine Zuordnung zu einer der Größen zu.

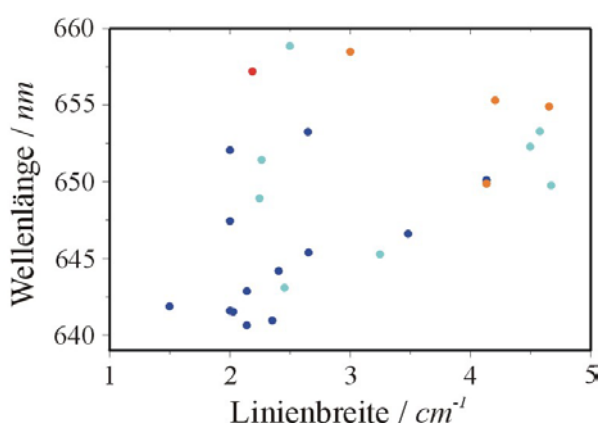


Abb. 3.38: Mittlere spektrale Position der Zustände mit langen Lebensdauern aufgetragen über die Linienbreite. Die 4 Farben geben die Linienposition innerhalb eines Komplexes an. Blau für die Linie der kürzesten Wellenlänge, dann aufsteigend cyan, orange und rot. Die Punkte sind relativ gleichmäßig verteilt.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass die relativen Orientierungen der einzelnen Dipolmomente eines Trimers keine Korrelation mit den Winkeldifferenzen der Dipolmomente anderer Trimere zeigen.

3.5.3 Abschließende Diskussion der Messungen an einzelnen LHC-II mit His6-tags

Die Ergebnisse der Fluoreszenzspektroskopie ergeben ein klares Bild und sind mit den Forschungsergebnissen anderer Gruppen vergleichbar. Sowohl bei Monomeren als auch bei Trimeren erreicht eine elektronische Anregung bei den hier verwendeten Temperaturen immer den energetisch niedrigsten Zustand, dessen Identität von der Konformation des Proteingerüsts abhängig ist. Übergänge zwischen Konformationen können einen Wechsel des tiefsten und damit emittierenden Zustands zur Folge haben. Unterschiedliche Konformationen der einzelnen Komplexe zum Zeitpunkt des Einfrierens sind die Ursache für die starke Heterogenität der gemessenen Spektren.

Deutlich schwieriger gestaltet sich die Interpretation der Ergebnisse der Anregungsspektroskopie. Dabei erweist sich die spektrale Position der absorbierenden Übergänge als stark heterogen und ohne messbare Korrelation zur Breite der Linien und damit zur Lebensdauer. Die Lebensdauern selbst können allerdings mit den Energietransferzeiten von Chl *b* auf Chl *a* aus Ensemblesmessungen verglichen werden.

Für die monomerischen Komplexe ergaben sich aus „Pump and Probe“ Experimenten mit 200 *fs* und 3 *ps* zwei dominierende Komponenten mit einem Anteil von jeweils ca. 50% [24]. Lebensdauern in diesen Größenordnungen werden auch in den Einzelmolekülexperimenten dieser Arbeit im Wellenlängenbereich zwischen 635 *nm* und 660 *nm* nachgewiesen. Ungefähr ein Drittel der identifizierten Linien entspricht hierbei angeregten Zuständen mit einer Lebensdauer von ≥ 1 *ps*. Ein quantitativer Vergleich dieser 33% mit dem Anteil von 50% der langsamen Komponente am Energietransfer der Ensemblesmessungen ist allerdings aus mehreren Gründen nicht angebracht:

Bei den Zeiten der Ensemblesmessungen handelt es sich um den Energietransfer von 650 *nm* zu Regionen jenseits von 660 *nm*, während die Einzelmoleküluntersuchungen die Lebensdauern elektronischer Anregungen in der Chl *b* Region nachweisen. Der Energietransfer zwischen den Chl *b* [125] wird demnach in die Ergebnisse der einzelnen Monomere einfließen, jedoch nicht in die Messungen am Ensemble.

Um den absoluten Anteil am Energietransfer zu bestimmen, müsste neben der Anzahl der Linien auch die Oszillatorstärke der Übergänge berücksichtigt werden.

Die Zustände langer Lebensdauern sind sehr ungleichmäßig auf die 16 untersuchten Monomere verteilt. Hierfür mögliche Erklärungen sind die wahrscheinlich fehlende Orientierung und die starke Heterogenität der monomerischen Komplexe.

Die Transferzeiten von Chl *b* auf Chl *a* der Trimere werden in der Literatur mit 300 fs (40%), 600 fs (40%) und 4–9 ps (20%) für das Ensemble angegeben [22,23,91,96]. Auch hier bestätigen die Einzelmolekülmessungen die Größenordnungen dieser Zeiten. Im Gegensatz zu den Monomeren ist es schwieriger, die nun dichter liegenden Linien einzelnen Übergängen zuzuordnen. Dies gelingt am Besten für die schmalen Linien der Anregungsspektren mit einer korrespondierenden Lebensdauer von ≥ 1 ps. Hierbei zeigen sich bei den Trimeren im Vergleich zu den Monomeren nur ca. 50% mehr Zustände mit langen Lebensdauern. Dies entspricht einem kleineren relativen Anteil der langen Transferzeiten und ist in Übereinstimmung mit den Ensemblemessungen. Als mögliche Ursachen wurde in Ref. [24] der Verlust oder die Verschiebung der Absorption von Chl *a* bei der Monomerisierung vorgeschlagen. Da es sich bei den hier untersuchten Monomeren und Trimeren um rekonstituierte Komplexe handelt, wird der Verlust von Chlorophyllen als unwahrscheinlich angesehen. Als Erklärung für die geänderten Transferzeiten bleiben die Kopplung der Pigmente zwischen den monomerischen Untereinheiten und die Änderung der „Site Energy“ bei der Trimerisierung. Festzuhalten gilt, dass Trimere nicht nur die Summe von 3 einzelnen Monomeren sind.

Wie schon bei den Monomeren sind auch bei den Trimeren die Zustände langer Lebensdauern sehr ungleichmäßig auf die untersuchten Komplexe verteilt. Aufgrund der orientierten Immobilisierung der Trimere ist die Ursache definitiv in der starken Heterogenität zu finden.

Eine Bestimmung der elektronischen Übergänge des LHC-II mit einer durchschnittlichen spektralen Position, den im Mittel beteiligten Chlorophyllen und einer durchschnittlichen Lebensdauer, ist mit den hier vorgestellten Messdaten nicht möglich. Die beobachtete starke Heterogenität erstreckt sich dabei über alle hier gemessenen Größen. Dies ist in Übereinstimmung mit einer umfassenden Modellierungsstudie [101], in welche die Ergebnisse der räumlichen Struktur nach Ref. [21] als auch verschiedener spektroskopischer Messungen einfließen. Dabei wird den „Site Energies“ und damit den spektralen Positionen, den beteiligten Chlorophyllen und damit den Orientierungen der Übergangsdipolmomente und den Energietransferzeiten ein stark heterogener Charakter zugeschrieben.

Die Studie erlaubt eine Identifizierung der Chlorophylle, die mit hoher Wahrscheinlichkeit bestimmte elektronische Übergänge dominieren. Hierzu ist in Abb. 3.39 noch einmal die räumliche Anordnung der Chlorophylle eines Trimers analog zu Abb. 3.6B dargestellt. Abb. 3.39A zeigt die Schicht nahe dem Stroma und B die nahe dem Lumen, jeweils in stromaler Ansicht. Die Chlorophylle (Chl *a* in rot, Chl *b* in blau) jeder monomerischen Untereinheit sind mit farbigen Ellipsen unterlegt. Die blauen Umrandungen heben die für uns interessanten Pigmente hervor.

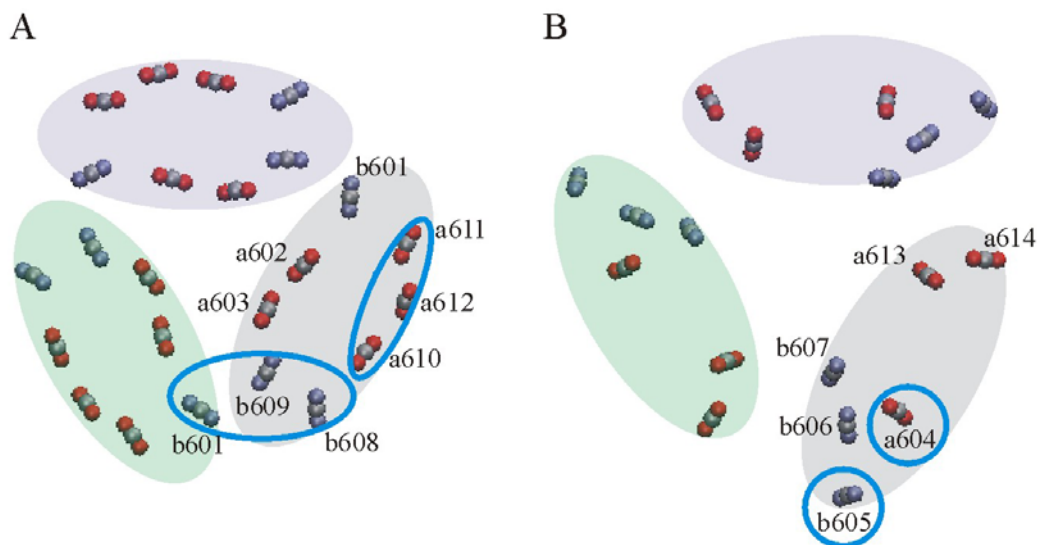


Abb. 3.39: Räumliche Anordnung der Chlorophylle eines Trimers entsprechend Abb. 3.6B. Die Chlorophylle sind durch das zentrale Magnesiumatom und zwei Stickstoffatome (rot für Chl *a* und blau für Chl *b*) symbolisiert. Farbige Ellipsen zeigen die Zugehörigkeit der Pigmente zu einer monomerischen Untereinheit. Mit Blickrichtung von der stromalen Seite sind in A die stromale Schicht und in B die luminalen Schicht dargestellt. Die blauen Umrandungen greifen spezielle Chl heraus.

Nach Novoderezhkin et al. [101,125] sind die angeregten Zustände über die Chlorophylle delokalisiert, allerdings ist der Grad der Delokalisierung und damit der exzitonische Charakter von Zustand zu Zustand sehr verschieden. Die Variation der „Site Energies“ kann zu einer völlig geänderten Beteiligung der einzelnen Chlorophylle an den angeregten Zuständen des LHC-II führen. Damit verknüpft ist die Heterogenität der spektroskopischen Messgrößen. Eine wahrscheinliche Konformation des LHC-II ergibt sich aus einer Mittelung über viele Ergebnisse einer Monte-Carlo-Simulation. Hierbei dominieren 3 Chl *a* (a610, a611, a612) die energetisch tiefsten Zustände [101]. Die Lage dieses „Clusters“ am Rand der Trimere ermög-

licht die Energieweiterleitung zu anderen Lichtsammelkomplexen und schließlich zum Reaktionszentrum. Die in dieser Arbeit beobachtete Fluoreszenz ist wahrscheinlich in den meisten Fällen stark mit diesen 3 Chlorophyllen assoziiert.

Um die langsamen Transferzeiten in der Chl *b* Bande zu erklären, benötigt man Pigmente, die eine schwache Kopplung an die energetisch tiefer liegenden Zustände aufweisen. Die Struktur bietet hierfür zwei Kandidaten an, das a604 und das b605. Beide zeigen keine starke Kopplung zu anderen Chl *a* und werden auch im Modell von Novoderezhkin mit den langlebigen Zuständen, den sogenannten „Bottlenecks“ verknüpft. Die zugehörigen Q_y -Übergänge liegen zwischen 650 und 665nm und damit etwas weiter im Roten als die hier gemessenen schmalen Linien.

Für die Kopplung der Untereinheiten eines Trimers sind die Chlorophylle b608 und b609 eines Monomers, sowie das b601 des benachbarten Monomers zu berücksichtigen. Zwischen diesen Pigmenten wurde die Kopplungsstärke von 34cm^{-1} berechnet. Die in den Fluoreszenzspektren beobachtete Äquilibration der elektronischen Anregung innerhalb eines Trimers benötigt die Wechselwirkung der monomerischen Untereinheiten und impliziert eine Änderung des Energietransfers. Die geringe Anzahl schmaler Linien in den Anregungsspektren der Trimere könnte auf die Kopplung dieser Chlorophylle zurückzuführen sein.

Eins der hier herausgegriffenen Chlorophylle wurde in der Struktur von 1994 fälschlicherweise als Chl *b* identifiziert (a611) und eines gar nicht aufgelöst (b605). Dies erklärt die teilweise große Diskrepanz zwischen den Vorschlägen zur elektronischen Struktur der Vergangenheit [23,98,118] und den jetzigen Erkenntnissen [101].

Wie schon in der Einführung erwähnt ist die Hauptaufgabe des LHC-II die Absorption des Sonnenlichts und die Weiterleitung der elektronischen Anregung an das Reaktionszentrum. Darüber hinaus werden dem LHC-II weitere Funktionen zugeordnet, wie der Abbau von Überschussenergie oder die strukturelle Anordnung der Thylakoidmembran. Es wird vermutet, dass die Antennenkomplexe diese Aufgaben durch teilweise drastische Änderungen in der Konformation des Proteingerüsts wahrnehmen können [83], z.B. ein „Umklappen“ des gesamten N-Terminus [126]. Der LHC-II ist demnach kein Pigment-Protein-Komplex, der lediglich auf eine Hauptaufgabe optimiert ist, sondern vielmehr ein Multitalent, das auch bei geänderter Struktur dennoch die Absorption von Licht und die korrekte Weiterleitung der Anregungsenergie gewährleistet. Diese biologisch notwendige Flexibilität der Komplexe ist letztlich eine Erklärung für die in dieser Arbeit beobachtete starke Heterogenität.

Es erscheint durchaus wahrscheinlich, dass einzelne Komplexe in einer Detergenzhülle zum Zeitpunkt des Einfrierens deutlich verschiedene Konformationen des Proteingerüsts einnehmen können. Die unterschiedlichen Konformationen führen zu unterschiedlichen „Site Energies“ und damit zu unterschiedlichen spektroskopischen Eigenschaften. Das Proteingerüst der eingefrorenen Komplexe hingegen sollte offensichtlich auf minimale Bewegungen eingeschränkt sein. Diese Überlegungen stehen im Einklang mit den in dieser Arbeit gemessenen Ergebnissen. So ist die Heterogenität der verschiedenen Komplexe deutlich stärker ausgeprägt als die spektrale Diffusion eines einzigen Komplexes.

Eine interessante Fragestellung in diesem Zusammenhang wäre die Zuordnung einer gemessenen elektronischen Struktur zu einer Konformation und der damit verbundenen Funktion. Hierfür müsste jedoch die Konformation der eingefrorenen Komplexe festgelegt sein, was im Rahmen der hier durchgeführten Experimente nicht gegeben war.

3.5.4 Trimere in Liposomen

Native Trimere wurden aus Blättern der Erbsenpflanze extrahiert und einzeln in Liposomen mit einer Lipidzusammensetzung ähnlich der Thylakoidmembran inseriert. Zur Immobilisierung wurde wahlweise eine Quarz- oder eine Glimmeroberfläche verwendet. Im Fall des Glimmersubstrats ergeben sich dadurch geplatze, im Fall des Quarzsubstrats ungeplatze Liposomen (siehe Kapitel 3.3.2). Die Ergebnisse werden abschließend parallel vorgestellt.

Die Proben wurden entsprechend Kapitel 3.3.2 unter Verwendung der identischen Lösung inserierter LHC-II Trimere in Liposomen präpariert und mittels des konfokalen Mikroskops bei $T = 2K$ untersucht. Die Messparameter der aufgenommenen Fluoreszenzspektren können in Tabelle 3-2 (Seite 116) nachgeschlagen werden und waren für alle Moleküle identisch gewählt. Unabhängig von der Substratoberfläche zeigen sich in den Spektren Linien bei ca. $680nm$, was auf die Insertion von Trimeren in die Liposomen schließen lässt.

Die unterschiedlichen Präparationsmethoden ergeben trotz identischer Liposomenlösung verschiedene Ergebnisse. In Abb. 3.40 sind die „Spectral Trails“ der Fluoreszenz beider Kanäle des Wollastonprismas sowie die Auftragungen der berechneten Polarisationswinkel über die Wellenlänge für jeweils einen einzelnen Fluoreszenzpunkt der Probe, immobilisiert auf Glimmer (A) bzw. Quarz (B), abgebildet. Es handelt sich um repräsentative Beispiele der jeweiligen Präparationsmethode mit ähnlicher Fluoreszenzintensität.

Vergleicht man zunächst die jeweils 100 Spektren der Trails, erkennt man, dass das auf Glimmer geplatze Liposom nahezu immer mehrere Linien innerhalb eines Spektrums auf-

weist. Die identische Liposomenlösung, auf eine Quarzoberfläche aufgebracht, zeigt hingegen offensichtlich ein einzelnes Trimer, das in den meisten Spektren nur eine Spektrallinie besitzt. Die maximale Intensität der Fluoreszenzlinien ist im Falle des Quarzsubstrates bei gleichen Anregungsparametern deutlich größer. Durch die höhere Anzahl an Linien erhält man dennoch für beide Komplexe eine vergleichbare, über die Wellenlänge integrierte Fluoreszenzintensität.

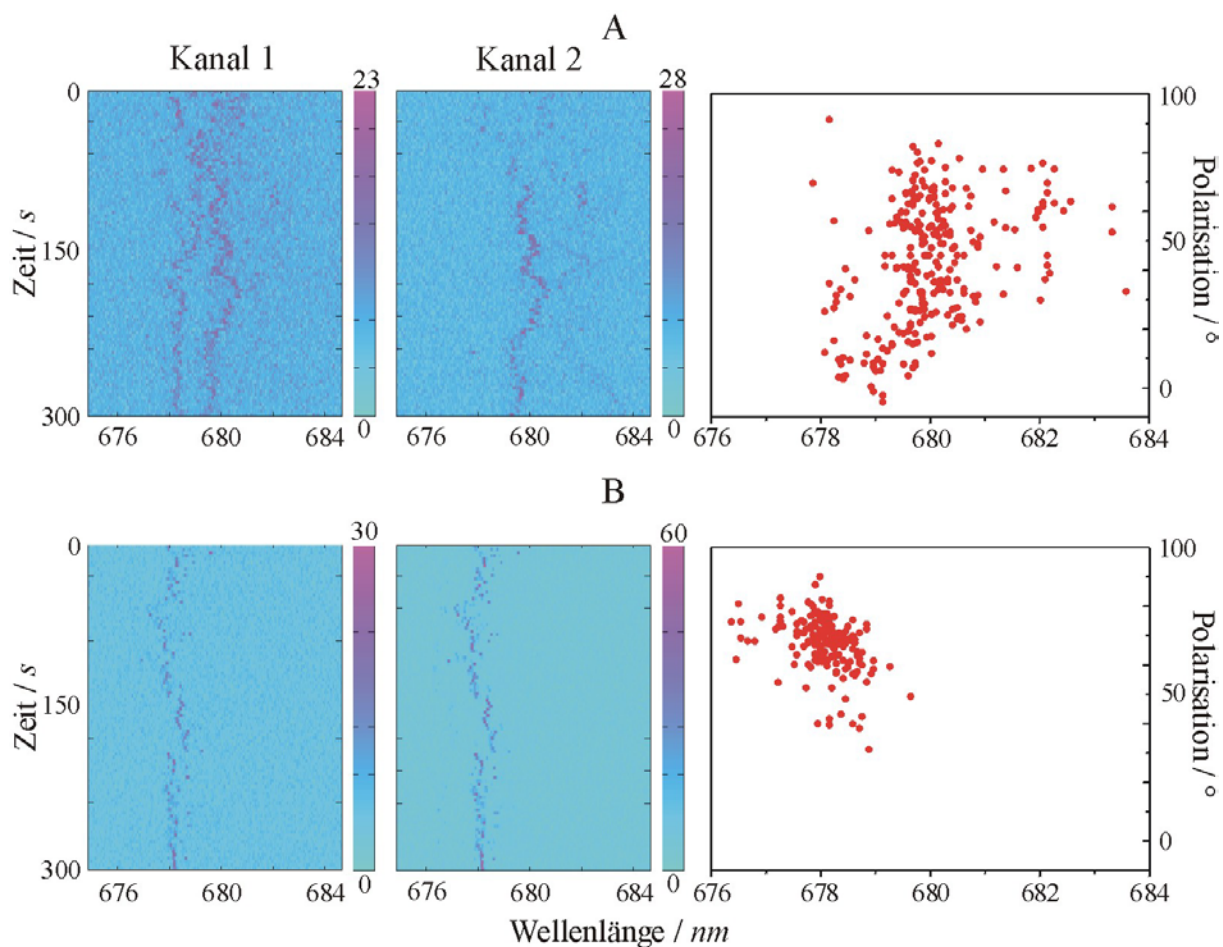


Abb. 3.40: „Spectral Trails“ der Fluoreszenz (linke Seite) und Ergebnisse der emittierten Polarisation nach Gleichung (3.1) (rechte Seite) einzelner Trimere in Liposomen auf Glimmer (A) und Quarz (B). Die Messparameter der jeweils 100 Spektren können in Tabelle 3-2 (Seite 116) nachgelesen werden. Es zeigen sich schmale Linien der LHC-II Fluoreszenz, wobei die Probe mit Glimmersubstrat im Gegensatz zur Probe mit Quarzsubstrat in nahezu jedem Spektrum mehr als eine Linie aufweist.

Betrachtet man zusätzlich die Ergebnisse der Polarisationsberechnung nach Gleichung (3.1) (jeweils das rechte Teilschaubild), lassen sich für das Glimmersubstrat einige Populationen

identifizieren, die verschiedene Wellenlängen als auch eine geänderte Polarisation aufweisen. Die zeitgleich aufgenommenen Linien stammen demnach von verschiedenen orientierten Übergangsdipolmomenten. Das Polarisations-Wellenlängen-Schaubild der Quarzimmobilisierung besteht zwar ebenfalls nicht nur aus einer Population, zeigt aber ein deutlich stabileres Verhalten und gleicht dem der Trimere auf einer HRP-Oberfläche (siehe Kapitel 3.5.2.1).

Unter der Annahme, dass beide Substratoberflächen die Beobachtung einzelner Komplexe erlauben, ist eine mögliche Erklärung für das Verhalten der Trimere auf Glimmer eine, verglichen mit Trimeren auf Quarz, stärkere spektrale Diffusion. Die Ursache hierfür muss auf eine Wechselwirkung der Komplexe mit dem Substrat zurückzuführen sein. Da die Komplexe aus der Doppelmembran herausragen, erscheint dies bei geplatzten Liposomen und dem daraus folgenden direkten Kontakt der LHC-II mit der Glimmeroberfläche durchaus möglich. So konnte die Fluoreszenz einzelner, in Detergenz gelöster LHC-II auf Glimmer bei 4,2K ebenfalls kaum detektiert werden.

Die Anregungsspektren der beiden unterschiedlichen Probenpräparationen zeigen qualitativ ein den Fluoreszenzspektren identisches Verhalten. Im Fall des Glimmersubstrats sind nahezu keine einzelnen Linien zu identifizieren, während die Liposomen auf Quarz deutlich absorbierende Linien verschiedener Breite aufweisen. Aufgrund der fehlenden Orientierung auf dem Quarzsubstrat wurden die Messungen jedoch nicht tiefgehend verfolgt.

Fazit

Ein großer Nachteil der Experimente an LHC-II Komplexen in Liposomen ist die fehlende Insertion der Monomere. Als weiteres Hindernis entpuppte sich die orientierte Immobilisierung der Liposomen auf einem passenden Substrat. Ein solches wurde zwar in der Glimmeroberfläche gefunden, dabei zeigten die Komplexe jedoch eine starke Wechselwirkung mit der Oberfläche. Die Quarzoberfläche ermöglichte eine spektroskopische Untersuchung einzelner Trimere, allerdings keine orientierte Immobilisierung.

Die Untersuchung in Liposomen inserierter LHC-II wurde schließlich zugunsten der erfolgversprechenderen Immobilisierung mutierter Komplexe auf einer HRP-Ni-NTA Oberfläche abgebrochen.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse optischer Untersuchungen an einzelnen Quantensystemen vorgestellt. Die gewählten Systeme waren ein Defektzentrum in Diamant sowie der majore Antennenkomplex höherer Pflanzen, der LHC-II. Bei der eingesetzten Untersuchungsmethode handelt es sich in beiden Fällen um die konfokale Mikroskopie.

Im Folgenden sind die wichtigsten Erkenntnisse zusammengestellt.

Das Kapitel 2 widmet sich der experimentellen Verifizierung mehrerer Fluktuationstheoreme eines getriebenen Zwei-Niveau-Systems. Ein Defektzentrum wird hierfür optisch zwischen einem fluoreszierenden und einem dunklen Zustand geschaltet:

- Mit steigender Trajektorienlänge und stärkerer Modulation verschieben sich die Mittelwerte der Verteilungen von Δs_{tot} und R zu größeren Werten. In Übereinstimmung mit dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik ist der Mittelwert dabei immer größer als Null. Gleichzeitig werden die Verteilungen breiter, um Trajektorien negativer Entropieproduktion zu garantieren. Diese Trajektorien sind für die Erfüllung der Fluktuationstheoreme unabdingbar.
- Für alle Modulationstiefen und verschiedene Trajektorienlängen erfüllen die Entropie entlang einer Trajektorie Δs_{tot} und die stochastische Größe R sowohl die integrale Version des Fluktuationstheorems als auch die detaillierte Version nach Crooks. Für ein gegebenes Protokoll kann R hierbei als Entropiedifferenz zwischen zwei Gleich-

gewichtszuständen aufgefasst werden. Obwohl es sich bei Δs_{tot} und R für den gleichen ausgewerteten Datensatz um verschiedene Größen handelt, erfüllen dennoch beide die beschriebenen Relationen.

- Die Form der Verteilungen ist für kurze Trajektorien nicht gaußförmig. Kurze Trajektorien mit den hier verwendeten Messparametern erfüllen die Anforderungen an ein stark getriebenes System. Je kürzer die Trajektorien, desto ausgeprägter die Peakstruktur der Histogramme. Im Fall der stochastischen Größe R wird dieses Verhalten durch die numerische Lösung der Chapman-Kolmogorov-Gleichung bestätigt. Für lange Trajektorien nähern sich die Verteilungen einer Gaußfunktion an.
- Die Entropiedefinition nach Seifert [65] erlaubt die direkte Visualisierung der zeitlichen Entwicklungen der beiden Teilentropien Δs_{sys} und Δs_{med} und damit der Entropie entlang einer Trajektorie. Die Berücksichtigung der Entropie des Systems zusätzlich zur Entropie des Mediums erweist sich dabei für die Erfüllung der zugehörigen Fluktuationstheoreme als ausschlaggebend.

Die Messungen an einem einzelnen effektiven Zwei-Niveau-System ermöglichten eine experimentelle Überprüfung der theoretischen Voraussagen. Aktuell werden die Experimente auf komplexere Systeme erweitert. Wünschenswert ist die Untersuchung eines getriebenen Drei-Niveau-Systems im stationären Nichtgleichgewicht und eine damit verknüpfte komplette thermodynamische Betrachtung. Die optische Einzelmoleküldetektion ist dabei eine äußerst vielversprechende Methode.

Kapitel 3 befasst sich mit den spektroskopischen Messungen an einzelnen Antennenkomplexen höherer Pflanzen. Ziel der Untersuchungen war die Bestimmung der Lebensdauern und Orientierungen elektronisch angeregter Zustände.

Die erste Aufgabe bestand darin, Komplexe orientiert zu immobilisieren:

- Einzelne LHC-II, die in einer Polymermatrix immobilisiert sind, zeigen keine Orientierung.
- Liposomen aus den Lipiden der Thylakoidmembran haften auf einer Quarzoberfläche und platzen auf Glimmer. Darin inserierte Komplexe sind demnach im Fall des Quarzsubstrats nicht orientiert, im Fall des Glimmersubstrats orientiert immobilisiert. Die Insertion einzelner Komplexe je Liposom war für native und rekonstituierte Trimere erfolgreich, jedoch nicht für monomerische Komplexe.

- Rekonstituierte Monomere und Trimere haften selektiv auf einer behandelten Oberfläche mit Hilfe von His6-tags, die an das Proteingerüst angebracht sind. Die Trimere zeigen dabei eine feste Orientierung [111] relativ zum Substrat. Über die Ausrichtung der Monomere können hingegen keine genauen Angaben gemacht werden.

Die Auswertung beschäftigt sich nahezu ausschließlich mit den mutierten Komplexen. Die in Liposomen inserierten LHC-II werden nur kurz gestreift.

Fluoreszenzspektren einzelner LHC-II geben Auskunft über den emittierenden Zustand des Systems. Dabei zeigten die auf Glimmer aufgebrauchten LHC-II eine ausgeprägte spektrale Diffusion. Als mögliche Ursache wird eine starke Wechselwirkung zwischen Komplexen und Substrat genannt.

Die nun folgenden Ergebnisse der Fluoreszenzspektroskopie ergaben sich aus Messungen an Monomeren und Trimeren mit His6-tags auf einer mit Ni-NTA-HRP beschichteten Oberfläche:

- Unter Berücksichtigung der spektralen Diffusion konnten die Emissionslinien der Monomere und Trimere jeweils dem Nullphononenübergang des energetisch tiefsten Zustandes zugeschrieben werden.
- Beobachtete Sprünge in der Polarisierung des Fluoreszenzlichts wurden durch Änderungen der Übergangsenergien der rotesten Zustände erklärt. Als Ursache hierfür wird die spektrale Diffusion und die damit verbundene Änderung der „Site Energies“ durch Proteindynamik vorgeschlagen.
- Bei Monomeren waren diese Polarisationsänderungen immer mit einem Sprung in der Wellenlänge von $\geq 1nm$ verknüpft. Trimere zeigten auch Sprünge in der Polarisierung bei gleichbleibender spektraler Position. Dies ist vereinbar mit den energetisch dichter liegenden Zuständen der trimerischen Komplexe.
- Die spektrale Position der Fluoreszenz liegt bei ungefähr $680nm$. Die Linienbreite des zugehörigen Übergangs ist geringer als die Auflösung des Spektrometers. Das Summenspektrum von jeweils 16 Komplexen weist die Charakteristika von Ensemblemessungen auf und veranschaulicht die starke Heterogenität des LHC-II.

Die Anregungsspektren bilden die absorbierenden Übergänge der einzelnen Komplexe im untersuchten Wellenlängenbereich von $635nm$ bis $660nm$ ab. Erneut werden die Ergebnisse aus den Messungen an LHC-II auf Ni-NTA präsentiert.

- Die Linien der Anregungsspektren konnten den Nullphononenlinien einzelner elektronischer Übergangsdipolmomente zugeordnet werden.
- Die Lebensdauern der angeregten Zustände bei Monomeren und Trimeren sind in Übereinstimmung mit den Energietransferzeiten von Chl *b* auf Chl *a*, die in Messungen am Ensemble ermittelt wurden.
- Trimere zeigen weniger angeregte Zustände mit Lebensdauern $\geq 1ps$ als 3 einzelne Monomere. Mögliche Ursachen sind die Kopplung zwischen den Untereinheiten oder geänderte „Site Energies“ im Trimer verglichen mit dem Monomer. Der Verlust von Chlorophyll wird dagegen ausgeschlossen.
- Es konnte keine Korrelation zwischen den Größen spektrale Position, Lebensdauer und Orientierung der Übergangsdipolmomente gemessen werden. Dies wird auf den sehr heterogenen Charakter des LHC-II zurückgeführt.

Die spektroskopischen Untersuchungen an einzelnen Antennenkomplexen erweitern und bestätigen die Ergebnisse der Ensemblemessungen. Eine exakte Bestimmung der spektralen Position, der Lebensdauer und der Orientierung der Übergangsdipole der angeregten Zustände war aufgrund der Heterogenität des LHC-II und der damit verbundenen Forderung nach einer umfangreichen Statistik nicht möglich. Gleichzeitig ist diese Heterogenität aber auch ein Argument für die Untersuchung einzelner Moleküle. Um eine bessere Statistik zu erzielen, muss die Messzeit pro Komplex allerdings drastisch reduziert werden. Darüber hinaus ist es unumgänglich, die monomerische Untereinheit orientiert zu immobilisieren.

Summary

Single molecule detection (SMD) is a powerful tool to reveal parameters hidden in the averaging nature of ensemble measurements. In this work two confocal set-ups, one working at room temperature and one working at liquid helium temperature, are used to optically detect and examine single quantum systems. The thesis can be divided into two parts each one corresponding to a different question of research held together by the research method.

The first part deals with the experimental verification of different fluctuation theorems (FTs) for a system with discrete levels describable via master equations with time-dependent rates. The second part is dedicated to the spectroscopy of single light-harvesting complexes of higher plants, the LHC-II.

Part 1: Verification of FTs for master equations with time-dependent rates

Fluctuation theorems are a class of exact results for nonequilibrium systems driven externally beyond the validity of linear-response regimes and are closely connected to the entropy production. The most noted is the Jarzynski relation [52,53]. The FTs derive essentially from the behavior of the system under time reversal and can therefore be defined for quite diverse dynamics [62]. Recently, Seifert [49,63,65] introduced different FTs for stochastic dynamics using master equations with time-dependent rates. They all have in common that the non-linear average of some entropy related quantity has to meet a certain relation. In this work two of these integral FTs as well as the corresponding detailed version of Crooks are verified experimentally. The quantities in question being the entropy along a single trajectory Δs_{tot} and

the entropy difference between two steady states for a given protocol denoted as the stochastic quantity R by Seifert. Despite the difference between ΔS_{tot} and R for the same set of trajectories

$$\left\langle \exp\left(-\frac{R}{k_B}\right) \right\rangle = 1 \quad \text{and} \quad \left\langle \exp\left(-\frac{\Delta S_{tot}}{k_B}\right) \right\rangle = 1$$

must hold. The pointed brackets indicate the average over an infinite number of trajectories. k_B is the Boltzmann constant.

The experimental verification was achieved by using the simplest possible case, a two-level system.

System and Measurement

The chosen system for the experimental verification is a photochromic defect center in natural IIa-type diamond. Single centers were addressed with a home-built confocal microscope using a dye laser (CR699, DCM) running at $680nm$ (red light) superimposed to the $514nm$ line of an Ar-Ion laser (green light) as excitation sources. While the red light was kept constant throughout the experiment the green light was modulated using a function generator controlled AOM. In addition to the fluorescence of a single defect a second Avalanche Photo Diode recorded simultaneously the alternating intensity of the green light.

The defect is defined by its optical properties indicating that we are dealing with a nickel-related center [19]. It can be excited with red light responding with a stokes-shifted fluorescence. Additionally to this bright state the defect exhibits a non-fluorescing dark state. The transition rates between these states depend linearly on the intensity of the green (dark \rightarrow bright) and of the red (bright \rightarrow dark) light. Hence it is sufficient to consider a single defect as a single two-level system with a dark and a bright state and with controllable transition rates fit to verify the FTs for the simplest case.

At a time resolution of $1ms$ the data of the two detectors was recorded simultaneously after starting the modulating protocol for the green light, which we chose to be of sinusoidal form. Following 50 periods with a periodic time of $50ms$ and a certain modulation depth γ the system was given $1000ms$ of unmodulated green intensity to relax into the steady state. The fluorescence of the defect for a certain amount of modulated time is one trajectory of the corresponding experiment. The 4 experiments in this work contain two times 1000, once 1100 and once 2000 of such trajectories. The modulation depths were varied from $\gamma = 0,07$ to

$\gamma = 0,46$. For every single trajectory the quantities Δs_{tot} and R are computed yielding a set of values for each of the 4 experiments.

Results

For all 4 experiments with different modulation depths γ the integral fluctuation theorem and the fluctuation theorem of Crooks are met exactly by Δs_{tot} as well as R for various trajectory lengths regardless of the obvious difference between the two quantities. With increasing length and increasing modulation depth the mean value of the distributions increases. As negative values are needed to satisfy the non-linear relations of the FTs an increasing mean leads to an increasing broadening of the distributions. Despite the negative or entropy consuming trajectories the mean value is larger than zero for all experiments and for all trajectory lengths in agreement with the second law of thermodynamics. This holds for both Δs_{tot} and R . A closer look at the exact shape of the distributions reveals a distinctively non-Gaussian behavior for short trajectories and large modulation depths. For these parameters, that are equal to a strongly driven system, pronounced peaks are visible in the measured histograms. As we are proceeding to longer trajectory lengths the peaks are melting into the broadening distribution and the shape approaches a Gaussian. This behavior is affirmed by numerical calculations in the case of the stochastic quantity R .

Furthermore the experiments allow us to follow the evolution of the entropy of a single two-level system along one single trajectory. It is possible to visualize and calculate the change in entropy for each jump between the two states of the system.

For the sake of completeness it shall be mentioned that the worth of the physical meaning of the entropy along a single trajectory is not undisputed up to now [71,72].

Part 2: Spectroscopy on single LHC-II

Photosynthesis in higher plants is carried out by photosynthetic units, which are embedded in the thylakoid membrane of the chloroplasts. Photons are absorbed and the excitation energy is transported to the reaction center where charge separation takes place. The task of absorption and transport is accomplished by the antenna complexes of the system, consisting of a protein frame with built-in chlorophylls and carotenoids. The most abundant antenna complex is the major light-harvesting complex LHC-II.

System and Measurements

During the past decade, the question of the steric and electronic structure of the LHC-II has attracted much interest. According to the crystal structure by Kühlbrandt et al. [20] the LHC-II is forming a Trimer and each monomeric subunit binds 12-14 chlorophylls. With a resolution of 3.4 \AA this structure did not allow to distinguish between Chl *a* and *b*. As Chl *a* and *b* exhibit different spectroscopic properties several biochemical and spectroscopic studies [23,88-91] tried to add to the pure phenomenological assignment of the chlorophyll identities. Furthermore time-resolved spectroscopic methods revealed the energy transfer times within the complexes [24,91,98]. The Chl *b* to Chl *a* transfer times were denoted to 300 fs , 600 fs and several picoseconds for the trimeric and 200 fs and 3 ps for the monomeric form. In 2004 Liu et al. [21] were able to obtain the crystal structure at 2.72 \AA resolution, which allowed them to assign the chlorophylls unambiguously. As the energies of the binding sites could not be acquired the electronic structure of the LHC-II is still under debate.

This work deals with the spectroscopic examination of single LHC-II. The goal of the measurements is to gather information about the lifetimes of the excited states and the orientation of the associated transition dipole moments of single Monomers and Trimers. Via his6-tags the complexes are attached to a quartz surface treated with horse-radish peroxidase. This yields oriented molecules in the case of Trimers and most likely randomly distributed ones in the case of Monomers. Using a confocal microscope at helium temperatures (2 K) single complexes could be examined without photobleaching.

For the fluorescence spectra the sample was excited at a constant wavelength of 640 nm . A CCD camera detected the emitted light that was split up by a grating spectrometer. A Wollaston prism in front of the spectrograph allows the assignment of a polarization angle to the emitting transition dipole moments.

In the case of the excitation spectra the exciting laser was swept from 635 nm to 660 nm while an APD accumulated the fluorescence photons. This wavelength region is dominated by the Chl *b* absorption. A rotating polarizer provides the possibility to control the orientation of the linearly polarized excitation light. Therefore the spectra hold information about the orientation of the absorbing transition dipole moments.

Results

In this work the spectra of 16 Monomers and 16 Trimers are presented, all measured with the same parameters.

Fluorescence Spectra:

After including the effect of spectral diffusion the spectra of Monomers and Trimers respectively did exhibit narrow single lines at around 680nm that were linearly polarized. This indicates a single transition dipole moment responsible for the emission, which is what we would expect for a single complex with working energy transfer at helium temperatures. However the polarization angle of the emission is not constant in time. The jumps in polarization are often connected to jumps in the spectral position of the fluorescence. A combination of spectral diffusion and the density of excited states can explain this: If e.g. the spectral diffusion shifts the energetically lowest state further to the blue than the second lowest state, the excitation energy will relax into this new lowest state. If the orientations of the two states differ this will lead to a jump in polarization as well as spectral position. Five out of 16 Monomers and seven out of 16 Trimers did show two clearly distinguishable polarizations. While the jumps of the polarization of the Monomers were always connected to a jump of the spectral position of $\geq 1nm$ two of the seven Trimers displayed a shift in polarization without any noticeable jump in the spectral position. This can be explained by the three fold higher density of states in the case of the Trimers.

The width of the observed lines could not be resolved by the spectrometer. Therefore the lifetime of the emitting states cannot be determined. A summation over the spectra of the 16 complexes exhibits a strong heterogeneity but nevertheless the same characteristics as reported by ensemble measurements.

Excitation Spectra:

In the excitation spectra of Monomers and Trimers single lines could be identified and were assigned to single transition dipole moments. The varying number of lines per complex is a further indication for the heterogeneity of the LHC-II. The lifetimes of the excited states do confirm the energy transition rates from Chl *b* to Chl *a* given by pump and probe experiments for both Monomers [24] and Trimers [22,23,91,96]. A relative reduction of the long-lived component upon trimerization was shown to be valid in analogy to the ensemble measurements. As possible reasons one proposes the coupling between the subunits or an altered site energy of the Trimer compared with the Monomer, whereas the loss of chlorophylls is ruled out.

For the 16 Monomers and Trimers no correlation between the spectral positions, the lifetimes and the relative orientations of the dipole moments was observed. In fact all quantities did demonstrate a very strong heterogeneous behavior which is in agreement with the concluding results of the extensive study by Novoderezhkin et al. [101].

Literaturverzeichnis

- [1] W. E. Moerner and L. Kador, *Optical-Detection and Spectroscopy of Single Molecules in A Solid*, Physical Review Letters **62**, 2535 (1989).
- [2] M. Orrit and J. Bernard, *Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in A Para-Terphenyl Crystal*, Physical Review Letters **65**, 2716 (1990).
- [3] E. B. Shera *et al.*, *Detection of Single Fluorescent Molecules*, Chemical Physics Letters **174**, 553 (1990).
- [4] J. Kohler *et al.*, *Magnetic-Resonance of A Single Molecular Spin*, Nature **363**, 242 (1993).
- [5] J. Wrachtrup *et al.*, *Optical-Detection of Magnetic-Resonance in A Single Molecule*, Nature **363**, 244 (1993).
- [6] M. Nirmal *et al.*, *Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals*, Nature **383**, 802 (1996).
- [7] A. Gruber *et al.*, *Scanning confocal optical microscopy and magnetic resonance on single defect centers*, Science **276**, 2012 (1997).
- [8] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinosita, *Direct observation of the rotation of F-1-ATPase*, Nature **386**, 299 (1997).
- [9] M. S. Z. Kellermayer, S. B. Smith, H. L. Granzier, and C. Bustamante, *Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers*, Science **276**, 1112 (1997).
- [10] M. A. Bopp *et al.*, *Fluorescence and photobleaching dynamics of single light-harvesting complexes*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**, 10630 (1997).
- [11] A. M. van Oijen *et al.*, *Unraveling the electronic structure of individual photosynthetic pigment-protein complexes*, Science **285**, 400 (1999).
- [12] G. Seisenberger *et al.*, *Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus*, Science **294**, 1929 (2001).
- [13] T. Basché, W. Moerner, M. Orrit, and U. Wild, *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy* (Verlag Chemie, Weinheim, 1997).
- [14] C. Zander, J. Enderlein, and R. Keller, *Single Molecule Detection in Solution* (Wiley, Berlin, 2002).

- [15] G. Binnig *et al.*, *Atomic Resolution with Atomic Force Microscope*, *Europhysics Letters* **3**, 1281 (1987).
- [16] G. Binnig and H. Rohrer, *Scanning Tunneling Microscopy*, *Helvetica Physica Acta* **55**, 726 (1982).
- [17] T. Gaebel *et al.*, *Stable single-photon source in the near infrared*, *New Journal of Physics* **6**, (2004).
- [18] F. Jelezko *et al.*, *Observation of coherent oscillation of a single nuclear spin and realization of a two-qubit conditional quantum gate*, *Physical Review Letters* **93**, (2004).
- [19] Jelezko, F., Gaebel, T., and Wrachtrup, J. *Das Photochrome Zentrum*, unpublished
- [20] W. Kuhlbrandt, D. N. Wang, and Y. Fujiyoshi, *Atomic Model of Plant Light-Harvesting Complex by Electron Crystallography*, *Nature* **367**, 614 (1994).
- [21] Z. F. Liu *et al.*, *Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 angstrom resolution*, *Nature* **428**, 287 (2004).
- [22] T. Bittner, K. D. Irrgang, G. Renger, and M. R. Wasielewski, *Ultrafast Excitation-Energy Transfer and Exciton-Exciton Annihilation Processes in Isolated Light-Harvesting Complexes of Photosystem-II (Lhc-II) from Spinach*, *Journal of Physical Chemistry* **98**, 11821 (1994).
- [23] J. P. Connelly *et al.*, *Ultrafast spectroscopy of trimeric light-harvesting complex II from higher plants*, *Journal of Physical Chemistry B* **101**, 1902 (1997).
- [24] F. J. Kleima *et al.*, *Energy transfer in LHCII monomers at 77K studied by sub-picosecond transient absorption spectroscopy*, *Biochemistry* **36**, 15262 (1997).
- [25] E. J. G. Peterman *et al.*, *Low-temperature spectroscopy of monomeric and trimeric forms of reconstituted light-harvesting chlorophyll a/b complex*, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1273**, 171 (1996).
- [26] N. R. S. Reddy *et al.*, *Low-Energy Exciton Level Structure and Dynamics in Light-Harvesting Complex-II Trimers from the Chl A/B Antenna Complex of Photosystem-II*, *Journal of Physical Chemistry* **98**, 4729 (1994).
- [27] R. H. Webb, *Confocal optical microscopy*, *Reports on Progress in Physics* **59**, 427 (1996).
- [28] J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (Plenum Press, New York, 1989).
- [29] A. Drabenstedt *et al.*, *Low-temperature microscopy and spectroscopy on single defect centers in diamond*, *Physical Review B* **60**, 11503 (1999).
- [30] F. Jelezko *et al.*, *Spectroscopy of single N-V centers in diamond*, *Single Molecules* **2**, 255 (2001).

- [31] A. M. Boiron, B. Lounis, and M. Orrit, *Single molecules of dibenzanthanthrene in n-hexadecane*, Journal of Chemical Physics **105**, 3969 (1996).
- [32] F. T. H. den Hartog, C. van Papendrecht, U. Storkel, and S. Volker, *Protein dynamics in photosystem II complexes of green plants studied by time-resolved hole-burning*, Journal of Physical Chemistry B **103**, 1375 (1999).
- [33] U. Storkel, T. M. H. Creemers, F. T. H. den Hartog, and S. Volker, *Glass versus protein dynamics at low temperature studied by time-resolved spectral hole burning*, Journal of Luminescence **76-7**, 327 (1998).
- [34] J. Gafert, H. Pschierer, and J. Friedrich, *Proteins and Glasses - A Relaxation Study in the Millikelvin Range*, Physical Review Letters **74**, 3704 (1995).
- [35] D. T. Leeson and D. A. Wiersma, *Real-Time Observation of Low-Temperature Protein Motions*, Physical Review Letters **74**, 2138 (1995).
- [36] H. Frauenfelder, S. G. Sligar, and P. G. Wolynes, *The Energy Landscapes and Motions of Proteins*, Science **254**, 1598 (1991).
- [37] A. M. van Oijen *et al.*, *Spectroscopy of individual light-harvesting 2 complexes of Rhodospseudomonas acidophila: Diagonal disorder, intercomplex heterogeneity, spectral diffusion, and energy transfer in the B800 band*, Biophysical Journal **78**, 1570 (2000).
- [38] W. Demtröder, *Laser Spectroscopy, Basic Concepts and Instrumentation* (Springer, Berlin, 1981).
- [39] C. Tietz, *Untersuchungen an einzelnen Pigmenten und Pigment-Protein-Komplexen*, Thesis/Dissertation, 2000.
- [40] J. Liphardt *et al.*, *Equilibrium information from nonequilibrium measurements in an experimental test of Jarzynski's equality*, Science **296**, 1832 (2002).
- [41] G. Röpke, *Statistische Mechanik für das Nichtgleichgewicht* (Physik-Verlag, Weinheim, 1987).
- [42] D. J. Evans, E. G. Cohen, and G. P. Morriss, *Probability of second law violations in shearing steady states*, Physical Review Letters **71**, 2401 (1993).
- [43] D. J. Evans and D. J. Searles, *Equilibrium microstates which generate second law violating steady states*, Physical Review e **50**, 1645 (1994).
- [44] G. Gallavotti and E. G. Cohen, *Dynamical Ensembles in Nonequilibrium Statistical Mechanics*, Physical Review Letters **74**, 2694 (1995).
- [45] C. Bustamante, J. Liphardt, and F. Ritort, *The nonequilibrium thermodynamics of small systems*, Physics Today **58**, 43 (2005).
- [46] J. Kurchan, *Fluctuation theorem for stochastic dynamics*, Journal of Physics A-Mathematical and General **31**, 3719 (1998).

- [47] J. L. Lebowitz and H. Spohn, *A Gallavotti-Cohen-type symmetry in the large deviation functional for stochastic dynamics*, Journal of Statistical Physics **95**, 333 (1999).
- [48] P. Gaspard, *Fluctuation theorem for nonequilibrium reactions*, J. Chem. Phys. **120**, 8898 (2004).
- [49] U. Seifert, *Fluctuation theorem for a single enzym or molecular motor*, Europhysics Letters **70**, 36 (2005).
- [50] G. M. Wang *et al.*, *Experimental demonstration of violations of the second law of thermodynamics for small systems and short time scales*, Physical Review Letters **89**, (2002).
- [51] D. M. Carberry *et al.*, *Fluctuations and irreversibility: An experimental demonstration of a second-law-like theorem using a colloidal particle held in an optical trap*, Physical Review Letters **92**, (2004).
- [52] C. Jarzynski, *Equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements: A master-equation approach*, Physical Review e **56**, 5018 (1997).
- [53] C. Jarzynski, *Nonequilibrium equality for free energy differences*, Physical Review Letters **78**, 2690 (1997).
- [54] G. E. Crooks, *Entropy production fluctuation theorem and the nonequilibrium work relation for free energy differences*, Physical Review e **60**, 2721 (1999).
- [55] T. P. Straatsma and J. A. Mccammon, *Computational Alchemy*, Annual Review of Physical Chemistry **43**, 407 (1992).
- [56] C. H. Bennett, *Efficient Estimation of Free-Energy Differences from Monte-Carlo Data*, Journal of Computational Physics **22**, 245 (1976).
- [57] O. Braun, A. Hanke, and U. Seifert, *Probing molecular free energy landscapes by periodic loading*, Physical Review Letters **93**, (2004).
- [58] G. Hummer and A. Szabo, *Free energy reconstruction from nonequilibrium single-molecule pulling experiments*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**, 3658 (2001).
- [59] G. E. Crooks, *Path-ensemble averages in systems driven far from equilibrium*, Physical Review e **61**, 2361 (2000).
- [60] D. Collin *et al.*, *Verification of the Crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies*, Nature **437**, 231 (2005).
- [61] F. Ritort, *Work fluctuations and transient violations of the second law: perspectives in theory and experiments*, Seminar Poincare **2**, 193 (2003).
- [62] C. Maes, *On the Origin and the Use of Fluctuation Relations for the Entropy*, Seminar Poincare **2**, 29 (2003).

- [63] U. Seifert, *Fluctuation theorem for birth-death or chemical master equations with time-dependent rates*, Journal of Physics A **37**, L517-L521 (2004).
- [64] C. E. Shannon, *A Mathematical Theory of Communication*, Bell System Technical Journal **27**, 379 (1948).
- [65] U. Seifert, *Entropy production along a stochastic trajectory and an integral fluctuation theorem*, Phys. Rev. Lett. **95**, 040602 (2005).
- [66] A. M. Zaitsev, *Optical Properties of Diamond - A Data Handbook* (Springer, 2001).
- [67] S. Schuler *et al.*, *Experimental test of the fluctuation theorem for a driven two-level system with time-dependent rates*, Physical Review Letters **94**, 180602 (2005).
- [68] J. Gore, F. Ritort, and C. Bustamante, *Bias and error in estimates of equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**, 12564 (2003).
- [69] T. Speck and U. Seifert, *Distribution of work in isothermal nonequilibrium processes*, Physical Review e **70**, (2004).
- [70] A. Imparato and L. Peliti, *Work probability distribution in single-molecule experiments*, Europhysics Letters **69**, 643 (2005).
- [71] G. Gallavotti, *Entropy production and thermodynamics of nonequilibrium stationary states: A point of view*, Chaos **14**, 680 (2004).
- [72] G. Gallavotti and E. G. D. Cohen, *Nonequilibrium stationary states and entropy*, Physical Review e **69**, (2004).
- [73] S. L. Wolfe, *Molecular and Cellular Biology* (Wadsworth Publishing, Belmont, 1993).
- [74] <http://www.daviddarling.info>, 2006
- [75] D. J. Murphy, *The Molecular-Organization of the Photosynthetic Membranes of Higher-Plants*, Biochimica et Biophysica Acta **864**, 33 (1986).
- [76] D. Voet and J. G. Voet, *Biochemistry* (Wiley, New York, 1995).
- [77] A. Zouni *et al.*, *Crystal structure of photosystem II from Synechococcus elongatus at 3.8 angstrom resolution*, Nature **409**, 739 (2001).
- [78] J. Barber and V. Kuhlbrandt, *Photosystem II*, Current Opinion in Structural Biology **9**, 469 (1999).
- [79] J. P. Dekker, H. van Roon, and E. J. Boekem, *Heptameric association of light-harvesting complex II trimers in partially solubilized photosystem II membranes*, Febs Letters **449**, 211 (1999).

- [80] J. P. Dekker and E. J. Boekema, *Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants*, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1706**, 12 (2005).
- [81] H. van Amerongen and R. van Grondelle, *Understanding the energy transfer function of LHCII, the major light-harvesting complex of green plants*, *Journal of Physical Chemistry B* **105**, 604 (2001).
- [82] O. Kruse, *Light-induced short-term adaptation mechanisms under redox control in the PSII-LHCII supercomplex: LHC II state transitions and PSII repair cycle*, *Naturwissenschaften* **88**, 284 (2001).
- [83] J. F. Allen and J. Forsberg, *Molecular recognition in thylakoid structure and function*, *Trends in Plant Science* **6**, 317 (2001).
- [84] J. Standfuss and W. Kuhlbrandt, *The three isoforms of the light-harvesting complex II - Spectroscopic features, trimer formation, and functional roles*, *Journal of Biological Chemistry* **279**, 36884 (2004).
- [85] S. Jansson, *The Light-Harvesting Chlorophyll A/B Binding-Proteins*, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1184**, 1 (1994).
- [86] A. V. Ruban *et al.*, *Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes*, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 10458 (1999).
- [87] G. F. Peter and J. P. Thornber, *Biochemical-Composition and Organization of Higher-Plant Photosystem-II Light-Harvesting Pigment-Proteins*, *Journal of Biological Chemistry* **266**, 16745 (1991).
- [88] J. Pieper *et al.*, *Q(y)-level structure and dynamics of solubilized light-harvesting complex II of green plants: Pressure and hole burning studies*, *Journal of Physical Chemistry A* **103**, 2412 (1999).
- [89] R. Remelli *et al.*, *Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex - A mutation analysis of chromophore-binding residues*, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 33510 (1999).
- [90] H. Rogl *et al.*, *Assignment of spectral substructures to pigment-binding sites in higher plant light-harvesting complex LHC-II*, *Biochemistry* **41**, 2281 (2002).
- [91] H. M. Visser *et al.*, *Probing the many energy-transfer processes in the photosynthetic light-harvesting complex II at 77 K using energy-selective sub-picosecond transient absorption spectroscopy*, *Chemical Physics* **210**, 297 (1996).
- [92] R. Standfuss, A. C. T. van Scheltinga, M. Lamborghini, and W. Kuhlbrandt, *Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5Å resolution*, *Embo Journal* **24**, 919 (2005).
- [93] <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/>, 2006

- [94] F. G. Plumley and G. W. Schmidt, *Reconstitution of Chlorophyll A/B Light-Harvesting Complexes - Xanthophyll-Dependent Assembly and Energy-Transfer*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **84**, 146 (1987).
- [95] E. J. G. Peterman, T. Pullerits, R. Vangrondelle, and H. Vanamerongen, *Electron-phonon coupling and vibronic fine structure of light-harvesting complex II of green plants: Temperature dependent absorption and high-resolution fluorescence spectroscopy*, Journal of Physical Chemistry B **101**, 4448 (1997).
- [96] T. Bittner *et al.*, *Femtosecond Transient Absorption-Spectroscopy on the Light-Harvesting Chl A/B Protein Complex of Photosystem-II at Room-Temperature and 12 K*, Chemical Physics **194**, 311 (1995).
- [97] G. Trinkunas *et al.*, *Model for the excitation dynamics in the light-harvesting complex II from higher plants*, Journal of Physical Chemistry B **101**, 7313 (1997).
- [98] C. C. Gradinaru *et al.*, *The flow of excitation energy in LHCII monomers: implications for the structural model of the major plant antenna*, Biophys. J. **75**, 3064 (1998).
- [99] V. Barzda *et al.*, *Singlet-singlet annihilation kinetics in aggregates and trimers of LHCII*, Biophys. J. **80**, 2409 (2001).
- [100] A. Schubert *et al.*, *Excitonic coupling of chlorophylls in the plant light-harvesting complex LHC-II*, Biophys. J. **82**, 1030 (2002).
- [101] V. I. Novoderezhkin, M. A. Palacios, H. van Amerongen, and R. van Grondelle, *Excitation dynamics in the LHCII complex of higher plants: Modeling based on the 2.72 angstrom crystal structure*, Journal of Physical Chemistry B **109**, 10493 (2005).
- [102] C. Tietz *et al.*, *Single molecule spectroscopy on the light-harvesting complex II of higher plants*, Biophys. J. **81**, 556 (2001).
- [103] P.-A. Siegenthaler, *Molecular organization of acyl lipids in photosynthetic membranes of higher plants in Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*, (Kluwer, Dordrecht, 1998).
- [104] J. Joyard, *Structure, distribution and biosynthesis of glycerolipids from higher Plant Chloroplasts: Lipids in Photosynthesis in Structure, Function and Genetics*, (Kluwer, Dordrecht, 1998).
- [105] S. Boggasch, *Bindung von Pigment-Protein-Komplexen an Nanokristalle sowie Proteoliposomen aus rekombinanten LHCII und Thylakoidlipiden-Charakterisierung und Anwendbarkeit bei der Konstruktion eines lichtleitenden Systems sowie bei Stabilitäts- und Konformationsanalysen*. Thesis/Dissertation, 2006.
- [106] H. Egawa and K. Furusawa, *Liposome adhesion on mica surface studied by atomic force microscopy*, Langmuir **15**, 1660 (1999).

- [107] M. Grandbois, H. Clausen-Schaumann, and H. Gaub, *Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A(2)*, *Biophysical Journal* **74**, 2398 (1998).
- [108] Gerken U., *Spektroskopische Untersuchungen an einzelnen Lichtsammelkomplexen des Purpurbakteriums R. rubrum*, Thesis/Dissertation, 2003.
- [109] D. Pastre *et al.*, *Adsorption of DNA to mica mediated by divalent counterions: A theoretical and experimental study*, *Biophysical Journal* **85**, 2507 (2003).
- [110] H. Wolf-Klein, *Biomimetisches Modell eines Photosystems aus dem pflanzlichen Photosyntheseapparat*, Thesis/Dissertation, 2001.
- [111] U. Gerken *et al.*, *Single molecule spectroscopy of oriented recombinant trimeric light harvesting complexes of higher plants*, *Single Molecules* **3**, 183 (2002).
- [112] S. Vasil'ev *et al.*, *Quenching of chlorophyll a fluorescence in the aggregates of LHCII: steady state fluorescence and picosecond relaxation kinetics*, *Biochemistry* **36**, 7503 (1997).
- [113] S. Nussberger *et al.*, *Spectroscopic Characterization of 3 Different Monomeric Forms of the Main Chlorophyll A/B Binding-Protein from Chloroplast Membranes*, *Biochemistry* **33**, 14775 (1994).
- [114] R. Bassi, R. Croce, D. Cugini, and D. Sandona, *Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound into multiple sites*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10056 (1999).
- [115] A. Pascal *et al.*, *Structure and interactions of the chlorophyll a molecules in the higher plant Lhcb4 antenna protein*, *Journal of Physical Chemistry B* **104**, 9317 (2000).
- [116] S. Krawczyk, Z. Krupa, and W. Maksymiec, *Stark Spectra of Chlorophylls and Carotenoids in Antenna Pigment-Proteins Lhc-II and Cp-II*, *Biochimica et Biophysica Acta* **1143**, 273 (1993).
- [117] M. Krikunova, B. Voigt, and H. Lokstein, *Direct evidence for excitonically coupled chlorophylls a and b in LHC II of higher plants by nonlinear polarization spectroscopy in the frequency domain*, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1556**, 1 (2002).
- [118] V. I. Novoderezhkin, M. A. Palacios, H. van Amerongen, and R. van Grondelle, *Energy-transfer dynamics in the LHCII complex of higher plants: Modified red-field approach*, *Journal of Physical Chemistry B* **108**, 10363 (2004).
- [119] T. Renger and V. May, *Theory of multiple exciton effects in the photosynthetic antenna complex LHC-II*, *Journal of Physical Chemistry B* **101**, 7232 (1997).
- [120] T. Renger and V. May, *Simulations of frequency-domain spectra: Structure-function relationships in photosynthetic pigment-protein complexes*, *Physical Review Letters* **84**, 5228 (2000).

- [121] N. J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry* (Benjamin/Cummings Publishing, Menlo Park, CA., 1978).
- [122] V. May and O. Kühn, *Charge and Energy Transfer Dynamics in Molecular Systems* (Wiley, Berlin, 2000).
- [123] H. van Amerongen, L. Valkunas, and R. van Grondelle, *Photosynthetic Excitons* (World Scientific, London, 2000).
- [124] S. Savikhin and W. S. Struve, *Electronic energy transfer in light-harvesting antennas of green photosynthetic bacteria*, Abstracts of Papers of the American Chemical Society **212**, 36-HYS (1996).
- [125] R. van Grondelle and V. Novoderezhkin, *Energy transfer in photosynthesis: experimental insights and quantitative models*, Phys. Chem. Chem. Phys. 793 (2005).
- [126] A. Bender, *Konformationsanalyse und Lipidbindung am rekombinanten Lichtsammelerprotein LHCIIB höherer Pflanzen*, Thesis/Dissertation, 2004.

Danksagung

Die wissenschaftliche Arbeit für diese Dissertation wurde in den Laboren des 3. Physikalisches Instituts durchgeführt. Mein Dank gilt Jörg Wrachtrup für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren, und den eingeräumten Freiraum bei der Auswahl der Experimente. Clemens Bechinger danke ich für die Übernahme des Mitberichts.

Meinem Betreuer Carsten Tietz möchte ich einen besonderen Dank aussprechen. Er unterstützte mich mit einer Vielzahl experimenteller Ideen und theoretischer Erklärungen in manch verzwickter Situation.

Der wissenschaftliche Erfolg war nur aufgrund der Kooperation mit anderen Instituten möglich. Udo Seifert und Thomas Speck aus dem II. Institut für theoretische Physik lieferten das theoretische Fundament und den Anstoß für die Experimente zu den Fluktuationstheoremen. Die untersuchten Lichtsammelkomplexe wurden von Stephanie Boggasch vom Institut für Allgemeine Botanik der Universität Mainz in allen Variationen zur Verfügung gestellt. Danke für die Zusammenarbeit und die Antworten auf meine Fragen.

Bei experimentellen und theoretischen Problemen aller Art war Fedor Jelezko ein verlässlicher Rettungsanker. Torsten Gaebel und Iulian Popa programmierten die Steuerungssoftware für die konfokalen Mikroskope und waren immer für einen Spaß zu haben. Einen herzlichen Dank auch an Andrew Aird, der sich die Zeit nahm die Simulation der mutierten LHC-II Monomere für mich aufzusetzen.

Allen Mitgliedern des Instituts möchte ich für den guten Zusammenhalt und die freundliche Unterstützung während meiner 5 Jahre im Pfaffenwaldring 57 danken. Hervorzuheben sind hier Elmar Thews und Michael Börsch, die durch ihren unermüdlichen Einsatz den Kaffee zum Genuss gemacht haben.

Der technische Ablauf der durchgeführten Experimente war nur durch die Mitarbeiter der mechanischen Werkstatt, der Glastechnik und der Tieftemperaturwerkstatt möglich.

Meine Eltern Ruth und Ulrich Schuler können nun auch ihr letztes Kind in das Berufsleben entlassen. Vielen Dank für die aufgebrauchte Geduld und den anhaltenden Zuspruch.

