

Spektroskopische Untersuchungen an einzelnen Photosystem I-Komplexen aus Cyanobakterien

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

Vorgelegt von
Alexandra F. Elli
aus Leonberg

Hauptberichter: Prof. Dr. Jörg Wrachtrup
Mitbericht: Prof. Dr. Emil Roduner

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Mai 2007

3. Physikalisches Institut der Universität Stuttgart

2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Summary	11
1 Einleitung.....	21
2 Photosynthese in Cyanobakterien.....	25
2.1 Die Photosynthese.....	25
2.2 Cyanobakterien	29
3 Photosystem I – Aufbau und Funktionsweise.....	33
3.1 Die Protein-Untereinheiten	36
3.2 Die Elektronentransferkette	38
3.3 Die Kernantenne	41
3.3.1 Die Chlorophylle	41
3.3.1.1 Chemische Beschreibung der Chlorophylle	41
3.3.1.2 Spektroskopische Eigenschaften der Chlorophylle	42
3.3.1.3 Photophysikalische Eigenschaften der Chlorophylle.....	44
3.3.1.4 Chlorophylle in Antennensystemen von Protein-Pigment-Komplexen.....	44
3.3.2 Aufbau der Kernantenne.....	45
3.3.3 Funktionsweise der Kernantenne – Energietransfermechanismen	48
3.3.3.1 FÖRSTER-Mechanismus	49
3.3.3.2 DEXTER-Mechanismus	50
3.3.3.3 Exzitonentransfer-Mechanismus	52
3.4 Die roten Chlorophylle	53
3.4.1 Die Natur der roten Chlorophylle in cyanobakteriellen PSI-Komplexen.....	54
3.4.2 Mögliche Funktionen der roten Chlorophylle	56
3.4.3 Anzahl und Lokalisierung der roten Chlorophyllpools	57
3.4.4 Spektrale Eigenschaften der roten Chlorophyllpools	60
4 Grundlagen der optischen Einzelmolekülspektroskopie	61
4.1 Wechselwirkung von Licht mit Materie	61
4.2 Fluoreszenzspektroskopie	65
4.2.1 Die physikalische Grundlage der Fluoreszenzspektroskopie – Das FRANCK-CONDON-Prinzip	65
4.2.2 Die Position einer Spektrallinie im Spektrum	69
4.2.3 Intensität einer Spektrallinie	69
4.2.4 Linienbreite.....	73
4.2.5 Einfluss der Temperatur auf die spektrale Bande.....	75
4.3 Bedeutung der physikalischen Grundlagen für die Einzelmolekülspektroskopie.....	76

5	Experimenteller Aufbau und Probenpräparation.....	81
5.1	Einzelmolekülspektroskopie	82
5.2	Das konfokale Laserscanning-Mikroskop	83
5.2.1	Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren.....	87
5.2.2	Messung der Autokorrelationsfunktion	88
5.2.3	Untersuchung der Fluoreszenzpolarisation.....	89
5.3	Probenpräparation	90
5.3.1	Proben.....	90
5.3.2	Eingesetzte Chemikalien	92
5.3.3	Probenpräparation.....	93
6	Optische Einzelmolekülspektroskopie an	
	Photosystem I-Komplexen aus <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	97
6.1	Zielsetzung.....	97
6.2	Die roten Chlorophyllpools in PSI aus <i>TS. elongatus</i>	97
6.3	Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren von PSI aus <i>TS. elongatus</i> in einer Ensemble-Probe.....	103
6.4	Fluoreszenzeinzelmolekülspektren von trimeren PSI-Komplexen aus <i>TS. elongatus</i>	105
6.5	Untersuchung des photophysikalischen und photochemischen Ausbleichverhaltens von einzelnen trimeren Photosystem I-Komplexen	116
6.6	Zusammenfassung des Kapitels.....	121
7	Fluoreszenzkorrelationsanalyse.....	123
7.1	Zielsetzung.....	123
7.2	Grundlagen.....	124
7.2.1	Bedeutung der Grundlagen für die Untersuchung einzelner Moleküle mittels Autokorrelationsanalyse.....	125
7.2.2	Die Autokorrelationsfunktion.....	126
7.3	Ergebnisse.....	129
7.4	Diskussion.....	133
7.5	Zusammenfassung des Kapitels.....	135
8	Fluoreszenzpolarisationsanalyse.....	137
8.1	Zielsetzung.....	137
8.2	Grundlagen.....	138
8.2.1	Prinzip der Fluoreszenzpolarisationsanalyse.....	140
8.3	Ergebnisse und Auswertung	144
8.3.1	Untersuchung der Fluoreszenzbanden der roten Chlorophyllpools einzelner Photosystem I-Trimere auf lineare Polarisation	144
8.3.2	Untersuchung der Fluoreszenzbanden der roten Chlorophyllpools einzelner Photosystem I-Monomere auf lineare Polarisation	149
8.3.3	Ermittlung der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente aus den Messergebnissen mittels Statistik	155

8.3.3.1	Simulation der relativen Orientierung der roten Chlorophyllpools in einer isotrop verteilten PSI-Probe	155
8.3.3.2	Statistische Auswertung der berechneten Phasendifferenzwinkel.....	158
8.3.3.3	Bestimmung der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten einzelner Chlorophyllpools anhand von Literaturdaten.....	164
8.3.3.4	Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit den Literaturdaten.....	169
8.4	Zusammenfassung des Kapitels	172
9	Optische Spektroskopie an Photosystem I-Komplexen aus <i>Arthrospira platensis</i>	175
9.1	Zielsetzung	175
9.2	Die roten Chlorophyllpools.....	176
9.2.1	Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität F760 des Chlorophyllpools Chl735 vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors P700	178
9.3	Ergebnisse und Diskussion	183
9.3.1	Absorptionsspektrum von Photosystem I aus <i>Arthrospira platensis</i>	183
9.3.2	Abhängigkeit der Fluoreszenzemission der roten Chlorophylle von der Anregungsleistung	184
9.3.2.1	Herleitung der Ratengleichung für den Chlorophyllpool Chl708.....	187
9.3.2.2	Herleitung der Ratengleichung für den Chlorophyllpool Chl735.....	188
9.3.2.3	Qualitative Analyse des Intensitätsverhältnisses I(F725):I(F760).....	192
9.3.3	Fluoreszenzemissionsspektren einzelner trimerer Photosystem I- Komplexe aus <i>Arthrospira platensis</i>	196
9.3.3.1	Fluoreszenzemissionsspektren vorreduzierter und voroxidiertes trimerer Photosystem I-Komplexe	196
9.3.3.2	Analyse von Fluoreszenzeinzelmolekülspektren trimerer Photosystem I-Komplexe.....	198
9.3.4	Summation der Einzelmolekülspektren zum Nachweis intakter einzelner Photosystem I-Komplexe	204
9.3.5	Zeitliche Untersuchung des Ausbleichverhaltens von einzelnen trimeren Photosystem I-Komplexen	205
9.4	Zusammenfassung des Kapitels	210
10	Zusammenfassung der Dissertation	213
10.1	Untersuchung von Photosystem I aus <i>TS. elongatus</i>	213
10.2	Optische Spektroskopie an Photosystem I-Komplexen aus <i>A. platensis</i>	216
	Tabellenverzeichnis	219
	Literaturverzeichnis	221
	Danksagung	233

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Å	ÅNGSTRÖM
A, A ₀ , A ₁	Elektronenakzeptoren in der ETC von PSI
A + dreistellige Zahl	Absorptionsmaximum
<i>A. platensis</i>	<i>Arthrospira platensis</i>
ADP	Adenosindiphosphat
APD-SPCM	Avalanche Photodiode-Single photon counting module
ATP	Adenosintriphosphat
A/B + zweistellige Zahl	Chlorophylle, welche an PsaA oder PsaB gebunden sind
B _(x oder y) -Banden	Absorptionsbanden von Chlorophyll im grünen Spektralbereich
β-DM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
CCD	Charge coupled device
Chl/Chls	Chlorophylle
Chl Zahl	Chlorophyllpool
cm ⁻¹	Wellenzahl
Cyt c553	Cytochrom c553
Cyt b ₆ f	Cytochrom b ₆ f
e ⁻	Elektron
E _a , E _b	Elektronenzustände allgemein
E _m	Mittleres Redoxpotential
ETC	Elektronentransferkette
F + dreistellige Zahl	Fluoreszenzmaximum
F _A /F _B	Terminale Eisen-Schwefelcluster in PSI
Fd	Ferredoxin
Flvd	Flavodoxin
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Oxidoreduktase
FeS-Cluster	Eisen-Schwefel-Cluster
FWHM	Halbwertsbreite (<i>full width at half maximum</i>)
F _x	Eisen-Schwefel-Cluster in der ETC von PSI
HOMO	Höchstes besetztes Molekülorbital (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
I	Intensität
K	KELVIN
k	Übergangsrate zwischen zwei elektronischen Zuständen
kWh	Kilowattstunde
kDa	Kilodalton
LD	Lineardichroismus

Fortsetzung Abkürzungsverzeichnis

LHCI	Lichtsammelkomplex I
LUMO	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
MG	Molekulargewicht
MGDG	Monogalactoyldiglycerid
MHz	Megahertz
min	Minute
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
ms	Millisekunde
µs	Mikrosekunde
µW	Mikrowatt
n	Besetzungswahrscheinlichkeit
NA	Numerische Apertur
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
nm	Nanometer
NPL	Nullphononenlinie
ns	Nanosekunde
OD	Optische Dichte
P680	Erster Elektronendonator in PSII
P700	Erster Elektronendonator in PSI
PC	Plastocyanin
P _{ex}	Anregungsleistung
PG	Phosphatidylglycerol
Pheo	Pheophytin
PMS	Phanazinmethosulfat
PQ/PQH ₂	Plastochinon-Pool
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
Psa + <i>Buchstabe</i>	Protein-Untereinheit in PSI
PSB	Phononenseitenbande (phonon side band)
Q _(x oder y) -Banden	Absorptionsbanden von Chlorophyll im roten Spektralbereich
Q _A /Q _B	Plastochinon
RT	Raumtemperatur
S ₀ , S ₁ , S _n	Singulettzustände

Fortsetzung Abkürzungsverzeichnis

s	Sekunde
t	Zeit (<i>time</i>)
TAC	Time to Amplitude Converter
T _n	Triplettzustand
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
<i>TS. elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>
TT	Tiefe Temperaturen
UV	Ultraviolett
V	VOLT
VIS	sichtbar
x, y	Übergangsdipolmomente
ZPL	Zero-phonon line

Summary

Photosystem I (PSI), a pigment-protein complex, is one of two photosystems that are responsible for the conversion of light energy into chemical energy in oxygenic photosynthesis. Light is captured by pigments in the antenna system of the pigment-protein complex and is subsequently transferred to the reaction center, where charge separation takes place. During the process of photosynthesis, a proton gradient is established. Finally, the light energy is used to build the strong reducing agent, NADPH, and the highly energetic molecule, ATP, both of which are used for the cell metabolism.

Light harvesting and subsequent transfer of the resulting excitation energy to the primary donor of the reaction center, which forms an energetic trap, are the main tasks of the antenna. PSI complexes however, have among many other fascinating characteristics a remarkable spectral feature. They possess so-called red chlorophylls or red pool chlorophylls. This group of pigments shows an absorption band, which is red-shifted with respect to the absorption of the primary electron donor P700 and therefore forms an even lower energetic trap. In PSI, the red chlorophylls show an absorption band with wavelengths longer than 700 nm due to strong excitonic coupling with a significant charge-transfer character. At first glance, the energetic position of the red chlorophylls appears to be incompatible with an efficient energy trapping by the primary donor, but it seems that the red chlorophylls may play an important role in maintaining an efficient energy equilibration. Furthermore, it is discussed that the red chlorophylls are funnelling the energy toward the reaction center and thus increasing the efficiency. Having red pool chlorophylls in addition to the bulk chlorophylls enlarges the cross section for the absorption to longer wavelengths, giving a biological advantage to the organism under shadowy conditions.

The number and spatial location of the red pigments that make up the red chlorophyll pool and of the red chlorophyll pools themselves are still discussed controversially and can vary between organisms and the oligomerization state of the pigment-protein complex. Studies based on absorption spectroscopy show that trimeric PSI as well as monomeric PSI from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* (*TS. elongatus*) have two red chlorophyll pools with absorption maxima at 708 nm and 719 nm; these red chlorophyll pools are called Chl708 and Chl719. Recently, a new red chlorophyll pool was discovered with an absorption wavelength of 715 nm through hole burning experiments. Contrary to PSI from *TS. elongatus*, the number of the red chlorophyll pools of PSI from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*

(*A. platensis*) differs with the oligomerization state of PSI. There are two red chlorophyll pools Chl708 and Chl735 in trimeric PSI of *A. platensis* but only one (Chl708) in the monomeric form.

Despite several experimental and theoretical simulation studies, the exact number of participating chlorophylls as well as a clear assignment of the red pool chlorophylls to the 90 antenna chlorophylls is still not possible yet.

In the framework of this thesis, the red chlorophyll pools in PSI complexes isolated either from *TS. elongatus* or *A. platensis*, were investigated. Besides studying the spectral properties of the red chlorophylls in single Photosystem I complexes, the photophysical behaviour of the red chlorophylls were investigated and a possible assignment of the red chlorophyll pools to antenna chlorophylls in PSI of *TS. elongatus* was performed.

Experiments on the spectral properties of the red chlorophylls of the two different PSI complexes were done using fluorescence spectroscopy either on bulk samples or on the single molecule level. Applying single molecule spectroscopy has the advantage to completely avoid ensemble averaging and therefore gives access to the accurate determination of photophysical parameters. This is especially important for photosynthetic proteins where the heterogeneity of pigments can be attributed to the interaction within the PSI complex as well as to the heterogeneity between different PSI complexes. Dynamic properties of the photophysical parameters are studied using autocorrelation analysis of the fluorescence emission. Fluorescence polarization analysis of the different fluorescence bands allows a possible assignment of the red chlorophyll pools to the antenna chlorophylls for PSI from *TS. elongatus*, based on the known crystal structure.

Setup and Sample Preparation

The main part of the setup consists of a low-temperature confocal scanning microscope with a high numerical aperture objective lens (NA = 0.85, MIKROTEK und BERNHARD-HALLE NACHFOLGER) placed in a liquid helium bath cryostat operating at $T = 1.6$ K. The detection yield of the setup is about 0.5%. Individual PSI complexes were excited using a CW dye laser (COHERENT 699, line width 1 cm^{-1}) operating at 672 nm. The sample was scanned in a two dimensional plane by the laser beam using a beam scanner (GENERAL SCANNING INC.); the fluorescence light is refocused via the same microscope objective, filtered from the excitation light by a holographic notch filter (675 Notch Plus, KAISER) and an interference long pass

filter (LP 679, OMEGA FILTERS) and directed to two avalanche photodiodes (APD - SPCM-14, PERKIN-ELMER). The two-detector photon-counting scheme allows the analysis of the fluorescence autocorrelation function in a timescale of nanoseconds. For this purpose, a multiscaler photon counter card (B&H, MSA 300) was employed. Fluorescence emission spectra were recorded using a 30 cm imaging spectrograph (ACTON RESEARCH Inc.; SpectraPro 300i) equipped with a back illuminated CCD camera (ROOPER SCIENTIFIC; model 100EB). For the fluorescence polarization analysis a rotating polarizer was installed in front of the spectrometer.

PSI from *A. platensis* was received from N. V. KARAPETYAN; trimeric PSI from *TS. elongatus* from P. FROMME and monomeric PSI from F. MUEH.

The PSI complexes were suspended in either a buffer containing 100 mM glycine, pH 10 and 0.02% β -DM for reducing conditions. Only for control experiments PSI was suspended in a buffer containing 1 M Tris-HCl, pH 7.5 and 0.02% β -DM for oxidation. The chemical oxidation was carried out by adding ferricyanide to a final concentration of 3 mM. To chemically avoid an accumulation of oxidized P700, sodium dithionite and phenazine methosulfate was added to a final concentration of 50 mM and 10 μ M, respectively. For reduction, the sample preparation was carried out at room temperature and under green light. The sample was incubated in darkness for at least 15 min before glycerol was added as a cryoprotectant to a final concentration of about 50% (v/v). Finally, the sample was frozen in darkness. The oxidation was carried out like the reduction, but under normal light and the freezing was done under illumination.

Results

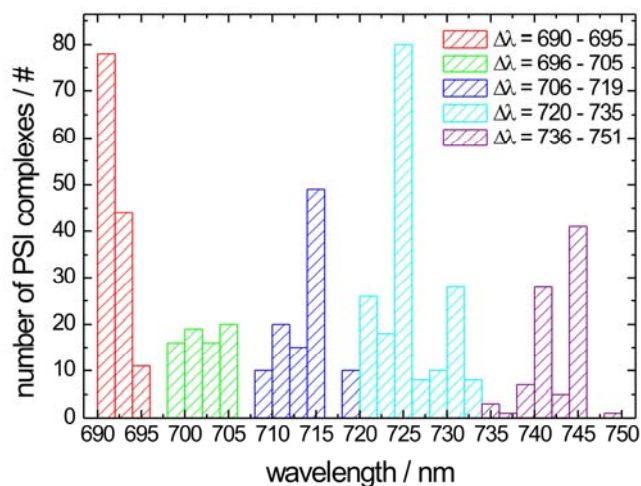
Optical single molecule spectroscopy of Photosystem I complexes of *TS. elongatus*

To investigate the spectral behaviour of the red chlorophylls of single PSI complexes the fluorescence was analyzed by a monochromator.

Fluorescence emission spectra of trimeric PSI complexes in bulk samples show only one dominant band with a maximum at 730 nm. This fluorescence emission band can be assigned to the red chlorophyll pool Chl719. In contrary to bulk measurements, the fluorescence emission spectrum of single PSI complexes reveals that this broad band is the superposition of several narrow bands, which cannot be resolved in bulk measurements. The fluorescence emission spectra of single PSI complexes are very heterogeneous and exhibit a different number of bands. These bands can vary in the spectral position, the line width and the fluores-

cence intensity. This phenomenon can be explained by the size and complexity of this pigment-protein complex and also by the photophysical properties of PSI which influence the fluorescence emission spectrum. Besides different levels of photostability of the single fluorescing chlorophyll pools, the fluorescence intensity and the position of the bands are influenced by dynamical processes like blinking or spectral diffusion.

A statistical analysis of the wavelength distribution of the fluorescence emission bands of single PSI complexes in combination with data from literature facilitates the classification of the emission wavelength into five fluorescence emission bands between 690 nm and 750 nm. Two

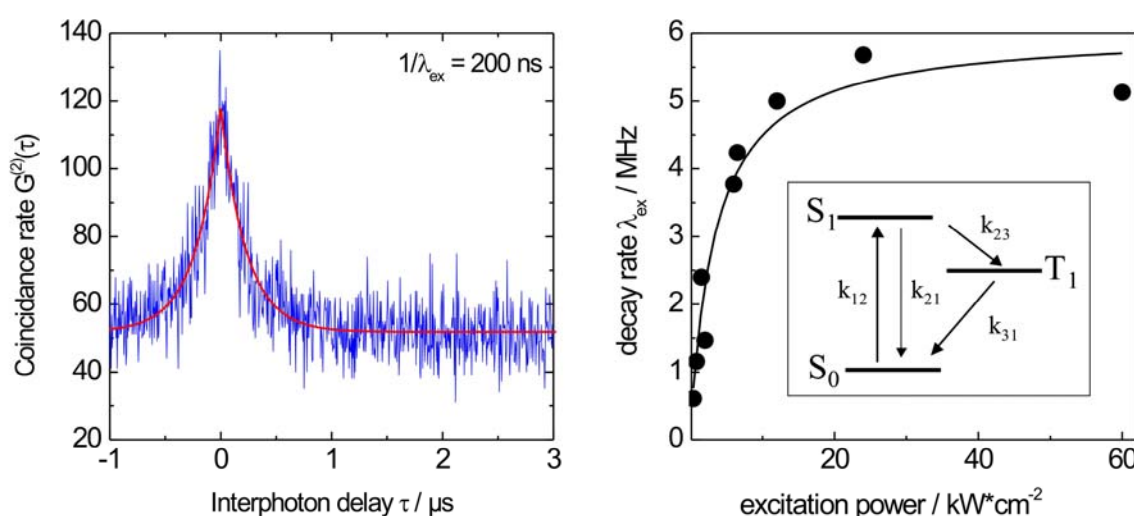


of the analyzed bands occurring between 706 nm and 719 nm and between 720 nm and 735 nm, can be assigned to the known red chlorophyll pools Chl708 and Chl719. It was demonstrated that in addition to Chl719 the red chlorophyll pool Chl708 fluoresces, which was not seen in bulk measurements. After photobleaching of the dominant fluorescence emission band of Chl719, a further band appears at around 745 nm. This band has not been detected before. Two additional bands were found, one between 690 nm and 695 nm and the other between 696 nm and 705 nm. Due to the spectral position of these two bands the corresponding chlorophyll pools could not be assigned to the red chlorophyll pools, which need to have absorption wavelengths longer than 700 nm. The chlorophylls fluorescing between 690 nm and 695 nm are chlorophylls that neither belongs to the antenna, nor to the red chlorophyll pools. Because of their uncoupled state, these chlorophylls are able to fluoresce. The chlorophylls, which are responsible for the emission band between 696 nm and 705 nm, could be connecting chlorophylls between the antenna system and the reaction center. At ambient conditions these chlorophylls transfer the excitation energy to the reaction center.

Fluorescence correlation analysis

To obtain more details on the photophysical properties of the fluorescent chlorophylls, the statistics of the photon emission from single PSI complexes from *TS. elongatus* were investigated using fluorescence correlation spectroscopy. With this method, it is possible to unravel dynamic molecular events based on statistical analysis of the fluctuations of the

fluorescence originated by the pigments. When PSI complexes are immobilized, internal dynamics such as intersystem crossing yield and triplet lifetime can be investigated. Organic dye molecules like chlorophylls can be described in terms of a three-level system including ground and excited singlet states (S_1 , S_2) and a metastable triplet state (T_1), which are connected by the transition rates k_i . Under optical excitation, the fluorescence emission of single molecules shows interruptions in the fluorescence signal related to intersystem crossing events. Such fluctuations of the fluorescence intensity can be analyzed using a second order fluorescence intensity correlation function $G^2(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle$, where $I(t)$ is the fluorescence intensity and the averaging is over time.



The fluorescence correlation function is defined as the conditional probability density $G^{(2)}(\tau)$, which corresponds to the probability to detect a photon at time $t + \tau$ when another photon was detected at time t .

The correlation function of a correlated signal is heterogeneously distributed over time and can be fitted with a single-exponential decay. In contrast to this behaviour, uncorrelated photons are homogeneously distributed and the correlation function is flat.

Under continuous illumination, single chlorophylls can be excited from the ground singlet state to the first excited singlet state, shown in the inset in the above right figure.

A radiative decay from this state results in the emission of fluorescence photons. If the metastable triplet state is present, the molecule can escape into the triplet state. In this state, the molecule is trapped for a certain time, usually longer than the lifetime of the excited singlet state, before the molecule relaxes back to the ground singlet state. This process leads to a “bunching” of fluorescence photons resulting in a monoexponential decay of the correlation function according to $C(\tau) = A + B \exp(-\lambda_{\text{ex}}\tau)$. The decay rate λ_{ex} was

determined for several excitation powers and plotted versus the excitation intensity. The dependency of the decay rates λ_{ex} with respect to the excitation intensity can be fitted by the following equation $\lambda_{th} = k_{31} + k_{31} \cdot I / I_S \cdot \left(1 / \left(1 + (2k_{31} / k_{23}) \cdot I / I_S\right)\right)$, where I is the excitation intensity and I_S the saturation intensity. The decay rate λ_{th} approaches $k_{23} + k_{31}$ for high excitation intensities and k_{31} for low excitation intensity. k_{23} is the population rate (intersystem crossing rate), and k_{31} is the depopulation rate of the triplet state.

On the left side of the figure above a correlation function of a single PSI complex at $T = 2K$ is shown. The decay rate is $(200 \text{ ns})^{-1}$. The decay rate increases with increasing laser power. At full saturation the decay rate is determined to $(170 \text{ ns})^{-1}$ by using the equation for λ_{th} to fit the experimental data. Typically, the population rate of the triplet state k_{23} is much larger than the depopulation rate of the triplet state k_{31} in organic molecules; hence the decay rate λ_{th} corresponds to the intersystem crossing rate k_{23} of the fluorescing chlorophylls. Taking into account the fluorescence lifetime of chl a ($\sim 1.5 \text{ ns}$), an intersystem crossing yield $\phi_{ISC} = 0.01$ can be estimated. This value is lower than the reported intersystem crossing yield $\phi_{ISC} = 0.64$ for monomeric chlorophyll a in solution. The inverse decay rate $1/\lambda_{th}$ at low laser power tends to the microsecond range, which at zero power limit corresponds to the triplet state lifetime. The triplet state lifetime is at least 2 orders of magnitude shorter than the triplet lifetime of chl a in solution (0.6 ms), indicating an efficient quenching by carotenoids.

Modification of the triplet state parameters, both the decrease of the population rate k_{23} and the increase of the depopulation rate k_{31} for the fluorescing chlorophylls leads to a reduced population of the triplet state. This has a photoprotective effect for PSI complexes, since a significant population of the triplet state may lead to structural deterioration by photochemical reaction due to formation of singlet oxygen.

Fluorescence polarisation analysis

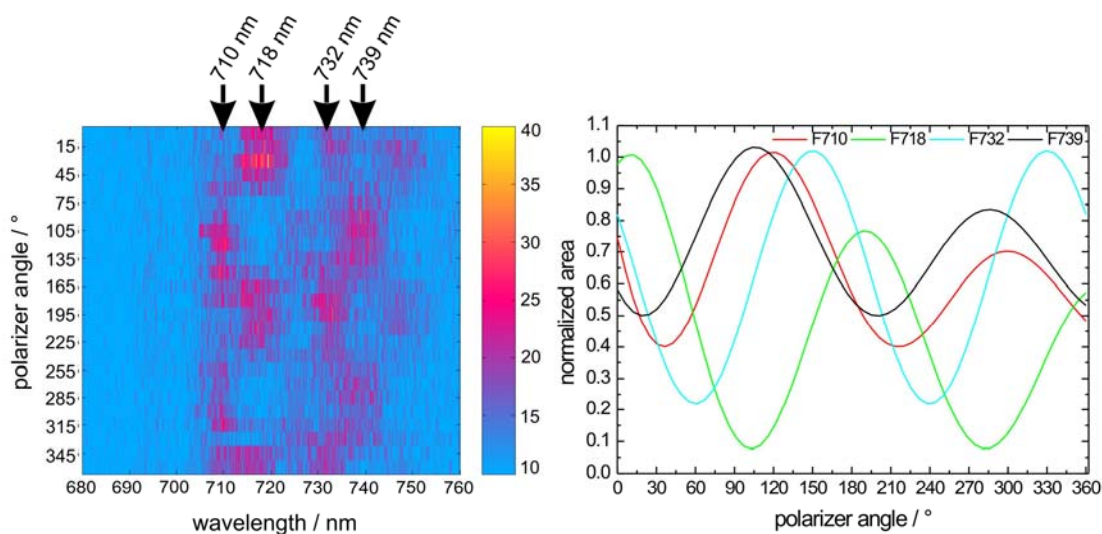
Based on the analysis of the fluorescence polarization, a possible assignment of the red chlorophyll pools to certain antenna chlorophylls of PSI from *TS. elongatus* was performed via the determination of the orientations of their transition dipole moments. An assignment is only possible, when the crystal structure of the protein complex and hence the orientation of the transition dipole moments of all antenna chlorophylls is known. This is only the case for PSI from *TS. elongatus*, wherefore the fluorescence polarization analysis is restricted to this species.

The fluorescence light of distinct chlorophyll pools in trimeric and monomeric PSI complexes was tested for linear polarization using a rotating polarizer in front of the spectrometer. Linearly polarized fluorescence light can originate either from a single emitter, or several emitters, which are strongly coupled and thus form a new quantum system, or several emitters, which are orientated collinearly. The fluorescence intensity modulation shows a \cos^2 -dependency on the rotation angle of the polarizer. The modulation was analysed by integration of the individual bands and following non-linear curve fitting applying a \cos^2 -function.

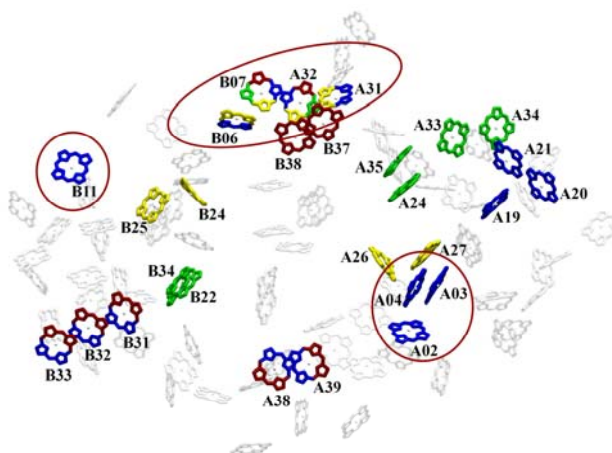
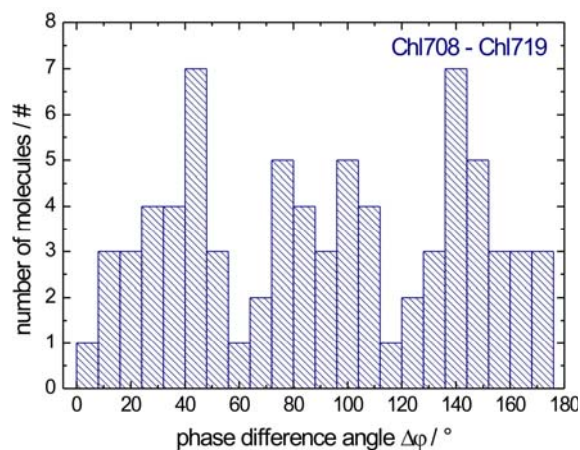
Due to the fact that the PSI complexes are randomly oriented in the sample, a single measurement of one fluorescing band does not result in a unique orientation which can be identified using structural data. A statistical analysis of the relative orientation of two fluorescing bands is necessary to obtain a unique orientation corresponding to the angle between two chlorophyll pools. Simulations and subsequent analysis of the relative orientation of two transition dipole moments in an isotropic distributed sample showed that a determination of the real orientation is possible. A prerequisite for the assignment of the red chlorophylls to the antenna chlorophylls is the determination of the phase shift (angle) between two fluorescence bands and therefore more than one linearly polarized band per complex.

For trimeric PSI complexes, only individual fluorescence bands in the fluorescence emission spectrum showed a linear polarization. A reason for the rare linearly polarized behaviour of the fluorescence light can be found in the trimeric structure itself. A fluorescence band of one chlorophyll pool is the result of the fluorescence emission of three emitters, if they are able to emit simultaneously and have indistinguishable emission wavelengths.

An investigation of monomeric PSI complexes increases the probability to detect fluorescence light with linear polarization. For monomeric PSI complexes, up to four bands in one fluorescence emission spectrum were detected simultaneously (left figure below).

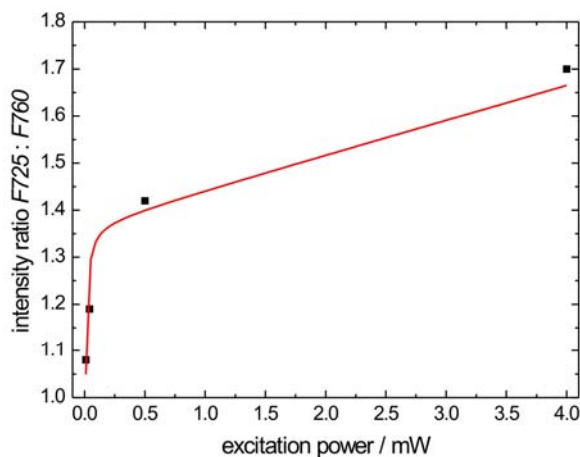


By means of a GAUSS decomposition of the single fluorescence bands and a mathematical analysis using a \cos^2 -fit the phase difference angle between different chlorophyll pools and their components were determined (right figure above). A statistical analysis of the phase difference angles for certain pairs of chlorophyll pools results in a preferential angle between the participating chlorophyll pools, shown in the figure on the right for Chl708 and Chl719. This preferential angle was compared with angles between the calculated transition dipole moments of predicted candidates for the red chlorophyll pools from literature. An agreement was found for the angle between the chlorophyll cluster *A31-A32-B07-B06* of the chlorophyll pool Chl719 and the chlorophyll cluster *A2-A3-A4* of the chlorophyll pool Chl708. A further assignment was done for the chlorophyll cluster *A31-A32-B07-B06* (Chl719) and chlorophyll *B11* (Chl708).



Optical spectroscopy of Photosystem I complexes from *A. platensis*

Fluorescence spectroscopic investigations of trimeric PSI complexes in a bulk sample revealed a different dependency of the fluorescence intensity (F725 and F760) of the corresponding red chlorophyll pools Chl708 and Chl735 with respect to the excitation power. The qualitative characteristics of the fluorescence intensity ratio $F725:F760$ (black squares in the figure on the right) can be described by a simple model, derived from the rate equation of each participating molecule. The rate equations take into account the rate constants of the transitions between the electronic states and the population of every single state. The dependency of the intensity ratio $F725:F760$ with respect to the excitation power can be described with the following equation



$$\frac{I(F725)}{I(F760)} = \frac{P_{ex} \cdot C}{\frac{B_{12}(Chl735)}{\frac{k_{ET} \cdot B_{12}(P700)}{P_{ex} \cdot B_{12}(P700) + k_{rec}} + B_{12}(Chl735) + \frac{k_F}{P_{ex}}}},$$

where P_{ex} is the excitation energy, k_{ET} the energy transfer rate, k_{rec} the recombination rate and k_F the fluorescence rate. $B_{12}(Chl735)$ and $B_{12}(P700)$ are the excitation efficiency for the transition $S_0(Chl735) \rightarrow S_1(Chl735)$ and $P700 \rightarrow P700^{+\bullet}$, respectively.

Taking into account literature values for the energy transfer rate, the fluorescence rate and the recombination rate for PSI complexes a qualitative description of the curve progression for the intensity ratio $F725:F760$ with respect to the excitation power was possible (red line in the figure above).

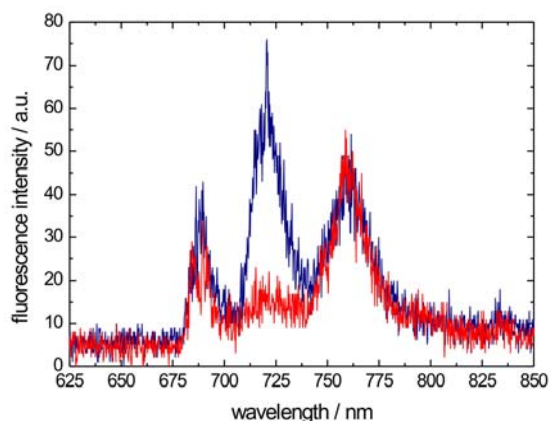
In addition to bulk measurements, single molecule spectra of trimeric PSI from *A. platensis* were investigated. Bulk spectra revealed that the fluorescence emission of Chl735 compared to the fluorescence emission of Chl708 depends on the reaction state of the reaction center. If the primary electron donor P700 is situated in the neutral form, Chl735 is able to emit the excitation energy as fluorescence; the radical cation $P700^{+\bullet}$, which only exists after charge separation, is able to trap the excitation energy partly and the intensity of the fluorescence band of Chl735 strongly decreases. It is published in literature that a pre-reduction can shift the balance between P700 and $P700^{+\bullet}$ toward P700, whereby the fluorescence band F760 of

Chl735 should be clearly visible. In spectra of pre-oxidized PSI complexes this band should be missing. However, single molecule spectra show that on time average the primary electron donor P700 is mainly found as the radical cation $P700^{+\bullet}$, irrespective of any pre-reduction and pre-oxidation. To collect enough fluorescence photons, it is necessary to excite single PSI complexes with sufficient excitation power, that P700 is existent in the cationic form for most of the time. The fluorescence fluctuations in the fluorescence emission spectra of single PSI complexes cannot be attributed to the reaction state of P700.

The heterogeneous spectra are the result of spectral diffusion due to changes in the local environment and fluctuations in the fluorescence intensity. Because of a transition of a red chlorophyll pool to a long-living triplet state, no fluorescence can be emitted as long as the pigment is situated in this state and the intensity of the fluorescence band decreases.

In contrast to fluorescence emission spectra of single PSI complexes from *TS. elongatus*, fluorescence emission spectra of single PSI complexes from *A. platensis* exhibit at maximum two fluorescence emission bands between 710 nm and 760 nm, which can be assigned to the red chlorophyll pools Chl708 and Chl735. A further emission band was detected at around 695 nm, which is generated by uncoupled chlorophylls. The fluorescence emission bands are accompanied by so called zero-phonon lines – a typical feature in single molecule spectra.

The red chlorophyll pools Chl708 and Chl735 show a different level of photostability. Compared to Chl735 and the chlorophylls responsible for the band at 695 nm, Chl708 is more photosensitive, probably due the structural environment, and the fluorescence intensity fades faster than the intensity of the other bands. In extreme cases this band completely bleaches during the measurement.



1 Einleitung

Der weltweite Energiebedarf ist mit dem Zeitalter der Industrialisierung stark angestiegen. Anfänglich auf Europa und Nordamerika beschränkt, breitete sich der industrielle Fortschritt immer weiter aus, und mit ihm nahm der Verbrauch an Energie stetig zu. In den nächsten Jahrzehnten wird eine weitere Zunahme des Energieverbrauchs zu einem Energieengpass führen, der mit den heute zur Verfügung stehenden Energiequellen nicht zu umgehen ist. Die Entwicklung neuer Energiequellen ist daher erforderlich.

Die Sonne stellt mit einer Energieleistung von $1,08 \times 10^{18}$ kWh pro Jahr (auf der Erdoberfläche) zurzeit den größten Energielieferanten dar. Um Sonnenenergie in elektrische Energie umzuwandeln, wurden Solarzellen entwickelt, die das Sonnenlicht absorbieren und in elektrische Energie umwandeln. Ursprünglich auf dem Halbleitermaterial Silizium basierend, wurden zwischenzeitlich Solarzellen entwickelt, die organische Moleküle (exzitonische Solarzelle [1]) oder Farbstoffe (GRÄTZEL-Zelle [2]) als Absorbermaterial verwenden. Trotz unterschiedlichen Aufbaus der Solarzellen weisen alle derzeit verfügbaren Solarzellen einen geringen Wirkungsgrad auf, der zwischen 15 - 20% liegt.

Die Natur hat bereits seit Milliarden von Jahren einen Weg entwickelt und optimiert, um Sonnenenergie effizient zu nutzen. Mit der Photosynthese bietet sich der Natur die Möglichkeit, Sonnenenergie in chemische Energie umzuwandeln. Nach Absorption von Licht durch photophysikalisch aktive Moleküle, den Pigmenten, wird die Energie über verschiedene Energietransfermechanismen vom Ort der Lichtabsorption zum Ort der Ladungstrennung

transportiert. Der weitere Energietransport wird letztendlich durch ein energiereiches Elektron und der Ausbildung eines elektrochemischen Gradienten vermittelt.

Trotz intensiver Forschung, die inzwischen alle Gebiete der Naturwissenschaften umfasst, ist die Photosynthese noch nicht vollständig verstanden. Ein tieferes, detailliertes Verständnis sowohl der biologischen als auch der chemischen Prozesse, wie auch der physikalischen Mechanismen der Photosynthese, könnte zu einer Optimierung der Energiegewinnung auf der Basis von Solarzellen führen. Die Übertragung von Mechanismen aus der Natur auf technische Anwendungen, wird unter dem Namen Bionik zusammengefasst und ist in der Vergangenheit bereits in verschiedenen Bereichen erfolgreich durchgeführt worden.

Aufgrund der Komplexität der photosynthetischen Maschinerie ist es derzeit nicht möglich dieses System als Einheit zu untersuchen.

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Photosystem I-Komplexe (PSI) aus den Cyanobakterien *Arthrospira platensis* (*A. platensis*) und *Thermosynechococcus elongatus* (*TS. elongatus*). Im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen die so genannten roten Chlorophyllpools des Antennensystems. Photosystem I-Komplexe besitzen mehrere rote Chlorophyllpools. Diese lassen sich am genauesten fluoreszenzspektroskopisch bei tiefen Temperaturen (1,6 K) auf Einzelmolekülebene untersuchen. Die Einzelmolekülspektroskopie ermöglicht einen Zugang zur Bestimmung der Heterogenität von Parametern, die bei Messungen im Ensemble durch eine Ensemble-Mittelung verborgen bleiben würden. Zu diesem Zweck kommt ein konfokales Laserscanning-Mikroskop zum Einsatz.

Durch die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Photosystem I-Komplexe sollen die spektralen Eigenschaften der roten Chlorophylle sowohl auf Einzelmolekülebene als auch im Ensemble untersucht werden. Besonderes Augenmerk soll dabei auf die Anzahl der Fluoreszenzemissionsbanden, deren Emissionsmaxima und die Strukturierung der Banden gelegt werden und ebenso auf die Erforschung dynamischer Prozesse wie der Photosensitivität, der spektralen Diffusion und möglichen Quantensprüngen innerhalb der roten Chlorophyllpools.

Arbeiten hierzu wurden bereits für PSI aus *TS. elongatus* auf Einzelmolekülebene von JELEZKO [3] und im Ensemble von PÅLSSON [4,5] durchgeführt; für PSI aus *A. platensis* von SHUBIN [6-9] und KARAPETYAN [10].

Quantensprünge innerhalb der roten Chlorophyllpools können mittels Autokorrelationsanalyse der Fluoreszenzemission ermittelt werden. Lebensdauern von elektronischen Zuständen

wie die Fluoreszenz-Lebensdauer τ_F oder Intersystem Crossing-Raten k_{ISC} zwischen Singulettzuständen und dem Triplettzustand werden somit zugänglich [11-13].

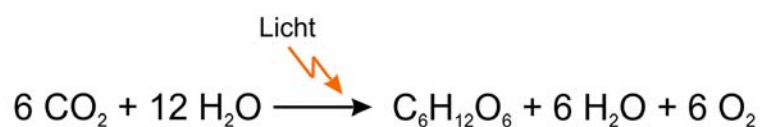
Eine Analyse der Polarisationsseigenschaften der Fluoreszenzemission der roten Chlorophyllpools einzelner PSI-Komplexe ermöglicht die Bestimmung der relativen Lage der Chlorophyllpools im Protein-Pigment-Komplex über die Ausrichtung ihrer Übergangsdipolmomente [14]. Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis der Kristallstruktur mit atomarer Auflösung. Im Jahr 2001 wurde die Kristallstruktur des PSI aus *TS. elongatus* mit einer Auflösung von 2,5 Å ermittelt [15]. Durch den Vergleich der experimentell ermittelten Orientierungen der Chlorophyllpools mit möglichen Kandidaten aus der Literatur, die das Ergebnis quantenchemischer Berechnungen sind, sollte bei Übereinstimmung der experimentellen und berechneten Daten eine Zuordnung der roten Chlorophylle zu bestimmten Antennen-Chlorophyllen im PSI aus *TS. elongatus* möglich sein.

Die Arbeit ist in insgesamt zehn Kapitel unterteilt. Nach einer Präsentation der Photosynthese in Cyanobakterien erfolgt eine nähere Beschreibung des PSI-Komplexes und der roten Chlorophylle. Die roten Chlorophyllpools der Organismen *TS. elongatus* und *A. platensis* werden jeweils am Beginn der entsprechenden Experimente genauer vorgestellt. Vor der Beschreibung der Ergebnisse werden die physikalischen Grundlagen und die Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie erörtert sowie der Versuchsaufbau und die Probenpräparation vorgestellt. Die Ergebnisse der Untersuchungen des PSI-Komplexes aus *TS. elongatus* sind in den Kapiteln 6 - 8 zusammengefasst; Kapitel 9 stellt die Ergebnisse für PSI aus *A. platensis* vor. Die Arbeit schließt mit einer kurzen Zusammenfassung der Ergebnisse.

2 Photosynthese in Cyanobakterien

2.1 Die Photosynthese

Die Photosynthese ist eine der bedeutendsten Reaktionen in der Natur. Ohne sie ist Leben in der Form, wie wir es kennen, nicht möglich. Allein durch die photosynthetische Aktivität einfacher Organismen veränderte sich die Zusammensetzung der Luft von einer auf Methan basierenden Atmosphäre in eine Atmosphäre, die überwiegend aus Stickstoff und Sauerstoff besteht. Allgemein wird die Photosynthese als physikalisch-chemischer Prozess definiert, der Sonnenlicht in chemische Energie umwandelt. Prinzipiell werden zwei Arten von Photosynthesemechanismen unterschieden: die oxygene und die anoxygene Photosynthese. In der oxygenen Photosynthese wird Kohlendioxid aus der Atmosphäre mit Wasser zu Kohlenhydraten und Sauerstoff als Abfallprodukt, entsprechend der Brutto-Reaktionsgleichung,



umgesetzt.

Während die oxygene Photosynthese der Prozess zur Energiegewinnung in Pflanzen, Algen und Cyanobakterien ist, wandeln anaerobe Bakterien Sonnenlicht über die anoxygene Photo-

synthese in chemische Energie um. Hierbei werden anstelle von Wasser einfache organische Verbindungen wie Succinat oder anorganische Verbindungen wie beispielsweise Schwefelwasserstoff oder Wasserstoff als Reduktionsmittel verwendet. Bei der anoxygenen Photosynthese entsteht deshalb kein Sauerstoff. Cyanobakterien waren erstmals in der Lage die oxygene Photosynthese durchzuführen, wodurch der Sauerstoffgehalt in der Atmosphäre allmählich anstieg und somit die Grundlage für die heutigen Lebensformen geschaffen wurde.

Die oxygene Photosynthese kann in zwei elementare Teilprozesse unterteilt werden: in die Lichtreaktion und in die Dunkelreaktion. Angetrieben durch Licht wird Wasser in der Lichtreaktion der Photosynthese in Protonen, Elektronen und Sauerstoff zerlegt. Über die Membran hinweg wird ein Protonengradient aufgebaut, der die Synthese von Adenosin-triphosphat (ATP), der wichtigsten Speicherform chemischer Energie, antreibt. Daneben werden die Elektronen durch die Lichtenergie nicht nur aus Wasser freigesetzt, sondern auf ein höheres Energieniveau angehoben, das ausreicht, das wichtigste Reduktionsmittel des Anabolismus, das Coenzym Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP^+) zu reduzieren. Das Vorhandensein der energiereichen Verbindungen NADPH und ATP ist die Voraussetzung für die Reduktion von CO_2 zu Kohlenhydraten im nachfolgenden Calvinzyklus. Da die CO_2 -Assimilierung bei Anwesenheit von NADPH und ATP auch ohne Licht ablaufen kann, nennt man diesen Teil der Photosynthese auch Dunkelreaktion. Im Calvinzyklus wird mit Hilfe von ATP 3-Phosphoglycerat bzw. Ribulose-5-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat bzw. zu Ribulose-1,5-Bisphosphat phosphoryliert. NADPH wird bei der Reduktion von 1,3-Bisphosphoglycerat zu Glycerat-3-phosphat verbraucht.

In **Abb. 2.1** ist sowohl die Licht- als auch die Dunkelreaktion der oxygenen Photosynthese der Cyanobakterien graphisch dargestellt.

Der folgende Abschnitt soll einen Einblick in die Lichtreaktion der oxygenen Photosynthese geben, in deren Mittelpunkt neben den zwei Photosystemen PSI und PSII der Cytochrom b/f-Komplex und die ATP-Synthase stehen. Alle vier Proteinkomplexe sind in der Thylakoidmembran eingebettet. Diese trennt das Lumen, das Innere des Thylakoidsystems, vom Stroma, dem Innern des Chloroplasten bzw. der Cyanobakterien.

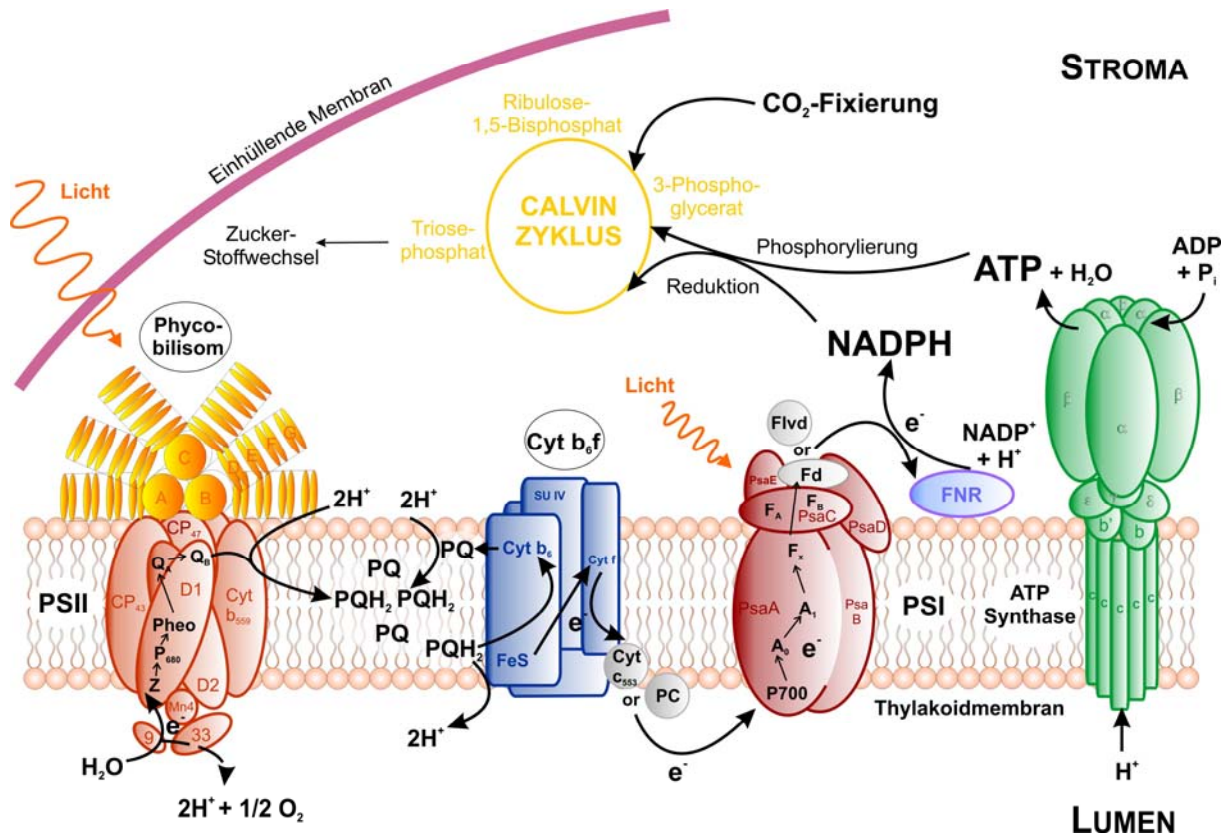


Abb. 2.1 Die oxygenen Photosynthese der Cyanobakterien. Nach Anregung der Photosysteme I (PSI) und II (PSII) über die entsprechenden Antennensysteme (Cyanobakterien besitzen als besonderes Antennensystem so genannte Phycobilisomen) wird jeweils ein Elektron abstrahiert. PSII gibt das Elektron an den Plastochinon-Pool (PQ/PQH₂) weiter, von wo es über den Cytochrom b_6/f -Komplex und einem mobilen Elektronencarrier (Plastocyanin/Cytochrom c_{553}) an das oxidierte PSI abgegeben wird. PSII erhält das fehlende Elektron durch Spaltung eines Wassermoleküls am wasserspaltenden Enzymkomplex auf der lumenalen Seite der Thylakoidmembran. Nach der Ladungstrennung im PSI wird das Elektron über eine Elektronentransferkette auf den mobilen Elektronencarrier Ferredoxin (oder Flavodoxin) abgegeben. Vom Ferredoxin wird das Elektron durch die Ferredoxin- $NADP^+$ -Oxidoreduktase auf $NADP^+$ übertragen. Während der Lichtreaktion baut sich ein Protonengradient über die Thylakoidmembran auf, der die ATP-Synthase antreibt, die ADP zu ATP phosphoryliert. ATP und NADPH werden unter anderem im Calvinzyklus verbraucht. Die Abkürzungen bezeichnen die einzelnen Protein-Untereinheiten und die Cofaktoren der Photosynthese. Einzelheiten siehe Text.

Die oxygenen Photosynthese beginnt mit der Anregung des Photosystem II-Komplexes durch elektromagnetische Strahlung mit anschließender Ladungstrennung im Reaktionszentrum. Licht wird über die Pigmente des Antennensystems absorbiert und zum Reaktionszentrum des Protein-Pigment-Komplexes PSII geleitet. Durch die Anregungsenergie wird das spezielle Chlorophyllpaar P680 im Reaktionszentrum angeregt, welches ein Elektron an die Elektronenakzeptoren Phaeophytin (Pheo) und die Plastochinone Q_A und Q_B weitergibt. Das oxidierte Chlorophyllpaar P680 erhält das fehlende Elektron aus der Wasserspaltung am wasserspaltenden Mangan-Enzymkomplex des PSII. Die Aufnahme eines abstrahierten Elektrons durch das Plastochinon Q_B führt zur Bildung des Semichinon-Radikals Q_B^\bullet . Erst

eine zweite photochemische Elektronenanregung reduziert das Semichinon-Radikal Q_B^\bullet in ein Plastohydrochinon (PQ/PQH₂), das gegen ein mobiles, oxidiertes Plastochinon ausgetauscht werden kann. Das reduzierte Hydrochinon transportiert die Elektronen zum Cytochrom b/f-Komplex (Cyt b₆f), von wo die Elektronen einzeln auf den mobilen Elektronencarrier Plastocyanin (PC) bzw. Cytochrom c₅₅₃ (Cyt c₅₅₃) abgegeben werden.

Durch die Wasserspaltung am wasserspaltenden Komplex des PSII-Komplexes und über den Transport von reduziertem Plastochinon werden Protonen im Lumen freigesetzt und die Protonenkonzentration im Thylakoidinnenraum erhöht sich gegenüber der Protonenkonzentration im Stroma. Der dadurch entstehende Protonengradient wird zum Antrieb der ATP-Synthase verwendet.

Das Photosystem I (PSI) ist ebenso wie das PSII, der Cytochrom b/f-Komplex und die ATP-Synthase ein Membranprotein der photosynthetischen Lichtreaktion. Es absorbiert Lichtenergie mittels eines Antennensystems und überträgt die Anregungsenergie zum Reaktionszentrum, wo die Energie für eine Ladungstrennung verwendet wird. Das freigesetzte Elektron wandert vom ersten Elektronendonator, dem speziellen Chlorophyllpaar P700 entlang einer Kette verschiedener Cofaktoren (siehe Unterkapitel 3.2 „Elektronentransferkette“) von der lumenalen Seite der Thylakoidmembran zur stromalen Seite, wo es auf den mobilen Elektronencarrier Ferredoxin (Fd) oder Flavodoxin (Flvd) übergeht. Am Ende dieser Elektronentransportkette steht die Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase (FNR), die NADP⁺ zu NADPH + H⁺ reduziert. Der oxidierte Photosystem I-Komplex erhält das fehlende Elektron über die mobilen Elektronencarrier Plastocyanin bzw. Cytochrom c₅₅₃ aus der Wasserspaltung am PSII.

In der Lichtreaktion der oxygenen Photosynthese sind zur Reduktion von NADP⁺ aus Wasser zwei Anregungsprozesse notwendig, um die Energiedifferenz zwischen Wasser und NADP⁺ zu überwinden. **Abb. 2.2** zeigt anhand der Angabe der Normalpotentiale der einzelnen Komponenten wie die Elektronen schrittweise das Energieniveau erreichen, das nötig ist, um NADP⁺ zu reduzieren.

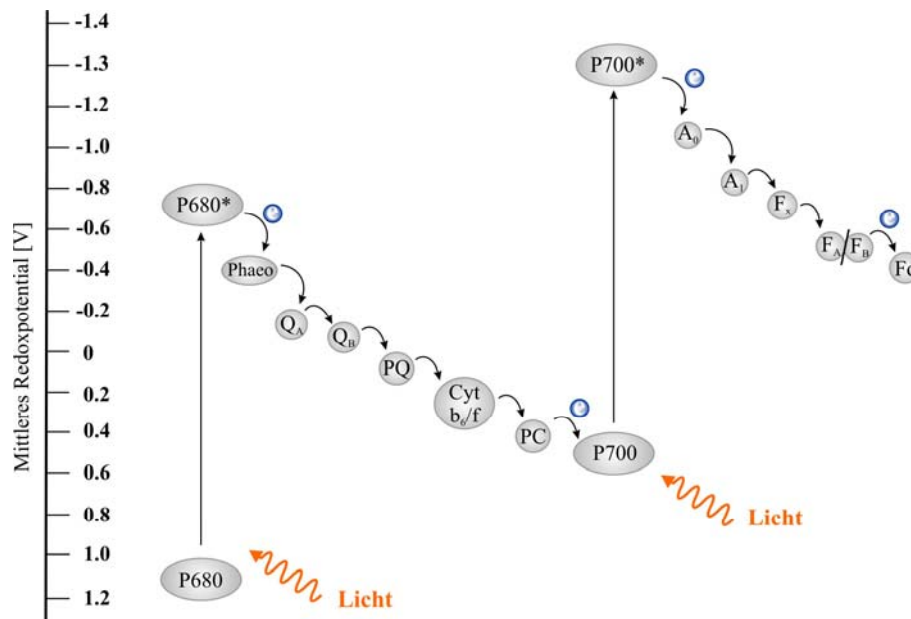


Abb. 2.2 Das HILL- und BENDALL-Schema (nach seiner Form auch Z-Schema genannt) zeigt die Redoxpotentiale der einzelnen Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette. Um ein Elektron aus Wasser ($E_m = 0,81V$) auf das Redoxpotential von Ferredoxin ($E_m = -0,42V$) anzuheben, ist die Energie von zwei Photonen notwendig. Dazu sind zwei Photosysteme hintereinander geschaltet.

Wie bereits erwähnt, gibt es mehrere Organismen aus unterschiedlichen Hauptgruppen, die in der Lage sind eine oxygene Photosynthese zu betreiben. Neben Pflanzen und Algen aus dem Reich der Eukaryoten sind Cyanobakterien als Prokaryoten zur oxygenen Photosynthese fähig. Cyanobakterien sind aufgrund ihrer Robustheit leicht zu kultivieren, und dienen daher oft als Modellorganismen zur Untersuchung physikalischer und chemischer sowie biochemischer Mechanismen der Photosynthese.

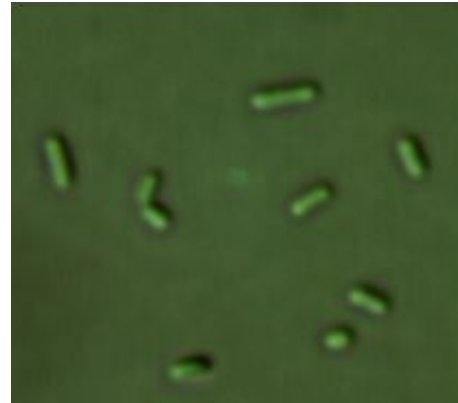
2.2 Cyanobakterien

Cyanobakterien (auch Blaualgen oder Blau-Grünalgen genannt) werden in der Taxonomie den Bakterien zugeordnet. Trotz der Bezeichnung Blaualge sind Cyanobakterien, photoautotrophe oxygene Prokaryoten ohne echten Zellkern und gehören nicht wie die Algen zu den Eukaryoten. Der Name „Blaualge“ geht einerseits auf die Morphologie und die Farbe zurück, die die Cyanobakterien durch den Antennenkomplex Phycobilisom erhalten. Dieser ist charakteristisch für Cyanobakterien und enthält verschiedene Pigmente wie Phycocyanin oder Phycoerythrin. Je nach Zusammensetzung dieses Antennenkomplexes können Cyanobakterien eine Färbung von rot über blau nach grün bis zu schwarz annehmen.

Abb. 2.3 zeigt als Beispiele die Cyanobakterien *Arthrospira platensis* (A) und *Thermosynechococcus elongatus* (B).



(A) *Arthrospira platensis*



(B) *Thermosynechococcus elongatus*

Abb. 2.3 *Arthrospira platensis* (früher: *Spirulina platensis*) ist ein filamentöses Cyanobakterium, *Thermosynechococcus elongatus* (früher: *Synechococcus elongatus*) tritt hingegen in Form von Stäbchen auf.

Cyanobakterien sind sehr widerstandsfähige Organismen und in marinen Lebensräumen weit verbreitet. So gibt es Cyanobakterien, die sowohl bei hohen als auch niedrigen Lichtintensitäten und bei extremen Salzkonzentrationen oder pH-Werten existieren können. Zusätzlich sind sie in der Lage sich auf unterschiedliche Nahrungsangebote einzustellen und können den unterschiedlichsten Stresssituationen standhalten. Während *A. platensis* (

Abb. 2.3A) in alkalischen Seen lebt und dabei hohen Lichtintensitäten ausgesetzt ist, konnte *TS. elongatus* (

Abb. 2.3B) erstmals aus einer heißen Quelle bei Beppu auf der Insel Kyushu, Japan, von SAKAE KATOH isoliert werden. Im Laufe der Zeit wurde der Name dieser thermophilen Cyanobakterien mehrmals geändert. Von anfänglich *Synechococcus sp.* über *Synechococcus elongatus*, ist inzwischen der Name *Thermosynechococcus elongatus* aktuell, der die thermophile Form von der mesophilen unterscheidet. Manchmal sieht man auch die Namensergänzung BP für Beppu See.

Cyanobakterien sind evolutionär die ältesten Organismen, die durch die Photosynthese Sauerstoff freisetzen. Im Gegensatz zu den photosynthetisch aktiven Bakterien, die eine anoxygene Photosynthese betreiben, besitzen die Cyanobakterien zwei Photosysteme – analog den Photosystemen der Pflanzen und Algen. Cyanobakterien werden als die Vorläufer der Chloroplasten, der Photosynthese betreibenden Organellen in Pflanzen und Algen, angesehen.

Ursprünglich autark, entwickelten sich die prokaryotischen Einzeller zu Organellen der eukaryotischen Zelle. Im Verlauf der Evolution bildete sich eine gegenseitige Abhängigkeit aus, so dass weder die prokaryotische Zelle noch die eukaryotische Zelle alleine überleben kann (Endosymbiontentheorie). Ein weiteres Beispiel für die Endosymbiontentheorie stellen neben den Chloroplasten die Mitochondrien dar.

Ein evolutionärer Zusammenhang zwischen den photosynthetisch aktiven Organismen und den verschiedenen Reaktionszentren der Photosysteme ist in **Abb. 2.4** gezeigt.

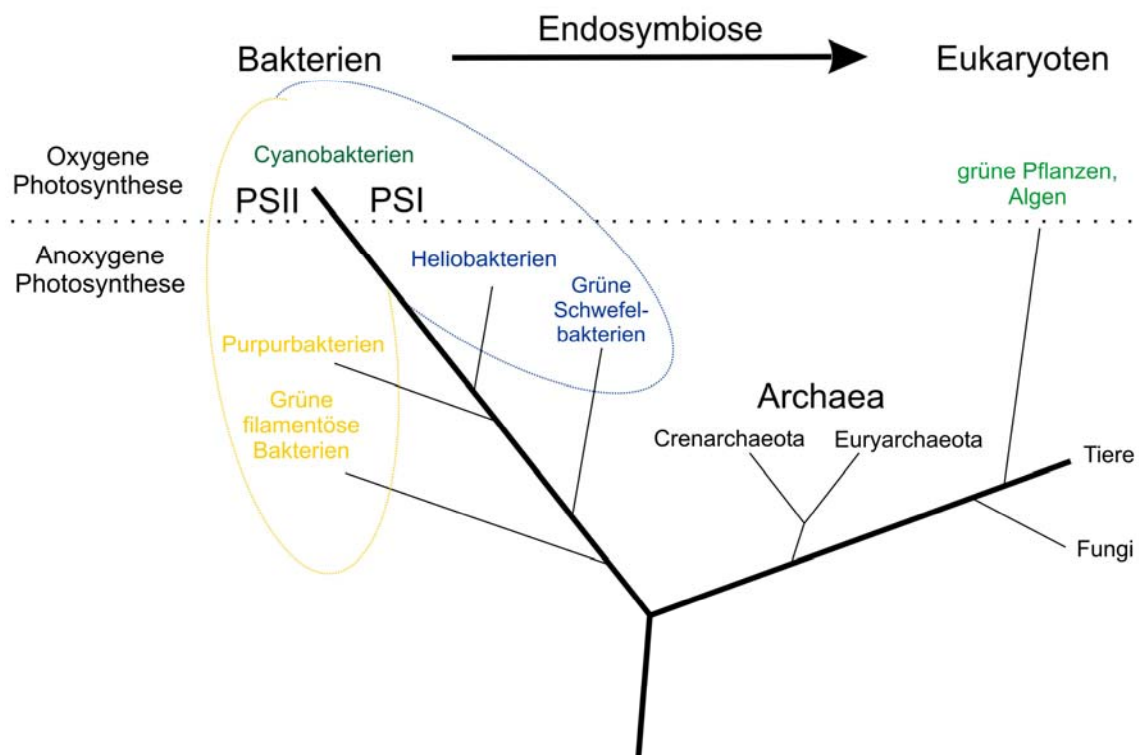


Abb. 2.4 Während Pflanzen, Algen und Cyanobakterien zur oxygenen Photosynthese zwei Photosysteme besitzen (grüne Markierung), verläuft die anoxygene Photosynthese mit einem Photosystem. Dabei kann man zwei Arten von Reaktionszentren unterscheiden. Das Reaktionszentrum vom Typ I, das Eisen-Schwefel-Cluster als terminale Elektronenakzeptoren enthält, tritt sowohl in den Reaktionszentren der Heliobakterien und der grünen Schwefelbakterien auf als auch im Photosystem I (blaue Markierung). Photosystem II wie auch die Reaktionszentren der Purpurbakterien und der grünen, filamentösen Bakterien besitzen ein Reaktionszentrum vom Typ II, dem Phaeophytin-Chinon-Typ (gelbe Farbe). Die Abbildung wurde aus [16] adaptiert und nach [17] modifiziert.

Nach **Abb. 2.4** gibt es phylogenetisch drei große Gruppen. Aus der Gruppe der Bakterien (Prokaryoten) und der Gruppe der Eukaryoten sind Organismen bekannt, die eine Photosynthese betreiben, die Chlorophylle als lichtabsorbierendes Pigment einsetzen. Bis auf die Cyanobakterien führen alle anderen photosynthetisch aktiven Bakterien eine anaerobe

Photosynthese durch und benötigen hierzu nur ein Reaktionszentrum. Die Reaktionszentren können in zwei unterschiedliche Klassen eingeteilt werden. Ein Teil der photosynthetisch aktiven Bakterien besitzt Reaktionszentren vom Typ I, mit Eisen-Schwefel-Cluster als terminale Elektronenakzeptoren; das Reaktionszentrum vom Typ II hingegen, besitzt ein Chinon als terminalen Elektronenakzeptor. In der oxygenen Photosynthese der Cyanobakterien vereinen sich beide Reaktionszentren im Photosystem I (Typ I)- und im Photosystem II (Typ II)-Komplex. Aufgrund dieses Zusammenhangs geht man unter anderem davon aus, dass die Cyanobakterien in der Evolution zwischen den photosynthetisch aktiven Bakterien und den grünen Pflanzen anzusiedeln sind. Zudem findet sich die oxygene Photosynthese der Cyanobakterien in den Chloroplasten der Pflanzen und Algen wieder (Endosymbiose).

3 Photosystem I – Aufbau und Funktionsweise

Wie in Kapitel 2 „*Die Photosynthese der Cyanobakterien*“ beschrieben, ist das Photosystem I eines der zwei Photosysteme der oxygenen Photosynthese. Das nachfolgende Kapitel beschäftigt sich mit dem strukturellen Aufbau von PSI und den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Pigmente, mit dem Fokus auf die Chlorophylle, die das Grundgerüst der Kernantenne von PSI bilden. Aufgrund der Anordnung der Pigmente im Antennensystem ergeben sich verschiedene Energieübertragungsmechanismen, die allgemein gültig sind, und in allen Protein-Pigment-Komplexen auftreten können. Diese werden kurz vorgestellt.

PSI besteht aus einem Proteingerüst, indem verschiedene Cofaktoren eingebettet sind. 2001 wurde die dreidimensionale Struktur von PSI aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* (*TS. elongatus*) mit einer Auflösung von 2,5 Å ermittelt [15] (**Abb. 3.1**).

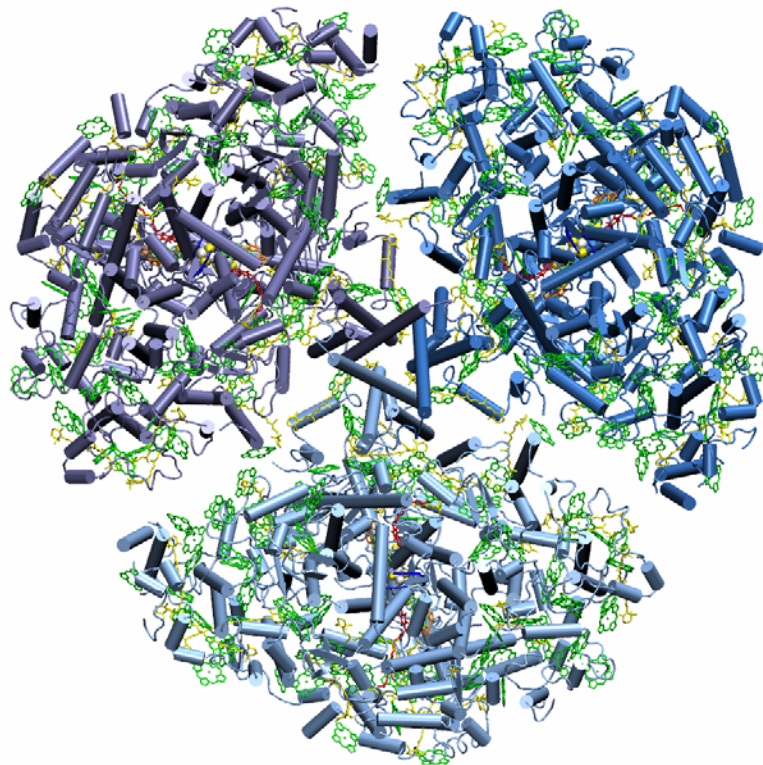


Abb. 3.1 Photosystem I-Trimer aus *Thermosynechococcus elongatus* (Aufsicht von der stromalen Seite auf das Protein). Das Proteingerüst der einzelnen Monomere ist in verschiedenen Blautönen dargestellt. Die Chlorophylle erkennt man an der grünen, die Carotinoide an der gelben Farbe. Bestandteile der Elektronentransferkette sind unterschiedlich angefärbt: blau das spezielle Chlorophyllpaar P700, orange die Chlorophylle der Elektronentransferkette, rot die Phyllochinone und gelb-/grau die Eisen-Schwefel-Cluster.

Die Strukturaufklärung weiterer PSI-Komplexe aus anderen Spezies, ist bis jetzt, mit Ausnahme von PSI aus Pflanzen, das mit einer Auflösung von 4,4 Å ermittelt wurde [18], nicht möglich. Es wird aber davon ausgegangen, dass sich PSI aus verschiedenen Cyanobakterien sowohl strukturell als auch funktionell ähnlich sind. Die folgenden Angaben beziehen sich somit auf PSI aus *TS. elongatus*, solange keine ausdrückliche Kennzeichnung vorhanden ist.

In 12 Protein-Untereinheiten eines PSI-Monomers sind insgesamt 127 Cofaktoren integriert. Zu den Cofaktoren zählen 96 Chlorophylle, 2 Phyllochinone, 3 Eisen-Schwefel-Cluster, 22 Carotinoide, 4 Lipide und vermutlich ein Ca^{2+} -Ion. **Abb. 3.2** zeigt die Struktur eines PSI-Monomers aus *TS. elongatus* von oben (d.h. mit Blick auf die stromale Seite des Monomers) (A) und von der Seite (B).

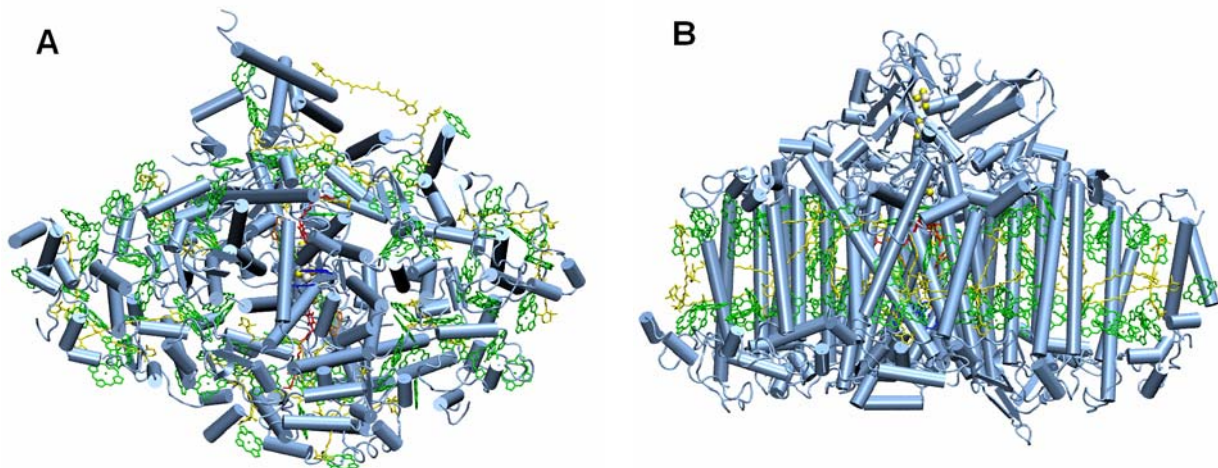


Abb. 3.2 Photosystem I-Monomer (A: Aufsicht von oben; B: Seitenansicht). Farbzuordnung entsprechend **Abb. 3.1**.

Im Gegensatz zum Photosystem I aus Pflanzen, das in der Thylakoidmembran als Monomer vorliegt [19], kann cyanobakterielles PSI als Trimer und als Monomer in der Thylakoidmembran vorliegen [7,8,20,21]. Welcher oligomere Zustand von PSI in Cyanobakterien vorherrscht, ist von den Umgebungsbedingungen wie den Lichtverhältnissen und dem Nährstoffangebot abhängig. Unter schwachen Lichtbedingungen liegt PSI überwiegend als Trimer vor. Die meisten Cyanobakterien leben für gewöhnlich in einem Lebensraum, in dem nur schwache Lichtverhältnisse vorherrschen, so dass in der Regel die trimere Form von PSI überwiegt. Durch die Trimerisierung der PSI-Monomere entsteht eine Kopplung der drei Antennensysteme der Monomere. Eine Kopplung dieser Art ermöglicht die gemeinsame Nutzung der Anregungsenergie, was eine effektivere Lichtabsorption besonders bei niedrigen Lichtintensitäten zur Folge hat. Das Gleichgewicht zwischen PSI-Trimeren und PSI-Monomeren ist außerdem vom Organismus abhängig. Die trimere Form scheint in thermophilen Spezies stabiler zu sein als in mesophilen Cyanobakterien.

PSI-Trimere aus *TS. elongatus* haben ein Molekulargewicht von insgesamt 3×356 kDa (1 068 000 Dalton). Damit zählt PSI zu einem der größten Proteinkomplexe in der Natur. Es besitzt eine Höhe von 90 \AA und ragt mit ca. 40 \AA aus der Thylakoidmembran in das Stroma hinein. Allein der Durchmesser eines Monomers liegt aufgrund der komplexen Zusammensetzung des Proteins bereits bei 210 \AA .

3.1 Die Protein-Untereinheiten

Neun der zwölf Protein-Untereinheiten liegen innerhalb der Thylakoidmembran. Nur drei Untereinheiten (PsaC, PsaD, PsaE) sind extrinsisch und liegen der stromalen Seite der Thylakoidmembran auf. **Tab. 3.1** gibt einen Überblick der Protein-Untereinheiten von PSI aus Cyanobakterien anhand des Cyanobakteriums *TS. elongatus*.

Tab. 3.1 Übersicht der Protein-Untereinheiten von PSI aus *TS. elongatus*. ETC ist die Abkürzung für Elektronentransferkette

Protein-Untereinheit	Molekulargewicht MG* [kDa]	Position bezüglich der Membran	Funktion
PsaA	83	intrinsisch	Bindung von Cofaktoren der ETC sowie der meisten Antennen-Chlorophylle
PsaB	82,4	intrinsisch	Bindung der Cofaktoren der ETC sowie der meisten Antennen-Chlorophylle
PsaC	8,9	extrinsisch (stromal)	Bindung von F _A und F _B ; Bindung von Ferredoxin
PsaD	15,6	extrinsisch (stromal)	Wichtig für den Elektronentransfer von PSI zu Ferredoxin; richtige Orientierung von PsaC
PsaE	8,0	extrinsisch (stromal)	Bindung von Ferredoxin
PsaF	15,7	intrinsisch	Stabilisierung der lumenalen Proteindomäne
PsaI	4,3	intrinsisch	Monomer-Monomer-Interaktion
PsaJ	4,4	intrinsisch	Stabilisierung von PsaL in der Trimerisierungsachse
PsaK	8,5	intrinsisch	Wichtig für die Wechselwirkung mit dem Isi-Antennenring
PsaL	16,6	intrinsisch	Monomer-Monomer-Interaktion
PsaM	3,4	intrinsisch	Monomer-Monomer-Interaktion
PsaX	unbekannt	intrinsisch	unbekannt

(* MG aus PSI des Cyanobakteriums *Synechocystis*)

Die zwei größten Protein-Untereinheiten **PsaA** und **PsaB** bilden das Zentrum eines jeden Monomers. Das Heterodimer PsaA/PsaB bindet sowohl die meisten Cofaktoren der Elektronentransferkette (ETC) als auch einen Großteil der Antennen-Chlorophylle, der Carotinoide und die Lipide. Die sieben kleineren intrinsischen Protein-Untereinheiten umgeben das Heterodimer und binden die restlichen Cofaktoren der Antenne.

PsaL, **PsaI** und **PsaM** sind an den Grenzflächen zwischen den PSI-Monomeren lokalisiert und bilden die Verbindungsdomäne. Die Ausbildung der trimeren Struktur erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen der Monomere, durch Wasserstoffbrücken und elektrostatische

Interaktionen. Stabilisiert werden könnte das PSI-Trimer zusätzlich über je ein Ca^{2+} -Ion, das von zwei benachbarten PsaL-Proteinuntereinheiten gebunden wird. Im Gegensatz zu PsaI bindet die Untereinheit PsaL drei Chlorophylle, die Untereinheit PsaM ein Chlorophyll. Diese Chlorophylle könnten eine wichtige Rolle im Anregungsenergietransfer zwischen den Monomeren spielen [22]. Alle drei Untereinheiten weisen Bindungen zu Carotinoiden auf.

Die Untereinheiten **PsaF**, **PsaJ**, **PsaK** und **PsaX** sind distal an der Oberfläche des Komplexes lokalisiert und stehen somit im direkten Kontakt mit der Thylakoidmembran. Die Hauptaufgabe dieser vier Untereinheiten ist zum einen die Stabilisierung des Kernantennen-Systems und zum anderen die Wechselwirkung mit verschiedenen peripheren Antennensystemen wie dem Lichtsammelkomplex I in Pflanzen, dem Superkomplex IsiA, der unter Eisenmangel in Cyanobakterien entsteht, und den für die Cyanobakterien typischen Lichtsammelkomplexen, den Phycobilisomen.

In Cyanobakterien ist **PsaF** nicht wie in Pflanzen direkt an der Bindung des mobilen Elektronenüberträgers Plastocyanin bzw. Cytochrom c_{553} beteiligt. Mehrere mögliche Funktionen werden für diese Untereinheit in Cyanobakterien vermutet. Neben der Stabilisierung der lumenalen Oberfläche von PSI, könnte PsaF die Pigmente von der Lipidphase abschirmen und die Anregungsenergie von externen Antennen wie dem IsiA-Komplex und den Phycobilisomen zum Reaktionszentrum weiterleiten. In der Nachbarschaft von PsaF befindet sich **PsaJ**, das drei Chlorophylle bindet, über hydrophobe Wechselwirkung mit Carotinoiden in Kontakt steht und PsaF stabilisiert.

PsaX konnte bis jetzt nur in Cyanobakterien nachgewiesen werden. Es koordiniert ein Chlorophyll und bildet hydrophobe Wechselwirkungen mit mehreren Carotinoiden und mit einem der Phospholipide aus. Ob PsaX in allen Cyanobakterien oder nur in thermophilen Arten vorkommt, ist bis jetzt noch nicht geklärt.

PsaK ist an der Peripherie des PSI lokalisiert, koordiniert zwei Chlorophylle und steht in Kontakt mit Carotinoiden. Bei Anwesenheit der IsiA-Antenne spielt es eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen PSI und dieser Antenne. In Pflanzen wechselwirkt PsaK mit dem Lichtsammelkomplex LHCI.

Auf der stromalen Seite des Pigment-Protein-Komplexes ragen 3 Untereinheiten aus der Membran heraus: PsaC, PsaD und PsaE. **PsaC** koordiniert die terminalen Eisen-Schwefel-Cluster F_A und F_B der Elektronentransferkette und bildet zusammen mit **PsaD** und **PsaE** die Bindungstasche für die löslichen Elektronencarrier Ferredoxin bzw. Flavodoxin.

Im Heterodimer PsaA/PsaB sind wie bereits erwähnt neben den Cofaktoren noch 4 Lipide eingelagert: 3 Phosphatidylglycerol-Moleküle (PG) und ein Monogalactoyldiglycerid (MGDG), die über Wasserstoffbrücken mit dem Protein verbunden sind. Man geht davon aus, dass die Lipide für eine korrekte Zusammenlagerung der Protein-Untereinheiten essentiell sind und aufgrund der Interaktion mit den Chlorophyllen auch die Funktionalität des PSI unterstützen. Während ein PG und ein MGDG nahe der Elektronentransferkette lokalisiert sind und somit wahrscheinlich Einfluss auf die Aktivität der Elektronentransferkette nehmen, werden die anderen zwei PG-Moleküle von PsaX oder von PsaL gebunden und beeinflussen somit auch die Trimerisierung von PSI.

3.2 Die Elektronentransferkette

Sechs Chlorophylle, zwei Phyllochinone und drei Eisen-Schwefel-Cluster bilden die so genannte Elektronentransferkette (ETC). Die Elektronentransferkette ist im Zentrum eines jeden Monomers lokalisiert [7,23]. Sie ist in Pflanzen, Algen und Cyanobakterien gleich organisiert, was für die Wichtigkeit der ETC spricht. Je konservierter eine Struktur während der Evolution ist, umso essentieller ist diese.

Die Chlorophylle und Phyllochinone sind in zwei Ästen angeordnet. Ob beide Äste der Elektronentransferkette aktiv sind bzw. welcher Ast den Elektronentransfer vermittelt, ist zurzeit noch nicht geklärt. **Abb. 3.3** zeigt die einzelnen Bestandteile der Elektronentransferkette in PSI. Der erste Elektronendonator P700 liegt auf der lumenalen Seite der Membran und besteht aus zwei Chlorophyllen, deren Tetrapyrrolringe in einem Abstand von 3,6 Å (Abstand der Mg^{2+} -Ionen: 6,3 Å) parallel zueinander orientiert sind und senkrecht zur Membranebene stehen. P700 ist ein Heterodimer, das aus einem Chlorophyll *a* und einem Chlorophyll *a'*, dem C13²-Epimer des Chlorophyll *a*, besteht. Die Chlorophylle des P700 sind über die zentralen Mg^{2+} -Ionen mit Histidin-Resten von PsaA und PsaB koordiniert. Die zwei Chlorophylle bilden aufgrund der starken Kopplung zueinander ein so genanntes „Supermolekül“ [24] und verhalten sich spektroskopisch wie ein einzelnes Molekül. Durch die exzitonische Kopplung ist P700 im Vergleich zu monomeren Chlorophyllen und zu den Antennen-Chlorophyllen in den roten Spektralbereich verschoben. Nach Abgabe eines Elektrons ist die positive Ladung des P700⁺ auf einem Chlorophyll des Chlorophylldimers lokalisiert.

Dabei handelt es sich wahrscheinlich um das Chlorophyll *a*-Molekül, das über PsaB koordiniert wird. Dem Elektronendonator P700 folgen zwei weitere Chlorophyllpaare, der initiale Elektronenakzeptor A und der erste Elektronenakzeptor A₀, wobei der initiale Elektronenakzeptor nicht immer zur ETC gezählt wird. Der Cofaktor A hat einen Mittenabstand (center-to-center Abstand) zum P700 von 12 Å. In beiden Ästen wird der initiale Elektronenakzeptor über das Mg²⁺-Ion von Wassermolekülen als fünfter Ligand gebunden. Die Wassermoleküle wiederum werden von den Protein-Untereinheiten koordiniert. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den ersten stabilen Elektronenakzeptoren A₀/A₀' ebenfalls um zwei Chlorophyll *a*-Moleküle, die in einem Rand-zu-Rand-Abstand von kleiner als 3,8 Å zu den Chlorophyllen des Elektronenakzeptors

A liegen und somit ungefähr in der Mitte der Membran lokalisiert sind. Die Cofaktoren A₀/A₀' werden über die Schwefelatome der Aminosäure Methionin mit dem Protein koordiniert. Diese Wechselwirkung ist sehr schwach, da eine harte Säure wie Mg²⁺ mit einer schwachen Base, nämlich dem Schwefel des Methionins, interagiert. Eine solche Interaktion könnte einen Einfluss auf das Redoxpotential von A₀ haben, welches mit -1,1 V sehr tief liegt [15]. Dieser Effekt wird wahrscheinlich noch zusätzlich durch die π-π-Stapelung zwischen dem π-System der Chlorophylle mit dem π-System der Aminosäure Tyrosin aus dem Protein verstärkt. Auf den ersten Elektronenakzeptor A₀ folgen zwei Phyllochinone (Vitamin K) Q_KA und Q_KB, die den zweiten Elektronenakzeptor A₁/A₁' darstellen. Die Phyllochinone befinden sich bereits nahe der stromalen Membranoberfläche. Die Koordination zum Protein erfolgt über Wasserstoffbrücken und zusätzlich durch eine π-π-Stapelung mit jeweils einem Tryptophan-Rest. Die asymmetrische Koordination der Phyllochinone über H-Brücken zum Protein (ein Sauerstoff des Phyllochinons ist über eine H-Brücke mit dem Protein koordiniert, ein

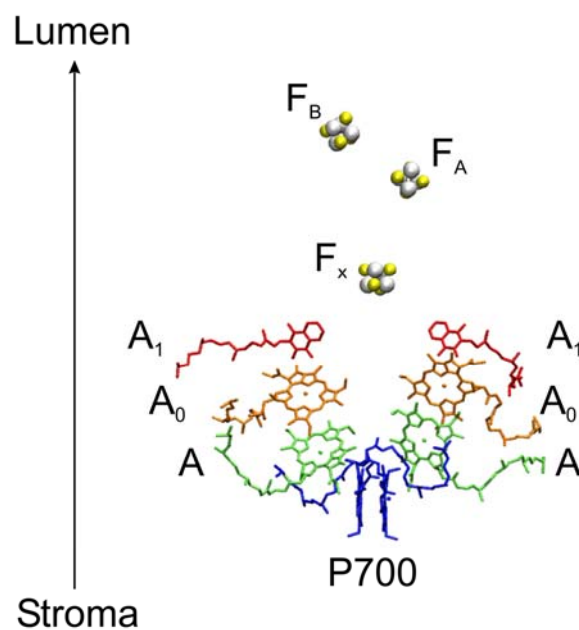


Abb. 3.3 Elektronentransferkette in PS I aus *TS. elongatus*. Gezeigt sind die einzelnen Bestandteile der ETC in verschiedenen Farben: P700 blau, der so genannte initiale Elektronenakzeptor A in grün, der Elektronenakzeptor A₀ in orange, der Elektronenakzeptor A₁ in rot und die Eisen-Schwefel-Cluster F_x, F_A, F_B in gelb/grau. Welcher der beiden Zweige der Elektronentransferkette aktiv ist oder ob beide gleichermaßen aktiv sind, ist noch nicht bekannt.

anderes Sauerstoff-Atom des Phyllochinons erfährt keine Bindung über eine H-Brücke), könnte eine Ursache für das sehr negative Redoxpotential von A_1 (-0,77 V) sein.

Der auf A_1 nachfolgende Cofaktor in der Elektronentransferkette ist F_x . F_x ist ein 4Fe4S-Cluster, der Elektronen vom Phyllochinon zu den terminalen Eisen-Schwefel-Clustern F_A und F_B weiterleitet. Der Elektronentransfer von A_1 zu F_x ist sehr viel langsamer als der nachfolgende Elektronentransferschritt zu F_A ; er ist der begrenzende Schritt im Elektronentransfer von PSI. Der Eisen-Schwefel-Cluster F_x liegt zwischen PsaA und PsaB und wird von beiden Protein-Untereinheiten über die Schwefelatome von Cystein-Resten koordiniert. F_x ist ein seltenes Beispiel eines FeS-Clusters, der von zwei Protein-Untereinheiten gebunden wird. Neben einer Beteiligung des F_x am Elektronentransfer, spielt F_x eine wichtige Rolle in der Stabilisierung und Zusammenlagerung des PSI-Komplexes.

Die terminalen 4Fe4S-Cluster F_A und F_B werden von der extrinsischen Protein-Untereinheit PsaC gebunden. F_A liegt mit einem center-to-center-Abstand von 12 Å von F_x entfernt und stellt somit den proximalen Eisen-Schwefel-Cluster dar. Mit einem Abstand von 22 Å zu F_x ist F_B auf der distalen Seite von PSI lokalisiert. Der Elektronentransfer erfolgt in der Reihenfolge $F_x \rightarrow F_A \rightarrow F_B$ [25-27]. F_B ist zwar der terminale Eisen-Schwefel-Cluster, F_A hat aber ein viel negativeres Redoxpotential als F_B , weshalb 80% der Elektronen auf F_A lokalisiert sind. Der Elektronentransfer von F_A zu F_B geht deshalb energetisch bergauf. Grund für eine solche Situation könnte ein Schutzmechanismus sein, der das System vor einem Verlust der Energie durch einen Elektronentransfer auf andere Moleküle wie Sauerstoff schützt. Erst durch die Bindung von Ferredoxin an PSI ist ein Absinken des Redoxpotentials von F_B möglich [28], was anschließend einen Elektronentransfer von F_A zu F_B auf Ferredoxin zur Folge haben würde.

3.3 Die Kernantenne

Photosystem I aus *TS. elongatus* besitzt eine Kernantenne (auch innere Antenne genannt) aus insgesamt 90 Chlorophyllen und 22 Carotinoiden pro Monomer. Die Antenne fängt Sonnenlicht ein und überträgt die Anregungsenergie in das Zentrum eines jeden Monomers, zum Reaktionszentrum. Bei Raumtemperatur hat die Energietransferkette im Protein-Pigment-Komplex eine hohe Effizienz; nach Anregung eines Chlorophylls ist die Wahrscheinlichkeit für eine Ladungstrennung im Reaktionszentrum 99%.

Um die Eigenschaften der Kernantenne untersuchen und die Funktionsweise des Antennensystems verstehen zu können, ist es unumgänglich sich mit den Eigenschaften der Pigmente zu beschäftigen. Besondere Aufmerksamkeit soll dabei auf die Chlorophylle gelegt werden.

3.3.1 Die Chlorophylle

Chlorophylle sind natürliche Farbstoffe, die aufgrund ihrer molekularen Struktur Licht im sichtbaren Bereich absorbieren können. Das nachfolgende Kapitel beschreibt die chemische Struktur, auf die das Absorptionsverhalten (das spektrale Verhalten) zurückzuführen ist.

3.3.1.1 Chemische Beschreibung der Chlorophylle

Chlorophylle sind zyklische Tetrapyrrole mit einem isozyklischen Fünfring. Die Stickstoffatome des Porphyrinrings koordinieren in der Regel ein Magnesiumion im Zentrum des Chlorophylls. Das am häufigsten vorkommende Chlorophyll ist das Chlorophyll *a*. Es ist in allen Antennen oxygen photosynthetisch-aktiver Organismen zu finden. Chemisch gesehen ist Chlorophyll *a* ein 17,18-Dihydroporphyrin (Chlorin), mit einem Cyclopentanonring am Pyrrolring III, an dem sich am Kohlenstoff C13² eine Carboxylestergruppe befindet. Die Propionylgruppe des Pyrrolrings IV von Chlorophyll *a* ist mit einem langkettigen Phytolrest verestert, der für den Einbau des Chlorophylls in das Protein verantwortlich ist (**Abb. 3.4**). Chlorophylle leiten sich strukturell vom Protoporphyrin IX ab, welches auch das Vorläufermolekül für den Cofaktor Häm des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin ist.

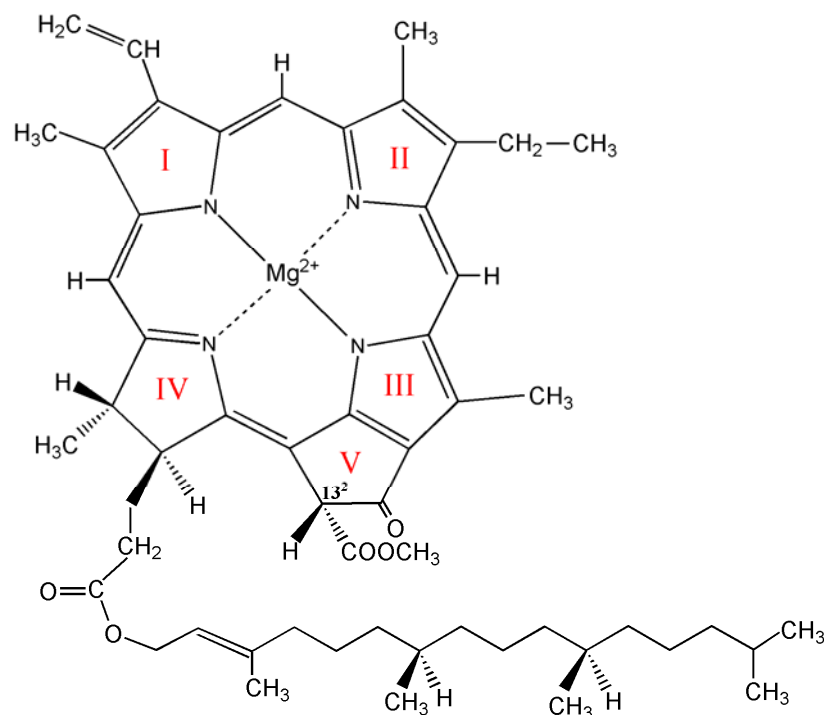


Abb. 3.4 Chemische Strukturformel von Chlorophyll *a*.

Die Antenne des Photosystem I-Komplexes aus Cyanobakterien besitzt als einzigen Vertreter der Chlorophylle das Chlorophyll *a*, weshalb sich nachfolgende Betrachtungen vor allem auf dieses Chlorophyll beziehen. Eine Ausnahme stellt im Reaktionszentrum des Photosystem I-Komplexes das C¹³S-Epimer [29] von Chlorophyll *a* dar, welches allgemein als Chlorophyll *a'* bezeichnet wird. Ein Chlorophyll *a* und ein Chlorophyll *a'* bilden zusammen den ersten Elektronendonator P700 des Photosystem I-Komplexes.

3.3.1.2 Spektroskopische Eigenschaften der Chlorophylle

Chlorophylle sind Porphyrinderivate, deren optische Spektren anhand des von GOUTERMAN aufgestellten Modells, dem Vier-Orbital-Modell, theoretisch erklärt werden können [30,31]. Nach GOUTERMAN entstehen die Absorptionsbanden eines Porphyrinrings durch die Linearkombinationen von Ein-Elektronen-Anhebungen zwischen den beiden höchsten besetzten π -Orbitalen (HOMO für *highest occupied molecular orbital*) und den beiden niedrigsten unbesetzten π^* -Orbitalen (LUMO für *lowest unoccupied molecular orbital*). Die Banden im sichtbaren und im nahen IR-Bereich, die so genannten Q-Banden, sind das Ergebnis von subtraktiven Kombinationen zweier Übergänge, während die B-Banden (SORET-Banden) im nahen UV-Bereich durch additive Kombinationen zweier Elektronen-Anhebungen entstehen.

Eine Beteiligung der Elektronen aus besetzten nicht bindenden Orbitalen (n-Orbitalen) der Heteroatome Sauerstoff und Stickstoff wird diskutiert, konnte bis jetzt aber nicht nachgewiesen werden. Die energetische Lage der Absorptionsbanden der Porphyrine ergibt sich für den einfachsten Fall aus dem Übergang des elektronischen Singulett-Grundzustands S_0 in den ersten angeregten Singulettzustand S_1 für die Q-Banden und aus dem Übergang des elektronischen Singulett-Grundzustands S_0 in den zweiten angeregten Singulettzustand S_2 für die Soret-Banden.

Bei einem einfachen Vertreter der Porphyrine, einem Metall-Porphyrin-Komplex, sind die π^* -Orbitale aufgrund der hohen Symmetrie (D_{4h}) entartet. Im Absorptionsspektrum sind zwei Banden zu sehen. Die Entartung der Orbitale ist vom Symmetriegrad des Moleküls abhängig. Durch Aufhebung der Symmetrie erfolgt eine Aufhebung der Entartung, wodurch die Anzahl an Absorptionsbanden steigt. Der Symmetriebruch hat auch eine Erhöhung der Übergangswahrscheinlichkeit der Elektronen zwischen verschiedenen HOMOs und LUMOs des Moleküls zur Folge, wodurch die Intensität der Q-Banden im Vergleich zu den Soret-Banden ansteigt. In Chlorophyll *a* ist die vierzählige D_{4h} -Symmetrie des Porphyrinsystems durch die Reduktion des Pyrrolrings IV zwischen C-17 und C-18 und durch den Cyclopentanonring am Pyrrolring III verringert. Die paarweise Entartung der π^* -Orbitale in Chlorophyll *a* ist aufgehoben.

Die dazugehörigen optischen Achsen bzw. die zwei Übergangsdipolmomente x und y sind aufgrund der Reduktion der Symmetrie nicht mehr äquivalent, was eine Aufspaltung der Q-Banden und der Soret-Banden in Q_y und Q_x bzw. in B_y und B_x nach sich zieht. Die niederenergetische Q_y -Bande wird zu längeren Wellenlängen zwischen 650 - 700 nm verschoben und steigt in der Oszillatorstärke an. Die optische Achse x von Chlorophyll *a* verläuft entlang der Stickstoffatome der Pyrrolringe II und IV, die optische Achse y verläuft entlang der Stickstoffatome von Pyrrolring I und III (Abb. 3.5).

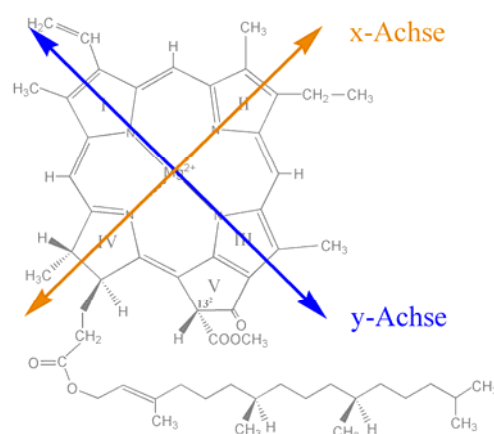


Abb. 3.5 Ausrichtung der optischen Achsen bzw. der Übergangsdipolmomente in Chlorophyll *a*.

3.3.1.3 Photophysikalische Eigenschaften der Chlorophylle

Die photophysikalischen Eigenschaften der Chlorophylle zeigen eine starke Abhängigkeit vom Aggregationsgrad der Chlorophylle. Einzelne Chlorophylle, die in einem Lösungsmittel gelöst wurden, verhalten sich anders als die entsprechenden Chlorophyllaggregate. Der erste angeregte Singulettzustand S_1 von monomeren Chlorophyllen hat eine mittlere Lebensdauer von $\tau \sim 1,5$ ns. Die Abregung dieses Zustandes erfolgt zu einem Drittel durch Fluoreszenz-emission (Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi_F \sim 0,3$) und zu zwei Dritteln durch Intersystem Crossing mit einer Intersystem Crossing-Rate von $13 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. Keine Bedeutung haben für gelöstes Chlorophyll strahlungslose Übergänge in den Grundzustand. Hingegen überwiegt bei Chlorophyllaggregaten der strahlungslose Übergang, während die Fluoreszenzquantenausbeute und die Triplettausbeute sehr gering sind. Diese Information ist wichtig für die Betrachtung der Chlorophylle in Protein-Pigment-Komplexen, da hier teilweise Chlorophyllcluster in der Antenne zu finden sind.

Erwähnt werden sollte, dass Parameter wie Lebensdauern, Quantenausbeute oder Übergangsraten stark von den Umgebungsbedingungen abhängig sind, weshalb in der Literatur eine Vielzahl von Werten angegeben wird.

3.3.1.4 Chlorophylle in Antennensystemen von Protein-Pigment-Komplexen

Über die Chlorophylle des Antennenpigmentsystems wird die Anregungsenergie zum Reaktionszentrum des PSI weitergeleitet. Eine effiziente Energieübertragung in einem Protein-Pigment-Komplex erfordert eine definierte Orientierung der Pigmente zueinander und einen genügend kleinen Abstand zwischen den an der Energieübertragung beteiligten Pigmenten (siehe Unterkapitel 3.3.3 „*Funktionsweise der Kernantenne*“). Der FÖRSTER-Radius für zwei Chlorophyll *a*-Moleküle liegt im Bereich zwischen 65 Å [32] und 90 Å [33], wodurch ein effektiver Energietransfer gesichert ist. Die Anzahl an Chlorophyllen pro gegebene Volumeneinheit ist somit sehr groß. Dadurch besteht aber auch die Gefahr der Bildung von Chlorophyllclustern in der Antenne. Wie bereits in Unterkapitel 3.3.1.3 „*Photophysikalische Eigenschaften*“ angesprochen, weisen Chlorophyllcluster andere Eigenschaften als monomere Chlorophyll-Moleküle auf. Dies äußert sich unter anderem in ihrem spektralen Verhalten und beeinflusst den Energietransfer innerhalb der Antenne. Durch eine unkontrollierte Aggregation von Chlorophyll-Molekülen würden dissipative Energiefallen entstehen, die die Effizienz des Photosystems senken. Eine Koordination der Antennen-Chlorophylle über das Magnesiumion mit einem Liganden wie beispielsweise Wasser oder durch die Assoziation

des Chlorophylls über die Carbonylgruppe mit spezifischen Proteingruppen kann eine Aggregation mehrerer Chlorophylle reduzieren. Die Bildung von Chlorophyllclustern in der Antenne kann aber aufgrund der dichten Packung der Chlorophyll-Moleküle nicht vollständig unterbunden werden, was an den roten Chlorophyllpools ersichtlich wird (siehe Unterkapitel 3.4 „Die Roten Chlorophylle“). Die Chlorophylle dieser Chlorophyllcluster weisen einen sehr geringen Abstand zueinander auf, liegen also in der Regel so dicht zusammen, dass sie exzitonisch gekoppelt sind.

3.3.2 Aufbau der Kernantenne

Cyanobakterielles Photosystem I besitzt keinen eigenen Lichtsammelkomplex. Die meisten Chlorophylle sind an dem Heterodimer PsaA/PsaB gebunden und bilden mit diesem einen Kernantennen-Reaktionszentrum-Komplex [34]. Die Antennen-Chlorophylle sind zylindrisch um das Reaktionszentrum angelegt und der Abstand der Antennen-Chlorophylle zu den Chlorophyllen der Elektronentransferkette beträgt wenigstens $\sim 18 \text{ \AA}$ (Abb. 3.6).

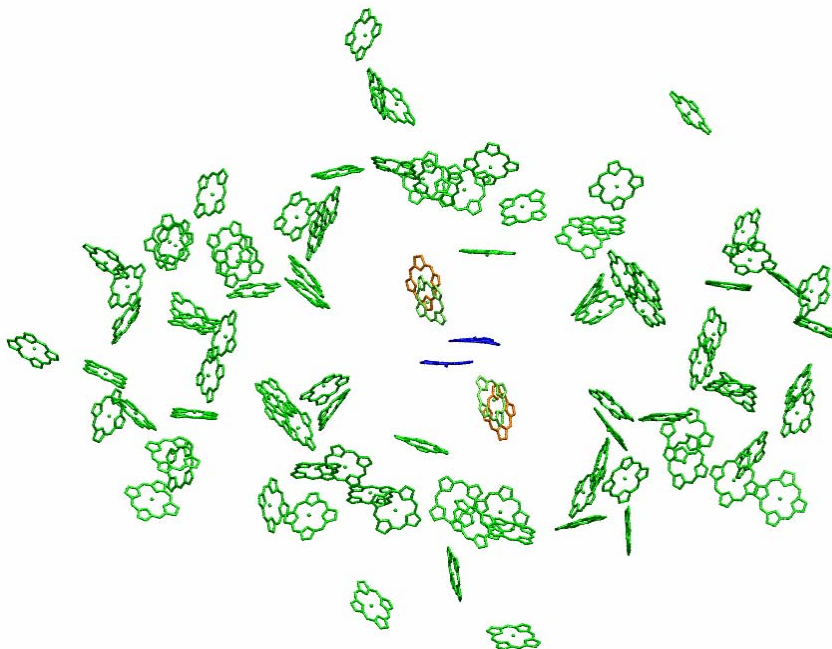


Abb. 3.6 Ansicht der Antennen-Chlorophylle eines PSI-Monomers von oben (Aufsicht von der stromalen Seite auf das Protein).

Die Antenne kann in eine zentrale Domäne und zwei periphere Domänen eingeteilt werden.

Die zwei peripheren Domänen bilden um die Elektronentransferkette zwei Schichten: eine zur stromalen Seite der Membran hin, die andere zur lumenalen Seite. Die absorbierte Anregungsenergie wird innerhalb der zwei peripheren Domänen zu der zentralen Domäne geleitet, von wo ein Energietransfer zur Elektronentransferkette stattfindet. Die zentrale Domäne der Antenne ist in der Mitte der Membran lokalisiert und verbindet so die lumenale und stromale Schicht der peripheren Domänen (**Abb. 3.7**). Trotz dieser strukturellen Einteilung liegen fast alle Chlorophyll *a*-Moleküle in einem Abstand (Mg^{2+} zu Mg^{2+}) von 7 - 15 Å zueinander [35]. Durch den kleinen Abstand wird eine schnelle Übertragung der Anregungsenergie zwischen den Chlorophyllen nach FÖRSTER möglich [36].

Die ansonsten räumlich und funktionell von der Elektronentransferkette getrennte Antenne scheint über zwei Chlorophylle (den so genannten Verbindungschlorophyllen) mit dieser in Verbindung zu stehen. Ob diese Chlorophylle aber wirklich die Energie von der Antenne zum P700 übertragen, ist bis jetzt noch nicht geklärt. Der durchschnittliche Abstand der Antennen-Chlorophylle zu P700 liegt zwischen 14 - 19 Å, einige Chlorophylle sind sogar bis zu 30 - 40 Å vom Reaktionszentrum entfernt.

Die meisten Chlorophylle werden von dem Heterodimer PsaA/PsaB über verschiedene Aminosäurereste oder indirekt über Wasser gebunden. Insgesamt 11 Chlorophylle der Antenne sind auf 5 kleinere Protein-Untereinheiten und ein Lipid verteilt (**Tab. 3.2**). Eine Koordination der Chlorophylle an das Protein kommt im Allgemeinen über das Magnesiumion des Chlorophylls mit Histidin-Resten und Sauerstoffatomen verschiedener Aminosäuren des Proteins oder über ein Wassermolekül zustande.

Tab. 3.2 Übersicht der Verteilung der Antennen-Chlorophylle auf die einzelnen Protein-Untereinheiten.

Protein-Untereinheit /Lipid	Anzahl an gebundenen Antennen-Chlorophyllen
PsaA	40
PsaB	39
PsaJ	3
PsaK	2
PsaL	3
PsaM	1
PsaX	1
Phosphatidylglycerol	1

Neben den 90 Chlorophyll *a*-Molekülen gibt es in der Antenne von *TS. elongatus* 22 Carotinoide; für *TS. elongatus* ausschließlich β -Carotin. Die Carotin-Moleküle befinden sich tief in der Membran eingebettet und werden vor allem über PsaA und PsaB koordiniert. Die Hauptaufgaben der Carotinoide sind neben Absorption von Licht im Wellenlängenbereich von 450 - 570 nm, der Schutz des Photosystems vor Bildung angeregter Chlorophyll *a*-Triplettzuständen und der Schutz vor Bildung von Singulett-Sauerstoff durch Quenchen eventuell entstandener Chlorophyll-Triplettzustände. Chlorophylle im Triplettzustand können mit Sauerstoff reagieren und so den toxischen Singulett-Sauerstoff bilden. Aufgrund dieser Tatsache ist es erstaunlich, dass keine Carotinoide in direkter Nachbarschaft zu P700 lokalisiert sind, um die Bildung eines Triplettzustandes von P700 zu verhindern [37]. Carotinoide sind außerdem wichtig bei der Aufrechterhaltung der PSI-Struktur.

Die 22 Carotinoide liegen in VAN DER WAALS-Kontakt ($< 3,6 \text{ \AA}$) zu 60 Chlorophyllen, so dass ein effizienter Energietransfer von angeregten Carotinoiden zu Chlorophyll *a*-Molekülen und ein Quenchen von Chlorophyll *a*-Triplettzuständen möglich ist. Einige Carotinoide sind bezüglich der Chlorophylle so orientiert, dass sie zueinander π - π -gestapelt vorliegen, was für die Feinabstimmung der Absorptionseigenschaften der Antenne förderlich ist. Von den 22 Carotinoiden besitzen 17 Carotinoide die energetisch günstige all-trans-Konfiguration, die restlichen fünf Carotinoide weisen eine oder zwei Doppelbindungen in der cis-Stellung auf. Mögliche Ursachen für eine derartige Verteilung der Stereoisomere könnte ein sterischer oder aber auch ein funktioneller Grund sein. Da cis-Isomere höhere Energieniveaus als die entsprechenden trans-Isomere besitzen, könnte sich dadurch eine höhere Quencheffizienz der Chlorophyll-Triplettzustände ergeben. In **Abb. 3.7** sind alle Pigmente einschließlich der Elektronentransferkette gezeigt.

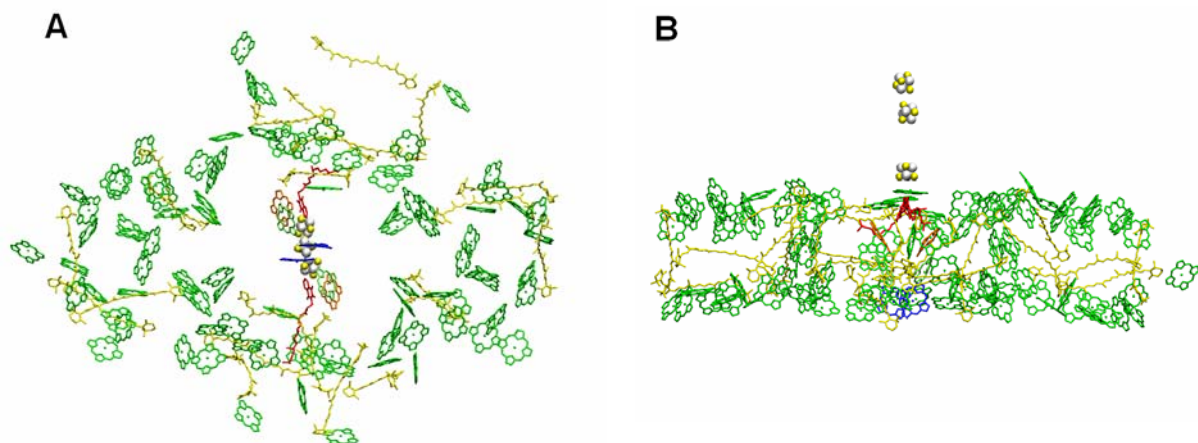


Abb. 3.7 Anordnung aller Pigmente einschließlich der Elektronentransferkette in Photosystem I, A: Ansicht aus dem Lumen senkrecht zur Membranebene, B: Seitenansicht auf das PSI.

3.3.3 Funktionsweise der Kernantenne – Energietransfermechanismen

Unter einem Energietransfer versteht man die strahlungslose Übertragung elektronischer Anregungsenergie von einem angeregten Donor auf einen nicht angeregten Akzeptor. Der Energietransfer in einem photosynthetischen System umfasst eine Vielzahl von sehr schnellen Übertragungsschritten entlang eines Energiegradienten bis letztendlich eine Gruppe von Pigmenten erreicht wird, die entweder isoenergetisch mit dem Reaktionszentrum ist oder energetisch sogar unterhalb des ersten Elektronendonors liegt. Für eine schnelle Energieübertragung sind neben der energetischen Lage der Pigmente, der Abstand zwischen den Pigmenten sowie die Orientierung der Pigmente zueinander von Bedeutung. Eine optimale räumliche Ausrichtung der einzelnen Pigmente zueinander sowie eine energetische Abstimmung der Pigmente ermöglichen einen schnellen Energietransfer über große Entfernungen und verhindern unerwünschte Relaxationsprozesse durch strahlungslose Prozesse.

In Protein-Pigment-Komplexen treten drei verschiedene Energieübertragungsmechanismen auf, die das Resultat unterschiedlicher Kopplungsstärken zwischen den beteiligten Pigmenten sind. Danach können drei verschiedene Energietransfermechanismen unterschieden werden: der FÖRSTER-Mechanismus, der DEXTER-Mechanismus und der Exzitonen-Mechanismus.

3.3.3.1 FÖRSTER-Mechanismus

Der FÖRSTER-Energietransfer (FÖRSTER-Resonanztransfer) beschreibt einen inkohärenten Prozess bei schwacher Kopplung der beteiligten Moleküle. Diese Kopplung ist das Ergebnis einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den Übergangsdipolmomenten des Donors und des Akzeptors. Beim FÖRSTER-Transfer wird ein Elektron aus dem Grundzustand (S_0) in einen angeregten Zustand (S_1) überführt. Bei Abregung des angeregten Zustands des Donors, wird über einen strahlungslosen Prozess ein Elektron des Akzeptors in einen angeregten Zustand angehoben. Dabei werden keine Elektronen zwischen den Molekülen ausgetauscht. Das Ergebnis ist ein angeregter Akzeptor und ein Donor im Grundzustand (Abb. 3.8). Der angeregte Elektronenzustand wandert nach dem Gesetz des Zufalls von Molekül zu Molekül durch die Antenne (*random walk*-Energietransfer).

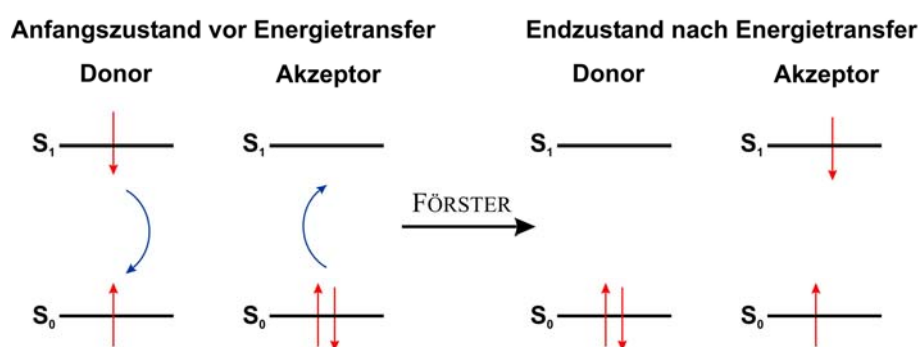


Abb. 3.8 Schematische Darstellung des FÖRSTER-Energietransfermechanismus. Der Energietransfer erfolgt über einen strahlungslosen Prozess, bei dem die Abregung des Donors mit der Anregung des Akzeptors gekoppelt ist. Die roten Pfeile stellen die Elektronen anhand ihrer Spinausrichtung dar, die gebogenen Pfeile kennzeichnen einen Übergang. S_0 und S_1 bezeichnen den Singulett-Grundzustand bzw. ersten angeregten Singulettzustand. Adaptiert aus [38] und modifiziert.

Voraussetzung für einen Energietransfer ist die energetische Resonanz zwischen Donor und Akzeptor. Sie lässt sich durch das Überlappungsintegral aus dem Fluoreszenzspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrums des Akzeptors beschreiben. Außerdem wird die Transferwahrscheinlichkeit bzw. die Geschwindigkeitskonstante der Energieübertragung zwischen Donor und Akzeptor von dem Abstand und der Orientierung bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers kann nach FÖRSTER [36] mit

$$k_{ET} \propto \frac{\kappa^2}{R^6 \cdot n^4} \cdot \frac{\Phi_F}{\tau_F} \cdot \int_0^\infty \frac{\varepsilon_A(\nu) \cdot I_F(\nu)}{\nu^3} d\nu = k_{rad} \frac{R_0^6}{R^6} \quad (3.1)$$

beschrieben werden. Dabei ist

- κ : Orientierungsfaktor der Dipole,
- R : Abstand Donor – Akzeptor,
- N : Brechungsindex des Mediums zwischen Donor und Akzeptor,
- Φ_F : Fluoreszenzquantenausbeute des Donors ($= k_{rad} \cdot \tau_F$),
- τ_F : Lebenszeit des angeregten Zustandes,
- ε_A : Absorptionsspektrum Akzeptor,
- I_F : Fluoreszenzspektrum Donor (normalisiert),
- ν : Frequenz,
- k_{rad} : Geschwindigkeitskonstante für Strahlungsemission des angeregten Donors,
- R_0 : FÖRSTER-Radius.

Der Orientierungsfaktor κ ergibt sich aus

$$\kappa = \cos \alpha - 3 \cos \beta_1 \cos \beta_2, \quad (3.2)$$

mit α als Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten des Donors ($\vec{\mu}_D$) und des Akzeptors ($\vec{\mu}_A$), β_1 dem Winkel zwischen dem Verbindungsvektor des Donors und des Akzeptors (\vec{R}_{DA}) und dem Übergangsdipolmoment des Donors $\vec{\mu}_D$ und β_2 , dem Winkel zwischen \vec{R}_{DA} und dem Übergangsdipolmoment des Akzeptors $\vec{\mu}_A$.

Im FÖRSTER-Radius werden alle konstanten Parameter zu einer Größe zusammengefasst; er gibt den Donor-Akzeptor-Abstand an, bei dem die Energietransferrate gleich der Geschwindigkeitskonstante für die Strahlungsemission des angeregten Donors k_{rad} ist.

3.3.3.2 DEXTER-Mechanismus

Ausgangspunkt für den DEXTER-Mechanismus ist eine direkte Überlappung der Wellenfunktionen des Donors und des Akzeptors [39]. Im Gegensatz zum FÖRSTER-Mechanismus, bei dem der Energietransfer aufgrund der Abstandsfunktion $1/R^6$ über einen großen Abstand

erfolgen kann, tritt der DEXTER-Mechanismus nur zwischen Molekülen mit sehr kleinem Abstand auf.

Beim DEXTER-Mechanismus wird zwischen Donor und Akzeptor ein Elektron ausgetauscht. Aus dem angeregten Zustand des Donors wird ein Elektron in den angeregten Zustand des Akzeptors übertragen, während gleichzeitig ein Elektron aus dem Grundzustand des Akzeptors in den Grundzustand des Donors wechselt. Der Endzustand entspricht dem des FÖRSTER-Mechanismus: es liegt ein angeregtes Akzeptormolekül vor und ein Donormolekül im Grundzustand (Abb. 3.9).

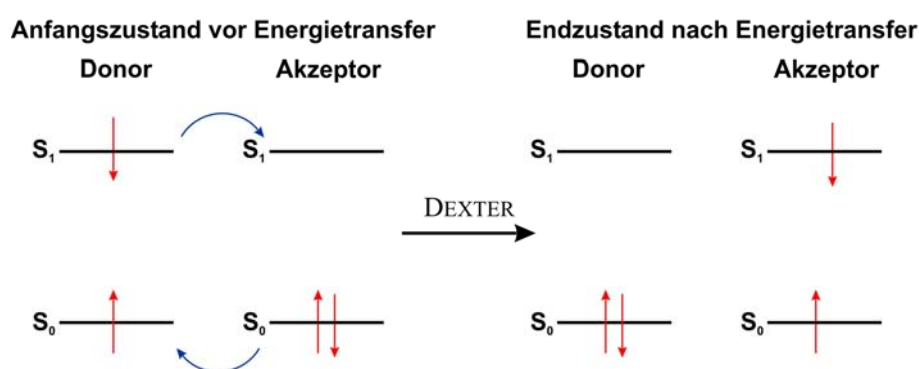


Abb. 3.9 Schematische Darstellung des DEXTER-Energietransfermechanismus. Im Gegensatz zum FÖRSTER-Energietransfers wird zwischen Donormolekül und Akzeptormolekül ein Elektron ausgetauscht. Die roten Pfeile stellen die Elektronen anhand ihrer Spinausrichtung dar, die gebogenen Pfeile kennzeichnen einen Übergang. S_0 und S_1 bezeichnen den Singulett-Grundzustand bzw. ersten angeregten Singulettzustand. Adaptiert aus [38] und modifiziert.

Die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers bei Energieübertragungsprozessen, die dem DEXTER-Mechanismus folgen, lässt sich wie folgt beschreiben

$$k_{ET} \propto \exp^{-\alpha R}, \quad (3.3)$$

wobei R für den Abstand der Pigmente steht und α der DEXTER-Koeffizient ist.

In den DEXTER-Koeffizient gehen vor allem die Wellenfunktionen der Elektronen ein. Ein Beispiel für einen Energietransfer nach DEXTER ist der Energietransfer zwischen Chlorophyllen und manchen Carotinoiden. Die Carotinoide sind zum Teil so nahe an den Chlorophyllen lokalisiert, dass alle Bedingungen für einen Energietransfer nach DEXTER erfüllt sind.

3.3.3.3 Exzitonentransfer-Mechanismus

Bei zwei oder mehreren gleichartigen Molekülen, die sehr dicht zusammen liegen (Abstand $< 6 - 8 \text{ \AA}$), kommt es bei Anregung der Moleküle zur Bildung von Exzitonen. Exzitonen sind angeregte Elektronen-Loch-Paare. Sie entstehen bei gleichartigen Molekülen, deren Energiezustände sich in Resonanz befinden, und die sehr dicht zusammen liegen. Es tritt eine so starke Wechselwirkung zwischen den Molekülen auf, dass ein Supermolekül entsteht, dessen elektronisches System als Überlagerung der Elektronensysteme der beteiligten Moleküle hervorgeht. Die exzitonische Kopplung induziert eine Veränderung der angeregten Zustände. Es kommt zu einer Aufspaltung der angeregten Zustände des Supermoleküls, so genannte Exzitonen-Aufspaltung (Abb. 3.10).

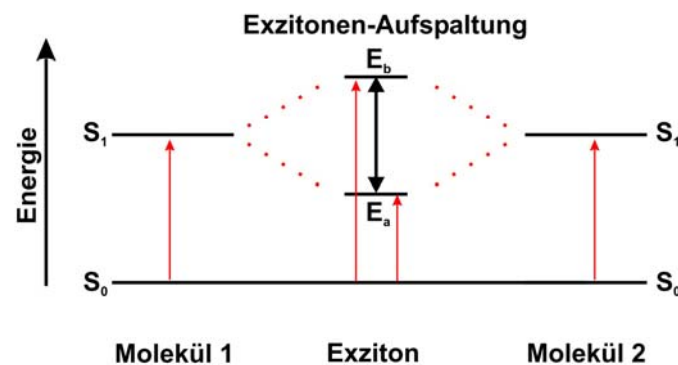


Abb. 3.10 Bei starker Kopplung von zwei Molekülen entsteht nach Anregung ein Elektronen-Loch-Paar, dessen angeregte Elektronenzustände (E_a und E_b) sich von den angeregten Zuständen der einzelnen Moleküle unterscheiden. Dadurch verändern sich die Übergangsenergien zwischen Grundzustand und angeregten Zuständen; diese werden durch die roten Pfeile angezeigt.

Der Anregungszustand und somit das Exziton wandert in Form eines Elektron-Defektelektron-Paares durch die gekoppelten Moleküle und ist über alle beteiligten Moleküle. Dieser muss nicht notwendigerweise homogen über die Moleküle verteilt sein.

Mit Hilfe des Exzitonmodells kann sowohl ein Teil der spektroskopischen Eigenschaften der Pigmente und der roten Chlorophyllpools als auch die Übertragung der Anregungsenergie in einem Antennensystem von Protein-Pigment-Komplexen erklärt werden.

Im Jahr 1931 beschrieb J. FRENKEL zum ersten Mal eine durch Energie induzierte, nicht leitende elektronische Anregung in einem Festkörper. Die durch diese Anregung entstehenden Quasiteilchen werden FRENKEL-Exzitonen genannt [40,41]. Von den FRENKEL-Exzitonen zu

unterscheiden, sind die so genannten WANNIER-Exzitonen [42]. Beide Modelle sind Grenzfälle, durch die Anregungen in einem Kristall auf der Grundlage von Wechselwirkungen zweier Teilchen beschrieben werden können. Während sich das Modell der FRENKEL-Exzitonen auf kleine Abstände zwischen den beteiligten Teilchen beschränkt, spricht man von WANNIER-Exzitonen, wenn Loch und Elektron einen sehr großen Abstand zueinander haben. Die WANNIER-Exzitonen werden vor allem zur Erklärung von Anregungszuständen in Halbleitern herangezogen, mit dem Modell der FRENKEL-Exzitonen kann die Anregungsdynamik in einem Protein-Pigment-Komplex erklärt werden.

Durch Absorption von Licht können aufgrund der räumlichen Anordnung der einzelnen Pigmente zueinander Exzitonen im Antennenpigmentsystem eines photosynthetischen Proteins entstehen, deren Lebensdauer zwischen 1 - 5 ns liegt. Ein Zerfall der Exzitonen in einem Protein der Photosynthese kann entweder photochemisch verursacht werden, indem die Anregungsenergie zur Ladungstrennung im Reaktionszentrum benutzt wird, durch strahlungslose Prozesse wie der internen Konversion oder durch Abgabe der Anregungsenergie in Form von Fluoreszenz [43].

Wie gesehen, sind die Eigenschaften der Chlorophylle von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, unter anderem von ihrem Aggregationsgrad und der Umgebung wie Lösungsmittel und Proteinmatrix. Verschiedene Wechselwirkungsmechanismen verändern die energetische Struktur und die photophysikalischen Eigenschaften der Chlorophylle in einem solchen Ausmaß, dass diese spektroskopisch detektiert werden können. Ein Beispiel par excellence sind die so genannten roten Chlorophylle der Protein-Pigment-Komplexe. Sie sind das Ergebnis verschiedener Wechselwirkungen, die auf die in der Proteinmatrix eingebetteten Chlorophylle wirken.

3.4 Die roten Chlorophylle

Bereits im Jahr 1870 beobachtete der Physiker und Mathematiker EDUARD HAGENBACH, dass das Absorptionsspektrum der Chlorophylle in grünen Pflanzen im Gegensatz zu Chlorophyll-Molekülen, die in polaren, organischen Lösungsmitteln gelöst waren, rot verschoben ist [44]. Jahre später erst wurde dieses Absorptionsverhalten von Chlorophyllen in photosynthetischen Organismen mittels verbesserter spektroskopischer Verfahren bestätigt und die Existenz von Chlorophyllen, die sogar bei größeren Wellenlängen als der erste Elektronendonator P700 absorbieren, nachgewiesen.

Chlorophyll *a*-Moleküle, die in polaren, nukleophilen Lösungsmitteln gelöst werden, absorbieren Licht im roten Spektralbereich zwischen 660 nm und 670 nm [45]. Nachfolgende Betrachtungen beziehen sich auf den roten Spektralbereich der Chlorophylle, da eine Fluoreszenzemission nur aus dem tiefsten angeregten Zustand (Q_y -Übergang) erfolgen kann und Photosystem I in dieser Arbeit ausschließlich über seine Fluoreszenz untersucht wurde.

Die Lage der Absorptions- und Fluoreszenzbanden ist sowohl von der Umgebung der Chlorophylle als auch von ihrem Aggregationsgrad abhängig (siehe Unterkapitel 3.3.1 „Chlorophylle“). Chlorophyll *a*-Moleküle, die in einer Proteinmatrix eingebettet sind, weisen im Vergleich zu „freien“ Chlorophyll *a*-Molekülen im Allgemeinen eine Rotverschiebung der Absorption auf. Der Hauptanteil der Antennen-Chlorophylle von Photosystem I absorbiert deshalb im roten Spektralbereich bei 680 nm. Ein geringer Anteil der Antennen-Chlorophylle absorbiert jedoch bei Wellenlängen größer 700 nm. Hier spricht man von den roten Chlorophyllen oder den roten Chlorophyllpools.

Allgemein absorbieren die roten Chlorophylle aus Protein-Pigment-Komplexen bei Wellenlängen, die größer sind als der erste Elektronendonator. Die roten Chlorophylle liegen somit energetisch tiefer als der ersten Elektronendonator des Reaktionszentrums eines Protein-Pigment-Komplexes, sind also bezüglich des ersten Elektronendonors bathochrom verschoben [5]. Rote Chlorophylle sind in photosynthetischen Komplexen weit verbreitet; nachgewiesen werden konnten sie in Photosystem I-Komplexen [6,7,46-49], in den Photosystemen der Purpur- [50] und Heliobakterien [51].

3.4.1 Die Natur der roten Chlorophylle in cyanobakteriellen PSI-Komplexen

Die roten Chlorophylle in PSI sind im Vergleich zu monomeren Chlorophyllen in Lösung um mindestens 40 nm, im Vergleich zu den Antennen-Chlorophyllen des PSI-Komplexes um mindestens 20 nm in den roten Spektralbereich hinein verschoben. Die Rotverschiebung der roten Chlorophylle in Protein-Pigment-Komplexen muss demnach ihre Ursache in den verschiedenen Wechselwirkungsmechanismen der Chlorophylle zu ihrer Umgebung haben. Eine Rotverschiebung kann durch Interaktionen der Chlorophylle untereinander induziert werden, wie auch über Kopplungen der Chlorophylle zu der umgebenden Proteinmatrix. Die meisten Chlorophylle bilden über eine Carbonylgruppe Wasserstoffbrücken zum Proteingerüst aus und sind außerdem über das zweiwertige Magnesiumion an das Protein gebunden

[52]. Eine Komplexbildung zwischen einem Chlorophyll und dem Protein führt im Allgemeinen zu einer Rotverschiebung der längerwelligen Absorptionsbande gegenüber den Spektren nicht komplexierter, freier Chlorophylle in Lösung.

Eine weitere Ursache für die bathochrome Verschiebung des niedrigsten Energieübergangs, d.h. des Q_y -Übergangs bzw. des Übergangs aus dem Singulett-Grundzustand in den ersten angeregten Singulettzustand, ist die Anordnung der roten Chlorophylle zueinander und die damit einhergehende exzitonische Kopplung. Die Chlorophylle können stark miteinander koppeln, wenn der Abstand zwischen den Chlorophyllen hinreichend klein ist. Eine solche Clusterbildung mehrerer Chlorophylle wird durch die räumliche Struktur der Proteinmatrix unterstützt [53]. Trotzdem werden als mögliche Kandidaten für die roten Chlorophylle nicht nur gekoppelte Chlorophylle angegeben. Auf der Grundlage quantenmechanischer Berechnungen wurden auch einzelne Chlorophylle als mögliche Kandidaten vorgeschlagen [54].

In den PSI-Komplexen verschiedener photosynthetischer Organismen gibt es mehrere Gruppen an roten Chlorophyllen, so genannte Pools. Die meisten Pools setzen sich wahrscheinlich aus mehreren Chlorophyllen zusammen, die in sehr kleinen Abständen zueinander liegen. Diese dichte Packung der Chlorophylle beeinflusst die Konfiguration der Molekülorbitale. In diesem Fall spricht man von einer exzitonischen Kopplung. Dabei entsteht ein neues Quantensystem mit neu definierten elektronischen Zuständen, die zum Teil energetisch tiefer liegen als die angeregten Zustände nicht koppelnder Chlorophylle. Eine Anregung in diese Zustände kann demnach zu einer Rotverschiebung der Q_y -Bande im Absorptionsspektrum führen. Zusätzlich wird den exzitonisch koppelnden Chlorophyllen anteilig ein Ladungstransfercharakter zugesprochen, der ebenfalls die Rotverschiebung noch verstärken kann [55-58]. Eine exzitonische Kopplung zwischen den Chlorophyllen, die die roten Chlorophyllpools bilden, sowie der Einfluss der Proteinmatrix auf die Kopplungsstärke, konnte mittels Stark-Spektroskopie bestätigt werden. Die roten Chlorophyllpools besitzen im Vergleich zu monomeren Chlorophyll-Molekülen einen kleinen STARK-Shift, was auf eine starke Wechselwirkung hindeutet [59].

Resümierend kann man somit sagen, dass die Rotverschiebung der roten Chlorophylle das Ergebnis einer Reihe von verschiedenen Wechselwirkungen ist, die für sich alleine keine Rotverschiebung in dem für die roten Chlorophylle typischen Wellenlängenbereich hervorrufen können. Rote Chlorophylle kann man demnach als, in einem Proteingerüst eingebettete, untereinander stark koppelnde Chlorophylle beschreiben, denen nach einer optischen Anre-

gung neben der Bildung eines Exzitons ein Ladungstransfercharakter zugesprochen werden kann.

3.4.2 Mögliche Funktionen der roten Chlorophylle

Anfänglich wurde die Existenz der roten Chlorophyllpools sehr kritisch diskutiert: als Chlorophyllgruppen, die möglicherweise die Effizienz des photosynthetischen Systems reduzieren und somit eine kontraproduktive Wirkung auf die Photosynthese haben. Energetisch gesehen, stehen sie als terminale Energieakzeptoren am Ende des Energietransfers in der Antenne [60]. Deswegen war man der Meinung, dass die roten Chlorophylle den Energietransfer verzögern würden, indem sie die Wahrscheinlichkeit verringern, dass sich die angeregten Zustände auf den Chlorophyllen befinden, von denen die Anregungsenergie auf das Reaktionszentrum übertragen wird. Zwischenzeitlich wird eine ganze Reihe von Funktionen der roten Chlorophylle diskutiert. Eine mögliche Funktion ist die Vergrößerung des Absorptionswirkungsquerschnitts [61,62]. Durch die roten Chlorophylle wird das Spektrum an Licht, welches photosynthetische Organismen in chemische Energie umwandeln, in den roten Spektralbereich hinein, erweitert. Vor allem Cyanobakterien, denen aufgrund ihres Lebensraums oft nur wenig Licht zur Verfügung steht, ermöglichen die roten Chlorophylle eine Adaption an schwache Lichtverhältnisse [52]. Ein weiterer Vorschlag ist die Beteiligung der roten Chlorophylle an der Energieverteilung innerhalb der Antenne [60]. Einerseits wird die Fokussierung der Anregungsenergie auf das Reaktionszentrum über die roten Chlorophylle diskutiert [9,63-65], andererseits sollen sie als energetische Zwischenfälle dienen [66,67]. Die roten Chlorophyllpools könnten demnach als Schutz des Reaktionszentrums vor überschüssiger Energie dienen [60]. Sicher nachgewiesen wurde aber, dass sie den Energietransfer innerhalb der Antenne beeinflussen [63,65,68,69] und an der Energieequilibrierung beteiligt sind [70,71]. Neben der Energieequilibrierung innerhalb eines Antennensystems, sollen die roten Chlorophylle außerdem den Energieaustausch zwischen den Antennen der einzelnen Monomere des trimeren PSI-Komplexes ermöglichen [72].

3.4.3 Anzahl und Lokalisierung der roten Chlorophyllpools

Die Anzahl der roten Chlorophyllpools und ihre Zusammensetzung in einem Protein-Pigment-Komplex sind vom Organismus abhängig. Die Gesamtanzahl an roten Chlorophyllen pro Reaktionszentrum wird auf 2 - 10 Chlorophylle geschätzt, abhängig vom Organismus und vom Oligomerisierungsgrad des PSI-Komplexes. Photosystem I aus Cyanobakterien kann *in vivo* sowohl als Monomer wie auch als Trimer vorliegen, wobei die trimere Form überwiegt. In einigen PSI-Komplexen entstehen bestimmte rote Chlorophyllpools erst nach Trimerisierung der Monomere, wie z.B. der Chlorophyllpool Chl735 aus *Arthrospira platensis*.

Mittels absorptions- bzw. fluoreszenzspektroskopischer Untersuchungen konnten in PSI aus Cyanobakterien bis zu zwei Chlorophyllpools nachgewiesen werden [70,73,74]. Der erste Pool, den alle PSI-Komplexe besitzen, zeigt ein Absorptionsmaximum zwischen 703 nm und 708 nm. Das Absorptionsmaximum des zweiten Chlorophyllpools ist stark vom Organismus abhängig, aus dem PSI isoliert wurde, und liegt für *TS. elongatus* bei ca. 719 nm und für trimeres PSI aus *A. platensis* bei ungefähr 740 nm. Mittlerweile konnte über spektrale Lochbrennexperimente ein weiterer roter Chlorophyllpool zwischen 714 - 715 nm für PSI-Komplexe aus *Synechocystis* PCC 6803 und *TS. elongatus* nachgewiesen werden [56-58,75,76]. **Tab. 3.3** gibt einen Überblick über die bis dato publizierten Literaturdaten für die roten Chlorophyllpools in Photosystem I-Komplexen verschiedener Cyanobakterien.

Tab. 3.3 Die roten Chlorophyllpools in PSI aus verschiedenen Cyanobakterien. Angegeben sind unter anderem sowohl die Absorptions- (A) als auch die Fluoreszenzmaxima (F) bei Raumtemperatur (RT) und bei Temperaturen zwischen 4 und 77 K (TT) für den jeweiligen Chlorophyllpool. Außerdem ist aufgeführt, aus wie vielen Chlorophyllen der jeweilige Pool besteht. Diese Anzahl berechnet sich aus den Absorptionsspektren. Die letzte Spalte gibt die Literatur an, aus der die Daten entnommen wurden. Die fett gedruckten Chlorophyllpools sind die in der Literatur am häufigsten genannten Chlorophyllpools. Absorptions- und Fluoreszenzmaxima besitzen die Einheit nm.

Oligomerisierungsgrad	Absorption (RT)	Absorption (TT)	Fluoreszenz (RT)	Fluoreszenz (TT)	Name des Chlorophyllpools	Anzahl an Chlorophyllen	Quelle
<i>Synechocystis PCC6803 (= Synechocystis sp.)</i>							
Trimer	A702	A708	F711	F720	Chl708	4-5	[74]
	-	-	-	F720	Chl706 Chl714	-	[56,75]**
	-	A710	-	F725	-	-	[64]
Monomer	A703	A708	F712	F720	Chl708	3	[74]
	-	A710	-	F725	-	-	[64]
<i>Thermosynechococcus elongatus (früher: Synechococcus elongatus)</i>							
Trimer	A702	A708	F707	F719	Chl708	5-6	[4,5,77]
	A708	A719	F723	F730	Chl719	4-6	[4,5]
	-	A715	-	-	Chl715	-	[58]
Monomer	-	A708	-	F719	Chl708	5-6	[4,5]
	-	A720	-	F735	Chl719	2	[4,5]
<i>Arthrospira platensis (früher: Spirulina platensis)</i>							
Trimer	-	A705	-	-	Chl705*	2	[10]
	-	A703-A708	F714	-	Chl708	7	[70,78]
	-	A714	-	-	Chl714*	1	[10]
	-	A726	-	-	Chl726*	1	[10]
	A715	A735-A746	F730- F740	F760***	Chl735	3	[60,61,70] [6,10,78] [7-9]
Monomer	-	A703	-	-	Chl703*	3	[10]
	A702	A708	F712	-	Chl708	5-7	[70]
	-	-	-	F725	Chl710	-	[7]
	-	A715	-	F725	Chl715*	1	[10]
	A708	A719	F721	F730	Chl719	3	[70]
	-	A725	-	F740	Chl725*	1	[10]

(* die mit einem Stern gekennzeichneten Pools für das PSI aus *A. platensis* sind das Ergebnis einer Berechnung;

** F720 ist das Ergebnis aus Chl706 und Chl708; *** Reaktionszentrum geschlossen)

Die Bezeichnung der einzelnen roten Chlorophyllpools erfolgt in der Regel in Anlehnung an das Absorptionsmaximum bei tiefen Temperaturen. In **Tab. 3.3** werden die Absorptions- und

Fluoreszenzmaxima, gemessen bei Raumtemperatur und bei tiefen Temperaturen zwischen 4 und 77K vorgestellt. Die Absorptionsmaxima sind durch das Präfix „A“ gekennzeichnet, die entsprechenden Fluoreszenzmaxima durch das Präfix „F“. Von vielen Chlorophyllpools liegt nur das Absorptionsmaximum bei tiefen Temperaturen vor. Es ist deshalb nicht bekannt, ob alle aufgeführten Chlorophyllpools in der Lage sind, zu fluoreszieren.

Die Detektion der roten Chlorophyllpools ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben einer Temperaturabhängigkeit zeigen die roten Chlorophyllpools zudem eine Abhängigkeit vom Oligomerisierungsgrad des Photosystem I-Komplexes. Die Monomere besitzen zum Teil weniger rote Chlorophyllpools als die Trimere, oder die Anzahl der an den roten Chlorophyllpools beteiligten Chlorophylle nimmt ab. Die Anzahl der an den roten Chlorophyllpools beteiligten Chlorophylle ermittelt sich aus den Absorptionsspektren über die Oszillatorstärke der einzelnen Banden. Zusätzlich beeinflusst der Redoxzustand des ersten Elektronendonors das photophysikalische Verhalten einiger Chlorophyllpools, wodurch ein fluoreszenzspektroskopischer Nachweis bestimmter Pools nicht immer möglich ist.

Wie sich zwischenzeitlich herausgestellt hat, haben die angewendeten Isolierungsverfahren und die Probenpräparation großen Einfluss auf die Integrität des Proteins. Ein Teil der Pigmente wurde während dieser Prozesse aus dem Antennensystem gelöst. Diese Pigmente wurden entweder während der Aufreinigung aus dem Komplex entfernt oder lagen bei der Messung als ungekoppelte Pigmente im Protein-Pigment-Komplex vor, was unterschiedliche Ergebnisse und Schlussfolgerungen nach sich zog [79].

Aus diesen Gründen sind die Literaturdaten bezüglich der Anzahl an roten Chlorophyllpools, den dazugehörigen Absorptions- und Fluoreszenzmaxima und den beteiligten Chlorophyllen sehr unterschiedlich. Aufgrund verbesserter Isolierungsmethoden und aufgrund der Entwicklung immer empfindlicherer Messmethoden musste die Anzahl der detektierten roten Chlorophyllpools immer wieder nach oben korrigiert werden [58]. Zusätzlich ergaben Berechnungen, dass weitere Chlorophyllpools existieren [10]. Für weitere Diskussionen wurden deshalb nur die roten Chlorophyllpools verwendet, die experimentell nachgewiesen wurden und in der Literatur mehrfach in Erscheinung treten (in der Tabelle fett geschrieben).

Bis jetzt liegt nur für den Photosystem I-Komplex aus *Thermosynechococcus elongatus* eine Kristallstruktur mit atomarer Auflösung vor [15]. Untersuchungen bezüglich der Zuordnung der roten Chlorophyllpools zu bestimmten Antennen-Chlorophyllen beziehen sich deshalb vor allem auf PSI aus *TS. elongatus*. Für alle anderen Organismen werden Vermutungen über die Zusammensetzung der roten Chlorophyllpools aufgestellt, eine genaue Zuordnung und Zu-

sammensetzung ist aufgrund der fehlenden Kristallstruktur aber nicht möglich (Zuordnung der roten Chlorophylle zu bestimmten Chlorophyllen in der Antenne von PSI aus *TS. elongatus* siehe Kapitel 8 „Fluoreszenzpolarisationsanalyse“).

3.4.4 Spektrale Eigenschaften der roten Chlorophyllpools

Die roten Chlorophylle besitzen bezüglich ihrer spektralen Eigenschaften charakteristische Merkmale. Durch die Rotverschiebung ist eine spektrale Trennung der roten Chlorophylle von den restlichen Antennen-Chlorophyllen bzw. Bulk-Chlorophyllen in Fluoreszenzemissionsspektren möglich. Ursache ist eine unterschiedlich starke STOKES-Verschiebung. Während die STOKES-Verschiebung der roten Chlorophyllpools zwischen 10 und 25 nm liegt [68,80], wird sie für die Antennen-Chlorophylle in Photosystemen mit 1,5 - 4 nm angegeben [68,80-82]. Monomere Chlorophylle dagegen weisen einen STOKES Shift zwischen 4-8 nm auf [68]. Die STOKES-Verschiebung für den Chlorophyllpool Chl708 in PSI aus *TS. elongatus* und *A. platensis* liegt bei ca. 12 nm, für Chl719 aus *TS. elongatus* und Chl740 aus *A. platensis* zwischen 11 und 20 nm, gemessen bei 6 K [83]. Die Unterschiede in den STOKES-Verschiebungen können auf unterschiedlich starke exzitonische Wechselwirkungen zwischen den Chlorophyllen und zusätzlich auf einen Ladungstransfercharakter des angeregten Zustandes [56-58,84,85] zurückgeführt werden. Durch den Ladungstransfercharakter ergibt sich für das angeregte Molekül eine Verschiebung der Potentialkurve des angeregten Zustandes. Schwingungszustände höherer Energie werden dadurch zugänglich. Im Spektrum wird dies durch eine Verbreiterung der Absorptions- und Emissionsbanden sichtbar [55,57-59,76,84,86-88]. Ein großer STOKES Shift wie auch ein großer HUANG-RHYS-Faktor deuten auf eine starke Elektronen-Phononen-Kopplung hin (siehe Kapitel 4 „Grundlagen der optischen Einzelmolekülspektroskopie“). Der große STOKES Shift als Folge einer ausgeprägten Elektronen-Phononen-Kopplung führt zu einer erheblichen homogenen und inhomogenen Linienverbreiterung in den Spektren. Die Emissionsbande der langwelligen Chlorophylle zeigt eine inhomogene Verbreiterung zwischen 200 - 400 cm^{-1} [4,56,75,79,84], die homogene Linienbreite der roten Chlorophylle kann zwischen wenigen Wellenzahlen bis 170 cm^{-1} [83] betragen. Kleine Veränderungen in der Proteinumgebung erklären auch die große Verbreiterung der Banden der roten Chlorophyllpools, wenn der angeregte Zustand dieser Chlorophylle einen Ladungstransfercharakter besitzt [89].

4 Grundlagen der optischen Einzelmolekülspektroskopie

Trotz der großen Vielfalt an photosynthetisch aktiven Komplexen ist allen photosynthetischen Einheiten gemeinsam, dass sie ein Antennensystem besitzen, welches Licht absorbieren und die Anregungsenergie zum Reaktionszentrum leiten kann, wo die Ladungstrennung stattfindet. Die Grundlagen der Wechselwirkung von Licht mit dem Antennensystem soll im folgenden Kapitel erläutert werden.

4.1 Wechselwirkung von Licht mit Materie

Fällt Licht mit einer Wellenlänge im sichtbaren Spektralbereich ($\lambda = 400 - 700 \text{ nm}$) auf die Pigmente des Antennensystems, kann es zu einer Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und den Pigmenten des Antennensystems kommen. Voraussetzung für eine Wechselwirkung zwischen Licht und Pigment ist die Erfüllung der so genannten Resonanzbedingung. Die Resonanzbedingung besagt, dass die Energie E der Photonen der Energiedifferenz ΔE zwischen zwei elektronischen Zuständen des Pigments entsprechen muss. Die Energiedifferenz zweier elektronischer Zustände berechnet sich aus dem PLANCKSchen Wirkungsquantum h ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$), der Lichtgeschwindigkeit c ($2,998 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ im Vakuum) und der Frequenz ν bzw. der Wellenlänge λ gemäß folgender Gleichung

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}. \quad (4.1)$$

Ein organisches Molekül wie Chlorophyll besitzt in der Regel als Grundzustand einen Singulettzustand S_0 mit einer geraden Anzahl an Elektronen. Die Spins der Elektronen im Grundzustand sind paarweise antiparallel orientiert. Durch Absorption von Licht kann das Molekül aus dem Singulett-Grundzustand in einen angeregten Singulettzustand S_n übergehen. Eine Abregung aus angeregten Singulettzuständen erfolgt entweder über die Emission von Fluoreszenz oder über strahlungslose Prozesse wie der internen Konversion bzw. dem Intersystem Crossing (Interkombination).

Mit Hilfe des JABLONSKI-Termschemas können Strahlungsprozesse und strahlungslose Prozesse eines Systems anhand seiner elektronischen Zustände erklärt werden (Abb. 4.1). Aus Gründen der Übersicht wurde auf die zu den elektronischen Zuständen gehörigen Rotationszuständen verzichtet.

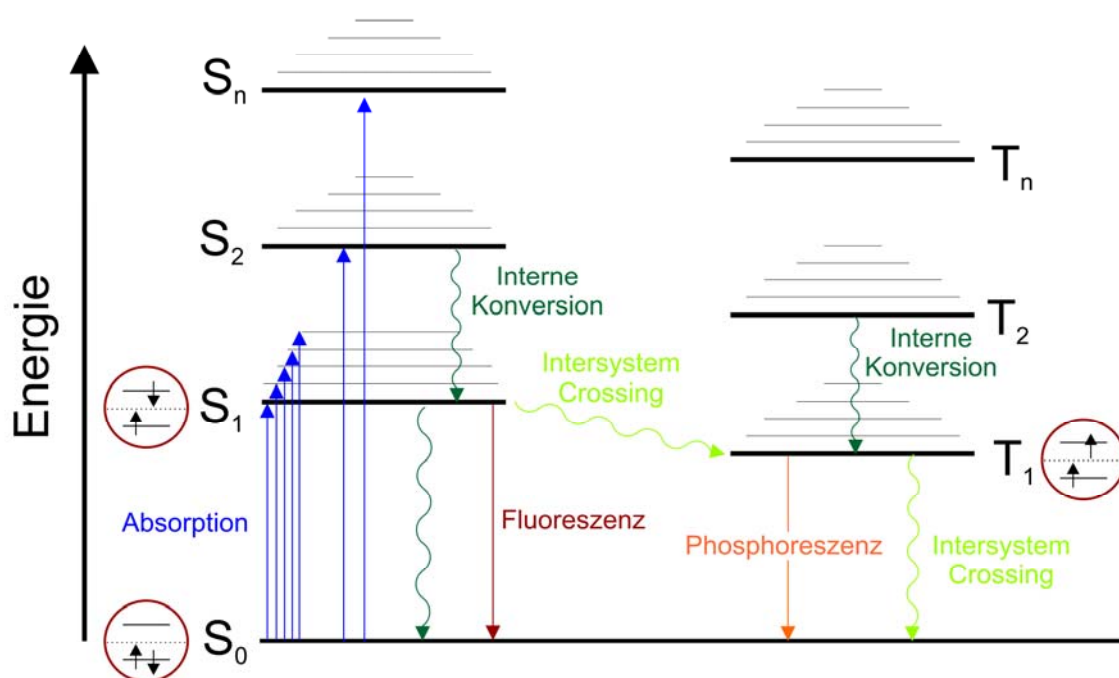


Abb. 4.1 In der Abbildung sind sowohl die Strahlungsprozesse Absorption, Fluoreszenz und Phosphoreszenz sowie die strahlungslosen Prozesse für verschiedene elektronische und vibronische Zustände gezeigt. Zu den strahlungslosen Prozessen zählen die interne Konversion und das Intersystem Crossing. Ebenso sind die zu den elektronischen Zuständen zugehörigen Elektronenkonfigurationen angedeutet.

Bei der internen Konversion geht die Anregungsenergie durch Dissipation thermischer Energie über die Schwingungsmoden verloren. Die interne Konversion stellt daher eine direkte Konkurrenzreaktion zur Fluoreszenz dar. Aus dem ersten angeregten Singulettzustand kann das System durch Fluoreszenzemission und durch interne Konversion in den Singulett-Grundzustand übergehen; durch Intersystem Crossing ist außerdem ein Übergang in den Triplettzustand möglich. Der Triplettzustand besitzt im Gegensatz zu den Singulettzuständen zwei parallel orientierte Elektronenspins. Der Übergang zwischen Singulett- und Triplettzuständen ist ein spin-verbotener Übergang, da ein Elektronenspin dabei die Orientierung ändern muss. Die Übergangswahrscheinlichkeit von S_1 zu T_1 ist im Vergleich zu einem Übergang zwischen Zuständen gleicher Multiplizität sehr gering.

Durch die Emission von Phosphoreszenz oder durch Intersystem Crossing geht der angeregte Triplettzustand in den Singulett-Grundzustand über. Der Triplettzustand liegt im Allgemeinen energetisch tiefer als der erste angeregte Singulettzustand, weshalb die Phosphoreszenz bei längeren Wellenlängen als die Fluoreszenz detektiert wird.

Aufgrund des Spinverbots ist die Intersystem Crossing-Rate des Übergangs vom angeregten Triplettzustand zum Singulett-Grundzustand sehr klein und der Triplettzustand sehr langlebig. Die Lebensdauer eines Moleküls im Triplettzustand kann maximal bis zu einer Sekunde betragen, wenn die Deaktivierung auf Intersystem Crossing und Interne Konversion beschränkt ist und das Molekül nicht über intermolekulare Prozesse abgeregt wird. Durch intermolekulare Übertragung der Energie auf Umgebungsmoleküle kann ein System aus dem Triplettzustand ebenfalls in den Singulett-Grundzustand übergehen. Ein Beispiel hierfür ist die Energieübertragung von angeregten Chlorophyll-Molekülen, die sich im Triplettzustand befinden, auf benachbarte Carotinoide.

Der erste angeregte Singulettzustand hingegen besitzt eine Lebensdauer im Nanosekundenbereich (10^{-8} - 10^{-9} s). Die Lebensdauer τ des ersten angeregten Singulettzustandes und damit die beobachtete Fluoreszenz-Zerfallszeit sind gegeben durch

$$\tau_F = \frac{1}{k_F + k_{ic} + k_{isc} + k_Q} \quad (4.2)$$

Die Lebensdauer eines angeregten Singulettzustandes wird demnach nicht nur durch die Abregung über die Fluoreszenz bestimmt, sondern auch durch strahlungslose Prozesse. Die Fluoreszenzrate (k_F) konkurriert mit der Rate der internen Konversion (k_{ic}), der Intersystem

Crossing-Rate (k_{isc}) und verschiedenen Quenchprozessen, gegeben durch die Rate k_Q . Diese Prozesse können den angeregten Singulettzustand zusätzlich entvölkern, wodurch die Lebensdauer des angeregten Singulettzustandes verkürzt wird.

Der Anteil an angeregten Singulettzuständen, der durch den Fluoreszenzprozess wieder in den Singulett-Grundzustand überführt werden kann, kann durch die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F gemäß

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{ic} + k_{isc} + k_Q} \quad (4.3)$$

beschrieben werden.

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F ist gleich dem Verhältnis aus emittierten Photonen zu absorbierten Photonen

$$\Phi_F = \frac{n(\text{emittierte Photonen})}{n(\text{absorbierte Photonen})}. \quad (4.4)$$

Eine Absorption muss nicht zwangsläufig einen Übergang in den ersten angeregten Singulettzustand zur Folge haben. Entsprechend der Resonanzbedingung kann das System in höhere elektronische Zustände angeregt werden. Der Übergang zwischen den höher angeregten Singulettzuständen (S_n nach S_l) erfolgt aufgrund interner Konversion sehr schnell (Pikosekundenbereich). Er ist sehr viel schneller als der Übergang zwischen dem ersten angeregten Singulettzustand und dem Singulett-Grundzustand. Letztendlich erfolgt ein strahlungsloser Übergang aus den energetisch höher angeregten elektronischen Zuständen in den ersten angeregten Singulettzustand (KASHA-Prinzip) [90], von wo eine Abregung über die zuvor genannten Abregungsprozesse erfolgt. Ähnlich verhalten sich höhere vibronische Zustände. Die Relaxation aus angeregten vibronischen Niveaus eines jeden elektronischen Zustandes in den vibronischen Grundzustand erfolgt viel schneller als die Photonenemission. Die beobachtete Fluoreszenz stammt somit normalerweise aus dem niedrigsten vibronischen Niveau (ν_0) des ersten angeregten Singulettzustandes S_l . Ein Fluoreszenzspektrum ist deshalb in der Regel unabhängig von der Anregungswellenlänge und ist zu längeren Wellenlängen (niedrigeren Energien) als das entsprechende Absorptionsspektrum verschoben. Fluoreszenzspektroskopische Methoden lassen deshalb Aussagen über die Energieniveaus des Moleküls sowie intra- und intermolekulare Wechselwirkungen zu.

4.2 Fluoreszenzspektroskopie

Man kann zwischen zwei grundlegenden, fluoreszenzspektroskopischen Methoden unterscheiden: der Fluoreszenzanregungsspektroskopie und der Fluoreszenzemissionsspektroskopie. Die Fluoreszenzanregungsspektroskopie zeichnet sich dadurch aus, dass ein Anregungswellenlängenbereich durchgescannt und die Gesamtfluoreszenz unabhängig von der Wellenlänge aufgenommen wird. Das Fluoreszenzanregungsspektrum eines Moleküls sollte daher die Form des Absorptionsspektrums haben. Im Gegensatz zur Anregungsspektroskopie ist die Anregungswellenlänge bei der Fluoreszenzemissionsspektroskopie fest und die Fluoreszenz wird über einen definierten Wellenlängenbereich aufgenommen. Das Fluoreszenzemissionsspektrum zeigt eine Wellenlängenverteilung der Fluoreszenz, die von dem ersten angeregten Singulettzustand emittiert wird. Eine Charakterisierung der einzelnen Fluoreszenzbanden erfolgt über die Bandenposition, die Linienbreite und die Intensität der Bande.

4.2.1 Die physikalische Grundlage der Fluoreszenzspektroskopie – Das FRANCK-CONDON-Prinzip

Durch Absorption von Licht wird nicht nur der Null-Null-Übergang induziert; elektronische Übergänge sind bei Raumtemperatur von Änderungen in der Schwingungsquantenzahl und von Rotationsübergängen begleitet. Als Null-Null-Übergang wird der schwingungslose Übergang zwischen dem Singulett-Grundzustand und dem ersten elektronischen Singulettzustand bezeichnet. Die Rotationsübergänge sollen hier vernachlässigt werden, da sie für spektroskopische Untersuchungen bei tiefen Temperaturen aufgrund der starren Matrix nicht auftreten können.

Die einzelnen Banden in einem Spektrum können mit Hilfe des FRANCK-CONDON-Prinzips näher erklärt werden. Das FRANCK-CONDON-Prinzip macht Aussagen über die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Schwingungsmoden des Grund- und ersten angeregten Zustands. Durch die Übergänge zwischen vibronischen Zuständen wird sowohl die Intensität als auch die Linienbreite der einzelnen Banden in einem Spektrum beeinflusst.

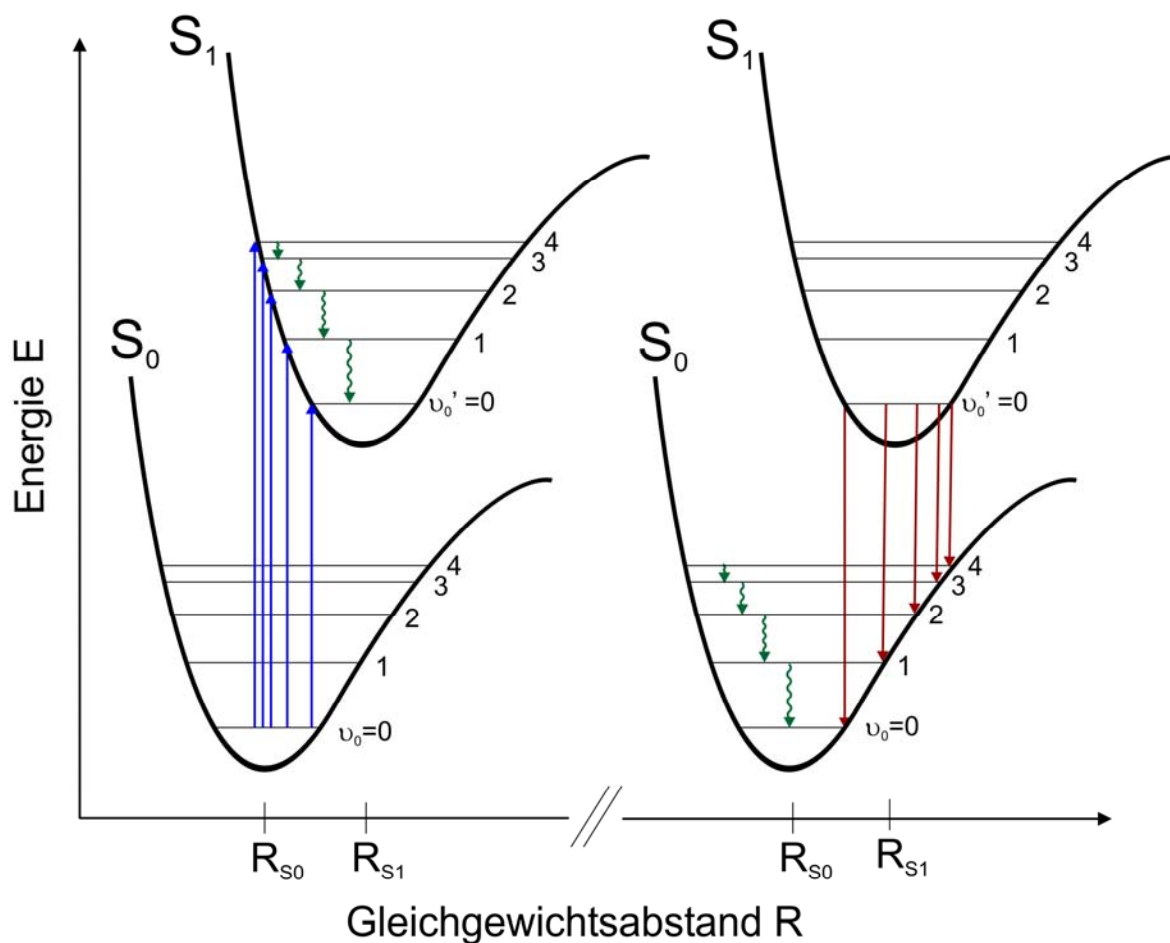


Abb. 4.2 Das FRANCK-CONDON-Prinzip, mit dessen Hilfe die Intensität und die Linienbreite einer Absorptions- und einer Fluoreszenzemissionsbande erklärt werden können. Gezeigt sind die Potentialkurven für den elektronischen Grund- und den ersten angeregten elektronischen Zustand mit den dazugehörigen vibronischen Zuständen. Die blauen Pfeile zeigen die Absorption, rote Pfeile die Fluoreszenzemission und die grünen Pfeile stellen die interne Konversion dar.

In **Abb. 4.2** sind die Potentialkurven des elektronischen Grundzustands und des ersten elektronischen Zustands mit den zugehörigen Schwingungsmoden eines Moleküls gezeigt. Nach dem FRANCK-CONDON-Prinzip ist die Absorption aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustands in einen Schwingungszustand eines angeregten elektronischen Zustands am größten, wenn sich das Maximum der Wellenfunktion des angeregten Schwingungszustands senkrecht über dem Maximum der Wellenfunktion des Schwingungsgrundzustandes befindet. Die Maxima einer Wellenfunktion befinden sich, bis auf das unterste Schwingungsniveau, entsprechend des quantenmechanischen harmonischen Oszillators an den Knotenpunkten der Potentialkurven. Die Absorptionswahrscheinlichkeit ist demnach für einen vertikalen Übergang zwischen den Energie-Hyperflächen am größten. Ein vertikaler

Übergang bedeutet, dass alle Molekülparameter wie Bindungslängen, Bindungswinkel, Konformation und Solvathülle während des Übergangs erhalten bleiben. Mit geringerer Wahrscheinlichkeit können aber auch andere Schwingungszustände besetzt werden.

Grundlage des FRANCK-CONDON-Prinzips ist die BORN-OPPENHEIMER-Näherung, die eine unabhängige Beschreibung der Elektronen- und Kernzustände bei optischen Übergängen erlaubt. Eine unabhängige Beschreibung der Elektronen- und Kernzustände ist möglich, da die Elektronenbewegung im Vergleich zur Kernbewegung sehr schnell ist. Bei einem elektronischen Übergang kann daher die Kernkonfiguration als statisch angenommen werden. Dadurch erfolgen die Übergänge des angeregten Elektrons unter Erhaltung des Kernabstandes senkrecht.

Bei den meisten Molekülen wird durch Anhebung eines Elektrons in einen angeregten Zustand der Gleichgewichtsabstand zwischen den Bindungen größer und die Bindung gelockert. Die Potentialkurve des angeregten Zustands liegt dann im Vergleich zum Grundzustand bei größeren Kernabständen.

Auch die Fluoreszenzemission erfolgt entsprechend dem FRANCK-CONDON-Prinzip. Von einer zu größeren Kernkoordinaten verschobenen Potentialkurve erfolgt die Emission vom niedrigsten Schwingungszustand des Anregungszustands in den Grundzustand. Der niedrigste Schwingungszustand wird durch interne Konversion innerhalb des elektronischen Zustandes erreicht [90]. Da Grundzustand und angeregter Zustand gegeneinander verschoben sind, liegt die Emission bei größeren Wellenlängen als die Absorption. Man spricht hier vom so genannten STOKES Shift (**Abb. 4.3**).

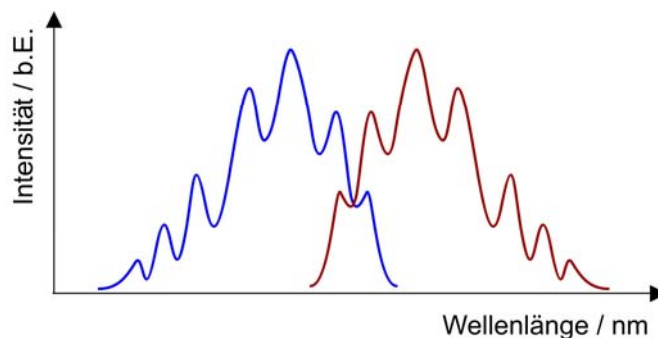


Abb. 4.3 Gezeigt ist das Absorptionsspektrum mit dem dazugehörigen Fluoreszenzspektrum. Das Fluoreszenz-emissionsspektrum ist entsprechend der Relaxation der vibronischen Zustände innerhalb des ersten angeregten elektronischen Zustandes zu niedrigeren Energien verschoben (STOKES Shift).

Neben intramolekularen Eigenschaften wie der Elektronenkonfiguration und der Struktur des Moleküls werden die photophysikalischen Eigenschaften der Chromophore von äußeren Bedingungen beeinflusst. Dazu zählen pH-Wert, Dielektrizitätskonstante, die Starrheit des Mediums, Lösungsmittelpolarität und direkte Wechselwirkungen mit Molekülen der Umgebung. Bei den Wechselwirkungen handelt es sich vor allem um Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und um Übertragungen von Protonen oder Elektronen zwischen den Molekülen.

Die Fluoreszenz reagiert sehr viel empfindlicher auf Veränderungen der Umgebung als die Absorption. Diese höhere Empfindlichkeit der Fluoreszenz gegenüber der Absorption ist die Konsequenz der langen Lebensdauer des ersten angeregten Singulettzustandes. Während bei kontinuierlicher Beleuchtung die Absorption innerhalb von 10^{-15} s abläuft, liegt die Lebensdauer von S_1 zwischen 10^{-8} und 10^{-9} s. In dieser Zeitspanne kann der angeregte Zustand eines Moleküls durch viele Prozesse unter anderem durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den Umgebungsmolekülen beeinflusst werden.

Die Wechselwirkungen des Moleküls mit den Umgebungsmolekülen und die Umgebungsbedingungen verändern das spektrale Verhalten des zu untersuchenden Moleküls derart, dass sich sowohl Position und Form der Spektrallinie, als auch die Intensität der Bande verändern.

4.2.2 Die Position einer Spektrallinie im Spektrum

Die Position einer Bande im Spektrum und damit die Wellenlänge der Absorption bzw. der Emission enthalten Informationen über die angeregten Energiezustände des Moleküls. Über die angeregten Zustände und über die Natur des Elektronenübergangs lassen sich Rückschlüsse auf die Molekülstruktur ziehen. Im Allgemeinen wirken sich sterische, induktive und mesomere Effekte auf die Lage einer Bande aus. Deutlich ist dies an verschiedenen Tetrapyrrolosystemen zu sehen, zu denen auch die Chlorophylle gehören [30,31]. In Abhängigkeit von der Größe des π -Elektronensystems und der Symmetrie des Moleküls ändert sich die Position der spektralen Linien. Chlorophylle besitzen ein delokalisiertes π -Elektronensystem, das sich über einen Großteil des Tetrapyrrolrings erstreckt. Das Spektrum der Chlorophylle wird somit hauptsächlich von π - π^* -Übergängen bestimmt. Je größer das konjugierte π -Elektronensystem ist, desto langwelliger und intensiver ist der energieärmste π - π^* -Übergang. Zu berücksichtigen ist zusätzlich der Einfluss der Umgebung auf die Lage der Spektrallinien. Lösungsmittel können eine Rotverschiebung (bathochromer Effekt) oder eine Blauverschiebung (hypsochromer Effekt) verursachen.

4.2.3 Intensität einer Spektrallinie

Voraussetzung für einen optischen Übergang ist die Wechselwirkung des Moleküls mit einem elektromagnetischen Feld. Dazu muss das Molekül zumindest vorübergehend einen Dipol haben, der mit der Frequenz des elektromagnetischen Feldes schwingen kann. Ein Maß für die Intensität eines Übergangs ist das Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}$, das durch die Struktur des Moleküls und dessen Symmetrieeigenschaften bestimmt wird.

Klassisch ist das Dipolmoment definiert als

$$\vec{\mu} = q \cdot \vec{r}, \quad (4.5)$$

mit q gleich einer Ladung und \vec{r} dem Abstand.

Quantenmechanisch repräsentiert das Dipolmoment bzw. das Übergangsdipolmoment die Veränderung des Dipolmoments während eines Übergangs, welche durch die Ladungsver-schiebung bei einem Elektronenübergang induziert wird. Das Übergangsdipolmoment zwi-

schen einem Zustand mit der Wellenfunktion Ψ_1 und einem Zustand mit der Wellenfunktion Ψ_2 ist quantenmechanisch gegeben durch

$$\bar{\mu}_{21} = \int \Psi_2^* \bar{\mu} \Psi_1 d\tau, \quad (4.6)$$

mit $\bar{\mu}_{21}$ als Übergangsdipolmoment oder Dichtematrixelement und $\bar{\mu}$ als Dipoloperator. Damit ein Übergang zwischen zwei Zuständen überhaupt stattfinden kann, muss das Übergangsdipolmoment von Null ($\bar{\mu}_{21} \neq 0$) verschieden sein.

Die Intensität I einer Spektrallinie ist allgemein proportional zum Quadrat des Übergangsdipolmoments

$$I \propto |\bar{\mu}_{21}|^2, \quad (4.7)$$

wobei die Indizes 1 und 2 für die beteiligten Zustände stehen.

Während in der Physik für das Übergangsdipolmoment oft der Einfachheit wegen die Oszillatorstärke f verwendet wird, gebraucht man in der Chemie oder Biologie den Extinktionskoeffizienten ε , um die Stärke eines Übergangs bzw. die Intensität einer spektralen Bande beurteilen zu können. Alle drei Parameter können ineinander überführt werden. Von dem Übergangsdipolmoment $\bar{\mu}$ kann entsprechend Gleichung (4.8) auf die Oszillatorstärke f geschlossen werden

$$f = (8\pi^2 / 3) (m_e \nu / h e^2) |\bar{\mu}|^2. \quad (4.8)$$

Hierbei ist m_e die Masse des Elektrons und e die dazugehörige Elementarladung, ν die Frequenz des eingestrahlten Lichtes, h das PLANCKSche Wirkungsquantum und $\bar{\mu}$ das Übergangsdipolmoment. Klassisch gesehen ist die Oszillatorstärke der effektive Bruchteil von Elektronen, der den betreffenden Übergang vollzieht. Wie das Übergangsdipolmoment $\bar{\mu}$ hängt die Oszillatorstärke f quantenmechanisch gesehen direkt von den Wellenfunktionen des Ausgangs- und Endzustands des Moleküls ab.

Für intensive, erlaubte Übergänge liegt die dimensionslose Oszillatorstärke nahe eins; ein verbotener Übergang hingegen besitzt eine sehr kleine Oszillatorstärke. Elektrisch erlaubte

Dipolübergänge besitzen deshalb eine Oszillatorstärke f von ungefähr 1; spin-verbotene Übergänge dagegen nur Oszillatorstärken von 10^{-5} .

Der Extinktionskoeffizient ε steigt ebenfalls mit der Wahrscheinlichkeit eines Übergangs an. Für einen erlaubten Übergang, der eine Oszillatorstärke nahe eins besitzt, kann der Extinktionskoeffizient Werte von bis zu 10^4 - $10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ annehmen. Der Extinktionskoeffizient ε ist eine von der Wellenlänge der einfallenden Strahlung abhängige Stoffkonstante und hat die Einheit $[1/\text{Konzentration}\cdot\text{Länge}]$. Für ein gesamtes Spektrum gibt man aufgrund der Wellenlängenabhängigkeit statt des Extinktionskoeffizienten, den so genannten integralen Absorptionskoeffizienten A , mit der Einheit $[\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$ an. Er ist mit der Oszillatorstärke f über folgende Beziehung verbunden:

$$f = \left(4 m_e c \varepsilon_0 \ln 10 / N_A e^2\right) A, \quad (4.9)$$

mit m_e der Masse und e der Elementarladung des Elektrons und h dem PLANCKSchen Wirkungsquantum, c der Lichtgeschwindigkeit, N_A der AVOGADRO-Konstanten und ε_0 der Dielektrizitätskonstanten im Vakuum.

Unter Berücksichtigung der Konstanten vereinfacht sich Gleichung (4.9) auf

$$f = 1,44 \cdot 10^{-19} A. \quad (4.10)$$

Auf der Grundlage der quantenmechanischen Definition des Übergangsdipolmoments ist ersichtlich, dass optische Übergänge nicht zwischen zwei beliebigen Zuständen möglich sind. Mit Hilfe so genannter Auswahlregeln können Übergänge als erlaubt ($\vec{\mu}_{21} \neq 0$) oder verboten ($\vec{\mu}_{21} = 0$) eingestuft werden. Erlaubte Übergänge finden mit einer hohen Wahrscheinlichkeit statt. Verbotene Übergänge sind hingegen möglich, aber weniger wahrscheinlich als erlaubte Übergänge. Je höher die Übergangswahrscheinlichkeit, umso höher ist auch die Intensität einer Bande.

Man unterscheidet verschiedene Auswahlregeln, die unter anderem die Symmetrie der beteiligten Orbitale, deren Überlappung, sowie den Spin des angeregten Elektrons betreffen. Ausgangspunkt für die verschiedenen Auswahlregeln sind einfache Systeme, die für komplexe Systeme nicht mehr streng gültig sind, aber die Grundlage für die Erklärung der optischen Übergänge bilden.

Wird die Symmetrie eines Moleküls herabgesetzt, steigt die Übergangswahrscheinlichkeit an. Die Regel von LAPORTE (Paritätsverbot, Symmetrieverbot) besagt für einfache Systeme wie es zentralsymmetrische Komplexe sind, dass nur solche Übergänge erlaubt sind, bei denen sich die Parität verändert, wohingegen Elektronenübergänge zwischen Orbitalen gleicher Parität verboten sind. Die Parität verändert sich, wenn die Wellenfunktionen der an einem elektronischen Übergang beteiligten Orbitale am Symmetriezentrum invertieren. Die Wellenfunktion geht bezüglich der Inversion am Symmetriezentrum von symmetrisch (gerade, „g“) in antisymmetrisch (ungerade, „u“) über. Durch Kernbewegungen kann die Symmetrie erniedrigt werden, so dass eigentlich symmetrie-verbotene Übergänge zu beobachten sind.

Unter bestimmten Bedingungen kann ein vorhandenes Übergangsdipolmoment verloren gehen (Überlappungsverbot). Das ist vor allem der Fall, wenn die Überlappung der Orbitale abnimmt oder die an dem Übergang beteiligten Orbitale überhaupt nicht überlappen wie das beispielsweise bei einem Ladungstransferkomplex der Fall ist. Hier erfolgt ein Elektronenübergang vom Donor- auf das Akzeptormolekül.

Neben Symmetrie und Überlappung der Orbitale beeinflusst der Gesamtspin S eines Moleküls die Intensität eines Übergangs. Der Gesamtspin S bzw. die Multiplizität (mögliche Orientierungen des Elektronenspins im äußeren Feld) $M = 2S+1$ darf sich während des Übergangs nicht ändern (Spinverbot). Dieses Übergangsverbot kann durch Einbau von schweren Atomen wie Schwefel, Phosphor oder Metalle gelockert werden, da die Spin-Bahn-Kopplung durch Atome mit hoher Kernladungszahl stärker wird. Optische Übergänge zwischen Singulett- und Triplettzuständen werden dann möglich; die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität bleibt jedoch sehr gering.

4.2.4 Linienbreite

Die Linienbreite ist über die Halbwertsbreite (FWHM, full width at half maximum) einer Bande entsprechend **Abb. 4.4** definiert.

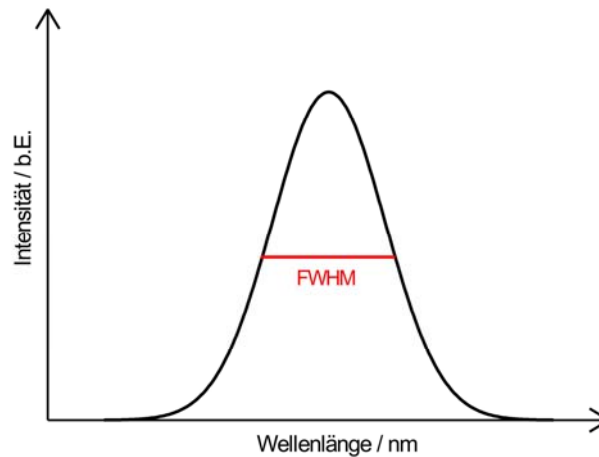


Abb. 4.4 Halbwertsbreite einer Spektrallinie.

Eine spektrale Linie kann im günstigsten Fall die natürliche Linienbreite besitzen. Die natürliche Linienbreite ist durch die Lebensdauer des angeregten Zustandes gegeben. Diesen Verbreiterungsmechanismus nennt man Unschärfe-Verbreiterung oder Lebensdauer-Verbreiterung. Die Energieunschärfe δE ist abhängig von der Lebensdauer τ eines Zustandes entsprechend

$$\delta E \approx \hbar / \tau . \quad (4.11)$$

Grundlage hierfür ist die HEISENBERGSCHES Unschärfetheorie, die besagt, dass es unmöglich ist, ein Energieniveau in endlicher Zeit beliebig genau zu bestimmen. Damit hat jeder angeregte Zustand eine endliche Lebensdauer, was zu einer Lebensdauer-Verbreiterung der beobachteten Banden führt. Je kürzer die Lebensdauer eines angeregten Zustandes ist, desto breiter werden die zugehörigen Spektrallinien. Die Lebensdauer ist eine für einen Übergang unter bestimmten Bedingungen charakteristische Größe. Die Lebensdauer-Verbreiterung wird zu den homogenen Linienverbreiterungsmechanismen gezählt.

Man kann zwei Arten von Linienverbreiterungsmechanismen unterscheiden: die homogene Linienverbreiterung und die inhomogene Linienverbreiterung. Bei der homogenen Linien-

verbreiterung kommen Mechanismen zum Tragen, die sich auf alle Moleküle eines Ensembles gleich auswirken. Die homogene Linienbreite ist unter anderem das Ergebnis der Wechselwirkung des Pigments mit seiner Umgebung, d.h. dem Lösungsmittel oder dem umgebenden Protein. Die Energieniveaus des Pigments spüren die Umgebungsmoleküle und deren Bewegungen, wodurch die Energie der elektronischen Zustände beeinflusst wird. Dadurch tritt ein Phasenverlust mit dem anregenden Licht innerhalb der Zeit T_2^* , der Dephasierungszeit auf. Mit steigender Temperatur nimmt die Bewegung der Moleküle zu. Das Ergebnis sind Fluktuationen im Energiegehalt der elektronischen Zustände, was eine Fluktuation der zugehörigen Absorptions- und Emissionsfrequenzen zur Folge hat. Eine homogene Spektrallinie lässt sich durch eine LORENTZlinie beschreiben. Neben der Lebensdauer-Verbreiterung zählen zur homogenen Linienverbreiterung die Stoßverbreiterung infolge von Stoßprozessen zwischen den Molekülen einer Probe und die Sättigungsverbreiterung, bei der sich durch hohe Anregungsleistungen die Besetzungsverhältnisse im Molekül verändern.

Im Gegensatz zur homogenen Linienverbreiterung wirken sich die Mechanismen der inhomogenen Linienverbreiterung auf die Moleküle eines Ensembles unterschiedlich aus. Die inhomogene Linienverbreiterung entsteht zum einen durch die DOPPLER-Verbreiterung, die abhängig von der Geschwindigkeit der Moleküle ist, und zum anderen durch statistische Unordnung in der Umgebung, in die das Molekül eingebettet ist. Die Spektrallinien gehen durch die inhomogene Linienverbreiterung in GAUSSförmige Banden über.

Bei tiefen Temperaturen reduziert sich die Anzahl der Linienverbreiterungsmechanismen. In starren Systemen haben Stoß-Deaktivierungsprozesse und die DOPPLER-Verbreiterung keine Relevanz mehr. Eine Verbreiterung der Linie ist dann das Ergebnis der Unschärfe-Verbreiterung, der Sättigungsverbreiterung und struktureller Inhomogenitäten. Die strukturellen Inhomogenitäten können durch den Einfrierprozess verstärkt werden, vor allem wenn als Medium ein amorpher Festkörper wie Glas oder Glycerol im gefrorenen Zustand verwendet wird. Dadurch gibt es unterschiedliche lokale elektrische Felder, in denen die einzelnen Moleküle eingebettet sind. Diese Felder beeinflussen wiederum die energetische Lage der einzelnen Zustände und somit die Absorptions- und Emissionsfrequenzen.

Bei der Untersuchung der PSI-Komplexe kann außerdem die Sättigungsverbreiterung vernachlässigt werden, da nicht die fluoreszierenden Pigmente angeregt werden, sondern das Antennensystem. Von dort wird die Anregungsenergie auf die roten Chlorophyllpools übertragen. Für Untersuchungen bei tiefen Temperaturen und durch die indirekte Anregung der roten Chlorophylle verringert sich die Anzahl der Linienverbreiterungsmechanismen letzt-

endlich auf die Unschärfe-Verbreiterung und auf die Verbreiterung durch unterschiedliche Umgebungen.

4.2.5 Einfluss der Temperatur auf die spektrale Bande

Die Besetzungswahrscheinlichkeit der elektronischen Zustände sowie der Schwingungs- und Rotationszustände kann im thermodynamischen Gleichgewicht über eine BOLTZMANN-Verteilung entsprechend

$$N_2 / N_1 = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad (4.12)$$

beschrieben werden. N_1 und N_2 sind dabei die Besetzungszahlen von zwei Energieniveaus, ΔE die Energiedifferenz zwischen den Energieniveaus und $k_B T$ ist die thermische Energie, die das Produkt aus Temperatur und BOLTZMANN-Konstante ist. Bei Raumtemperatur beträgt die thermische Energie $k_B T$ ungefähr 200 cm^{-1} . Da der erste elektronisch angeregte Zustand eines Moleküls in der Regel bei Raumtemperatur mit 10^4 cm^{-1} über dem Grundzustand liegt, ist der erste angeregte Zustand so gut wie nicht besetzt und die Übergänge gehen praktisch vom elektronischen Grundzustand aus. Die Energiedifferenz zwischen den vibronischen Zuständen und den Rotationszuständen liegt zwischen $10^2 - 10^3 \text{ cm}^{-1}$ für die Schwingungszustände und zwischen $1 - 100 \text{ cm}^{-1}$ für die Rotationszustände. Demnach sind bei Raumtemperatur höhere Rotations- und Schwingungszustände besetzt. Bei Abnahme der Temperatur sinkt die thermische Energie $k_B T$ ab. Dadurch verringert sich auch die Besetzungswahrscheinlichkeit angeregter Zustände. Im Spektrum äußert sich dies durch schmalere Banden. Bei Raumtemperatur verbreitern sich durch eine erhöhte Besetzungswahrscheinlichkeit angeregter Niveaus die spektralen Banden, was eine eindeutige Bestimmung der Maxima der Banden schwierig macht.

Aus diesem Grund findet sich in der Literatur für die roten Chlorophyllpools von Photosystem I eine Vielzahl von unterschiedlichen Absorptions- bzw. Fluoreszenzwavelengthen. Zusätzlich erfahren sowohl Absorptionsbande als auch Emissionsbande bei Raumtemperatur im Gegensatz zu tiefen Temperaturen eine Blauverschiebung. Diese hypsochrome Verschiebung kann bis zu 6 nm betragen. Tiefe Temperaturen hingegen können Abstandsänderungen zwischen den Pigmenten innerhalb eines Protein-Pigment-Komplexes induzieren,

was eine Erhöhung bzw. eine Abnahme der exzitonischen Kopplung zwischen den Pigmenten zur Folge haben kann und die spektrale Lage beeinflusst.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Absorptions- und Fluoreszenzbanden bei Raumtemperatur gegenüber tiefen Temperaturen eine Linienverbreiterung und eine Blauverschiebung erfahren.

Für Photosystem I, das neben den Antennen-Chlorophyllen, Chlorophylle besitzt, die energetisch tiefer als der erste Elektronendonator liegen, ergibt sich bei tiefen Temperaturen folgendes: erst durch das Abkühlen der Probe wird eine Energieübertragung von den roten Chlorophyllen zum Reaktionszentrum unterbunden, wodurch die roten Chlorophylle die Anregungsenergie als Fluoreszenz emittieren können. Unter Raumtemperaturbedingungen wird fast die gesamte Energie auf das Reaktionszentrum übertragen. Die Fluoreszenzquantenausbeute von PSI beträgt deshalb bei Raumtemperatur nur 1%, steigt aber mit fallender Temperatur an.

4.3 Bedeutung der physikalischen Grundlagen für die Einzelmolekülspektroskopie

Bei der Einzelmolekülspektroskopie treten die meisten Linienverbreiterungsmechanismen nicht mehr auf, da sich diese auf ein Ensemble beziehen. Für ein einzelnes Molekül ist deshalb nur die natürliche Linienbreite und aufgrund der Mittlungszeit für die einzelnen Spektren die inhomogene Linienverbreiterung aufgrund struktureller Inhomogenitäten von Bedeutung. Ebenso sind durch Messung bei tiefen Temperaturen Rotationsübergänge aufgrund der starren Matrix nicht mehr möglich. Durch die Messung einzelner Komplexe bei tiefen Temperaturen werden die Banden sehr viel strukturierter. In den Einzelmolekülspektren können die Nullphononenlinie (NPL) und die Phononenseitenbande (PSB) der einzelnen Emittent detektiert werden [12,91]. Dies ist schematisch in **Abb. 4.5** gezeigt.

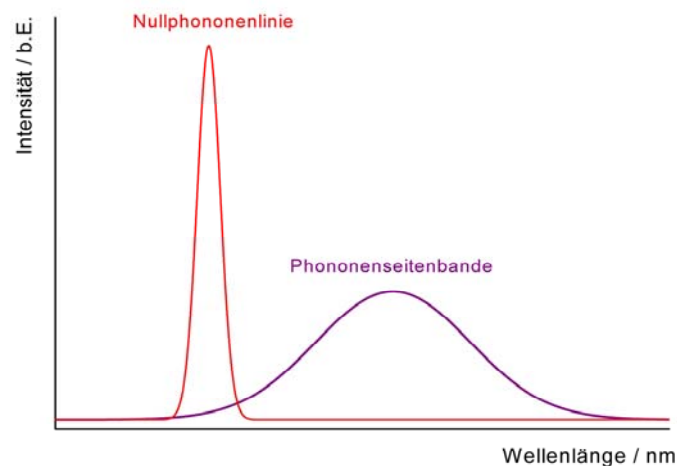


Abb. 4.5 Nullphononenlinie und Phononenseitenbande. Während die Nullphononenlinie durch den Übergang zwischen dem untersten vibronischen Zustand des ersten elektronischen Zustands und dem untersten vibronischen Zustand des elektronischen Grundzustands entsteht, ist die Phononenseitenbande das Ergebnis mehrerer vibronischer Übergänge.

Als Nullphononenlinie wird die Bande bezeichnet, die durch einen reinen elektronischen Übergang aus dem tiefsten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands zum niedrigsten Schwingungszustand des ersten elektronisch angeregten Zustands entsteht (Null-Null-Übergang). Das Ergebnis ist eine schmale Bande, deren Frequenz durch die Umgebung des Chromophors beeinflusst wird und somit der inhomogenen Linienbreite entspricht. Oft ist die Nullphononenlinie durch eine ausgeprägte Phononenseitenbande vor allem bei Raumtemperatur-Messungen überlagert. Die Intensität und die Linienbreite der Phononenseitenbande werden durch die Elektronen-Phononen-Kopplung bestimmt. Eine starke Elektronen-Phononen-Kopplung liegt vor, wenn das Molekül nach Anregung eine große geometrische Veränderung verbunden mit einer großen Veränderung der elektronischen Ladungsverteilung, erfährt. Die Kopplungsstärke kann deshalb über die Verschiebung der Potentialkurve des angeregten Zustandes bezüglich der Potentialkurve des Grundzustandes erklärt werden.

Die Kopplungsstärke zwischen Nullphononenlinie und Phononenseitenbande wird über den HUANG-RHYS-Faktor S bzw. über den DEBYE-WALLER-Faktor α_{DW} angegeben. Während der HUANG-RHYS-Faktor quantenmechanisch über den STOKES Shift und die Phononenenergie entsprechend Gleichung (4.13), mit E_A als Anregungsenergie, E_E als Emissionsenergie und $\hbar \cdot \omega_i$ der Differenz zwischen den Schwingungsmoden ermittelt werden kann,

$$S = \frac{E_A - E_E}{\hbar \cdot \omega_i}, \quad (4.13)$$

wird der DEBYE-WALLER-Faktor α_{DW} nach Gleichung (4.14) direkt aus einem Spektrum als Verhältnis aus Intensität der Nullphononenlinie zur Summe aus Gesamtintensität aus Nullphononenlinie und Phononenseitenbande ermittelt

$$\alpha_{DW} = \frac{I_{NPL}}{I_{NPL} + I_{PSB}}. \quad (4.14)$$

Für Temperaturen um 0 K ist der HUANG-RHYS-Faktor entsprechend Gleichung (4.15) mit dem DEBYE-WALLER-Faktor verbunden

$$\alpha_{DW} = e^{-S(T)}. \quad (4.15)$$

Für höhere Temperaturen kann der DEBYE-WALLER-Faktor durch den so genannten FRANCK-CONDON-Faktor FC ersetzt werden (Gleichung (4.16)) [92]

$$FC = e^{-S(T)}. \quad (4.16)$$

Einzelmolekülmessungen bei tiefen Temperaturen ermöglichen die Detektion der Nullphononenlinie und der Phononenseitenbande.

Zusätzlich sind in Einzelmolekülspektren spektrale Sprünge einzelner Emissionsbanden zu sehen, die aufgrund der Linienbreite der Banden in Spektren von Ensemble-Proben nicht aufgelöst werden können. Dieses Phänomen wird als spektrale Diffusion bezeichnet, Hierbei strahlt ein Emittor Fluoreszenz leicht unterschiedlicher Wellenlänge ab. Die spektralen Sprünge der Emissionswellenlänge werden durch strukturelle Veränderungen in der Umgebung des Emittors hervorgerufen. Dadurch werden die Wellenfunktionen der elektronischen Zustände der emittierenden Moleküle und somit ihre energetische Lage beeinflusst. In Einzelmolekülspektren führen spektrale Sprünge einerseits zu unterschiedlichen Emissionsmaxima und andererseits zu einer Zunahme der Linienbreite einzelner Banden, da eine Fluoreszenzbande das Ergebnis der Summe vieler Zyklen eines einzigen Prozesses (nämlich des optischen Über-

gangs zwischen zwei Zuständen, d.h. der Absorption und Emission) in einem Zeitintervall ist. Das Zeitintervall ist gegeben durch die Aufnahmedauer des Spektrums.

Anhand der theoretischen Vorüberlegungen und den für die Einzelmolekülspektroskopie aufgezeigten Besonderheiten sollen die Fluoreszenzemissionsspektren von Photosystem I aus den Cyanobakterien *A. platensis* und *TS. elongatus* genauer analysiert und diskutiert werden.

5 Experimenteller Aufbau und Probenpräparation

Photosystem I-Komplexe zeigen aufgrund ihres biologischen Ursprungs und des komplexen Aufbaus aus verschiedenen Protein-Untereinheiten, einer Vielzahl an Pigmenten und durch die Trimerisierung eine große Heterogenität innerhalb eines Ensembles von PSI-Komplexen. Diese Heterogenität spiegelt sich auch in den photophysikalischen Eigenschaften wider. Etablierte, spektroskopische Verfahren, die sich auf Messungen am Ensemble beziehen, führen zu einer Mittelung der physikalischen Messgrößen. Eine exakte Bestimmung der physikalischen Eigenschaften, insbesondere der Heterogenität, lassen solche Verfahren nicht zu. Durch *site*-selektive Spektroskopieverfahren wie das spektrale Lochbrennen [57] und die Einzelmolekülspektroskopie [93] können diese Probleme, wie sie bei der herkömmlichen Spektroskopie auftreten, vermieden werden.

Um neue Kenntnisse über die roten Chlorophyllpools der Photosystem I-Komplexe zu erhalten, wurde die Fluoreszenzemission dieser Pools auf Einzelmolekülebene genauer untersucht. Während im Absorptionsspektrum von PSI die roten Chlorophyllpools aufgrund ihrer geringen Anzahl im Vergleich zu den restlichen Antennen-Chlorophyllen nur als schwache Schulter in der roten Flanke der ausgeprägten Absorptionsbande der Antennen-Chlorophylle zu erkennen sind, dominieren die roten Chlorophyllpools das Fluoreszenzemissionsspektrum von PSI. Voraussetzung für die Detektion der Fluoreszenz ist eine Erniedrigung der Temperatur auf mindestens $k_B T < \Delta E$ (roter Chlorophyllpool-Reaktionszentrum), damit ein *uphill*-Energietransfer von den roten Chlorophyllpools zum Reaktionszentrum verhindert

wird. Die Untersuchung der Fluoreszenzemission der roten Chlorophyllpools auf Einzelmolekülebene ermöglicht somit, neue Erkenntnisse über strukturelle und photophysikalische Eigenschaften der roten Chlorophyllpools zu erlangen.

5.1 Einzelmolekülspektroskopie

Unter dem Begriff der „Spektroskopie“ werden alle Untersuchungsmethoden zusammengefasst, die auf der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie beruhen. Spektroskopische Untersuchungen liefern Informationen über den Aufbau von Atomen oder Informationen über die Struktur von Molekülen auf der Grundlage ihrer energetischen Konfiguration. Absorptionsspektroskopische und fluoreszenzspektroskopische Methoden sind klassische Beispiele aus dem Gebiet der optischen Spektroskopie. Auf der Basis dieser spektroskopischen Methoden wurde die Einzelmolekülspektroskopie entwickelt. Bis zu diesem Zeitpunkt konnten physikalische Parameter nur als Durchschnittswert über alle Einzelwerte aller Moleküle eines Ensembles ermittelt werden. Der Wert eines Parameters eines einzelnen Moleküls blieb aber unzugänglich - bis in den 80er Jahren von den Arbeitsgruppen MOERNER [94] und ORRIT [13] zum ersten Mal einzelne Moleküle nachgewiesen werden konnten. Durch die Kombination der optischen Spektroskopie, die eine spektrale Selektion der Moleküle ermöglicht, mit der konfokalen Mikroskopie, die eine räumliche Selektion der Probe erlaubt, wird das Auflösungsvermögen soweit erhöht, dass die Detektion einzelner Moleküle in einer stark verdünnten Probe möglich ist.

Die Einzelmolekülspektroskopie liefert darüber hinaus Momentaufnahmen eines jeden untersuchten Moleküls, da sich jedes Molekül zu einer bestimmten Zeit nur in einem bestimmten Zustand aufhalten kann. Durch die Beobachtung eines einzelnen Moleküls, wird die Durchschnittsbildung eines Parameters über ein Ensemble eliminiert. Das heterogene Verhalten der Moleküle in einem Ensemble wird normalerweise in einer Wahrscheinlichkeitsverteilung der aus dieser Ensemble-Messung ermittelten Werte deutlich. Neben einer direkten Untersuchung der Heterogenität einer Probe bzw. eines Molekül-Ensembles, ermöglicht die Einzelmolekülspektroskopie eine direkte Beobachtung dynamischer Prozesse wie Quantensprünge innerhalb eines einzelnen Moleküls.

Voraussetzung für die Anwendung der Einzelmolekülspektroskopie ist eine hohe Photostabilität, die es erlaubt, das Molekül über eine bestimmte Zeitdauer zu untersuchen. Bei Untersuchungsmethoden, bei denen die Fluoreszenz detektiert werden soll, ist außerdem eine

hohe Fluoreszenzquantenausbeute von Vorteil. Begrenzt wird die Untersuchungsdauer bei Fluoreszenzmethoden oftmals von einem Phänomen namens Photobleichen. Unter Photobleichen versteht man einen lichtinduzierten Verlust an Fluoreszenz, vermutlich aufgrund von photochemischen Veränderungen wie z.B. einer Oxidation innerhalb des Moleküls. Dadurch ändert sich die elektronische Konfiguration des Moleküls und mit ihr die photophysikalischen Eigenschaften. Durch Einfrieren der Probe kann das Photobleichen durch Ausschluss von Luft bzw. Sauerstoff vermindert werden. Bei Raumtemperatur-Messungen hingegen stellt das Ausbleichen der Probe einen limitierenden Faktor dar. Für lichtempfindliche Moleküle, die bei Raumtemperatur nicht untersucht werden können, ist die Messung bei tiefen Temperaturen (Temperaturen zwischen 1,6 - 77 K) die Methode der Wahl.

Messungen auf Einzelmolekülebene setzen eine stark verdünnte Probe voraus. Eine hohe Verdünnung reicht aber nicht aus, um einzelne Moleküle detektieren und untersuchen zu können. Durch Minimierung des Detektionsvolumens mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops wird erreicht, dass sich im Mittel deutlich weniger als ein Molekül im Fokus befindet. Im folgenden Abschnitt wird der zur Untersuchung einzelner Photosystem I-Komplexe verwendete Aufbau vorgestellt.

5.2 Das konfokale Laserscanning-Mikroskop

Ein konfokales Mikroskop besteht wie ein Lichtmikroskop aus einem Mikroskopobjektiv, einer Lichtquelle und einem Detektor. Zusätzlich befindet sich zwischen Objektiv und Detektor eine Lochblende, durch die das Auflösungsvermögen des optischen Systems um einen Faktor 1,5 erhöht wird. Die räumliche Auflösung δ lässt sich über die ABBESche Gleichung

$$\delta = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} \quad (5.1)$$

berechnen. In der Gleichung für die räumliche Auflösung steht λ für die Wellenlänge der Fluoreszenz und NA für die Numerische Apertur des Mikroskopobjektivs.

Im Fall eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops wird die Probe durch einen Laserstrahl angeregt. Dabei wird nur ein durch den Fokus begrenzter Bereich auf der Probe beleuchtet. Nur die Moleküle, die sich in dem durch den Laserstrahl definierten Bereich der Probe befinden, werden angeregt und emittieren Fluoreszenz, die von einem Detektor aufgefangen wird.

Streulicht, welches nicht direkt aus der Probe in der Fokusebene des Mikroskopobjektivs stammt, wird durch eine Lochblende (konfokale Apertur), die sich zwischen Objektiv und Detektor befindet, aus dem Detektionsstrahlengang herausgefiltert (**Abb. 5.1**).

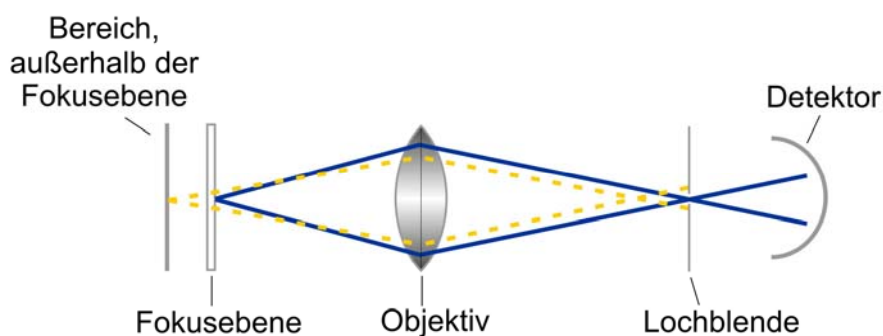


Abb. 5.1 Schema des Detektionsstrahlengangs eines konfokalen Mikroskops, bei dem sich die Probe in (blauer Strahlengang) und außerhalb (gelber Strahlengang) der Fokusebene befindet. Licht, welches nicht von Molekülen stammt, die in der Fokusebene liegen, wird durch die Lochblende blockiert und erreicht somit nicht den Detektor.

Mit dem konfokalen Mikroskop lässt sich somit im Gegensatz zu einem konventionellen Mikroskop ein definierter Punkt auf der Probe abbilden. Um ein zweidimensionales Bild der Probe zu erhalten, wird die Probe Punkt für Punkt mit einem Laser mittels eines Spiegel-scanners (GENERAL SCANNING, INC.) abgescannt (**Abb. 5.2A**).

Die PSI-Probe wird stark verdünnt und in der Probenkammer eines Badkryostaten (JANIS; SVT-200) fixiert. Eine Abkühlung der Probe erfolgt mit Hilfe superfluiden Heliums auf 1,6 K. Durch ein Kryostatenfenster tritt ein leistungsstabilisierter, linear-polarisierter Laserstrahl (Leistungsstabilisator: CONOPTICS, 350-105 E.O. Modulator) in den Kryostaten ein. Über ein Tieftemperaturobjektiv (Firmen: BERNHARD-HALLE NACHFOLGER und MIKROTEK) wird der Laser auf die Probe fokussiert. Eine optimale Fokussierung des Lasers auf einen einzelnen PSI-Komplex erfolgt indem die maximale Intensität in einem so genannten *timetrace* nachgewiesen wird. In einem *timetrace* können auch Fluoreszenzschwankungen aufgrund dynamischer Prozesse innerhalb des Komplexes in einen Zeitbereich von bis zu 10 ms detektiert werden (**Abb. 5.2B** und **Abb. 5.2C**).

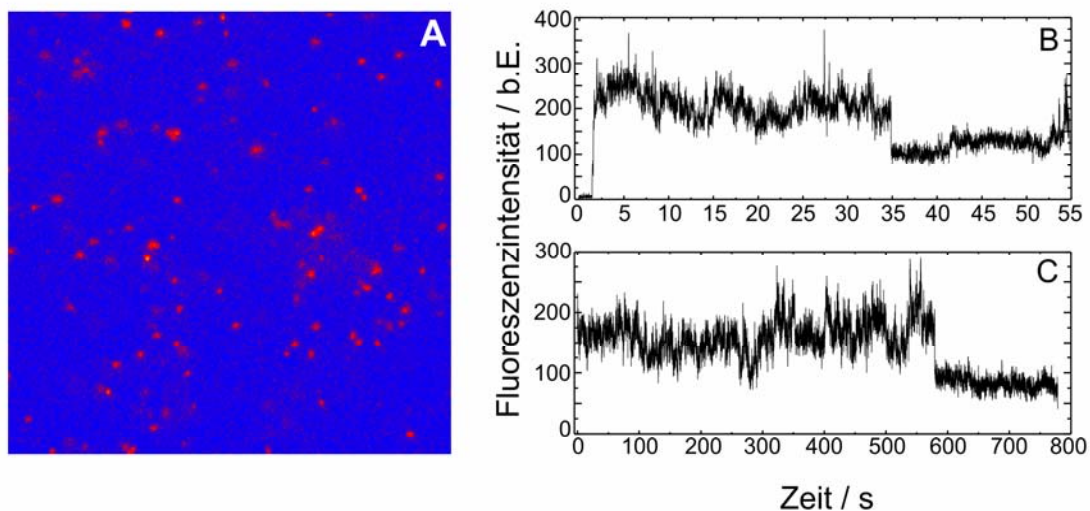


Abb. 5.2 (A) Zweidimensionaler Scan einer PSI-Probe. Der Laser wurde mittels eines Spiegelscanners entlang der x - und y -Achse verschoben. Die einzelnen PSI-Komplexe sind deutlich als rote Punkte zu erkennen. Der Scanbereich beträgt $(60\mu\text{m})^2$. (B) zeigt einen timetrace, der bei der Fokussierung des Lasers auf einen PSI-Komplex aufgenommen wurde; in (C) ist ein photodynamischer Prozess innerhalb des PSI-Komplexes gezeigt.

Zur Anregung der PSI-Komplexe wurde ein Farbstoff-Ringlaser der Firma COHERENT (Modell CR 699) eingesetzt, der mit DCM als Farbstoff betrieben wurde; die Linienbreite des Farbstofflasers beträgt 1 cm^{-1} . Gepumpt wurde der Farbstofflaser mit einem Argonionen-Laser (COHERENT, Innova300).

Die Anregungswellenlänge wurde auf 672 nm eingestellt, so dass eine Anregung der PSI-Komplexe über die Antenne von PSI erfolgen konnte. Die Einstellung der Laserintensität erfolgte mit Hilfe eines Filterrades (EDMUND SCIENTIFIC, OD 0-4); durch den Einbau des Kurzpassfilters SP675 (OMEGA SCIENTIFIC) wurde Licht mit Wellenlängen größer als 675 nm aus dem Anregungsstrahlengang entfernt. Über eine single-mode, polarisationserhaltende Faser (NEWPORT), den Leistungsstabilisator und einen Quarzkeil als Strahlteiler (BERNHARDHALLE NACHFOLGER) wird der linear polarisierte Anregungsstrahl auf ein telezentrisches Linsensystem mit einer Brennweite von je 25 cm gelenkt. Das telezentrische Linsensystem ermöglicht das Abrastern der Probe, indem es den Laserstrahl, der durch den Spiegelscanner abgelenkt wird, in das Objektiv im Kryostaten leitet. Durch die Verkippung des Laserstrahls über den Spiegelscanner und die Fokussierung des abgelenkten Laserstrahls über das telezentrische Linsensystem ist ein kontrolliertes Abscannen der Probe im Fokus des Tieftemperaturobjektivs möglich.

Die emittierte Fluoreszenz der PSI-Komplexe wird über dasselbe Objektiv, das den Laserstrahl auf die Probe fokussiert, aufgesammelt und kollimiert. Über einen um 90° gekippten, flachen Silberspiegel wird der Fluoreszenzstrahl aus den Kryostaten geleitet. Ein Aufbau, bei dem Anregungslicht und Fluoreszenzlicht über dasselbe Objektiv fokussiert bzw. eingesammelt wird, nennt sich Epifluoreszenz-Aufbau. Die Tieftemperaturobjektive der Firma MIKROTEK und der Firma BERNHARD-HALLE NACHFOLGER haben jeweils eine Numerische Apertur von 0,85 und besitzen eine Vergrößerung von 65 (BERNHARD-HALLE NACHFOLGER) bzw. eine 60fache Vergrößerung (MIKROTEK). Während das Tieftemperaturobjektiv der Firma BERNHARD-HALLE NACHFOLGER auf unendlich korrigiert ist, besitzt das Objektiv der Firma MIKROTEK eine Korrektur auf 160 mm. Der Fluoreszenzstrahl wird über das telezentrische Linsensystem und den Spiegelscanner zum Strahlteiler geleitet, wo der Detektionsstrahl vom Anregungsstrahl getrennt wird. Nach dem Strahlteiler und vor der konfokalen Apertur (THORLABS) sind zur Beseitigung von restlichem Laserlicht eine Blende (THORLABS), ein holographischer Notchfilter bei 675 nm (KAISER, 675 Notch Plus) und ein Langpassfilter LP679 (OMEGA FILTERS, LP675) eingebaut. Die Öffnung der eingebauten Lochblende hat einen Durchmesser von $50\ \mu\text{m}$ und lässt nur Licht, welches direkt aus der Fokusebene des Objektivs stammt, hindurch.

Die erhöhte Auflösung eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops ist das Ergebnis einer beugungsbegrenzten Fokussierung durch einen beugungsbegrenzten Laserspot auf die Probe. Hierdurch wird eine minimale laterale Ausdehnung (Ausdehnung senkrecht zur optischen Achse) des Detektionsvolumens erreicht, und durch die Verwendung einer konfokalen Apertur, die axiale Auflösung (Ausweitung entlang der optischen Achse) des Mikroskops erhöht. Durch die Reduzierung der Tiefe in der Bildauflösung auf wenige Mikrometer erhält man einen geringeren Hintergrund, wodurch sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis vergrößert. Nach Durchgang des Detektionsstrahls durch die Lochblende, erfolgt eine Refokussierung des Fluoreszenzstrahls auf den Detektor. Der Detektionsstrahl wird entweder auf eine Avalanche Photodiode (APD) (PERKIN-ELMER, APD-SPCM 14) gelenkt oder auf den Eingangsspalt eines Gitter-Spektrometers (ACTON RESEARCH INC., SpectraPro 300i) fokussiert (**Abb. 5.3**).

Die Detektionseffizienz des vorgestellten Aufbaus liegt bei ca. $\sim 0,5\%$, maximal bei 1% [95].

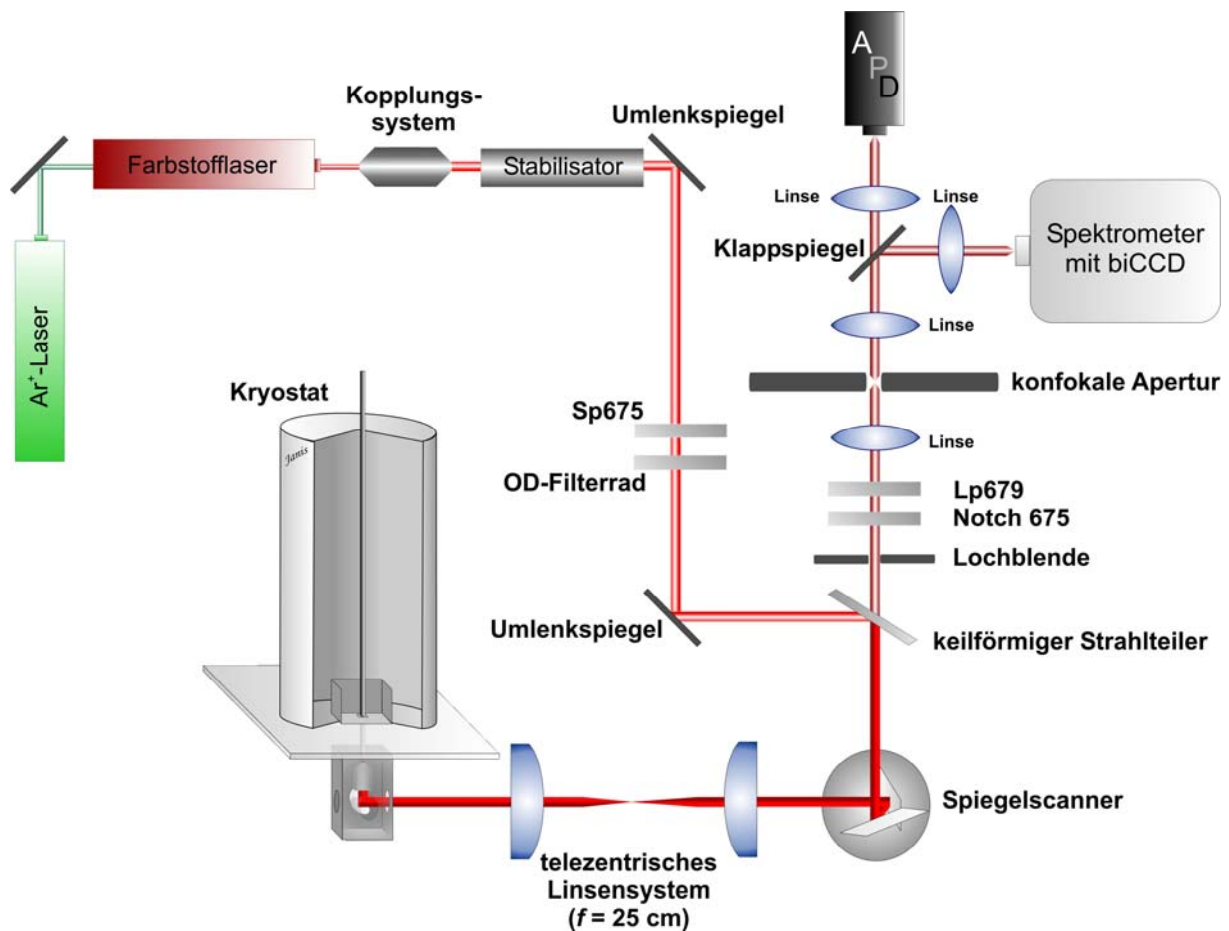


Abb. 5.3 Schema des konfokalen Laserscanning-Mikroskops, welches innerhalb eines Temperaturbereichs zwischen 300 K und 1,6 K arbeiten kann.

5.2.1 Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren

Durch das Spektrometer erfolgt eine spektrale Aufspaltung des emittierten Fluoreszenzlichtes. Zur Detektion der spektral getrennten Photonen wird eine rückbeleuchtete, mit Flüssigstickstoff gekühlte CCD (*charge-coupled device*)-Kamera (ROOPER SCIENTIFIC, 100EB) verwendet. Durch die Kühlung erhält die Kamera eine hohe Quanteneffizienz zwischen 50 und 75% und zeigt nahezu keine Dunkelrate. Vor allem für lichtschwache Moleküle, wie PSI, sind lange Akkumulationszeiten ohne großen instrumentellen Hintergrund Voraussetzung für die Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren.

5.2.2 Messung der Autokorrelationsfunktion

Mittels eines Klappspiegels kann der Detektionsstrahl anstatt zum Spektrometer zu der Avalanche Photodiode (APD) gelenkt werden, die mit einer Photonen-zählelektronik verbunden ist (Messkarte: BECKER & HICKL, MSA 300). Die APD besitzt als zentrales Element einen Festkörper-Halbleiter, der nach Belichtung Elektronen-Loch-Paare generiert. Durch Anlegen einer Spannung werden die Elektronen in dem Halbleiter so stark beschleunigt, dass sie durch Kollision mit Atomen des Halbleiters weitere Elektronen-Loch-Paare bilden, wodurch letztendlich eine Lawine von Elektronen ausgelöst wird. Dadurch kann eine Signalverstärkung um drei Größenordnungen erreicht werden. Der Untergrund der APD setzt sich aus Streulicht und der Dunkelzählrate (30 *counts per seconds*) der APD zusammen. Bei der Detektion einzelner Photonen werden Spannungspulse gemessen, die durch die einzelnen Photonen generiert werden. Jeder Spannungspuls wird als TTL-Puls an einen Rechner weitergeleitet und in einem Zeitregister bezogen auf die Ankunftszeit abgespeichert. Die Zuordnung der ankommenden Photonen zu bestimmten Zeiten bzw. die Messung der Zeit zwischen den detektierten Photonen erfolgt mittels der Messkarte. Solche Versuchsanordnungen lassen Messungen dynamischer Prozesse mit Zeitkonstanten bis zu 150 ns zu.

Nach Detektion eines Photons, d.h. nach Erzeugung eines elektrischen Spannungspulses in der APD, benötigt die APD eine gewisse Zeit, um wieder den aktiven Arbeitsmodus zu erreichen. Diese Zeit vom Einschlag eines Photons bis ein weiteres Photon detektiert werden kann, nennt man die Totzeit der APD. Diese obere Grenze der zeitlichen Auflösung kann durch Verwendung einer zweiten APD erhöht werden. Der Photonenstrahl, der von einem Molekül emittiert wird, wird mittels eines 50:50 Strahlteilers aufgetrennt und auf zwei APDs fokussiert. Während die erste APD bei Eintreffen eines Photons ein Startsignal auslöst, generiert die zweite APD nach Detektion eines weiteren Photons das Stoppsignal im so genannten Time-to-Amplitude Converter. Damit kann die Verteilung der Zeitintervalle zwischen den Ankunftszeiten aufeinander folgender Photonenpaare entsprechend der klassischen Versuchsanordnung nach HANBURY-BROWN und TWISS gemessen werden [96,97]. Dynamische Prozesse mit Zeitkonstanten von bis zu 5 ns können mit dieser Versuchsanordnung erfasst werden (**Abb. 5.4**).

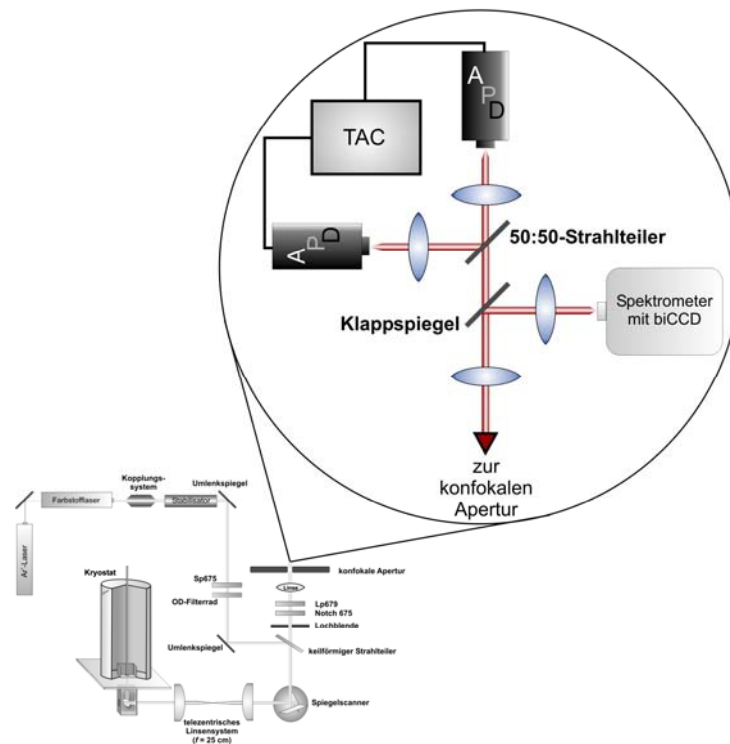


Abb. 5.4 Vergrößerung der Detektoreinheit eines Aufbaus mit zwei Avalanche-Photodioden nach der Vorlage von HANBURY-BROWN und TWISS zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung. Der Time-to-Amplitude Converter (TAC) wandelt die Zeitverzögerung von zwei Pulsen aus den zwei Photodioden in einen Spannungspuls um.

5.2.3 Untersuchung der Fluoreszenzpolarisation

Zur Durchführung einer Fluoreszenzpolarisationsanalyse wurde nach der konfokalen Apertur ein Polarisator (LINOS) in den Aufbau eingebaut. Der Polarisator kann elektrisch mit einem Schrittmotor (OWIS) angetrieben werden. Die Eingabe des Drehwinkels des Polarisators erfolgt Software gesteuert und wurde von einem Schrittmotor auf den Polarisator übertragen. Nach Fokussierung des Laserstrahls auf einen PSI-Komplex wurde für jede Polarisatorstellung ein Fluoreszenzemissionsspektrum aufgenommen. **Abb. 5.5** zeigt die zur Durchführung der Fluoreszenzpolarisationsanalyse notwendige Modifizierung des Aufbaus.

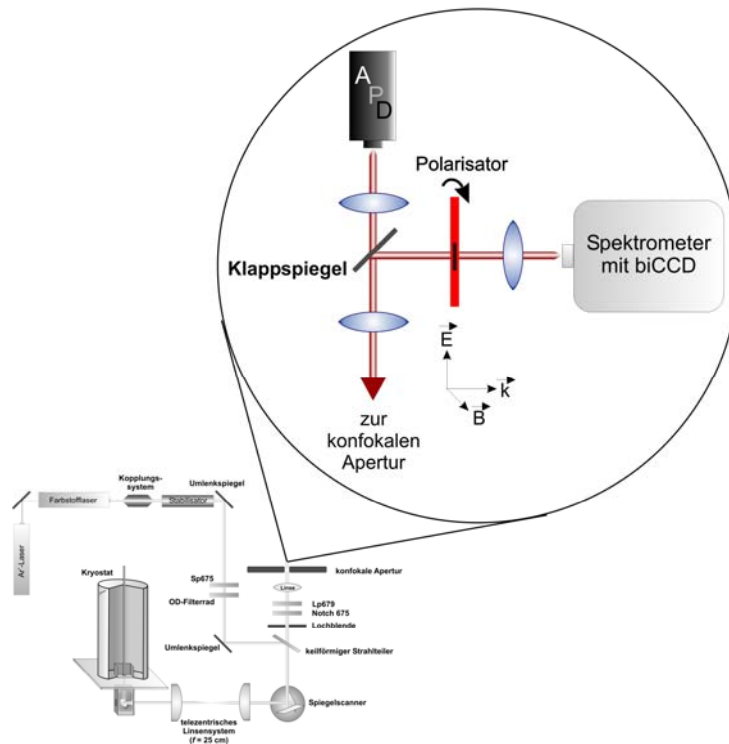


Abb. 5.5 Modifizierung des konfokalen Laser-Rastermikroskops zur Untersuchung der Polarisation der emittierten Fluoreszenz. Zwischen konfokaler Apertur und Spektrometer wurde ein elektrisch angetriebener Polarisator eingebaut.

5.3 Probenpräparation

5.3.1 Proben

Die Untersuchung der roten Chlorophyllpools wurde an PSI-Komplexen aus zwei verschiedenen Arten von Cyanobakterien durchgeführt. Die Kultivierung der Cyanobakterien sowie die Isolierung und Aufreinigung der PSI-Komplexe erfolgte für die PSI-Trimere aus *Thermosynechococcus elongatus* in der Arbeitsgruppe von PETRA FROMME (MAX VOLMER Laboratorium für Biophysikalische Chemie, TU Berlin, jetzt Arizona State University) entsprechend [98] und für monomeres PSI aus *TS. elongatus* von FRANK MUEH in der Arbeitsgruppe von DIETMAR STEHLIK (FU, Berlin). Trimere PSI-Komplexe aus *Arthrospira platensis* wurden von NAVASSARD V. KARAPETYAN (A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moskow) zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht der verwendeten Proben zeigt **Tab. 5.1**.

Tab. 5.1 Übersicht über die untersuchten PSI-Proben mit dem dazugehörigem Oligomerisierungsgrad.

Organismus	Oligomerisierungsgrad von PSI
<i>Arthrospira platensis</i>	Trimer
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	Trimer
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	Monomer

Anmerkung zu den Monomeren

Laut Hersteller der PSI-Monomere können aufgrund der Monomerisierungsmethode ein Teil der Protein-Untereinheiten fehlen. Dies kann folgende Untereinheiten betreffen: PsaD, PsaE, PsaF, PsaL, PsaJ, PsaI partiell, eventuell könnte auch PsaC fehlen. Da die meisten Chlorophylle von den Protein-Untereinheiten PsaA/PsaB gebunden werden, würden demnach im schlimmsten Fall insgesamt 6 Chlorophylle fehlen, von denen drei von der Untereinheit PsaJ und drei von der Untereinheit PsaL gebunden würden. Durch das Fehlen eines Teils der Protein-Untereinheiten kann sich die räumliche Struktur des verbleibenden Proteinkomplexes verändern; dies könnte Auswirkungen für die photophysikalischen und spektralen Eigenschaften der Pigmente haben. Ein Teil der untersuchten PSI-Monomere zeigt im Vergleich zu den PSI-Trimeren leichte spektrale Verschiebungen der Fluoreszenzbanden bzw. Banden, die den bekannten Chlorophyllpools aus den PSI-Trimeren, nicht eindeutig zugeordnet werden können. Diese Banden bzw. Moleküle wurden in der Auswertung der PSI-Monomere nicht berücksichtigt.

5.3.2 Eingesetzte Chemikalien

Eine Zusammenfassung über die eingesetzten Chemikalien mit Bezugsquelle und Verwendungszweck ist in **Tab. 5.2** wiedergegeben.

Tab. 5.2 Liste der verwendeten Chemikalien mit Bezugsquelle und Verwendungszweck.

Chemikalien	Bezugsquelle	Verwendungszweck
Wasser für die Chromatographie	MERCK	Puffer-Lösungsmittel
Glycin	SIGMA	Puffer
Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid (Trivialname: Tris-HCl)	SIGMA	Puffer
N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin (Trivialname: Tricin)	APPLICHEM	Puffer
Magnesiumchlorid	MERCK	Pufferzusatz
Salzsäure, 2M	SIGMA	Einstellen des pH-Wertes
Natriumhydroxid Plätzchen	ROTH	Einstellen des pH-Wertes
Natriumdithionit	FLUKA	Reduktionsmittel
Phenazinmethosulfat	SIGMA	Reduktionsmittel; Elektronenüberträger
Kaliumhexacyanoferrat (III) (Trivialname: Ferricyanid)	FLUKA	Oxidationsmittel
n-Dodecyl- β -D-maltosid (β -DM)	SIGMA	Detergenz, verhindert die Aggregation der PSI-Komplexe
Glycerol	FLUKA	Kälteschutzmittel
Helium	Tieftemperatur-Werkstatt der Universität Stuttgart	Kühlmittel für den Kryostaten
Flüssiger Stickstoff	Tieftemperatur-Werkstatt der Universität Stuttgart	Kühlmittel für den Kryostaten
DCM	RADIANT DYES	Laserfarbstoff
Benzylalkohol	ROTH	Lösungsmittel für den Laserfarbstoff
Ethylenglykol	ROTH	Lösungsmittel für den Laserfarbstoff

5.3.3 Probenpräparation

Die PSI-Komplexe wurden in einem Puffer so stark verdünnt, bis einzelne Komplexe auf dem zweidimensionalen Scanbild der Probe, aufgenommen mit dem beschriebenen konfokalen Laser-Rastermikroskop detektiert werden konnten. Um eine Akkumulation an oxidiertem P700 in den Reaktionszentren der PSI-Komplexe zu vermeiden und um das Elektron innerhalb der Elektronentransferkette beweglich zu halten, wurde dem Ansatz Natriumdithionit und Phanazinmethosulfat (PMS) mit einer Endkonzentration von 50 mM bzw. 10 μ M zugesetzt. Für die Reduktion wurde PSI in einem Glycin-Puffer (100 mM, pH 10, pK_{a2} (Glycin): 9,6) gelöst. Der Protein-Pigment-Komplex musste in einem Puffer mit hohem alkalischen pH-Wert verdünnt werden, damit das Reduktionsmittel Natriumdithionit stabil bleibt und sich nicht zersetzt. Dem Puffer wird außerdem 0,02% (w/v) des Detergenz β -DM zugesetzt, um eine Aggregation der einzelnen PSI-Komplexe zu größeren Konglomeraten zu verhindern. Die Oxidation der Komplexe wurde in einem 1 M Tris-HCl-Puffer (pK_a : 8,1) durchgeführt, dessen pH-Wert auf 7,5 eingestellt war; als Oxidationsmittel kam Ferricyanid mit einer Endkonzentration von 3 mM zum Einsatz. Entsprechend der Reduktion wurde dem Puffer 0,02% (w/v) β -DM zugesetzt. Eine Oxidation überführt das Reaktionszentrum des PSI-Komplexes in den geschlossenen Zustand, so dass P700 als Radikalkation $P700^{+\bullet}$ vorliegt.

Die Reduktion der PSI-Komplexe erfolgte auf der Grundlage der Arbeiten von SHUBIN [6,7] und POLM [99], die Oxidation der Komplexe entsprechend den Arbeiten von KARAPETYAN [10]. Nach Rücksprache mit Herrn SCHLODDER (MAX-VOLMER-Laboratorium für Biophysikalische Chemie, TU Berlin) bzw. Herrn GHOSH (Biologisches Institut, Universität Stuttgart) und einer Literaturrecherche bezüglich den Reaktionsbedingungen von Redoxreaktionen photosynthetischer Komplexe, wurden die Konzentrationen der einzelnen Komponenten modifiziert bzw. die Einfrierbedingungen der Probe variiert. Teilweise wurde den einzelnen Puffern Magnesiumchlorid zugesetzt, um die PSI-Komplexe zu stabilisieren. Vorversuche zu den Pufferbedingungen, d.h. unterschiedliche Puffersubstanzen wie Tris-HCl, Tricin oder Glycin, unterschiedliche Konzentrationen oder verschiedene Salzzusätze, haben aber gezeigt, dass keine merklichen Veränderungen der photophysikalischen Stabilität bzw. der Eigenschaften der PSI-Komplexe auftraten.

Die Reduktion wurde bei Raumtemperatur und unter Grünlicht durchgeführt. Nach Zugabe der Reduktionsmittel folgte eine 15-minütige Inkubation in Dunkelheit, bevor dem Ansatz Glycerol als Kälteschutzmittel zugegeben wurde. Die Endkonzentration von Glycerol lag bei 50% (v/v). Nach Zugabe des Kälteschutzmittels erfolgte die Abkühlung auf 1,6 K in Dunkel-

heit. Unter diesen Bedingungen sollten die terminalen Eisen-Schwefel-Cluster F_A und F_B reduziert vorliegen und ein zyklischer Elektronentransfer in der Elektronentransferkette der PSI-Komplexe gewährleistet sein. Im Gegensatz zur Reduktion kann die Oxidation und das Einfrieren der Probe bei Licht durchgeführt werden, weil Licht selbst in der Lage ist P700 zu oxidieren. Eine genaue Einstellung des pH-Wertes und der Redoxbedingungen sowohl für die spektroskopischen als auch für die zeitaufgelösten Messungen ist notwendig, da die Fluoreszenzemission und das dynamische Verhalten der Komplexe vom Aktivitätszustand der Reaktionszentren abhängig sind.

Von dem Probenansatz wurde 0,7 μl auf ein rundes Suprasilplättchen (Dicke: 200 μm ; Durchmesser 5 mm) pipettiert und mit einem zweiten Suprasilplättchen abgedeckt (sog. *Sandwich*-Probe). Als Material des Probenträgers wurde Suprasil gewählt, da dieses einen kleinen Expansionskoeffizienten aufweist. Die optischen Eigenschaften von Suprasil sind daher nahezu temperaturunabhängig. Der Brechungsindex von Suprasil liegt bei 1,455. Die Sandwich-Probe wird an einer Probenstange befestigt und in den Kryostaten eingeführt. Dies kann sowohl bei Raumtemperatur als auch bei tiefen Temperaturen geschehen. Nach Equilibrierung des Kryostaten bzw. des Systems kann die Probe untersucht werden. Eine typische Anregungsintensität, die bei diesen Experimenten verwendet wurde, ist 10 μW . Bei einer Anregungsintensität von 10 μW beträgt das Fluoreszenzsignal ca. 10^4 Photonen/s. Unter Berücksichtigung der Detektionseffizienz des Aufbaus von 0,5%, kann eine Anregungsrate der PSI-Komplexe von ca. $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ erwartet werden. Unter diesen Bedingungen ist die Anregungsrate sehr viel größer als die Rekombinationsrate des reduzierten Phyllochinons A_1^- . Das bedeutet, dass das Elektron die meiste Zeit von dem Phyllochinon gebunden wird. Für die Autokorrelationsmessungen wurden Anregungsleistungen bis 600 μW verwendet. Die Integrität der PSI-Komplexe unter hohen Beleuchtungsintensitäten wurde durch die Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren überprüft. Diese Fluoreszenzspektren stimmten mit denen überein, die bei sehr viel geringerer Anregungsleistung aufgenommen wurden [3].

Die Einzelmoleküluntersuchung der Photosysteme macht die Verwendung eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops notwendig. Zusätzlich kann die Fluoreszenz der roten Chlorophyllpools nur bei tiefen Temperaturen eindeutig nachgewiesen werden, wodurch die Probe in der Probenkammer eines Badkryostaten fixiert werden muss. Flüssiges Helium macht aufgrund seiner stoffspezifischen Eigenschaften wie der Superfluidität und seiner optischen Eigenschaften das Abkühlen auf Temperaturen bis 1,6 K und die Anwendung optischer Untersuchungsmethoden möglich, ohne dass die Ergebnisse nachteilig beeinflusst

werden. Dieser technische Aufwand ist notwendig, um die roten Chlorophyllpools in einzelnen PSI-Komplexen detektieren zu können, denn erst bei tiefen Temperaturen wird ein *uphill*-Energietransfer von den roten Chlorophyllpools zum Reaktionszentrum unterbunden und die Anregungsenergie wird als Fluoreszenz emittiert.

Durch Einzelmolekülspektroskopie bei tiefen Temperaturen kann gezeigt werden, dass die Schulter bzw. die schwache Bande, die in Absorptionsspektren oder in Fluoreszenzemissionsspektren von Ensemble-Proben gemessen wurde, nicht nur eine Bande ist, sondern aus mehreren Banden besteht, die von verschiedenen Chlorophyllpools stammen. Zusätzlich kann durch die Untersuchung einzelner PSI-Komplexe die Heterogenität innerhalb eines Ensembles von PSI-Komplexen aufgezeigt werden, die bei Bulk-Messungen völlig verloren geht und nur als Durchschnittswert des jeweiligen untersuchten Parameters in Erscheinung tritt.

6 Optische Einzelmolekülspektroskopie an Photosystem I-Komplexen aus *Thermosynechococcus elongatus*

6.1 Zielsetzung

Um nähere Kenntnisse über die roten Chlorophyllpools der Photosystem I-Komplexe aus *Thermosynechococcus elongatus* zu erhalten, wurden die Fluoreszenzeigenschaften der roten Chlorophyllpools mittels Einzelmolekülspektroskopie untersucht. Trotz der Tatsache, dass PSI aus *TS. elongatus* mehrere rote Chlorophyllpools hat, konnte bis jetzt in Ensemble-Messungen nur eine einzige, sehr breite Fluoreszenzemissionsbande nachgewiesen werden.

6.2 Die roten Chlorophyllpools in PSI aus *TS. elongatus*

PSI-Komplexe aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* (*TS. elongatus*) besitzen neben den Antennen-Chlorophyllen Chlorophyllpools, die Licht größerer Wellenlängen als der erste Elektronendonator P700 absorbieren. Im Jahr 2001 konnte die Struktur von PSI aus *TS. elongatus* röntgenkristallographisch mit einer Auflösung von 2,5 Å ermittelt werden [15]. Ein Abgleich der strukturellen Daten mit den Ergebnissen aus optischen Untersuchungen lässt Vermutungen über die Anzahl der Chlorophylle zu, die an den roten Chloro-

phyllpools beteiligt sind, und über die Lokalisation der roten Chlorophyllpools im PSI-Komplex. Aus den strukturellen Daten allein wäre dies nicht möglich.

Absorptionsspektren von PSI-Komplexen aus *TS. elongatus* lassen zwei rote Chlorophyllpools (Chl708 und Chl719), mit Absorptionsmaxima von 708 nm (A708) und 719 nm (A719), erkennen [4]. Mittels Lochbrennversuchen konnte ein weiterer Chlorophyllpool bei 715 nm (Chl715) detektiert werden [57,58,76]. Im Gegensatz zu PSI aus *A. platensis* besitzen PSI-Monomere und PSI-Trimere aus *TS. elongatus* dieselbe Anzahl an roten Chlorophyllpools. Aus den Absorptionsbanden von Chl708 und Chl719 kann über die Oszillatorstärke auf die Anzahl an beteiligten Chlorophyllen für den jeweiligen Chlorophyllpool geschlossen werden. Demnach besteht der Chl708 aus 4 - 5 Chlorophyllen und Chl719 aus 5 - 6 Chlorophyllen [4]. Die Angaben zur Anzahl der Chlorophylle beziehen sich auf eine monomerische Untereinheit des trimeren PSI-Komplexes. In PSI-Monomeren besteht der Chlorophyllpool Chl719 hingegen nur aus 2 Chlorophyllen [5]. Während die Chlorophylle der roten Chlorophyllpools Chl715 und Chl719 vermutlich als Dimere vorliegen, wird für Chl708 ein Chlorophyll-Trimer verantwortlich gemacht [56-58].

Mit Hilfe der Ergebnisse aus den Lochbrennversuchen konnten neben der Bestimmung der Anzahl der an den roten Chlorophyllpools beteiligten Chlorophylle auch Aussagen über die Lokalisierung der verantwortlichen Chlorophylle innerhalb des Pigment-Protein-Komplexes gemacht werden. Laut Literatur werden die Chlorophylle der roten Chlorophyllpools von dem Heterodimer PsaA und PsaB gebunden und sind nahe den Grenzflächen zwischen dem Heterodimer PsaA/PsaB und den kleinen Protein-Untereinheiten PsaL und PsaM lokalisiert [56,58]. Auch JORDAN et al. [15] schlug eine Lokalisierung der roten Chlorophylle in PSI von *TS. elongatus* in der Trimerisierungsregion des Protein-Pigment-Komplexes vor. Untermauert wird diese Aussage durch die Tatsache, dass der Chlorophyllpool Chl719 sowohl in PSI-Trimern als auch in PS-Monomeren vorhanden ist. Die Anzahl der beteiligten Chlorophylle in den Monomeren ist hier jedoch geringer als in den Trimern. Deshalb liegt zumindest ein Teil der Chlorophylle, die den Chlorophyllpool Chl719 bilden, in der Trimerisierungsachse des PSI-Komplexes [5]. Über diese Chlorophylle ist wahrscheinlich ein Energieaustausch zwischen den Monomeren möglich [35,77].

Während man davon ausgeht, dass Chl719 in der Trimerisierungsachse von PSI lokalisiert ist, wurde für Chl708 berechnet, dass sich die beteiligten Chlorophylle viel näher am Reaktionszentrum befinden als Chl719 [4,100].

Eine eindeutige Zuordnung der roten Chlorophylle zu den 90 Antennen-Chlorophyllen auf der Grundlage experimenteller Daten ist bis jetzt nicht möglich. Mit Hilfe quantenchemischer Berechnungen, ausgehend von einer Dipol-Dipol-Näherung zwischen den Chlorophyllen [101] bis hin zur Berücksichtigung der Proteinumgebung [102], wurde versucht, die roten Chlorophylle den Antennen-Chlorophyllen in der Kristallstruktur zu zuordnen.

Algorithmen, die nur eine exzitonische Kopplung zwischen den Pigmenten berücksichtigen, ohne dass unterschiedliche *site*-Energien aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkung der Pigmente mit der Umgebung in den Berechnungen miteinbezogen wurden, können Spektren der roten Chlorophyllpools nicht ausreichend erklären [102]. Die *site*-Energie, ist die Energie, die einem System zugeführt werden muss, um dieses aus dem Singulett-Grundzustand in den ersten angeregten Singulettzustand zu überführen; in einem Chlorophyll-Molekül entspricht diese Energie dem Q_y -Übergang. Unter Berücksichtigung der *site*-Energien der Chlorophylle, die sich mit Hilfe der Strukturdaten berechnen lassen, konnten die Hauptmerkmale des Absorptionsspektrums von PSI wiedergegeben werden [101,103]. Sowohl Berechnungen [101,102] als auch experimentelle Methoden [15,58] liefern eine Reihe von möglichen Kandidaten für die roten Chlorophyllpools.

Exemplarisch werden hier zwei Vorschläge möglicher Kandidaten vorgestellt, die einerseits auf den Ergebnissen experimenteller Untersuchungen beruhen [15,58], sich andererseits auf Ergebnissen quantenchemischer Berechnungen [102] stützen.

Die Kombination der Ergebnisse aus der Strukturaufklärung und den Lochbrennversuchen führt zu einem Chlorophyll-Trimer und mehreren Chlorophyll-Dimeren als mögliche Kandidaten für die roten Chlorophyllpools des PSI-Komplexes aus *TS. elongatus*. Diese weisen in der Regel einen geringen Abstand zwischen den beteiligten Chlorophyllen und demzufolge eine entsprechend starke exzitonische Kopplung auf. Das Trimer, bestehend aus den gestapelten Chlorophyllen *B31-B32-B33* liegt auf der lumenalen Seite der Thylakoidmembran. Der Buchstabe *B* steht für die Protein-Untereinheit PsaB, an der die Chlorophylle mit den Nummern 31, 32 und 33 gebunden sind. Der zwischenplanare Abstand misst zwischen 3,5 - 3,7 Å und die Verschiebung der Chlorophylle zueinander beträgt 8,3 Å, womit ein genügend kleiner Abstand für eine exzitonische Kopplung gegeben ist. Die symmetrische Anordnung der Chlorophylle dieses Trimers hat zur Folge, dass die Übergangsdipolmomente der Chlorine ungefähr parallel zueinander ausgerichtet sind. Eine derartige Anordnung erinnert an die Kristallstruktur von Chlorophyll-Derivaten mit Absorptionsmaxima von

740 nm [104] und rechtfertigt somit eine Zuordnung des Chlorophyll-Trimers zu den roten Chlorophyllpools.

Die Chlorophyll-Dimere, die auf der Grundlage experimenteller Daten als rote Chlorophyllpools in Frage kommen, sind die Dimere *B37-B38*, *A38-A39*, *A32-B7*. Innerhalb der roten Chlorophyll-Dimere sind die Ebenen der Chlorine nahezu parallel ausgerichtet. Der interplanare Abstand beträgt 3,5 Å; die Chlorophylle sind lateral verschoben und haben einen Mg^{2+} - Mg^{2+} -Abstand von 7,6 - 8,9 Å.

Die Dimere *B27-B38* und *A38-A39* liegen auf der stromalen Seite des Proteins und werden über PsaA/PsaB koordiniert. Jedes der zwei Dimere ist nahe einem der so genannten Verbindungschlorophylle lokalisiert, die die Antenne und das Reaktionszentrum räumlich miteinander verbinden. Diese räumliche Anordnung könnte eventuell eine schnelle Übertragung der Anregungsenergie von der Antenne über die roten Chlorophylle und die Verbindungschlorophylle zur Elektronentransferkette unterstützen. Ob der Energietransfer in der dargestellten Form verläuft, ist aber noch nicht bewiesen [105]. Für das einzellige, thermophile Cyanobakterium *Synechocystis* wurde ebenso eine mögliche Lokalisation der roten Pigmente des C708 Pools in der nahen Umgebung des Reaktionszentrums vorgeschlagen [106,107].

Das dritte putative Chlorophyll-Dimer *A32-B7* ist auf der lumenalen Seite der Trimerisierungsdomäne lokalisiert und steht in Kontakt mit der Untereinheit PsaL des angrenzenden Monomers. Es wird deshalb vermutet, dass dieses Chlorophyllpaar zum Chlorophyllpool Chl719 beiträgt.

Experimente basierend auf Lochbrennuntersuchungen ergeben eine andere Zuordnung. Demnach wird der Chlorophyllpool Chl719 von dem Chlorophyll-Dimer *B37-B38* gebildet, das Chlorophyll-Dimer *A38-A39* entspricht Chl715, und Chl708 entsteht durch das Chlorophyll-Trimer *B31-B32-B33*. Das Chlorophyll-Dimer *A32-B7* wird hier nicht zu den roten Chlorophyllen gezählt [58].

Quantenchemische Berechnungen, die neben der Kopplungsstärke zwischen den Chlorophyllen auch die Protein-Umgebung berücksichtigen, ergeben als mögliche Kandidaten für die roten Chlorophylle die Chlorophyll-Dimere *A32-B7*, *A33-34*, *A24-A35* und *B22-B34*. Während durch die Chlorophyll-Dimere *B22-B34* und *A32-B7* der Chlorophyllpool Chl708 bzw. Chl719 entsteht, sind die zwei Chlorophyll-Dimere *A33-34* und *A24-A35* für den Chlorophyllpool Chl715 verantwortlich [102]. Erwähnt werden sollte noch, dass Berechnungen, die auf anderen Modellen beruhen, weitere Chlorophylle als mögliche Kandidaten

ergeben [101,103,108]. **Abb. 6.1** zeigt graphisch die Kandidaten für die roten Chlorophylle aus verschiedenen Publikationen [15,54,101,102].

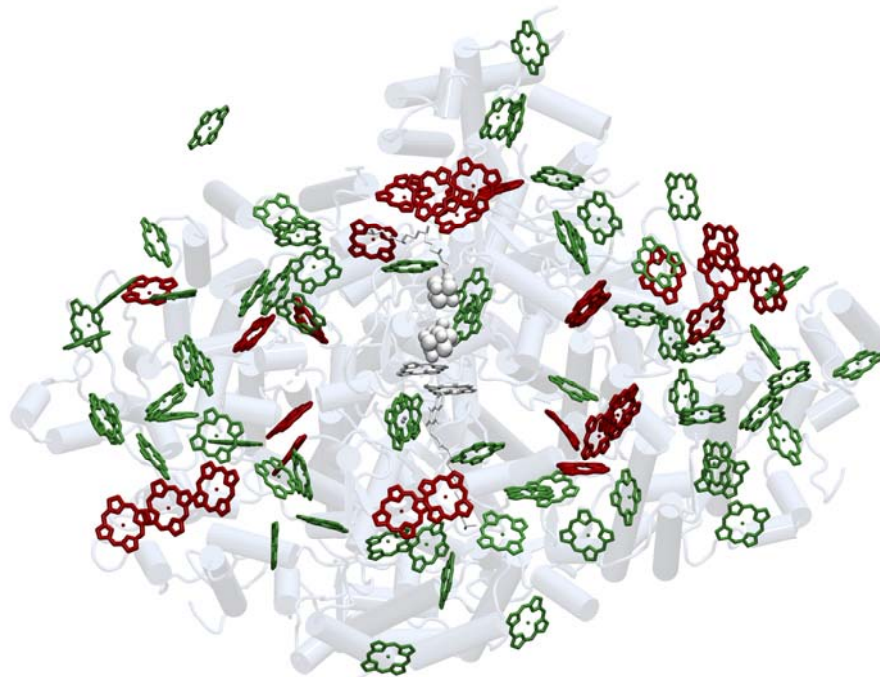


Abb. 6.1 zeigt mögliche Kandidaten für die roten Chlorophylle in Photosystem I aus *TS. elongatus* basierend auf den Publikationen von [15,54,101,102]. Während die Antennen-Chlorophylle grün und die Komponenten der Elektronentransferkette grau dargestellt sind, sind die potentiellen Kandidaten der roten Chlorophyllpools rot gezeichnet. Im Hintergrund ist die Proteinmatrix zu sehen. Aufsicht von der stromalen Seite.

Wie geschildert, ist aufgrund der experimentellen und theoretischen Ergebnisse zurzeit noch keine eindeutige Zuordnung der roten Chlorophyllpools zu den Chlorophyllen der Antenne möglich. Weitere experimentelle Untersuchungen, um die zur Lokalisierung notwendigen Informationen der roten Chlorophyllpools zu erhalten, sind deshalb erforderlich. Hilfreich wäre es die Anzahl der roten Chlorophyllpools und die an den roten Chlorophyllpools beteiligten Chlorophylle sowie die genaue Ursache für die Rotverschiebung der roten Chlorophylle im Vergleich zu den Antennen-Chlorophyllen und damit die energetischen Verhältnisse im Protein-Pigment-Komplex zu kennen.

Tab. 6.1 gibt einen Überblick der experimentell ermittelten roten Chlorophyllpools in PSI aus *TS. elongatus* mit den dazugehörigen Absorptions- und Fluoreszenzemissionsbanden gemessen bei Raumtemperatur und tiefen Temperaturen. Der Chlorophyllpool Chl715 wurde bis jetzt nur durch Lochbrennexperimente d.h. über Absorption in trimeren PSI-Komplexen

nachgewiesen. Angaben zur Fluoreszenz wurden noch nicht veröffentlicht. Ebenso ist noch unklar, ob Chl715 auch in monomeren PSI-Komplexen existent ist.

Tab. 6.1 Die Tabelle gibt einen Überblick über die experimentell ermittelten roten Chlorophyllpools in *PSI aus TS. elongatus*. Wenn möglich wurden die dazugehörigen Absorptions- und Fluoreszenz-emissionsbanden sowohl bei Raumtemperatur als auch bei tiefen Temperaturen angegeben sowie die Anzahl an Chlorophyllen, die die roten Chlorophyllpools bilden. Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima sind mit einem „A“ vor der Wellenlänge gekennzeichnet, die des Fluoreszenzmaximums mit einem „F“ vor der Wellenlänge.

	Trimer			Monomer	
	Bande 1	Bande 2	Bande 3	Bande 1	Bande 2
Absorptionsspektrum (RT)	A702 GOBETS (2001) PÅLSSON (1996)	-	A708 GOBETS (2001) PÅLSSON (1996)	-	-
Absorptionsspektrum (TT)	A708 GOBETS (2001) PÅLSSON (1996)	-	A719 GOBETS (2001) PÅLSSON (1996)	A708 PÅLSSON (1998)	A720 PÅLSSON (1998)
Fluoreszenzspektrum (RT)	F707 GOBETS (2001) PÅLSSON (1996)	-	F723 GOBETS (2001) PÅLSSON (1996)	-	-
Fluoreszenzspektrum (TT)	-	-	F730 GOBETS (2001) PÅLSSON (1996)	-	-
Chlorophyllpool	Chl708 PÅLSSON (1996)	Chl715 ZAZUBOVICH (2002)	Chl719 PÅLSSON (1996)	Chl708 PÅLSSON (1996)	Chl719 PÅLSSON (1996)
Anzahl an Chlorophyllen	6 PÅLSSON (1996) 5 GOBETS (2001) PÅLSSON (1998); FLEMMING (1996) in [77,109]	-	4-6 PÅLSSON (1996) 4 GOBETS (2001) FLEMMING (1996) in [77,109]	6 PÅLSSON (1996) 5 PÅLSSON (1998)	2 PÅLSSON (1996)

6.3 Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren von PSI aus *TS. elongatus* in einer Ensemble-Probe

Zur Überprüfung der Integrität von PSI aus *TS. elongatus* wurde mit Hilfe eines UV/Vis-Spektrometers (PERKIN ELMER, Lambda 16) ein Absorptionsspektrum bei Raumtemperatur aufgenommen (Abb. 6.2).

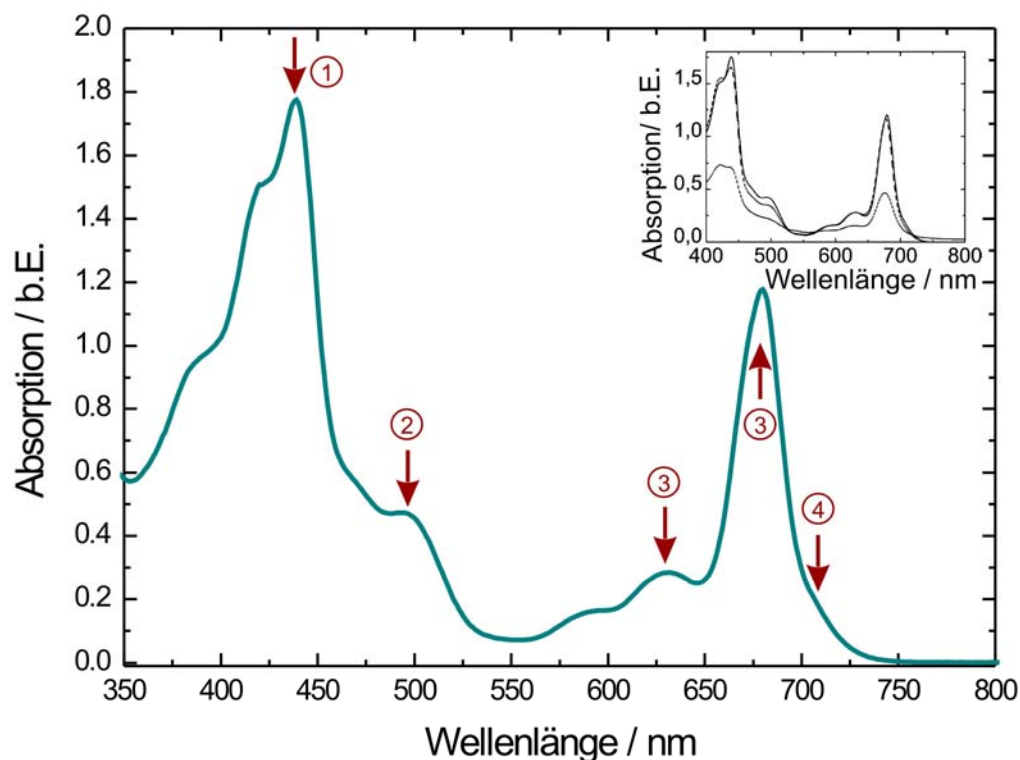


Abb. 6.2 Absorptionsspektrum von PSI aus *TS. elongatus*, aufgenommen bei Raumtemperatur. Die Markierungen (1) - (4) weisen auf die besonderen Merkmale des Spektrums hin. Im Inset ist ein Absorptionsspektrum von intakten PSI-Komplexen (durchgehende Linie) und zwei Absorptionsspektren von PSI mit zunehmendem Degradierungsgrad zu sehen (aus [110]).

Im Absorptionsspektrum sind die für PSI bzw. für Chlorophyll *a* charakteristische Soret-Bande bei 430 nm (1) und die Q-Banden (3) im nahen Infrarot-Bereich zu erkennen. Die roten Chlorophyllpools sind als Schulter in der roten Flanke der Q_y-Bande zu sehen (4). Die Absorptionsbande bei einer Wellenlänge von ca. 500 nm kann auf die Carotinoide in PSI zurückgeführt werden (2). Solange die roten Chlorophyllpools nachgewiesen werden können, kann davon ausgegangen werden, dass der Protein-Pigment-Komplex intakt vorliegt, da diese Pools erst durch Zusammenlagerung bestimmter Chlorophylle entstehen. Die roten Chloro-

phyllpools können am besten, wie in **Abb. 6.3** gezeigt, über ihre Fluoreszenzemission bei tiefen Temperaturen nachgewiesen werden. Zu sehen ist die Emission der roten Chlorophyllpools, deren Emissionswellenlängen größer als 700 nm sind.

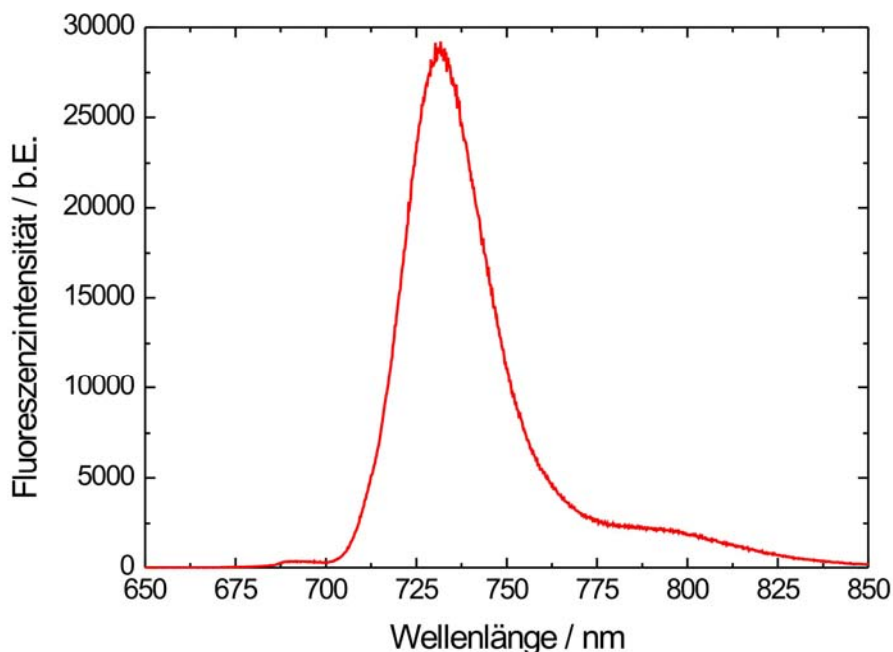


Abb. 6.3 Fluoreszenzemissionsspektrum für eine PSI-Bulkprobe, aufgenommen bei einer Temperatur von 5,2 K und mit einer Anregungswellenlänge von 640 nm. Im Fluoreszenzemissionsspektrum können vor allem die Q_y -Banden der einzelnen Chlorophyllpools detektiert werden, da die Q_y -Bande durch den Übergang aus dem energetisch niedrigsten, angeregten Zustand in den Grundzustand entsteht. Die Bande bei 790 nm ist eine vibronische Bande des Übergangs Q_y . Der Übergang Q_y besteht streng genommen aus einem reinem elektronischen Übergang bei 730 nm und seinen vibronischen Replika bei 790 nm.

Nach **Tab. 6.1** konnte bei tiefen Temperaturen trotz der Existenz mehrerer roter Chlorophyllpools nur eine einzige Fluoreszenzbande bei 730 nm nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzemission der roten Chlorophyllpools von PSI-Komplexen aus *TS. elongatus* wurde deshalb spektroskopisch auf Einzelmolekülebene untersucht und die Ergebnisse im nachfolgenden Kapitel analysiert und interpretiert.

6.4 Fluoreszenzeinzelmolekülspektren von trimeren PSI-Komplexen aus *TS. elongatus*

Die roten Chlorophyllpools emittieren die Anregungsenergie nur dann als Fluoreszenz, wenn keine energetische Kopplung zum Reaktionszentrum besteht. Das ist dann der Fall, wenn die vibronischen Moden aufgrund des Einfrierprozesses ausgefroren sind und damit ein *uphill*-Energietransfer unterbunden ist. Optische Untersuchungen von PSI aus *TS. elongatus* bei tiefen Temperaturen und auf Einzelmolekülebene liefern Fluoreszenzemissionsspektren mit hoher Auflösung. Auch PSI aus *TS. elongatus* zeigt wie PSI aus *A. platensis* eine Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors. Bei tiefen Temperaturen führt eine Oxidation von P700 zu einer Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute um 50% [77]. Damit während der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung die PSI-Komplexe überwiegend mit offenem Reaktionszentrum (P700 neutral) vorliegen und somit eine maximale Fluoreszenzquantenausbeute gesichert ist, wurde die Probe vor der spektroskopischen Messung reduziert. In **Abb. 6.4** ist eine Auswahl an Fluoreszenzemissionsspektren einzelner trimerer PSI-Komplexe mit den typischen Merkmalen gezeigt.

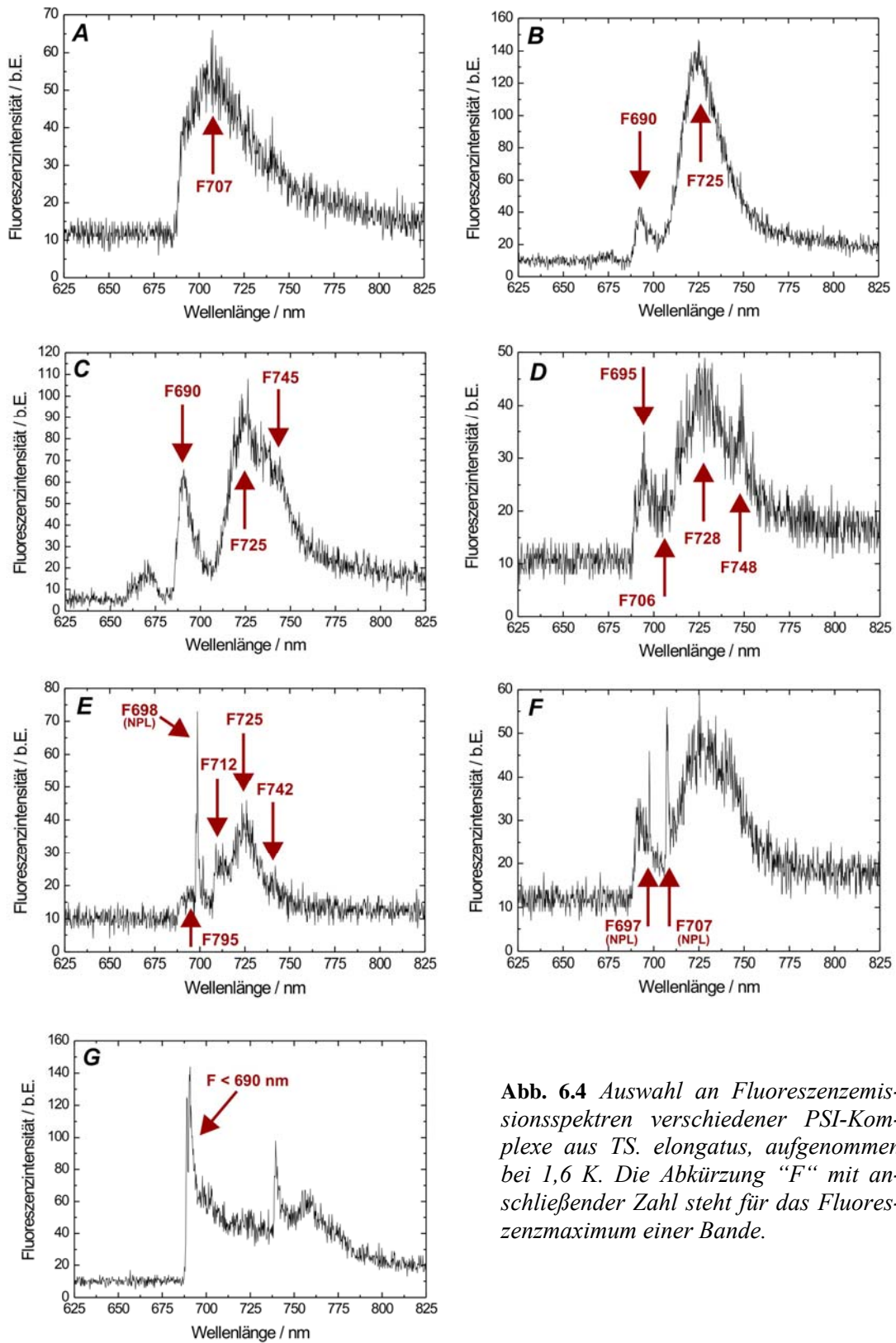


Abb. 6.4 Auswahl an Fluoreszenzemissionsspektren verschiedener PSI-Komplexe aus *TS. elongatus*, aufgenommen bei 1,6 K. Die Abkürzung "F" mit anschließender Zahl steht für das Fluoreszenzmaximum einer Bande.

Die Fluoreszenzemissionsspektren von PSI aus *TS. elongatus* werden häufig von einer sehr breiten Fluoreszenzemissionsbande dominiert, die eine Linienbreite (FWHM) von bis zu 50 nm besitzen kann. **Abb. 6.4A** zeigt ein Fluoreszenzemissionsspektrum mit einer einzigen Bande, die ein Maximum von 707 nm und eine Linienbreite von 50 nm besitzt. Die Bande umschließt einen Wellenlängenbereich von 690-760 nm und zeigt eine steile blaue Flanke, während die rote Flanke flach abfällt. Diese wenig strukturierte Fluoreszenzbande könnte eine Einhüllende darstellen, die mehrere schmale Banden verschiedener Emissionswellenlängen unter sich verbirgt. Ursache für die geringe spektrale Auflösung ist wahrscheinlich die spektrale Diffusion der schmalen Banden, die zu einer Verbreiterung der Linie und demzufolge zu einer erhöhten spektralen Überlappung der Banden führt. Der steile Anstieg an der blauen Flanke der Bande kann auf eine Nullphononenlinie (NPL) eines optischen Übergangs zurückgeführt werden (siehe Seite 77). Die flach abfallende Flanke auf der roten Seite der Bande hingegen ist das Resultat mehrerer Banden. Dass dies der Fall sein kann, wird in den folgenden Fluoreszenzemissionsspektren ersichtlich (**Abb. 6.4B** bis **Abb. 6.4F**). Bereits im Fluoreszenzemissionsspektrum der **Abb. 6.4B** sind zwei Banden zu sehen. Der breiten, intensiven Bande mit einem Maximum von 725 nm geht eine weniger intensive Bande bei 690 nm voraus. Die Linienbreite der langwelligen Bande hat sich auf 25 nm reduziert, die Bande bei 690 nm ist mit 8 nm sehr viel schmaler. Im Gegensatz zu der Bande in **Abb. 6.4A** ist die rote Emissionsbande symmetrisch; es sind weder Nullphononenlinien noch so genannte Schultern (spektral schlecht aufgelöste Banden) zu erkennen. Trotzdem kann man davon ausgehen, dass die zwei Banden aufgrund der Linienbreite das Ergebnis einer Überlagerung mehrerer schmaler Banden sind. Deutlich wird dies in der folgenden Abbildung (**Abb. 6.4C**). Neben den bereits genannten Banden mit Maxima von 690 nm und 725 nm zeigt sich auf der roten Flanke von F725 eine Schulter mit einem Maximum von 745 nm. Die schwache Bande, die bei 670 nm detektiert wurde, wird durch den Laser hervorgerufen, der während der Messung nicht vollständig blockiert war und ist kein spektrales Merkmal von Photosystem I. Die Schulter der Bande F725 ist in **Abb. 6.4D** als eigenständige Bande zu sehen. Dafür kann man in **Abb. 6.4D** auf der blauen Flanke von F725 eine weitere Schulter bei ca. 706 nm erkennen. Das Fluoreszenzemissionsspektrum besitzt somit insgesamt drei aufgelöste Banden bei den Wellenlängen 695 nm, 728 nm und 748 nm und eine Schulter bei ca. 706 nm. Dass es sich bei der Schulter in **Abb. 6.4D** wirklich um eine Bande handelt, zeigt **Abb. 6.4E**, in der insgesamt vier Fluoreszenzemissionsbanden mit den Fluoreszenzmaxima bei ca. 695 nm, 712 nm, 725 nm, 742 nm und eine Nullphononenlinie zu erkennen sind. Die Nullphononenlinie

sitzt der Bande zwischen 687 nm und 706 nm (FWHM \sim 19 nm) bei einer Wellenlänge von 698 nm auf. Die Anzahl der NPL kann von Spektrum zu Spektrum variieren, ebenso die zugehörige Wellenlänge. In **Abb. 6.4F** sind zwei NPLs, bei 697 nm und 707 nm, zu sehen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Fluoreszenzemissionsspektren von PSI aus *TS. elongatus* auf der Basis der Einzelmolekülspektroskopie sehr unterschiedlich aussehen. Um auszuschließen, dass nicht ein Teil der gezeigten Spektren von defekten PSI-Komplexen stammt, zeigt **Abb. 6.4G** ein Beispiel für einen PSI-Komplex, der nicht mehr intakt ist. Nicht eine einzige Bande zwischen 700 nm und 750 nm, mit den für die roten Chlorophyllpools typischen Fluoreszenzmaxima und Linienbreiten, ist in diesem Spektrum zu sehen. Zusätzlich ist die Fluoreszenzintensität im Bereich um 685 nm, was der Filterkante des Langpassfilters im Detektionsstrahlengang entspricht, stark angestiegen. Das spricht einerseits dafür, dass die roten Chlorophylle nicht mehr in der ursprünglichen Form in PSI vorliegen und deshalb die Antennen-Chlorophylle fluoreszieren, da keine energetische Kopplung zwischen den Chlorophyllen und dem Reaktionszentrum besteht. Andererseits können ungebundene, ungekoppelte Chlorophyll *a*-Moleküle in der Proteinmatrix vorliegen, die ebenfalls die Anregungsenergie nicht übertragen und diese als Fluoreszenz emittieren.

Eine genaue Bestimmung der Bandenanzahl und die Zuordnung dieser Banden zu den entsprechenden roten Chlorophyllpools sind oft schwierig, da durch spektrale Diffusion einerseits die Linie verbreitert wird und sich andererseits zusätzlich das Fluoreszenzmaximum verschieben kann. Die spektrale Diffusion erhält noch mehr Gewichtung dadurch, dass die einzelnen Banden aufgrund der trimeren Struktur des Photosystem I-Komplexes in der Regel das Ergebnis der Emission von drei Emitttern sind, deren lokale Umgebungen sich leicht unterscheiden können. Diese Tatsache beeinflusst Linienbreite, Fluoreszenzmaximum und Feinstruktur einer Bande. Die Feinstruktur einer Bande erschwert zusätzlich eine genaue Zuordnung der Banden zu bestimmten Chlorophyllpools. Sie ist das Ergebnis aus Nullphononenlinie und Phononenseitenbande (PSB) optischer Übergänge. Dabei ist zu beachten, dass eine auf eine Nullphononenlinie folgende Phononenseitenbande nicht unbedingt von demselben Emitter stammen muss [3]. Eine schwache PSB kann von einer intensiven und breiten PSB eines weiteren Emitters überlagert werden, so dass im Spektrum die Nullphononenlinie eines Emitters gefolgt von der Phononenseitenbande eines weiteren Emitters zu sehen ist. Abhängig ist dies von der Elektronen-Phononen-Kopplung der einzelnen roten Chlorophyllpools. Für den Fall einer schwachen Kopplung, wäre die NPL sehr intensiv und die PSB sehr schwach. Die NPL der verschiedenen Chlorophyllpools könnten nicht in jedem

Spektrum detektiert werden. Aufgrund der Abhängigkeit der Intensität der NPL und der PSB von der Elektronen-Phononen-Kopplung, kann die Fluoreszenzintensität der NPL und der PSB durch eine strukturelle Veränderung der Umgebung des jeweiligen Emitters abnehmen oder zunehmen.

Nicht in allen Spektren ist immer die gleiche Anzahl an Fluoreszenzbanden zu sehen. Ob eine Bande zu sehen ist, hängt von der spektralen Überlappung zu der benachbarten Bande und von deren Linienbreite ab. Durch die spektrale Diffusion kann die spektrale Position einer Bande bis zu $\pm 5 - 10$ nm springen. Außerdem beeinflussen extrinsische Faktoren wie die Beleuchtungsdauer aufgrund der unterschiedlichen Photosensitivität der Chlorophyllpools das Fluoreszenzspektrum (siehe Unterkapitel 6.5 „Ausbleichverhalten“). Da die Anregung der PSI-Komplexe über die Antenne erfolgt, beeinflusst die Polarisation des Anregungslichtes die Fluoreszenzemission der roten Chlorophylle jedoch nicht.

Um einen Überblick über alle möglichen Fluoreszenzbanden zu erlangen, wurde eine Statistik erstellt, die die Häufigkeit der detektierten Fluoreszenzbanden verdeutlicht (**Abb. 6.5**). Mit Hilfe eines solchen Histogramms können trotz der spektralen Diffusion, die in der Einzelmolekülspektroskopie häufig auftritt und vor allem dann, wenn es sich um ein so komplexes System wie Photosystem I handelt, Fluoreszenzbanden mit einer bevorzugten Wellenlänge herausgefiltert werden.

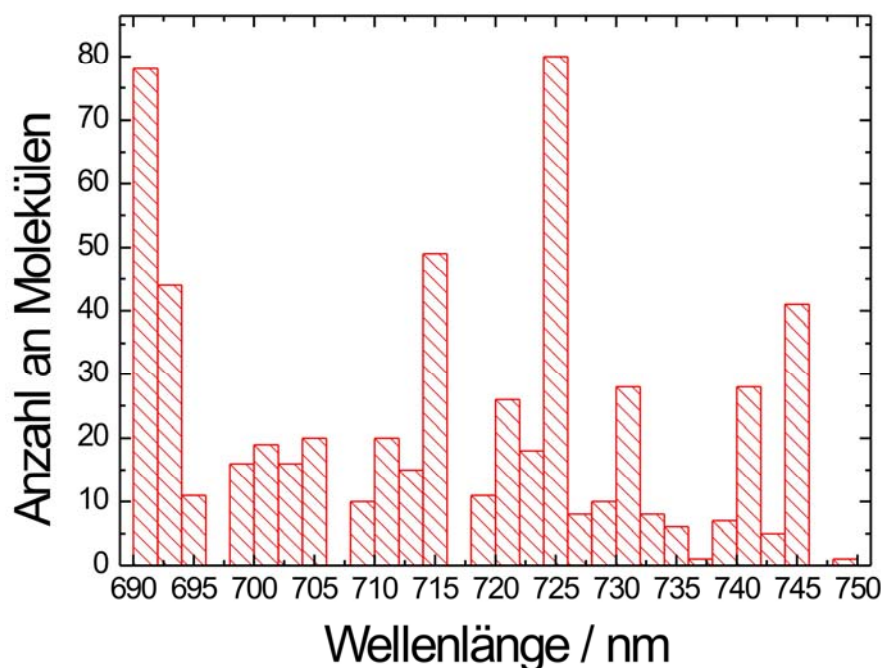


Abb. 6.5 Häufigkeitsverteilung der Emissionswellenlängen von insgesamt 215 trimeren PSI-Komplexen.

Unter Berücksichtigung des Histogramms und der Fluoreszenzemissionsspektren der einzelnen PSI-Trimere in Kombination mit Literaturdaten kann eine grobe Einteilung der Fluoreszenzemissionsbanden trotz der großen spektralen Verteilung der Emissionswellenlängen vorgenommen werden. In **Abb. 6.6** wird eine mögliche Zuordnung der Emissionswellenlängen zu Fluoreszenzbanden und folglich zu den entsprechenden Chlorophyllpools durchgeführt.

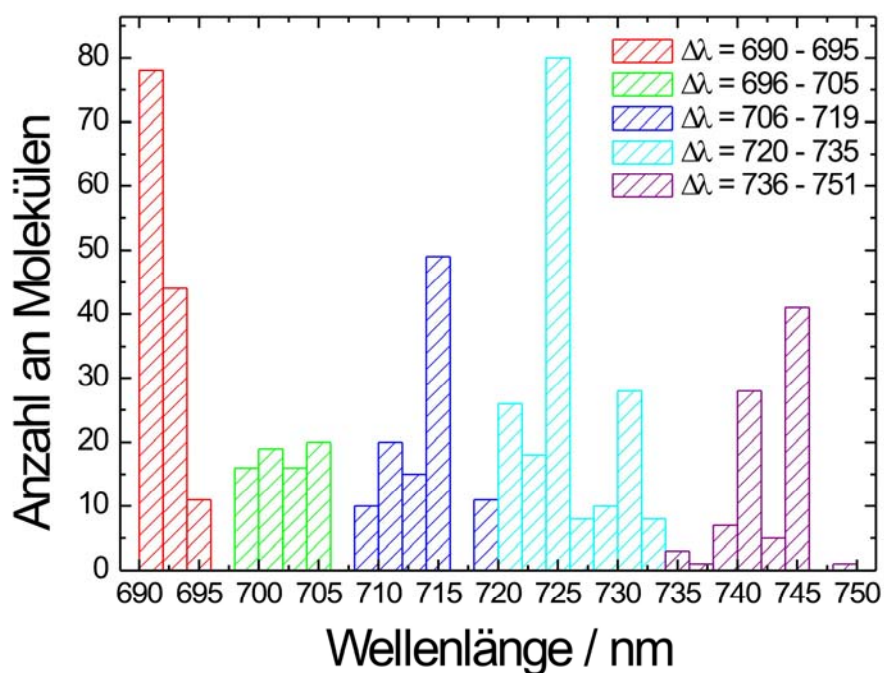
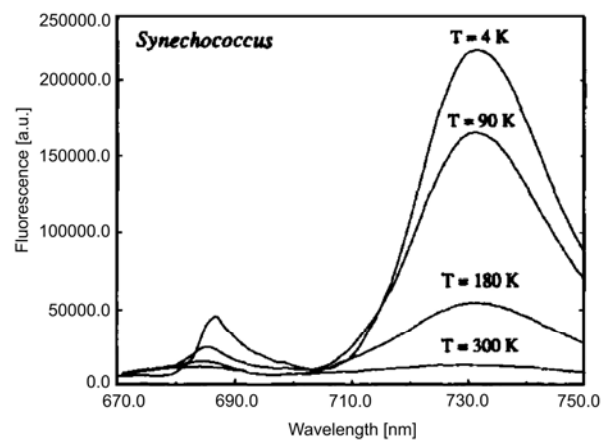


Abb. 6.6 Häufigkeitsverteilung der Emissionswellenlängen mit einer möglichen Zuordnung der Emissionswellenlängen zu verschiedenen Fluoreszenzbanden. Es können maximal fünf Fluoreszenzemissionsbanden nachgewiesen werden.

Aufgrund der spektralen Diffusion ist es nur möglich, einen groben Bereich für jede Bande abzuschätzen, da die Banden zum Teil spektrale Überlappungen zur benachbarten Emissionsbande zeigen. Auf der Grundlage einer maximalen Häufigkeit bestimmter Wellenlängen und unter den gemachten Annahmen für die Verteilung der Wellenlängen konnten, wie in **Abb. 6.6** verdeutlicht, insgesamt fünf Fluoreszenzemissionsbanden ermittelt werden. Drei der fünf möglichen Banden können infolge der Rotverschiebung (Emissionswellenlänge > 700 nm) den roten Chlorophyllpools zugeordnet werden.

Messungen an Ensemble-Proben zeigen aber in einem Spektralbereich von Wellenlängen größer als 700 nm nur eine breite, intensive Bande mit einem Wellenlängenmaximum von 730 nm (siehe **Abb. 6.7**). Nach PÄLSSON et al. [4] stammt die gesamte Fluoreszenz im roten Spektralbereich ($\lambda > 700$ nm), detektiert bei 4 K, nur von dem roten Chlorophyllpool Chl719, während Chl708 nicht emittieren soll.



Werden Fluoreszenzemissionsspektren einzelner PSI-Komplexe summiert, erhält man ein Spektrum, welches dem in **Abb. 6.7** gleicht. In **Abb. 6.8** ist ein Bulk-Spektrum zu sehen, dass durch die Summierung von 78 Einzelmolekülspektren einer einzigen PSI-Probe erhalten wurde.

Abb. 6.7 Gezeigt sind Fluoreszenzemissionsspektren von PSI-Trimeren aus *TS. elongatus* für verschiedene Temperaturen (aus [4]).

Im roten Spektralbereich ist ähnlich **Abb. 6.7** nur eine einzige breite Bande mit einem Maximum bei 730 nm zu sehen.

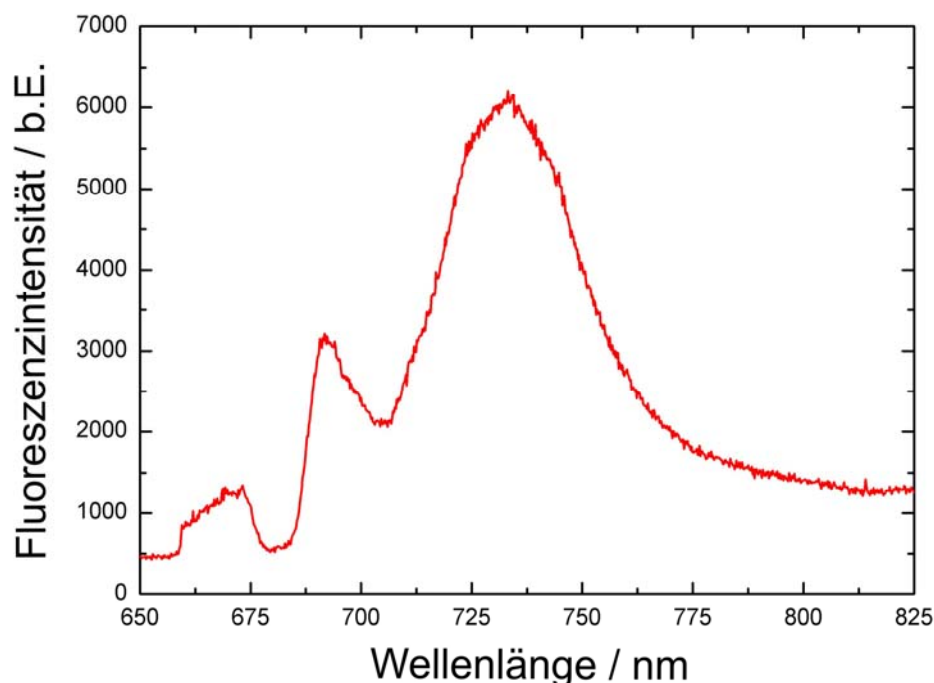


Abb. 6.8 Summiertes Bulk-Spektrum aus 78 Einzelmolekülspektren trimerer PSI-Komplexe einer PSI-Probe mit gleicher Vorbehandlung.

Die breite Fluoreszenzemissionsbande in einem Bulk-Spektrum kann somit als Ergebnis der Überlagerung mehrerer schmaler Banden angesehen werden. Die Fluoreszenzemissionsspektren einzelner PSI-Komplexe, aufgenommen bei tiefen Temperaturen, zeigen wie bereits gesehen, eine Vielzahl von Fluoreszenzbanden, die aber in Anzahl und Emissionswellenlänge stark variieren. Mit Hilfe der Histogramme wird ersichtlich, dass die PSI-Komplexe bis zu fünf Banden haben können. Aufgrund fehlender Literaturangaben zur Fluoreszenzemission der einzelnen Chlorophyllpools wird eine mögliche Zuordnung der detektierten Fluoreszenzbanden zu den einzelnen Chlorophyllpools diskutiert.

Wie bereits erwähnt, können aus dem Histogramm in **Abb. 6.6** insgesamt fünf Banden unterschieden werden, wobei die erste Bande bei ca. 690 nm emittiert. Bei dieser Bande handelt es sich wahrscheinlich um Chlorophyll *a*-Moleküle, die nicht mehr mit der Antenne verbunden sind. Dadurch kann die Anregungsenergie nicht mehr weitergeleitet werden und wird als Fluoreszenz emittiert. Je nach Anzahl freier bzw. ungekoppelter Chlorophylle ist diese Bande mehr oder weniger intensiv. Ist diese Bande sehr viel intensiver als die Fluoreszenzemissionsbanden der roten Chlorophyllpools, kann der Protein-Pigment-Komplex nicht mehr als intakter Komplex angesehen werden [110]. Ein kleiner Anteil an ungekoppelten Chlorophyllen muss aber hingenommen werden. Dieser Anteil variiert mit der Isolierungsmethode und Probenpräparation und kann nicht vollständig vermieden werden.

Eine weitere Fluoreszenzbande liegt zwischen ca. 696 nm und ca. 705 nm. Diese Bande zeigt für die einzelnen PSI-Komplexe keine definierte Emissionswellenlänge, die gehäuft auftritt, stattdessen konnte diese Bande sehr häufig über einen Wellenlängenbereich von ca. 10 nm detektiert werden. Sollte es sich hierbei um einen Chlorophyllpool handeln, kann dieser aufgrund des spektralen Bereiches, den die Bande dieses Pools abdeckt, nicht den roten Chlorophyllpools zugeordnet werden. Bei diesen Chlorophyllen könnte es sich unter physiologischen Bedingungen um mögliche Verbindungschlorophylle zwischen Antenne und Reaktionszentrum handeln.

Die Fluoreszenzbande, die zwischen 708 nm und 719 nm auftritt, zeigt für die meisten untersuchten PSI-Komplexe ein Maximum bei 716 nm. Diese Bande könnte die Fluoreszenzbande des roten Chlorophyllpools Chl708 sein. Wie bereits erwähnt konnte bei Bulk-Messungen nur eine dominante Bande mit einem Maximum bei 730 nm detektiert werden. Die Fluoreszenzemission von Chl708 wird wahrscheinlich durch die intensive und breite Bande des Chlorophyllpools Chl719 überlagert. Das lässt den Schluss zu, dass Chl708 weniger stark fluoresziert als Chl719 und somit eine kleinere Oszillatorstärke besitzt. Der STOKES Shift für

den roten Chlorophyllpool Chl708 beträgt, unter Annahme eines Fluoreszenzmaximums von 716 nm, 8 nm. Wie im Unterkapitel 3.4 „*Die roten Chlorophylle*“ beschrieben, besitzen die roten Chlorophyllpools aufgrund der exzitonischen Kopplung und dem Ladungstransfercharakter im Vergleich zu den Antennen-Chlorophyllen, die einen STOKES Shift zwischen 1 - 4 nm vorweisen, mit 20 nm einen sehr viel größeren STOKES Shift [83]. Ein STOKES Shift von ca. 8 nm für den roten Chlorophyllpool Chl708 würde deshalb im diesem Rahmen liegen.

Neben der nachgewiesenen Fluoreszenzemission für den Chlorophyllpool Chl708 zeigen fast alle Photosystem I- Komplexe eine sehr breite und sehr intensive Fluoreszenzbande mit einem Maximum von ca. 726 nm (siehe **Abb. 6.4** und **Abb. 6.6**). Diese Bande entspricht der Fluoreszenzbande des Chlorophyllpools Chl719 und wurde bereits in Fluoreszenzemissionsspektren bei tiefen Temperaturen von Ensemble-Proben, wie in **Abb. 6.7** gezeigt, nachgewiesen [4].

Zusätzlich zu den bereits genannten Banden konnte eine weitere Bande mit einem Maximum bei ca. 745 nm nachgewiesen werden (**Abb. 6.4C**, **Abb. 6.4D** und **Abb. 6.6**). Oft ist diese Fluoreszenzbande erst nach teilweisem Ausbleichen der sehr dominanten Bande bei 726 nm zu erkennen, wie **Abb. 6.9** verdeutlicht.

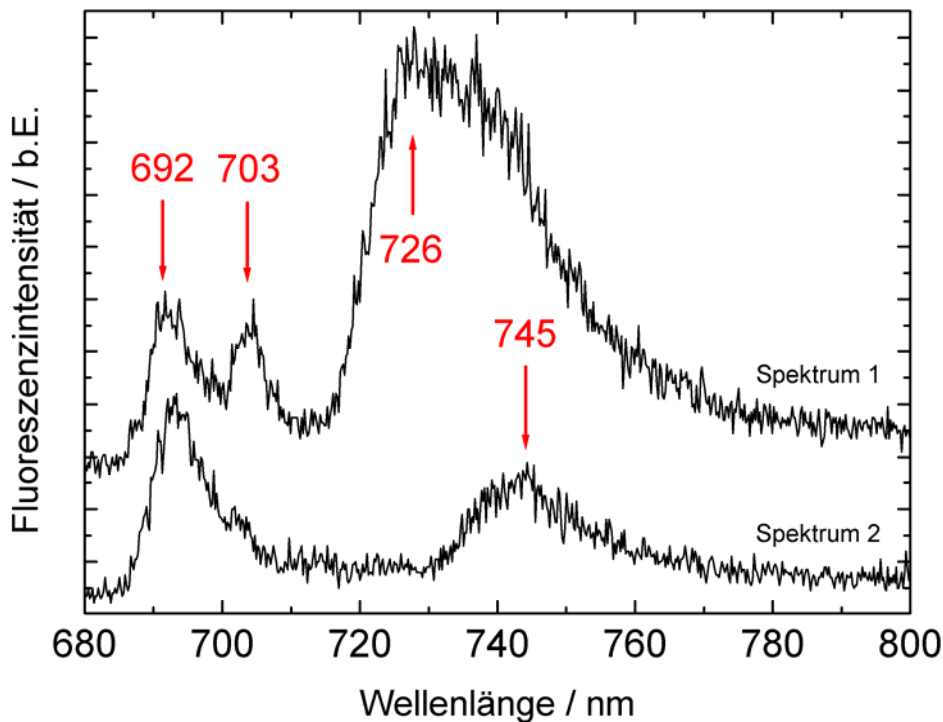


Abb. 6.9 Entwicklung eines Fluoreszenzmissionsspektrums während kontinuierlicher Beleuchtung. Die Abbildung zeigt zwei Fluoreszenzmissionsspektren eines PSI-Komplexes, aufgenommen bei tiefen Temperaturen. Der Übersichtlichkeit wegen sind die beiden Spektren vertikal zueinander verschoben. Während Spektrum 1 unmittelbar nach Positionierung des Lasers aufgenommen wurde, wurde Spektrum 2 nach einer Laserbeleuchtung des Komplexes von ca. 5 min aufgenommen.

Zu erkennen sind in Spektrum 1 insgesamt 3 Banden mit Hauptmaxima bei 692 nm, 703 nm und 726 nm. Im Gegensatz zu den Banden bei 692 nm und 703 nm zeigt die Bande bei 726 nm eine ausgeprägte Seitenbande an der roten Flanke, die sich bis zu einer Wellenlänge von 760 nm erstreckt. Die intensive Flanke des rötlichsten Chlorophyllpools entsteht durch starke Kopplungen [55-58]. Nach kontinuierlicher Beleuchtung des PSI-Moleküls ist im Fluoreszenzmissionsspektrum ein teilweises Ausbleichen der roten Chlorophylle zu erkennen. Während die Bande bei 692 nm stabil ist, bleicht die Bande bei 703 nm vollständig aus. Die Bande bei 726 nm verliert stark an Intensität; sichtbar wird eine weitere Bande bei 745 nm und somit ein weiterer Chlorophyllpool, der in Spektrum 1 wahrscheinlich aufgrund der sehr breiten und intensiven Bande bei 726 nm nicht zu identifizieren war. Ein Grund, warum diese rote Bande in Absorptionsspektren von PSI-Molekülen im Ensemble nicht identifiziert werden konnte, könnte eine schwache Oszillatorstärke des entsprechenden Übergangs sein.

Die Bande F716, die dem Chlorophyllpool Chl708 zugeordnet werden kann, ist in diesen zwei Spektren nicht zu erkennen. Dafür können mehrere Ursachen verantwortlich sein. Neben spektraler Diffusion und damit einer möglichen spektralen Verschiebung der Bande, die eine Zuordnung zu dem entsprechenden Pool nicht mehr zulassen würde, könnte die Bande F716 bereits ausgebleicht sein. Zusätzlich könnte sich durch den Einfrierprozess, sowie durch die Zufuhr von Anregungsenergie während der Messung, die Umgebung des Emitters derart ändern, dass eine energetische Kopplung entweder zum Reaktionszentrum oder zu anderen Chlorophyllpools induziert würde. Bei einer energetischen Kopplung würde die Anregungsenergie weitergeleitet und von dem entsprechenden Pigment nicht mehr als Fluoreszenz emittiert. Die genannten Ursachen sind allgemein gültig, und können auch auf alle anderen Fluoreszenzbanden übertragen werden, die nicht immer in den Einzelmolekülspektren der PSI-Komplexe zu sehen sind.

Tab. 6.2 zeigt zusammenfassend eine Übersicht der in Einzelmolekülspektren detektierten Fluoreszenzemissionsbanden und der zugeordneten Chlorophyllpools.

Tab. 6.2 Überblick über die in Einzelmolekülspektren detektierten Fluoreszenzemissionsbanden und eine mögliche Zuordnung zu den entsprechenden Chlorophyllpools.

Wellenlängenbereich / nm	Chlorophyllpool	Bemerkung
690 - 695	Ungekoppelte Antennen-Chlorophylle oder einzelne Chlorophyll <i>a</i> -Moleküle	Diese Chlorophylle sind energetisch nicht an die Antenne oder die roten Chlorophyllpools gekoppelt und geben die Anregungsenergie als Fluoreszenz ab
696 - 705	Pool ?	Mögliche Verbindungschlorophylle zwischen Antenne und Reaktionszentrum
706 - 719	Chl708	Die Fluoreszenzemission konnte in Ensemble-Messungen nicht nachgewiesen werden
720 - 735	Chl719	Im Ensemble nachgewiesen: $\lambda_{\max} = 730$ nm
736 - 751	Chl745	Unbekannter neuer Chlorophyllpool

Lochbrennversuche konnten einen weiteren roten Chlorophyllpool mit einem Absorptionsmaximum von 715 nm nachweisen. Sowohl die Einzelmolekülspektren als auch das Histogramm lassen keine Rückschlüsse auf die Fluoreszenzemission dieses Chlorophyllpools zu. Eine mögliche Ursache könnte eine sehr geringe Fluoreszenzquantenausbeute dieses Pools sein, so dass die Fluoreszenzintensität durch die Fluoreszenz der anderen Chlorophyllpools überlagert wird. Außerdem wäre es möglich, dass dieser Pool nicht fluoresziert und die Abre-

gung entweder durch Weiterleitung der Anregungsenergie zu einem der roten Chlorophyllpools oder durch interne Konversion erfolgt. Folglich wäre Chl715 nicht in einem Fluoreszenzemissionsspektrum nachzuweisen.

Anhand der diskutierten Einzelmolekülspektren konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzmolekülspektren einzelner PSI-Trimere viel mehr Fluoreszenzemissionsbanden zeigen als die entsprechenden Bulk-Spektren. Eine Beurteilung der Einzelmolekülspektren wird durch mehrere Faktoren erschwert. Neben spektraler Diffusion, dem Auftreten von Nullphononenlinie und Phononenseitenbande und der Tatsache, dass eine Fluoreszenzemissionsbande aufgrund der Struktur von PSI das Ergebnis von drei Emitttern ist, beeinflusst die Anregungsdauer des Komplexes die Anzahl der zu detektierenden Banden. Während am Anfang der Messung oft eine einzige sehr breite Bande im roten Spektralbereich zu sehen ist, bleichen einzelne Emittter im Laufe der Messung aus, so dass weniger intensive Banden spektral aufgelöst werden können. Im folgenden Abschnitt soll das Ausbleichverhalten einzelner PSI-Komplexe näher diskutiert werden.

6.5 Untersuchung des photophysikalischen und photochemischen Ausbleichverhaltens von einzelnen trimeren Photosystem I-Komplexen

Im folgenden Unterkapitel sollen verschiedene photophysikalische Eigenschaften der roten Chlorophyllpools vorgestellt werden. Dazu wurden Fluoreszenzemissionsspektren einzelner PSI-Komplexe zu verschiedenen Zeitpunkten bei kontinuierlicher Beleuchtung aufgenommen. Anhand von Intensitätsschwankungen kann einerseits auf die Photosensitivität der einzelnen roten Chlorophyllpools sowie auf den Zustand des Komplexes geschlossen werden. **Abb. 6.10** zeigt Fluktuationen der Fluoreszenzintensität bzw. das spektrale Verhalten der roten Chlorophyllpools eines PSI-Komplexes während kontinuierlicher Beleuchtung. In **Abb. 6.10A** sieht man drei Spektren, die zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen wurden: Spektrum 1 am Anfang der Messung ($t = 0$ s), Spektrum 50 nach 150 s und Spektrum 100 nach 300 s Beleuchtungsdauer. Der Übersicht wegen wurden die drei Spektren geglättet (gleitender Durchschnitt). Während **Abb. 6.10A** Momentaufnahmen des Komplexes zu bestimmten Zeitpunkten wiedergibt, kann in einem 2D-Plot das dynamische Verhalten der Fluoreszenzemissionsbanden über den gesamten Verlauf einer Messung verfolgt werden (**Abb. 6.10B**). Dazu wurden insgesamt 100 Spektren nacheinander aufgereiht, und die Intensität farbkodiert.

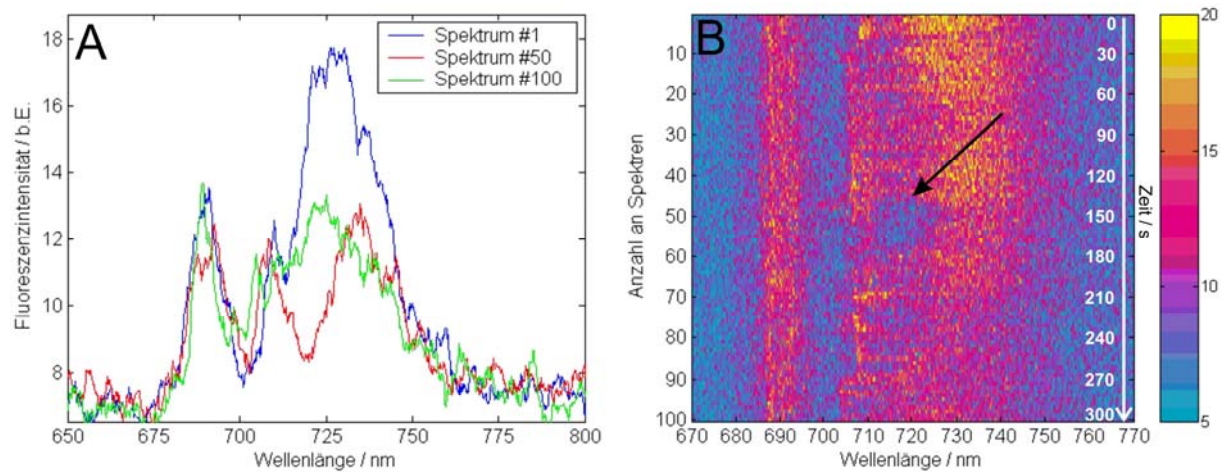
Fall 1: Blinken von Fluoreszenzemissionsbanden

Abb. 6.10 Während in (A) drei Momentaufnahmen der Fluoreszenzmission der roten Chlorophyllpools gezeigt sind, gibt (B) die zeitliche Veränderung der Fluoreszenzintensität bei kontinuierlicher Beleuchtung durch die Aneinanderreihung von insgesamt 100 Spektren wieder. Die Stärke der Fluoreszenzintensität ist über eine Farbkodierung dargestellt. Fluktuationen der Fluoreszenzintensität weisen für die Fluoreszenzemissionsbande F716 auf ein Phänomen hin, das als so genanntes Blinken bekannt ist. Dieses Verhalten kann bei einzelnen organischen Molekülen beobachtet werden, die für eine gewisse Zeitdauer in einen nicht-fluoreszierenden Zustand übergehen (durch einen Pfeil markiert). Die Messdauer betrug insgesamt 300 s.

Während die Fluoreszenzemissionsbanden bei einer Wellenlänge von ca. 690 nm und 709 nm während der Messung als nahezu photostabil anzusehen sind, bleicht die breite, intensive Bande mit einem Maximum von ca. 725 nm aus. Der PSI-Komplex zeigt ein Phänomen, das häufiger bei den roten Chlorophyllpools detektiert werden kann. Es ist als so genanntes Blinken bekannt. Dabei geht ein ursprünglich fluoreszierender Zustand für eine bestimmte Zeitdauer in einen nicht-fluoreszierenden Zustand über. In **Abb. 6.10B** ist diese Stelle durch einen Pfeil markiert. Nicht-fluoreszierende Zustände können beispielsweise Triplettzustände sein (siehe Kapitel 7 „Fluoreszenzkorrelationsanalyse“). Diese Zustände haben eine begrenzte Lebensdauer und gehen wieder in den fluoreszierenden Zustand über. Im Gegensatz hierzu können die roten Chlorophyllpools auch dauerhaft ausbleichen und sind dann nicht mehr in der Lage die Anregungsenergie als Fluoreszenz zu emittieren (**Abb. 6.11**).

Fall 2: Komplettes Ausbleichen der Fluoreszenzemissionsbanden der roten Chlorophyllpools

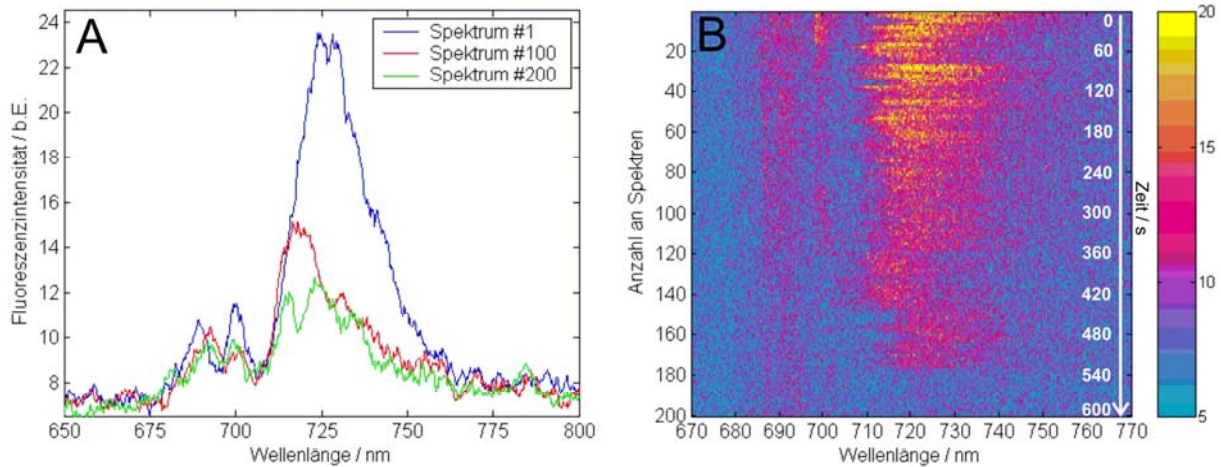


Abb. 6.11 Sowohl in (A) als auch in (B) kann man erkennen, dass alle roten Chlorophyllpools im Laufe der Messung (die Messdauer betrug insgesamt 600 s) vollständig ausbleichen.

Nach ca. 540 s ist kein roter Chlorophyllpool in der Lage mehr Fluoreszenz abzustrahlen, weshalb man davon ausgehen kann, dass entweder die roten Chlorophyllpools oder aber der Protein-Pigment-Komplex selbst durch die dauerhafte Beleuchtung zerstört worden sind.

Fall 3: Photostabiler Photosystem I-Komplex

Neben PSI-Komplexen, die im Verlauf einer Messung vollständig ausbleichen, gibt es Komplexe, die sehr photostabil sind und fast keine photophysikalische Dynamik zeigen (**Abb. 6.12**). Die Fluoreszenzintensität kann hier als annähernd konstant angesehen werden.

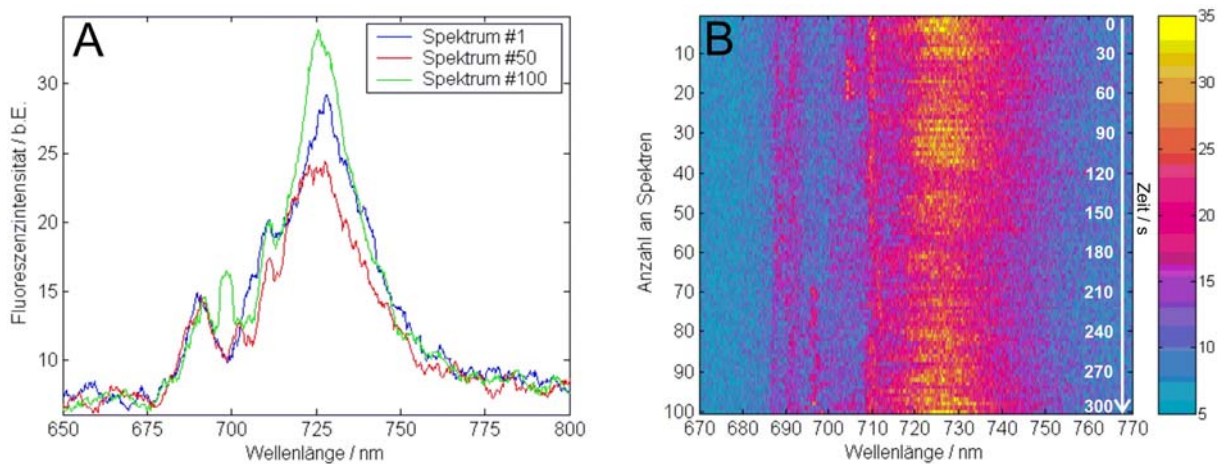


Abb. 6.12 Die Fluoreszenzemissionsbanden der roten Chlorophyllpools bleiben während der gesamten Messdauer von 300 s photostabil.

Im Verlauf einer Messung kann der PSI-Komplex bzw. können die roten Chlorophyllpools verschiedene photophysikalische Zustände annehmen, die sich durch unterschiedlich starke Fluoreszenzintensitäten (**Abb. 6.13**) oder durch spektrale Sprünge einzelner Fluoreszenzemissionsbanden (**Abb. 6.14**) auszeichnen.

Fall 4: Schrittweises Ausbleichen der Fluoreszenzemissionsbanden

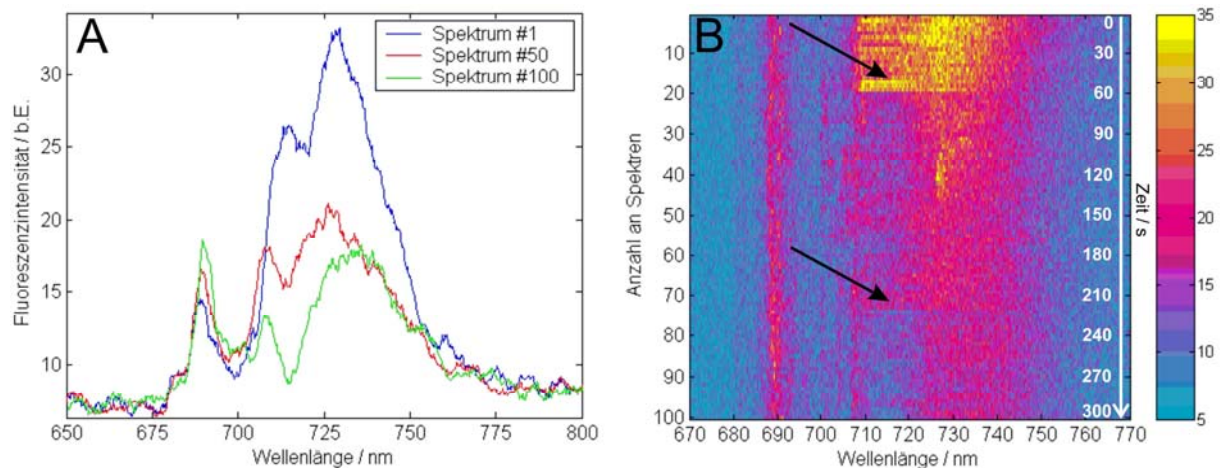


Abb. 6.13 Gezeigt ist sowohl das schrittweise Ausbleichen der einzelnen Emitter eines Chlorophyllpools (gezeigt durch die Pfeile) sowie der Chlorophyllpool Chl745, der erst durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität von Chl719 sichtbar wird. Die Messdauer betrug insgesamt 300 s.

In **Abb. 6.13** kann das sukzessive Ausbleichen der breiten, dominanten Fluoreszenzbande bei ca. 725 nm beobachtet werden. Übrig bleibt eine Bande mit einem Fluoreszenzmaximum von 735 nm. Diese Bande wird wahrscheinlich von dem neu detektierten Chlorophyllpool emittiert, obwohl das Fluoreszenzmaximum für diesen Chlorophyllpool sehr weit im Blauen liegt. Aufgrund der Abhängigkeit der Fluoreszenzwellenlänge von der Umgebung ist eine solche spektrale Verschiebung aber durchaus möglich. Daneben kann das schrittweise Ausbleichen der Fluoreszenzbande bei 716 nm beobachtet werden. Bei 60 s (Spektrum 20) und nach ca. 220 s (Spektrum 72) ist jeweils eine sprunghafte Abnahme der Fluoreszenzintensität zu sehen (siehe Markierung in **Abb. 6.13B**). Zurückzuführen ist dieses schrittweise Ausbleichen auf die Struktur des PSI-Komplexes selbst. Durch die trimere Struktur liegt jeder Emitter dreimal im Komplex vor. Während anfänglich noch alle drei Emitter fluoreszieren, bleichen diese im Laufe der Messung aus. Das sukzessive Ausbleichen der Emitter einer Fluoreszenzemissionsbande könnte hier in diesem Fall noch teilweise von einem Blinken

(nach ca. 90 s, d.h. bei Spektrum 30) oder von der spektralen Diffusion (nach 120 s, d.h. bei ca. Spektrum 40) begleitet sein.

Fall 5: Spektrale Diffusion

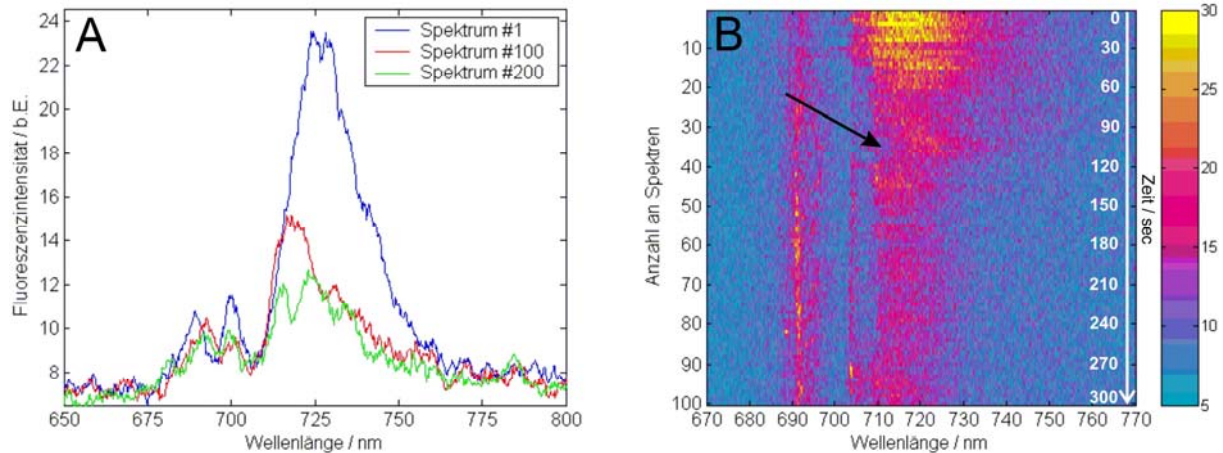


Abb. 6.14 Während man in (A) nur das Ausbleichen der Bande um 725 nm erkennen kann, zeigt sich in (B) ein spektraler Sprung von 716 nm zwischen 90 und 120 s (zwischen Spektrum 30 und Spektrum 40). Bei der ursprünglichen Wellenlänge nimmt die Fluoreszenzintensität plötzlich ab, während sie bei ca. 722 nm drastisch ansteigt. Die Messdauer betrug insgesamt 300 s.

Aufgrund der Komplexität der Fluoreszenzemissionsspektren der PSI-Komplexe aus *TS. elongatus* ist es oft schwierig zu beurteilen, ob es sich im vorliegenden Fall um ein Blinken (Abb. 6.10) des Chlorophyllpools oder um spektrale Diffusion (Abb. 6.14) handelt. Während sich das Blinken im Allgemeinen ausschließlich durch eine sprunghafte Abnahme in der Intensität einer bestimmten Fluoreszenzbande bemerkbar macht, sollte bei der spektralen Diffusion zusätzlich zu der Intensitätsabnahme bei einer bestimmten Wellenlänge eine Zunahme der Intensität bei einer benachbarten Wellenlänge erfolgen. Durch die große Anzahl an Fluoreszenzbanden, die in einem Fluoreszenzspektrum von PSI aus *TS. elongatus* zu sehen sind, die ebenso Fluktuationen in Intensität und Emissionswellenlänge zeigen, kann eine definitive Aussage bezüglich spektraler Diffusion oder Blinken des Chlorophyllpools oft nicht gemacht werden.

6.6 Zusammenfassung des Kapitels

Nach Überprüfung der Integrität der PSI-Komplexe aus *TS. elongatus* mittels Absorptionsspektroskopie und dem Nachweis der roten Chlorophyllpools über ein Fluoreszenzmissionsspektrum wurde die PSI-Probe so präpariert, dass die PSI-Komplexe spektroskopisch auf Einzelmolekülebene untersucht werden konnten. Die Spektren der Einzelmoleküluntersuchungen von PSI aus *TS. elongatus* zeigen, dass in einem Spektralbereich größer 700 nm, mehrere Banden detektiert werden können. Fluoreszenzmissionsspektren von PSI-Komplexen im Ensemble dagegen zeigen nur eine einzige dominante Emissionsbande mit einem Maximum bei 730 nm, die dem roten Chlorophyllpool Chl719 zugeordnet wurde. Diese breite Fluoreszenzmissionssbande ist das Ergebnis einer Überlagerung mehrerer schmaler Banden, die in Ensemble-Messungen nicht aufgelöst werden können. Insgesamt konnten gleichzeitig bis zu vier Banden in einem Spektrum eines PSI-Komplexes nachgewiesen werden, die teilweise von Nullphononenlinien begleitet wurden. Die große Heterogenität der Fluoreszenzmissionsspektren der einzelnen PSI-Komplexe lässt sich auf den komplexen Aufbau dieses biologischen Systems wie auf die spektralen Eigenschaften der fluoreszierenden Pigmente zurückführen. Eine statistische Analyse der Verteilung der Emissionswellenlängen ermöglicht eine grobe Einteilung der Emissionswellenlängen in insgesamt fünf verschiedene Fluoreszenzmissionssbanden. Zwei dieser Banden konnten nach Vergleich mit Literaturdaten den roten Chlorophyllpools Chl708 und Chl719 zugeordnet werden. Demnach fluoresziert neben Chl719 auch Chlorophyllpool Chl708, was in Ensemble-Messungen nicht nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurden drei weitere Fluoreszenzmissionssbanden ermittelt, wovon eine Bande erst nach teilweisem Ausbleichen der sehr dominanten Bande F725 des Chlorophyllpools Chl719 bei einer Wellenlänge von ca. 745 nm hinreichend gut aufgelöst werden kann. Diese Fluoreszenzmissionssbande wurde bis jetzt noch nicht in der Literatur erwähnt und der dazugehörige Chlorophyllpool wurde deshalb, nach dem Emissionsmaximum seiner Fluoreszenzmissionssbande, als Chl745 bezeichnet, da keine Absorptionsdaten verfügbar waren (Anmerkung: die in der Literatur genannten Namen der Chlorophyllpools beziehen sich auf das Absorptionsmaximum, gemessen bei tiefen Temperaturen zwischen 77 und 4 K). In dem Wellenlängenbereich zwischen 690 und 705 nm werden zwei Fluoreszenzmissionssbanden detektiert. Die dazugehörigen Chlorophyllpools können per Definition nicht eindeutig zu den roten Chlorophyllpools gezählt werden. Diese Banden sind im Gegensatz zu den Fluoreszenzbanden der roten Chlorophyllpools relativ schmal und weisen auf die Anwe-

senheit schwach gekoppelter Chlorophylle hin, die nicht in der Lage sind, die Anregungsenergie auf die roten Chlorophyllpools zu übertragen und somit fluoreszieren. Unter physiologischen Bedingungen könnten diese Chlorophylle die Energie auf den ersten Elektronendonator P700 übertragen, da bei Raumtemperatur die Emissionsbanden breiter werden, was zu einer besseren spektralen Überlappung zwischen der Fluoreszenzbande dieser Chlorophyllpools und der Absorptionsbande von P700 führen könnte. Dadurch würde sich die Effizienz des Energietransfers erhöhen.

Die einzelnen Fluoreszenzemissionsbanden zeigen ein unterschiedliches dynamisches Verhalten über einen bestimmten Zeitraum bei kontinuierlicher Beleuchtung. Neben sehr photostabilen PSI-Komplexen, bleichen sehr viele PSI-Komplexe im Verlauf der Messung aus. In mehreren PSI-Komplexen konnte ein schrittweises Ausbleichen von einzelnen Fluoreszenzemissionsbanden detektiert werden. Schrittweises Ausbleichen kann auf das sukzessive Ausbleichen einzelner Chlorophyllpools in den trimeren Untereinheiten von PSI hindeuten, wenn keine energetische Konnektivität für den jeweiligen Chlorophyllpool zwischen den Antennensystemen besteht bzw. wenn diese unterbrochen ist. Des Weiteren konnte spektrale Diffusion sowie Blinken (Übergang zwischen fluoreszierenden Zustand und Dunkelzustand) von einzelnen Fluoreszenzemissionsbanden detektiert werden. Dunkelzustände können auf dynamische Prozesse, wie dem Übergang in den „langlebigen“ Tripletzustand, zurückgeführt werden. Mit Hilfe der Autokorrelationsanalyse können solche dynamischen Prozesse innerhalb eines Systems genauer untersucht werden. Dies wird im nächsten Kapitel beschrieben.

7 Fluoreszenzkorrelationsanalyse

7.1 Zielsetzung

Der Photonenemissionsstrahl enthält Informationen über intramolekulare dynamische Prozesse. Durch Erstellen einer Photonenstatistik können aus der zeitlichen Abfolge emittierter Photonen eines einzelnen Moleküls die Lebensdauern elektronischer Zustände sowie die Geschwindigkeitskonstanten der Übergänge zwischen den elektronischen Zuständen ermittelt werden. Eine Autokorrelationsfunktionsanalyse über die Ankunftszeiten der von den roten Chlorophyllpools emittierten Fluoreszenzphotonen ermöglicht es, die Populations- und Depopulationsrate, d.h. die Lebensdauer des Triplettzustandes der roten Chlorophyllpools in PSI zu bestimmen.

7.2 Grundlagen

Die Quantenzustände eines Chlorophyllpools können vereinfacht durch ein JABLONSKI-Termschema veranschaulicht werden.

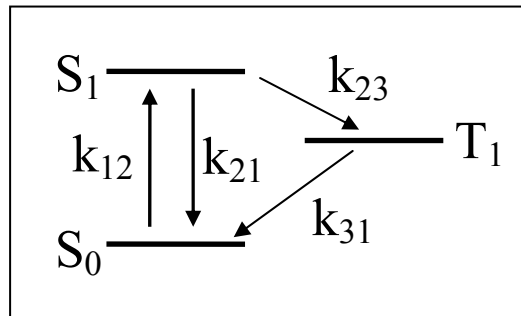


Abb. 7.1 Die Abbildung zeigt ein vereinfachtes JABLONSKI-Termschema mit den Singulettzuständen S_1 und S_2 und dem Triplettzustand T_1 eines Quantensystems. Verbunden sind die einzelnen Quantenzustände über die Übergangsraten k_{ij} .

In dem JABLONSKI-Diagramm (**Abb. 7.1**) sind die für das Emissionsverhalten wichtigen elektronischen Zustände eines Quantensystems dargestellt, in PSI einem roten Chlorophyllpool entsprechend. Gemäß dem KASHA-Prinzip kann als höchster elektronischer Zustand der erste angeregte Singulettzustand angenommen werden [90]. Aus dem ersten angeregten Singulettzustand kann das System entweder über interne Konversion oder durch Emission von Fluoreszenzphotonen in den Singulett-Grundzustand oder durch Intersystem Crossing in den ersten angeregten Triplettzustand übergehen. Die Übergänge zwischen S_0 und S_1 sind aufgrund der Spinerhaltung (Multiplizität) erlaubte Übergänge. Die Übergangsraten eines erlaubten Übergangs sind sehr hoch und die Lebensdauern deshalb der beteiligten elektronischen Zustände sehr kurz. Die Lebensdauer des ersten angeregten Singulettzustands liegt im Bereich von Nanosekunden. Aufgrund des Spinverbots geht das System nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit aus dem angeregten Singulettzustand in den metastabilen Triplettzustand über. Die Lebensdauer von T_1 ist im Vergleich zu der Lebensdauer der angeregten Singulettzustände sehr lang und kann bis zu einigen Sekunden betragen. Durch Emission von Phosphoreszenz kann eine Rückkehr des Systems in den Singulett-Grundzustand erfolgen [111].

7.2.1 Bedeutung der Grundlagen für die Untersuchung einzelner Moleküle mittels Autokorrelationsanalyse

Vom Singulett-Grundzustand ausgehend kann ein einzelnes Quantensystem durch Absorption eines Lichtquants in den ersten angeregten Singulettzustand überführt werden, von wo es durch Emission eines Fluoreszenzphotons wieder in den Singulett-Grundzustand übergehen kann. Nachdem ein Fluoreszenzphoton emittiert wurde, kann erst nach einer weiteren Absorption eines Photons, ein Fluoreszenzphoton emittiert und detektiert werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Fluoreszenzphotonen zur selben Zeit an einem Detektor ankommen, ist deshalb null. Man spricht von Photonen-Antibunching (**Abb. 7.2**).

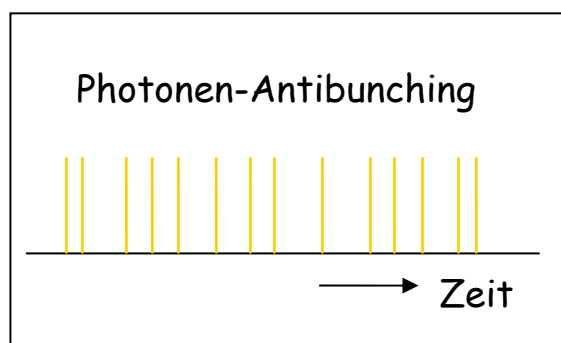


Abb. 7.2 Zeitliches Verhalten eines Photonenstrahls für einen S_0 - S_1 -Übergang in einem Quantensystem mit resultierendem Photonen-Antibunching. Zeitskala: Nanosekunden-Bereich.

Während das System zwischen S_0 und S_1 oszilliert, werden aufgrund der Lebensdauer von S_1 kontinuierlich Fluoreszenzphotonen im Nanosekunden-Bereich emittiert. Durch Intersystem Crossing geht das System in den Triplettzustand T_1 über. In der Zeit, in der sich das System im Triplettzustand befindet, werden keine Photonen emittiert. Im *time trace* ist dieses Verhalten als so genanntes Dunkelintervall zu sehen. Da die Lebensdauer von T_1 sehr viel länger ist als die Lebensdauer von S_1 entstehen so genannte Photonenbündel aufgrund zahlreicher S_0 - S_1 -Übergänge, die durch Dunkelintervalle voneinander getrennt sind (Photonen-Bunching, siehe **Abb. 7.3**).

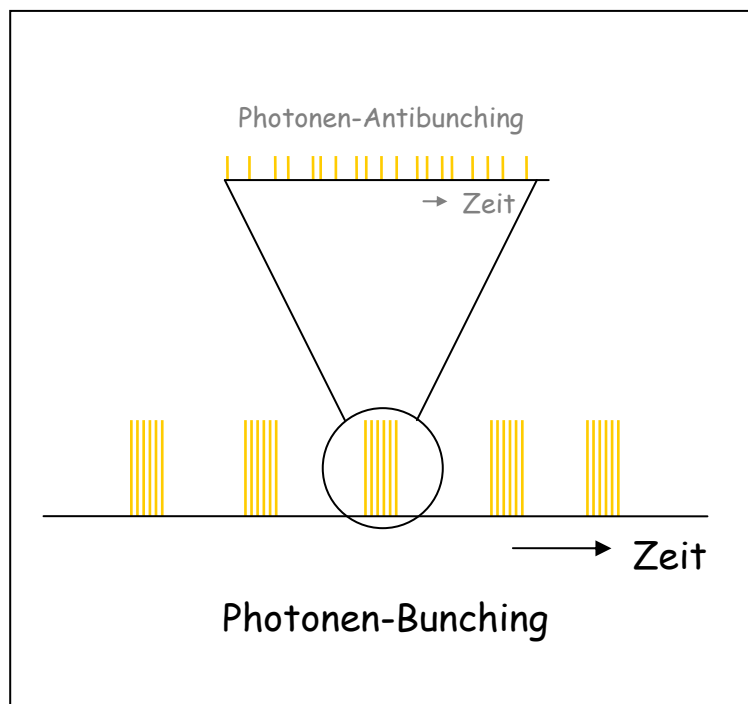


Abb. 7.3 Zeitliches Verhalten eines Photonenstrahls für ein einzelnes Quantensystem mit einem Tripletzustand. Die mittlere Zeitdauer des Dunkelintervalls entspricht der Triplet-Lebensdauer. Die Zeitskala geht bis in den Sekundenbereich.

Wie aus den **Abb. 7.2** und **Abb. 7.3** ersichtlich ist, können verschiedene intramolekulare dynamische Prozesse in verschiedenen Zeitbereichen untersucht werden. Die schnellen dynamischen Prozesse im Nanosekunden-Bereich entsprechen Übergängen zwischen S_0 und S_1 , während die Prozesse auf längeren Zeitskalen dem Intersystem Crossing zwischen den Singulettzuständen und dem Tripletzustand zugeordnet werden können. Eine Analyse der Verteilung der Ankunftszeiten der Photonen über einen bestimmten Zeitbereich ermöglicht somit die Bestimmung der Lebensdauern der elektronischen Zustände und den Geschwindigkeitsraten.

7.2.2 Die Autokorrelationsfunktion

Die quantitative Analyse der zeitlichen Abfolge der emittierten Photonen kann unter Zuhilfenahme einer Autokorrelationsfunktion erfolgen. Die Autokorrelationsanalyse wird im Allgemeinen zur statistischen Untersuchung stochastischer dynamischer Prozesse herangezogen, die von einem hohen Hintergrundrauschen überlagert werden. Hintergrundrauschen entsteht zufällig und ist deshalb unkorreliert, im Gegensatz zu stochastisch dynamischen

Prozessen eines einzelnen Moleküls, bei denen die emittierten Photonen einem Mechanismus unterliegen und somit korreliert sind. Die Autokorrelationsfunktion eines unkorrelierten Signals strebt gegen einen konstanten Wert, während die Autokorrelationsfunktion eines korrelierten Signals eine charakteristische Form aufweist. Mathematisch gesehen wird durch die Autokorrelationsfunktionsanalyse die Ähnlichkeit einer Funktion, mit einer zeitlich um eine Zeitkonstante τ verschobenen Kopie dieser Funktion, bestimmt (mathematische Faltung). Je größer die Ähnlichkeit, d.h. die Überlappung der um die Zeitkonstante τ verschobenen Funktionen, umso größer ist die Korrelation. Die Autokorrelationsfunktion $C_f(\tau)$ wird allgemein beschrieben als

$$C_f(\tau) = \int f(t) f(t+\tau) dt. \quad (7.1)$$

Die Intensitätsautokorrelationsfunktion $C_I(\tau)$ bzw. die Korrelationsfunktion zweiter Ordnung der Intensität $G^{(2)}(\tau)$, ist definiert als die Detektionsrate eines Photonenpaares, das durch die Zeit τ getrennt ist, pro Zeiteinheit, bzw. die bedingte Wahrscheinlichkeit des Auftretens zweier Photonen mit Zeitabstand τ .

$$C_I(\tau) = \int I(t) I(t+\tau) dt = G^{(2)}(\tau). \quad (7.2)$$

Mittels dieser Funktion können die Fluoreszenz-Lebensdauern sowie die Populations- und Depopulationszeiten des Triplettzustandes bestimmt werden. Die normierte Form der Intensitätsautokorrelationsfunktion $C_I(\tau)$ lautet

$$g^{(2)}(\tau) = \langle I(t) I(t+\tau) \rangle / \langle I(t) \rangle^2, \quad (7.3)$$

wobei $I(t)$ die Fluoreszenzintensität zur Zeit t bzw. die Photonenzählrate ist [112], mit

$$\langle I(t) I(t+\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t) I(t+\tau) dt. \quad (7.4)$$

Die normierte Form der Intensitätsautokorrelationsfunktion erhält man somit durch eine Mittelung über die Zeit. Durch Messung der Photonen über eine lange Integrationszeit kann die Intensitätskorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ durch Zählen der Photonenpaare, die durch die Zeit τ getrennt sind, ermittelt werden.

Die Korrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität ergibt sich aus den optischen BLOCH-Gleichungen, den Bewegungsgleichungen für Dreiniveausysteme. Da kohärente Effekte wie die RABI-Oszillation für die Betrachtung des Photonen-Bunchings aufgrund der zeitlichen Zuordnung vernachlässigt werden können, vereinfachen sich die BLOCH-Gleichungen auf die Terme, die den inkohärenten Prozess des Photonen-Bunchings beschreiben. Das Photonen-Bunching und somit die Quantensprünge zwischen den Singulett- und Triplettzuständen können als Abnahme in der Korrelationsfunktion gesehen werden [13].

Für die Korrelationsfunktion langer Zeitskalen ergibt sich dann, unter der Bedingung, dass der Triplettzustand durch ein Niveau beschrieben werden kann, ein exponentieller Zerfall erster Ordnung:

$$C(\tau) = A + B \exp(-\lambda_{ex}\tau), \quad (7.5)$$

wobei τ die bereits erwähnte Zeitkonstante ist, A den Ordinatenabschnitt darstellt, B die Amplitude und λ_{ex} die Zerfallsrate der Fitfunktion ist.

Unter der Annahme, dass zum einen die Intersystem Crossing-Raten k_{23} und k_{31} sehr viel kleiner sind als die Übergangsraten k_{12} und k_{21} zwischen S_0 und S_1 und zum anderen kleiner sind als die Dephasierungsrate Γ_2 und der Phasenverlust zwischen S_1 und S_0 , ergibt sich für die Zerfallsrate der Korrelationsfunktion für lange Zeitskalen [12]

$$\lambda_{th} = k_{31} + k_{31} \frac{I}{I_S} \left(\frac{1}{1 + \frac{2k_{31}}{k_{23}} \frac{I}{I_S}} \right), \quad (7.6)$$

mit I als Anregungsintensität, k_{31} der Depopulationsrate des Triplettzustandes, k_{23} der Populationsrate des Triplettzustandes und λ_{th} der berechneten Zerfallsrate. Die Sättigungsintensität I_S ist eine Systemkonstante.

Aus Gleichung (7.6) folgt, dass für niedrige Anregungsleistungen die Photonenbündel und damit die Hellintervalle im *time trace* im Gegensatz zu den Dunkelintervallen, die der durchschnittlichen Lebensdauer des Triplettzustandes entsprechen, sehr lange andauern. Wenn die Anregungsleistung sehr klein wird, dann entspricht die Zerfallsrate λ_{th} der Depopulationsrate k_{31} . Für unendlich große Anregungsleistungen ist die Besetzungswahrscheinlichkeit des ersten angeregten Singulettzustandes maximal. Wird das System direkt durch Einstrahlung von Licht angeregt, dann liegt die maximale Besetzungswahrscheinlichkeit von S_1 aufgrund der Absorption und der stimulierten Emission bei 50%. Die Zerfallsrate der Korrelationsfunktion ist unter diesen Bedingungen nur noch von der Populationsrate des Triplettzustandes abhängig. Geht die Anregungsleistung gegen unendlich, dann ist die berechnete Zerfallsrate $\lambda_{th} = k_{23}/2$. Für den Fall einer Sättigung von S_1 aufgrund sehr hoher Anregungsleistungen wird die Dauer der Hellintervalle unabhängig von der Anregungsleistung. Ist noch keine Sättigung erreicht, dann ist die durchschnittliche Dauer eines Hellintervalls umgekehrt proportional der Anregungsleistung bis eine Sättigung erreicht wurde.

Photosystem I wird in der Antenne angeregt, die die Anregungsenergie bei tiefen Temperaturen auf die roten Chlorophyllpools weiterleitet. Durch die indirekte Anregung ist eine stimulierte Emission aus dem ersten angeregten Singulettzustand S_1 nicht möglich; die Besetzungswahrscheinlichkeit von S_1 liegt unter diesen Bedingungen bei 100%. Im Grenzfall unendlicher hoher Anregungsleistungen ergibt sich für die Populationsrate des Triplettzustandes k_{23} : $\lambda_{th} = k_{23}$.

Die Autokorrelationsanalyse in Kombination mit der Einzelmolekülspektroskopie ermöglicht es somit, dynamische Prozesse eines einzelnen PSI-Komplexes bei kontinuierlicher Anregung (ohne Verwendung eines gepulsten Lasers) zu untersuchen, die bei Ensemble-Messungen nicht zugänglich wären. Bei Ensemble-Messungen sind die Photonen der vielen PSI-Komplexe unkorreliert und die Autokorrelationsfunktion der Ensemble-Messung strebt gegen 1, $g^{(2)}(\tau) = 1$.

7.3 Ergebnisse

Die Autokorrelationsfunktionen von einzelnen trimeren Photosystem I-Komplexen aus *TS. elongatus* wurden bei 1,6 K mit dem in Kapitel 5 „*Experimenteller Aufbau und Probenpräparation*“ beschriebenen Aufbau gemessen. Dabei wurde die Anregungsleistung

zwischen $4 \mu\text{W}$ und $600 \mu\text{W}$ variiert. Zur Messung der Autokorrelationsfunktion wurde die gesamte Fluoreszenz mit einer Wellenlänge größer 680 nm detektiert. Somit steuern alle roten Chlorophyllpools Fluoreszenzphotonen zur Autokorrelationsfunktion bei. In **Abb. 7.4** ist eine Auswahl von Autokorrelationsfunktionen und den dazugehörigen Fitfunktionen einzelner PSI-Komplexe bei verschiedenen Anregungsleistungen zusammengestellt.

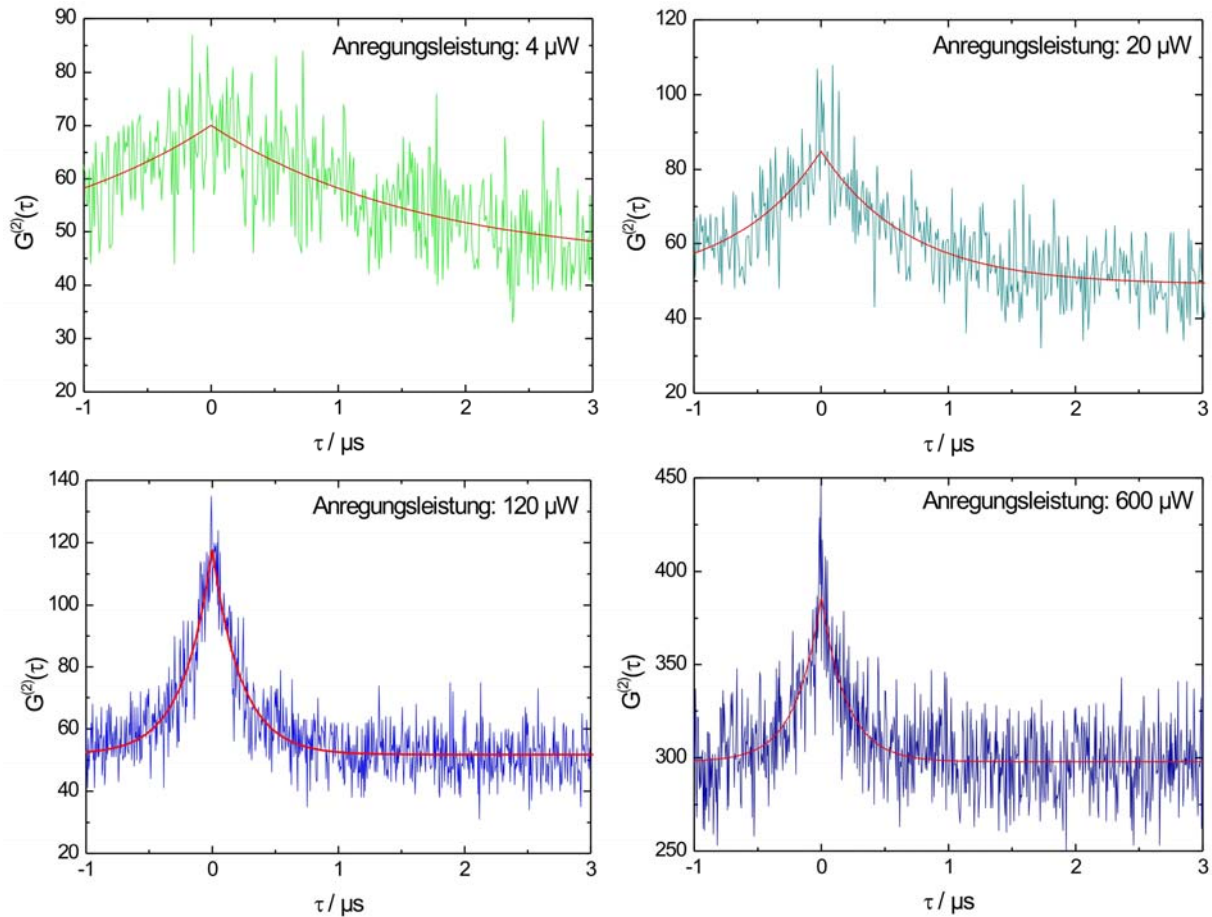


Abb. 7.4 Auswahl von nicht normierten Autokorrelationsfunktionen verschiedener PSI-Komplexe, aufgenommen für vier unterschiedliche Anregungsleistungen zwischen $4 \mu\text{W}$ und $600 \mu\text{W}$. Die Autokorrelationsfunktionen können mittels einer Funktion ersten Grades $C(\tau) = A + B \exp(-\lambda_{ex} \tau)$ gefittet werden.

Aus den exponentiellen Fitfunktionen kann die Zerfallsrate λ_{ex} der Korrelation ermittelt werden. Die Funktion wird mittels eines monoexponentiellen Zerfalls gefittet, und die Zerfallsrate λ_{ex} beträgt für eine Funktion, aufgenommen bei einer Anregungsleistung von $4 \mu\text{W}$, $0,61 \text{ MHz}$. Je höher die Anregungsleistung wird, umso steiler fällt die Autokorrelationsfunktion ab, was in **Abb. 7.4** deutlich zu sehen ist. Während bei einer Anregungsleistung von

20 μW und 120 μW die Zerfallsraten λ_{ex} 1,46 bzw. 5,00 MHz betragen, steigt die Zerfallsrate λ_{ex} bei 600 μW bis auf 5,12 MHz an (**Tab. 7.1**).

Tab. 7.1 Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die Zerfallsraten λ_{ex} der Autokorrelationsfunktionen, aufgenommen bei verschiedenen Anregungsleistungen. Mit ansteigender Anregungsleistung nimmt auch die Zerfallsrate λ_{ex} zu. Aus den Zerfallsraten können die zugehörigen Zerfallskonstanten berechnet werden.

Anregungsleistung P_{ex} [μW]	Zerfallsrate λ_{ex} [MHz]	Zerfallskonstante $1/\lambda_{\text{ex}}$ [μs]
4	0,61	1,650
20	1,46	0,684
120	5,00	0,200
600	5,12	0,197

Durch die hohe Anregungsleistung steigt die Besetzungswahrscheinlichkeit des ersten angeregten Singulettzustandes an. Dadurch nimmt die Wahrscheinlichkeit eines Intersystem Crossing-Übergangs in den Triplettzustand zu. Durch eine höhere Übergangswahrscheinlichkeit des Systems in den Triplettzustand überzugehen, verkürzt sich die Dauer der Photonenbündel, wodurch die Autokorrelationsfunktion im Vergleich zu der Autokorrelationsfunktion, aufgenommen bei geringer Anregungsintensität, schneller abfällt.

Der Triplettzustand ist aufgrund anisotroper, dipolarer Wechselwirkung der zwei ungepaarten Elektronenspins auch in Abwesenheit eines magnetischen Feldes in drei Unterniveaus $|X\rangle$, $|Y\rangle$, $|Z\rangle$ aufgespalten, die aber mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit bevölkert werden. So zeigt die Autokorrelationsfunktion des aromatischen Kohlenwasserstoffs Pentacene trotz der Nullfeld-Aufspaltung des Triplettzustandes nur einen biexponentiellen Zerfall. Zwei Triplett-Subniveaus weisen ähnliche Intersystem Crossing-Raten auf und sind deshalb nicht voneinander zu unterscheiden. In der Autokorrelationsfunktion für Pentacene sind deshalb nur zwei Zerfallsraten zu erkennen [113]. Die Autokorrelationsfunktionen der roten Chlorophyllpools scheinen von nur einer Zerfallsrate dominiert zu werden. Wie für Pentacene könnten zwischen dem angeregten Singulettzustand und den drei Subniveaus des metastabilen Triplettzustands ähnliche Übergangsraten existieren, die in der Autokorrelationsfunktion nicht zu unterscheiden sind. Eine weitere Erklärung des monoexponentiellen Zerfalls könnte eine bevorzugte Bevölkering eines der drei Subniveaus sein, wodurch nur eine Populations- bzw. Depopulationsrate messbar ist.

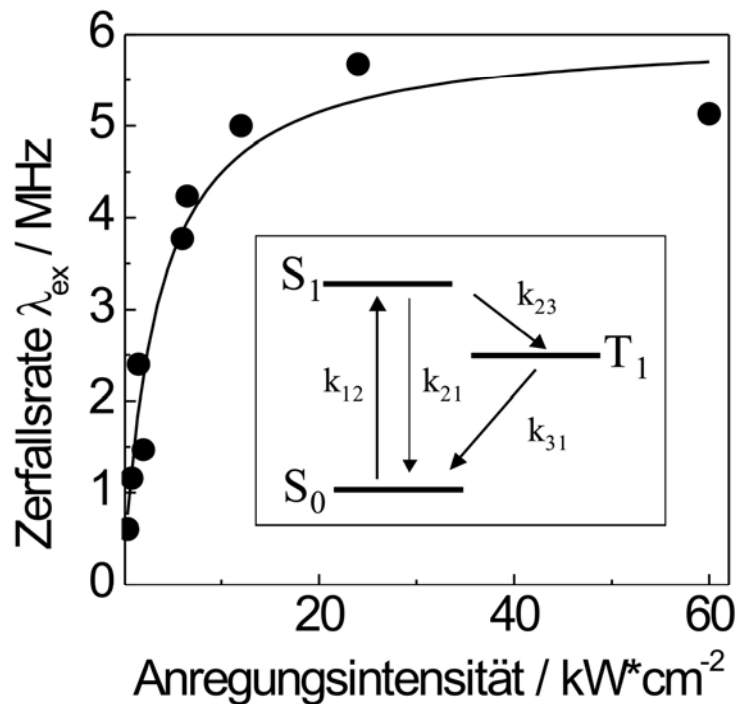


Abb. 7.5 Aufgetragen sind die aus den Autokorrelationsfunktionen ermittelten Zerfallsraten λ_{ex} gegen die Anregungsintensität. Entsprechend Gleichung (7.6) strebt λ_{th} für große Anregungsintensitäten gegen einen Grenzwert $(k_{23})^{-1} = 170$ ns. Zur Erinnerung ist das vereinfachte JABLONSKI-Termschema gezeigt.

Die Zerfallsrate λ_{ex} nähert sich bei großen Anregungsintensitäten einem konstanten Grenzwert und erreicht bei vollständiger Sättigung einen Wert von ca. 5,85 MHz (**Abb. 7.5**). In organischen Molekülen ist die Populationsrate k_{23} des Triplettzustandes in der Regel sehr viel größer als die Depopulationsrate k_{31} , da der Triplettzustand energetisch näher am ersten angeregten Singulettzustand als am Singulett-Grundzustand liegt. Die vibronischen Zustände des Triplettzustands überlappen mit denen des ersten angeregten Singulettzustands, so dass Intersystem Crossing von S_1 zum Triplettzustand im Vergleich zum Übergang $T_1 \rightarrow S_0$ sehr viel wahrscheinlicher ist. Bei starker Anregungsleistung folgt aus Gleichung (7.6), dass die abgeleitete Zerfallsrate λ_{th} der Intersystem Crossing-Rate k_{23} der roten Chlorophyllpools entspricht. Gleichung (7.6) vereinfacht sich für sehr hohe Anregungsleistungen zu $\lambda_{th} = k_{23}$. Die Intersystem Crossing-Rate bzw. die Populationsrate k_{23} beträgt demnach für die roten Chlorophyllpools des trimeren Photosystem I-Komplexes aus *TS. elongatus* $(170 \text{ ns})^{-1}$.

7.4 Diskussion

Die Intersystem Crossing-Rate k_{23} der roten Chlorophyllpools in PSI aus *TS. elongatus* ist mit $(170 \text{ ns})^{-1}$ deutlich kleiner als die Intersystem Crossing-Rate für Chlorophyll *a* in Lösung. Diese berechnet sich aus der Fluoreszenz-Lebensdauer von Chlorophyll *a*, die mit 5,5 ns angegeben wird [114], und der Intersystem Crossing-Ausbeute $\phi_{ISC} = 0,64$ [115] zu ungefähr $(8,6 \text{ ns})^{-1}$. Die Fluoreszenz-Lebensdauer von Chlorophyll *a* in PSI ist mit 1,5 ns [77] kürzer als für Chlorophyll *a* in Lösung. Die Ursachen hierfür sind in den unterschiedlichen Umgebungen zu finden. Aus der Fluoreszenz-Lebensdauer von Chlorophyll *a* in PSI und der inversen Intersystem Crossing-Rate der roten Chlorophyllpools ermittelt sich die Intersystem Crossing-Ausbeute ϕ_{ISC} gemäß

$$\phi_{ISC} = \frac{k_{23}}{k_{21} + k_{23}}, \quad (7.7)$$

wobei k_{23} die Populationsrate des Triplettzustandes aus dem ersten angeregten Singulettzustand beschreibt und die Summe $k_{21} + k_{23}$ die Summe aller strahlenden und nicht-strahlenden Übergangsprozesse darstellt. Die Summe $k_{21} + k_{23}$ ist demnach die inverse Fluoreszenz-Lebensdauer:

$$\frac{1}{\tau_F} = k_{21} + k_{23}. \quad (7.8)$$

Daraus ergibt sich für die Intersystem Crossing-Ausbeute der roten Chlorophyllpools in PSI aus *TS. elongatus* ungefähr ein Wert von 0,01. Die Intersystem Crossing-Ausbeute von Photosystem I liegt damit weit unterhalb der Ausbeute von Chlorophyll *a* in Lösung mit $\phi_{ISC} = 0,64$. Sowohl die Triplettausbeute als auch die Triplett-Lebensdauern sind stark abhängig von der lokalen Umgebung des Moleküls und beruhen auf Verformungen des Moleküls, induziert durch die strukturellen Gegebenheiten der Umgebung [116]. Bei hoher Symmetrie des Moleküls ist Intersystem Crossing zusätzlich zum Spinverbot symmetrieverboten; durch eine Verformung des Moleküls wird die Symmetrie aufgehoben und die Intersystem Crossing-Rate wird größer. Durch Umgebungseffekte kann die Triplettausbeute von Chlorophyll *a* bis auf 5×10^{-3} absinken [117]. Durch den Einbau der Chlorophylle in eine

Proteinmatrix wird die Übergangswahrscheinlichkeit der Chlorophylle in PSI, zumindest wie hier gezeigt, der roten Chlorophylle, aus dem angeregten Singulettzustand in den Triplettzustand reduziert.

Für photosynthetische Organismen ist es überlebenswichtig, dass die Bildung von Triplettzuständen auf einem möglichst geringen Wert reduziert wird und, dass der Abbau eventuell gebildeter Triplettzustände in einem photosynthetisch aktiven Protein-Pigment-Komplex so schnell wie möglich geschieht. Der Abbau des Triplettzustandes wird durch die Depopulationsrate k_{31} bestimmt. Bei niedrigen Anregungsleistungen liegt die Zerfallszeit $1/\lambda$ im Mikrosekunden-Bereich (siehe **Tab. 7.1**), was im Grenzfall verschwindender Anregungsleistung der Triplett-Lebensdauer des Systems entsprechen würde. Die Triplett-Lebensdauer der roten Chlorophyllpools ist um zwei Größenordnungen kleiner als die Triplett-Lebensdauer von Chlorophyll *a* in Lösung, die mit 0,6 ms angegeben wird [117].

Die Triplettzustände der roten Chlorophyllpools des PSI-Komplexes werden effizient durch Carotinoide in der Umgebung der Antennen-Chlorophylle gequencht, wodurch eine verkürzte Triplett-Lebensdauer der Chlorophylle resultiert. Die Vernichtung des Triplettzustandes der Chlorophylle ist wichtig, da dieser den unschädlichen Triplett-Sauerstoff $^3\text{O}_2$ in den für das photosynthetische System gefährlichen Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ umwandeln kann. Der Singulett-Sauerstoff ist in der Lage mit fast allen organischen Molekülen Oxidationsreaktionen einzugehen, und führt so zur oxidativen Zerstörung der Proteine und anderer Bestandteile des Protein-Pigment-Komplexes. Das Quenchen der Triplettzustände erfolgt durch die Übertragung der Energie des Triplettzustandes via DEXTER-Mechanismus auf die Carotinoide. Voraussetzung für den DEXTER-Energietransfer ist eine Überlappung der Wellenfunktionen des Donors und des Akzeptors, so dass eine Übertragung von Elektronen zwischen den beteiligten Molekülen möglich ist. Die Effizienz der Energieübertragung in Form einer Elektronenübertragung hängt exponentiell vom Donor-Akzeptor-Abstand ab. Wie die Daten zeigen, wird der Triplettzustand der roten Chlorophylle effektiv durch die Carotinoide gequencht, weshalb die beteiligten Moleküle in direkter Nachbarschaft zueinander liegen müssen.

7.5 Zusammenfassung des Kapitels

Der photosynthetische Organismus versucht sowohl die Bildung gefährlicher Triplettzustände der Chlorophylle in der Antenne von Protein-Pigment-Komplexen zu vermeiden als auch die Eliminierung des Triplettzustandes zu beschleunigen. Für die roten Chlorophyllpools der Kernantenne des Photosystem I-Komplexes aus *TS. elongatus* ist die Populationsrate k_{23} des Triplettzustands mit $(170 \text{ ns})^{-1}$ im Vergleich zu Chlorophyll *a* in Lösung stark verringert; die Depopulationsrate k_{31} ist dagegen erhöht. Die Triplett-Lebensdauer liegt im Mikrosekunden-Bereich und ist somit kürzer als die Triplett-Lebensdauer von Chlorophyll *a*. Sowohl eine Verringerung der Populationsrate als auch eine Erhöhung der Depopulationsrate führen zu einer Reduktion der Bevölkerung des Triplettzustandes. Für die roten Chlorophylle ist der Schutz vor einem Triplettzustand besonders wichtig, da diese Pools möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Übertragung der Anregungsenergie aus der Antenne auf das Reaktionszentrum besitzen. Durch den Übergang der roten Chlorophyllpools in den Triplettzustand wäre eine effiziente Energieübertragung nicht mehr möglich.

8 Fluoreszenzpolarisationsanalyse

8.1 Zielsetzung

Eine Zuordnung der roten Chlorophyllpools zu den Chlorophyllen des Antennensystems von PSI wird durch eine Analyse der Polarisations-eigenschaften der Fluoreszenzemission der Chlorophyllpools möglich, wenn nach Detektion von linear polarisiertem Licht eine feste Phasenbeziehung zwischen der Fluoreszenz der einzelnen Chlorophyllpools und damit die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente festgestellt werden kann. Aus der Kristallstruktur für PSI aus *TS. elongatus* können die Übergangsdipolmomente für die vorgeschlagenen Kandidaten der roten Chlorophyllpools berechnet und mit der aus der Fluoreszenzpolarisationsanalyse ermittelten relativen Orientierungen für die einzelnen Pools verglichen werden. Dadurch wird eine Zuordnung der Chlorophyllpools zu bestimmten Chlorophyllen in PSI realisierbar.

8.2 Grundlagen

Licht ist eine elektromagnetische Welle, bei der das elektrische Feld, beschrieben durch den elektrischen Feldvektor \vec{E} , das magnetische Feld, beschrieben durch den B-Feldvektor \vec{B} und die Ausbreitungsrichtung \vec{k} , wie in **Abb. 8.1** gezeigt, ein orthogonales Dreibein bilden.

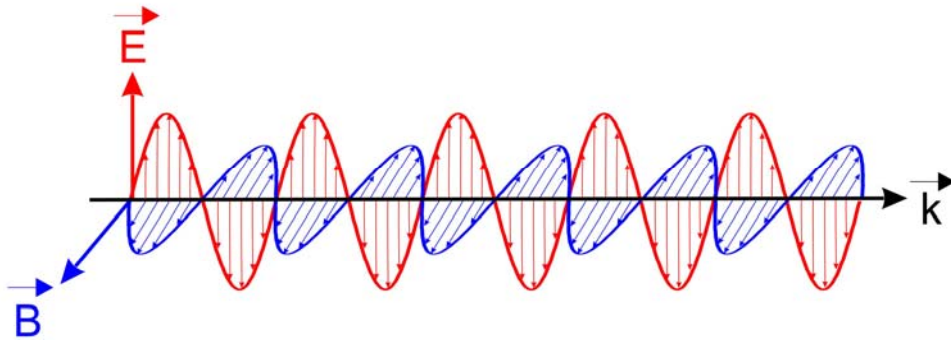


Abb. 8.1 Elektromagnetische Lichtwelle, die ein orthogonales Dreibein, bestehend aus dem elektrischen (\vec{E}) Feldvektor, dem magnetischen (\vec{B}) Feldvektor und der Ausbreitungsrichtung \vec{k} bildet.

Zur Betrachtung der Polarisation ist es ausreichend, das Augenmerk auf die Richtung des \vec{E} -Feldvektors zu richten. Während der \vec{E} -Feldvektor von unpolarisiertem Licht (z.B. Licht der Sonne oder einer Glühbirne) in alle Raumrichtungen schwingen kann, schwingt der \vec{E} -Feldvektor von linear polarisiertem Licht nur in eine Richtung. **Abb. 8.2** zeigt einen Querschnitt senkrecht zur Ausbreitungsrichtung einer elektromagnetischen Welle.

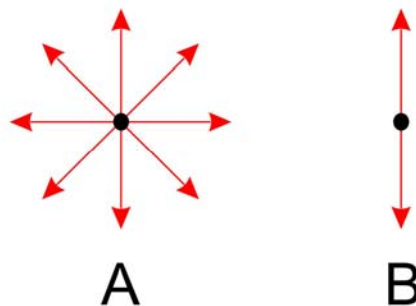


Abb. 8.2 Ausrichtung des \vec{E} -Feldvektors von unpolarisiertem Licht (A) und von polarisiertem Licht (B). Die Ausbreitungsrichtung der Welle ist senkrecht zur Blattebene.

Bei Absorption von Licht durch ein Molekül wird die Elektronenverteilung des Moleküls durch das \vec{E} -Feld des Anregungslichtes in Schwingungen versetzt und ein Elektron aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand angehoben. Die Elektronenverteilung eines Moleküls kann über das Dipolmoment charakterisiert werden. Veränderungen der Elektronenverteilung während eines optischen Übergangs induzieren ein Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{ij}$ zwischen den am Übergang beteiligten Zuständen i und j (zum Übergangsdipolmoment siehe Kapitel 4 „*Physikalische Grundlagen*“). Die Effizienz der Absorption hängt von der relativen Orientierung des Übergangsdipolmomentes $\vec{\mu}_{ij}$ und dem \vec{E} -Feldvektor ab. Maximale Absorption findet statt, wenn das Übergangsdipolmoment zwischen Grund- und angeregtem Zustand parallel zum \vec{E} -Feldvektor des einstrahlenden Lichtes orientiert ist. Liegt das Übergangsdipolmoment senkrecht zum \vec{E} -Feldvektor, sinkt die Wahrscheinlichkeit einer Absorption auf Null. Für Übergangsdipolmomente, die einen Winkel zwischen 0° und 90° zum \vec{E} -Feldvektor einnehmen, reduziert sich die Absorption von maximaler Absorption bei 0° -Gangunterschied auf eine minimale (= 0) Absorption bei 90° -Gangunterschied. Das Übergangsdipolmoment der Absorption und das Übergangsdipolmoment der Emission sind in der Regel nicht identisch. Für den Fall aber, dass die Emission aus dem angeregten Zustand erfolgt, in den das Molekül zuvor angeregt wurde, liegen das Übergangsdipolmoment der Absorption und der Emission parallel zueinander. Chlorophyll a , das das Hauptpigment in PSI ist, besitzt für die Emission der Q_y -Bande ein Übergangsdipolmoment entlang der optischen y -Achse (siehe Abbildung in Unterkapitel 3.3.1 „*Die Chlorophylle*“), weshalb der \vec{E} -Feldvektor der Fluoreszenz parallel zu dieser Achse schwingt.

Für die roten Chlorophyllpools muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um die Zusammenlagerung mehrerer Chlorophyll a -Moleküle handelt, die exzitonisch gekoppelt sind. Das Übergangsdipolmoment der Emission, d.h. der Q_y -Bande der exzitonisch gekoppelten Moleküle kann als Linearkombination der Übergangsdipolmomente der einzelnen Moleküle mit $\vec{\mu}_j = \sum_i c_{ji} \cdot \vec{\mu}_i$ beschrieben werden, wobei die Koeffizienten c_{ji} die relativen Beiträge der beteiligten angeregten Moleküle des j -ten exzitonischen Zustandes kennzeichnen. Neben der starken Kopplung einzelner Chlorophylle untereinander wird die Lage des Übergangsdipolmoments zusätzlich von der lokalen Umgebung beeinflusst. Eine Berechnung der für die Q_y -Übergänge relevanten Übergangsdipolmomente eines solchen

exzitonic gekoppelten Systems wurde beispielsweise für die Lichtsammelkomplexe LH1 [118,119], LH2 [120] und PSI [54,101] durchgeführt.

8.2.1 Prinzip der Fluoreszenzpolarisationsanalyse

Die relative Orientierung der fluoreszierenden Chlorophyllpools im Protein kann über Bestimmung der Ausrichtung ihrer Übergangsdipolmomente ermittelt werden. Anhand der relativen Ausrichtung der Übergangsdipolmomente der einzelnen Chlorophyllpools kann durch Vergleich mit den Parametern aus der Kristallstruktur auf die an den roten Chlorophyllpools beteiligten Chlorophyllen geschlossen werden.

Die PSI-Komplexe werden in einem Kryostaten eingefroren, wodurch eine starre Probe entsteht, in der die PSI-Komplexe räumlich fixiert sind. Im Gegensatz zu Raumtemperaturmessungen, bei denen die Fluoreszenz im Allgemeinen unpolarisiert ist, zeigt die Fluoreszenz starrer Emitter bei tiefen Temperaturen eine lineare Polarisation. In **Abb. 8.3** sind einzelne Photosystem I-Komplexe, eingefroren in einem Kryostaten, als Kreise mit mehreren Pfeilen schematisch dargestellt. Die Pfeile sollen die einzelnen Übergangsdipolmomente $\vec{\mu}_j$ der fluoreszierenden Chlorophyllpools repräsentieren. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionswellenlängen dieser Chlorophyllpools können diese Pools und somit ihre Übergangsdipolmomente, zumindest bei Untersuchung einzelner PSI-Komplexe, spektral voneinander unterschieden werden. Exemplarisch wurde ein Übergangsdipolmoment herausgegriffen und im unteren Teil der Abbildung vergrößert dargestellt. Bei Anwendung der konfokalen Mikroskopie können nur Informationen erhalten werden, die in der Fokusebene liegen; Informationen der dritten Raumkoordinate z gehen verloren; das Übergangsdipolmoment wird in die Fokusebene (xy -Ebene) projiziert. Der Betrag des Übergangsdipolmomentes und damit die Intensität der emittierten Fluoreszenz verändern sich dadurch. Für die im Folgenden beschriebene Fluoreszenzpolarisationsanalyse ist jedoch nur die Orientierung des Übergangsdipolmomentes in der Fokusebene wichtig.

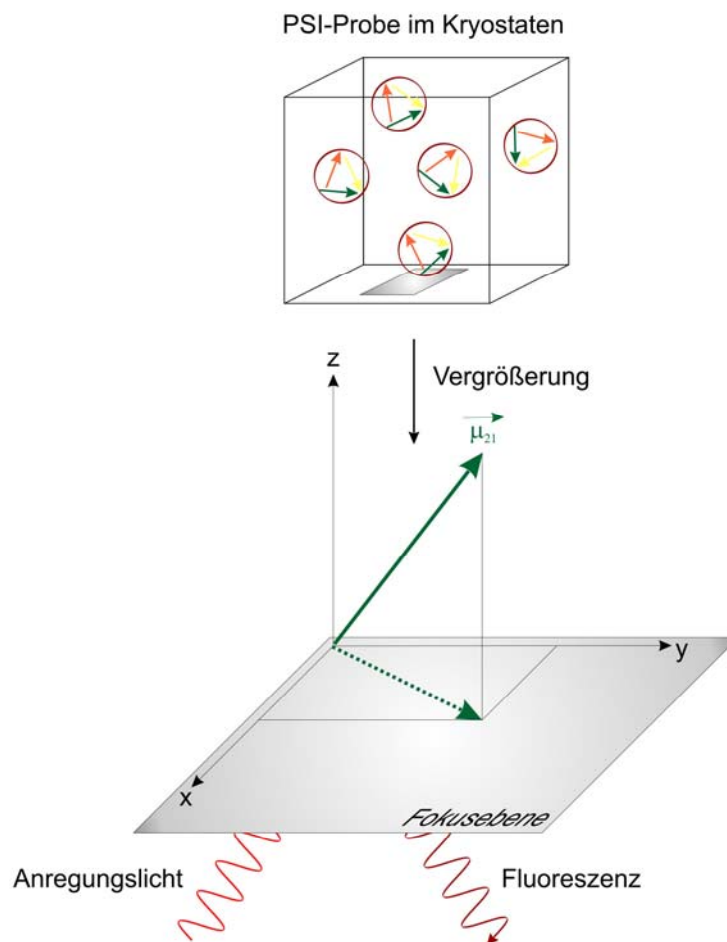


Abb. 8.3 Im oberen Teil der Abbildung ist schematisch eine PSI-Probe, eingefroren in einem Kryostaten, dargestellt. Die Pfeile sollen die Übergangsdipolmomente $\vec{\mu}_i$ der fluoreszierenden Chlorophyllpools repräsentieren. Im unteren Teil der Abbildung ist ein Übergangsdipolmoment vergrößert und auf die Fokusebene projiziert. Dadurch ist die Richtung des Übergangsdipolmomentes in dieser Ebene festgelegt.

Mit Hilfe eines rotierenden Polarisators im Detektionskanal wird die Orientierung der Projektion des Übergangsdipolmomentes über den \vec{E} -Feldvektors der Fluoreszenz analysiert. Ist die Transmissionsachse des Polarisators parallel zum \vec{E} -Vektor ausgerichtet, erhält man maximale Intensität, steht die Transmissionsachse senkrecht zum \vec{E} -Vektor, ist die Intensität gleich Null. Bei einer 360° Drehung des Polarisators erhält man deshalb zwei Intensitätsmaxima und zwei Minima. Der Zusammenhang zwischen gemessener Intensität und der Polarisatorstellung α ist gegeben durch $I(\alpha) \sim \cos^2 \alpha$ (Abb. 8.4). Der \vec{E} -Feldvektor kann durch eine Vektorzerlegung in verschiedene Komponenten zerlegt werden. Steht die Trans-

missionsachse des Polarisators weder senkrecht noch parallel zum eintreffenden \vec{E} -Feldvektor, dann kann nur die Komponente des \vec{E} -Vektors durch den Polarisator treten, die parallel zur Transmissionsachse des Polarisators schwingt (in **Abb. 8.4** ist diese Komponente hellgrün gezeigt).

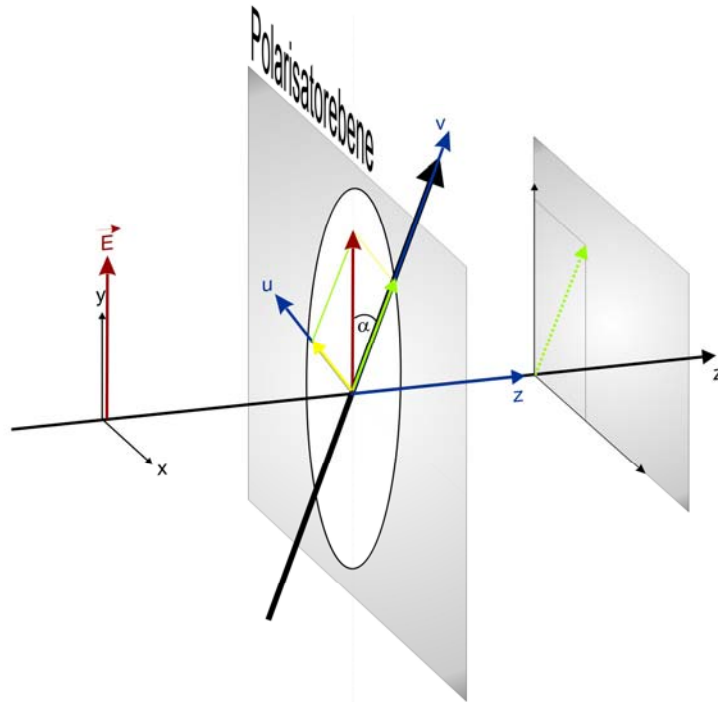


Abb. 8.4 Der \vec{E} -Feldvektor der emittierten Fluoreszenz (roter Pfeil) schwingt in der xy -Ebene und bewegt sich entlang der Ausbreitungsrichtung „ z “ des Lichtstrahls. Durch die Ausrichtung der Transmissionsachse (schwarzer Pfeil) des Polarisators kann ein neues Koordinatensystem „ uvz “ mit dem Polarisator als Bezugssystem definiert werden (blaues Koordinatensystem). Durch Vektorzerlegung erhält man den Anteil des \vec{E} -Feldvektors, der parallel zur Transmissionsachse liegt und detektiert werden kann (hellgrüner Pfeil). Je kleiner der Winkel α zwischen Transmissionsachse und Lage des \vec{E} -Feldvektors ist, umso intensiver ist die Fluoreszenz.

Durch schrittweises Drehen des Polarisators erhält man eine Intensitätsmodulation, die in **Abb. 8.5** gezeigt ist.

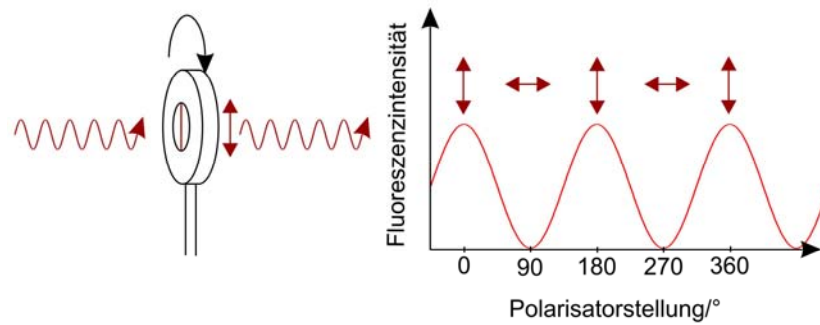


Abb. 8.5 Gezeigt ist die Intensitätsmodulation in Abhängigkeit der Ausrichtung der Transmissionsachse bzw. der Polarisatorstellung. Eine parallele Stellung der Transmissionsachse zur Polarisationsachse der Fluoreszenz entspricht einem Winkel von 0° und somit maximaler Intensität. Eine senkrechte Stellung der Transmissionsachse zur Polarisationsachse der Fluoreszenz entspricht einem Winkel von 90° und somit einem Intensitätsminimum.

PSI besitzt mehrere fluoreszierende Chlorophyllpools, die bei verschiedenen Wellenlängen emittieren. Für die Fluoreszenzpolarisationsanalyse bedeutet dies, dass in Abhängigkeit der Emissionswellenlänge unterschiedlich orientierte Übergangsdipolmomente auftreten können. In **Abb. 8.6** sind exemplarisch zwei Übergangsdipolmomente gezeigt, die den Winkel φ einschließen. Bei zwei Übergangsdipolmomenten, die mit einem bestimmten Winkel zueinander orientiert sind, erhält man bei unterschiedlichen Polarisatorstellungen ein Intensitätsmaximum bzw. -minimum. Die Phasenverschiebung der zwei Winkelfunktionen ist identisch mit dem Winkel, den die zwei projizierten Übergangsdipolmomente einschließen.

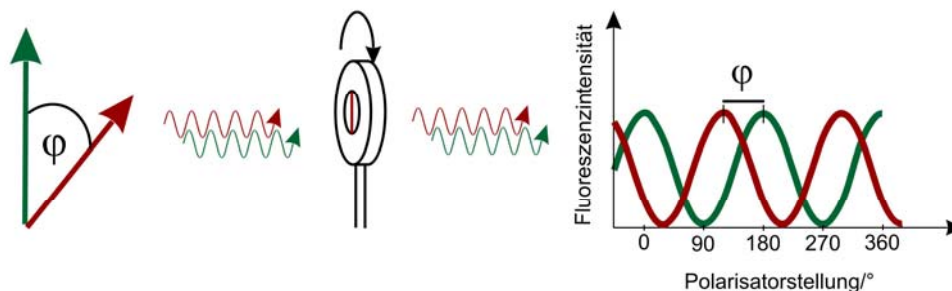


Abb. 8.6 Bestimmung der Phasenverschiebung φ zwischen zwei Winkelfunktionen für den Fall, dass zwei Übergangsdipolmomente vorliegen.

Sind mehr als zwei Chlorophyllpools vorhanden oder kann die Abhängigkeit der Intensität von der Polarisatorstellung für mehrere Chlorophyllpools ermittelt werden, dann können entsprechend mehrere Winkel zwischen den fluoreszierenden Chlorophyllpools bestimmt

werden. Durch die Bestimmung der relativen Orientierung der projizierten Übergangsdipolmomente in einem einzelnen PSI-Komplex ist es nicht möglich, auf die tatsächliche Orientierung der Übergangsdipolmomente der roten bzw. fluoreszierenden Chlorophyllpools zu schließen. Aufgrund der Probenpräparation kann davon ausgegangen werden, dass die PSI-Komplexe räumlich isotrop orientiert vorliegen. Erst durch eine Häufigkeitsverteilung der auftretenden, relativen Orientierungen kann auf einen Vorzugswinkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der Chlorophyllpools geschlossen werden.

8.3 Ergebnisse und Auswertung

8.3.1 Untersuchung der Fluoreszenzbanden der roten Chlorophyllpools einzelner Photosystem I-Trimere auf lineare Polarisation

Entsprechend des im vorherigen Unterkapitel beschriebenen Messprinzips der Fluoreszenz-polarisationsanalyse wurde die Fluoreszenz der Chlorophyllpools einzelner Photosystem I-Trimere auf lineare Polarisation hin untersucht. Pro Polarisatorstellung wurde ein Fluoreszenzemissionsspektrum aufgenommen. **Abb. 8.7** zeigt einen Auszug aus einer Messserie an Fluoreszenzemissionsspektren für ein einziges PSI-Trimer.

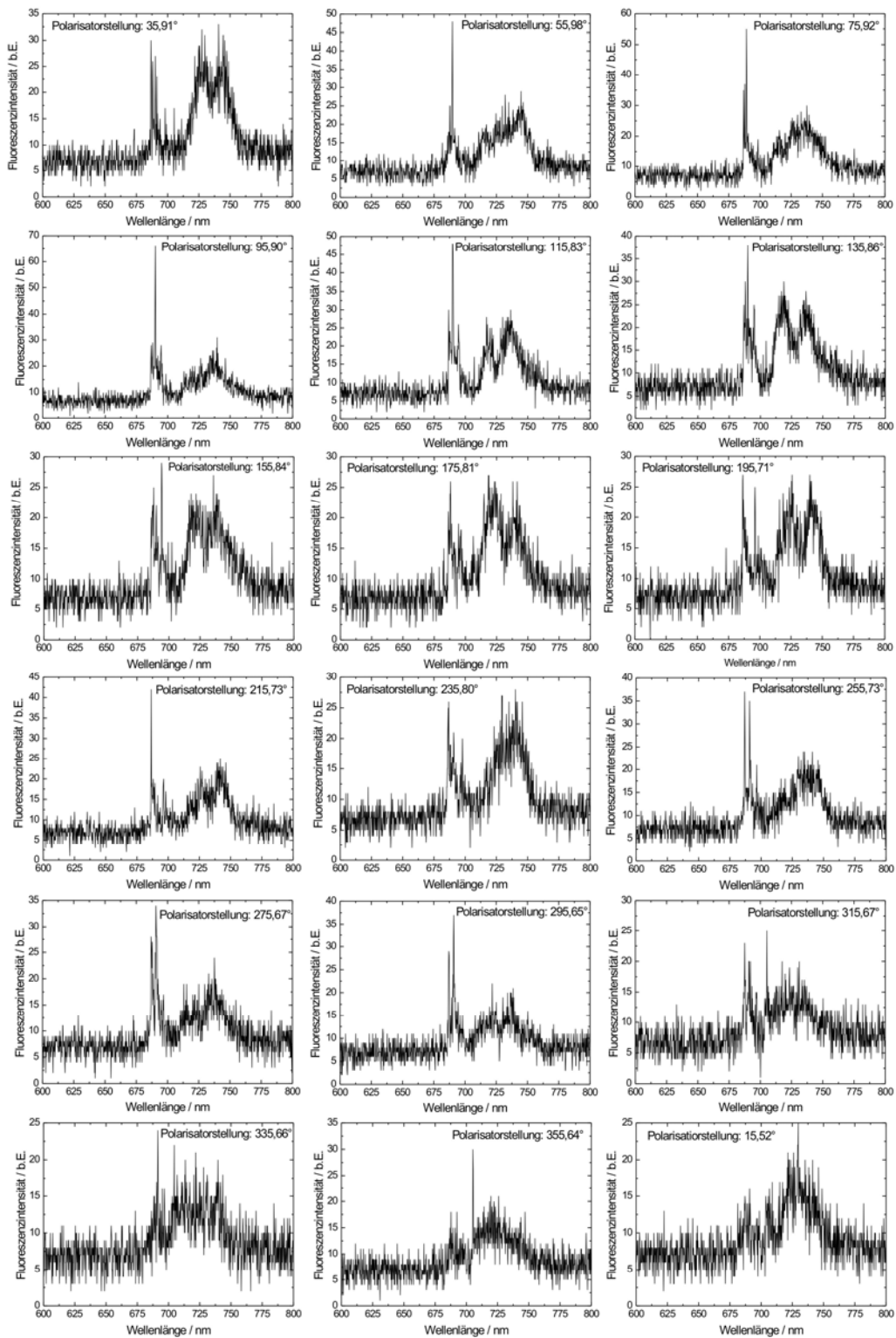


Abb. 8.7 Auszug an Fluoreszenzemissionsspektren aus einer Messreihe für einen trimeren PSI-Komplex. Pro Polarisatorstellung wurde ein Spektrum aufgenommen. Die Mittelungszeit eines Spektrums betrug 10 s. Der Polarisator wurde bei diesem PSI-Komplex nach Aufnahme eines Spektrums um 20° gedreht. Die Anregungsleistung betrug $100 \mu\text{W}$.

Wie aus **Abb. 8.7** ersichtlich, variiert die Intensität scheinbar mit der Stellung des Polarisators. Eine genaue Aussage über die Intensitätsfluktuationen im Verlauf der Messung kann aus den einzelnen Spektren nicht gemacht werden. Damit eine Intensitätsmodulation der einzelnen Chlorophyllpools in Abhängigkeit der Polarisatorstellung eindeutiger wird, wurde ein 2D-Plot aller Fluoreszenzemissionsspektren eines Komplexes erstellt und die Intensität farbkodiert (**Abb. 8.8**).

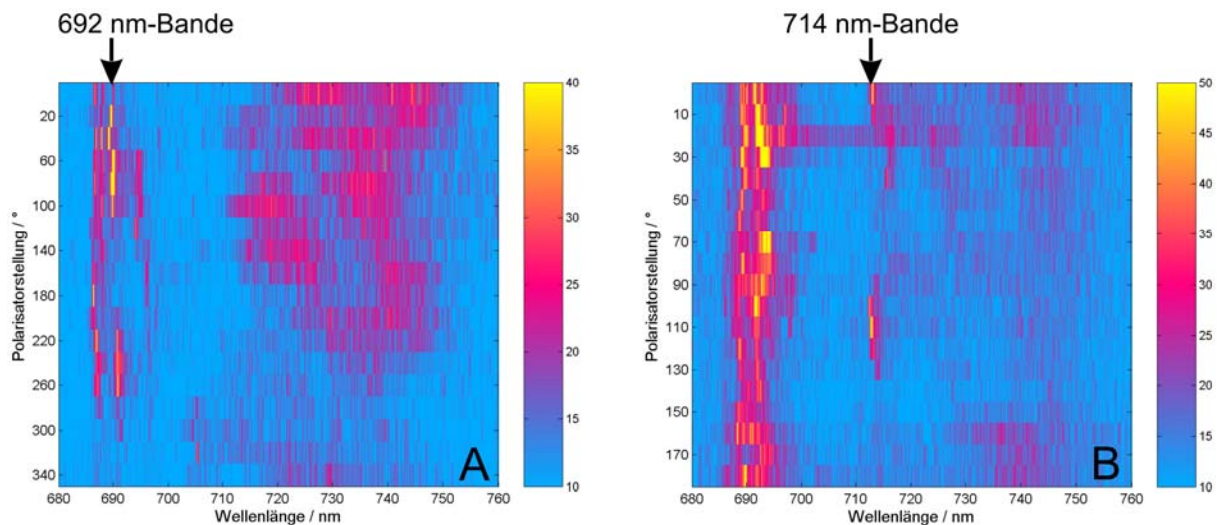


Abb. 8.8 Farbkodierter 2D-Plot hintereinander aufgereihter Fluoreszenzemissionsspektren. Exemplarisch sind zwei 2D-Plots von zwei einzelnen PSI-Trimeren gezeigt. Die 2D-Plots zeigen die Fluoreszenzintensität der fluoreszierenden Chlorophyllpools von PSI in Abhängigkeit von der Polarisatorstellung. Während (A) eine periodische Modulation der Bande bei ca. 690 nm zeigt, kann in (B) eine Periodizität der Fluoreszenzfluktuationen der Bande bei einer Wellenlänge von ca. 714 nm festgestellt werden. (A) ist der zugehörige 2D-Plot der in **Abb. 8.7** gezeigten Spektren.

Abb. 8.8 zeigt exemplarisch zwei 2D-Plots für zwei trimere PSI-Komplexe. Aus den 2D-Plots kann je eine Fluoreszenzbande eindeutig bestimmt werden, die eine periodische Modulation der Fluoreszenzintensität bei Drehung des Polarisators um 360° zeigt. In **Abb. 8.8A** lässt die Fluoreszenzbande bei ca. 692 nm eine Periodizität erkennen, in **Abb. 8.8B** zeigt die Fluoreszenzbande bei ca. 714 nm eine periodische Modulation. Wenn die Modulation der Fluoreszenzintensität eine Folge linearer Polarisation ist, sollten die Fluoreszenzschwankungen mit einer Winkelfunktion beschrieben werden können. Dazu wurde die integrierte Fluoreszenzintensität entsprechend nachfolgender Gleichung berechnet:

$$AUC = \sum_{\lambda} I(\lambda), \quad (8.1)$$

mit AUC als integrierte Fluoreszenzintensität (*area under the curve*) und $I(\lambda)$ die Intensität für einen bestimmten Wellenlängenbereich. Die Modulation der integrierten Fluoreszenzintensität kann bei linearer Polarisation durch folgende Funktion beschrieben werden:

$$y = y_0 + A \cdot e^{-\frac{\alpha}{b}} \cdot \cos(\alpha - \alpha_p)^2, \quad (8.2)$$

mit y_0 als Fluoreszenzuntergrund, A der Amplitude, α dem Winkel zwischen Transmissionsachse des Polarisators und projiziertem Übergangsdipolmoment und α_p dem Winkeloffset der Polarisatorstellung. Der Winkeloffset muss in die Gleichung eingeführt werden, da die Transmissionsachse des Polarisators am Anfang der Messung keine genau definierte Ausrichtung bezüglich des projizierten Übergangsdipolmoments einnimmt. Der Exponent berücksichtigt empirisch eine mögliche Intensitätsabnahme im Verlauf der Messung durch Photo-bleichen mit b als Dämpfungskoeffizient.

Die integrierten Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der Polarisatorstellung bzw. der Transmissionsachse des Polarisators mit den dazugehörigen Fitkurven für die in **Abb. 8.8** ausgewählten Beispiele sind in **Abb. 8.9** gezeigt.

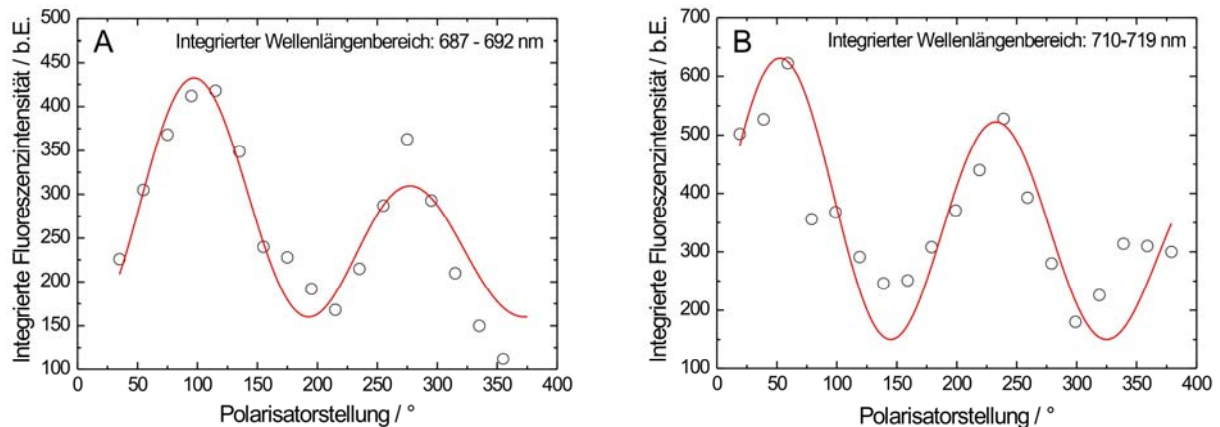


Abb. 8.9 Modulation der Fluoreszenzintensität von zwei fluoreszierenden Chlorophyllpools aus zwei trimeren PSI-Komplexen. Aufgetragen ist die integrierte Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Polarisatorstellung (Kreise). Bei linearer Polarisation kann die Fluoreszenzmodulation mit einer \cos^2 -Kurve entsprechend Gleichung (8.2) gefittet werden (rote Kurve). (A) zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Polarisatorstellung für die Fluoreszenzbande zwischen 687-692 nm und (B) für die Fluoreszenzbande mit einem Maximum bei ca. 714 nm.

Unter Berücksichtigung eines möglichen Auftretens von spektraler Diffusion und von Dunkelzuständen sowie eventuell auftretendes Ausbleichen, die die Fluoreszenzintensität zusätzlich beeinflussen, kann eine periodische Fluoreszenzmodulation einzelner Fluoreszenzemissionsbanden mit einer \cos^2 -Funktion gefittet werden.

Um linear polarisiertes Fluoreszenzlicht detektieren zu können, müssen zwei Voraussetzungen gegeben sein. Zum einen muss die zu untersuchende Probe ein starres System darstellen, so dass sich die zu untersuchenden Moleküle nicht bewegen können und sich dadurch die Orientierung der Emitter nicht ändert. Diese Bedingung ist durch eine Temperatur von 1,6 K gegeben. Zum anderen muss die Fluoreszenz entweder von einem Emitter beziehungsweise von einem Quantensystem bestehend aus mehreren stark koppelnden Molekülen oder von zueinander kollinear angeordneten Molekülen emittiert werden. Eine Fluoreszenzbande, die durch die Überlagerung von Fluoreszenzlicht unabhängig voneinander ausgerichteter Emitter entsteht, zeigt keine lineare Polarisation. Aus **Abb. 8.9** kann man deshalb schließen, dass für die ausgewählten Fluoreszenzbanden eine lineare Polarisation vorliegt, deren Ursprung auf einen Emitter bzw. Quantensystem oder auf kollinear ausgerichtete Emitter zurückzuführen ist.

Trotz der trimeren Struktur von PSI und der somit dreifachen Ausfertigung der fluoreszierenden Chlorophyllpools können für einzelne Photosystem I-Komplexe Fluoreszenzemissionsbanden detektiert werden, deren Fluoreszenz linear polarisiert ist. Dies kann nur dann der Fall sein, wenn entweder die drei „Kopien“ (jeder Chlorophyllpool kommt aufgrund der trimeren Struktur in dreifacher Ausführung vor) eines fluoreszierenden Chlorophyllpools leicht unterschiedliche Emissionswellenlängen zeigen, so dass die drei Emitter der einzelnen Chlorophyllpools spektral aufgelöst werden können, oder von den drei „Kopien“ eines Chlorophyllpools nur eine fluoresziert. Ein Grund, dass nur eine „Kopie“ von den drei möglichen „Kopien“ eines Chlorophyllpools fluoresziert, kann in der leicht unterschiedlichen Umgebung der einzelnen „Kopien“ liegen, die eine Abregung der Anregungsenergie als Fluoreszenz nicht mehr zulässt und die Anregungsenergie im Komplex weiterleitet oder einen weiteren Abregungsmechanismus wie beispielsweise die interne Konversion stärkt. Eine weitere Möglichkeit für die Detektion linear polarisierter Fluoreszenz könnte eine mögliche energetische Konnektivität zwischen den monomeren Untereinheiten des trimeren Photosystem I-Komplexes sein [22]. Der Einfrierprozess könnte aufgrund einer Veränderung der räumlichen Verhältnisse die energetische Konnektivität begünstigen oder benachteiligen. Dies

würde vor allem bei den rötesten Chlorophyllpools zum Tragen kommen, da hier eine mögliche energetische Konnektivität diskutiert wird [35,77].

Eine Bestimmung der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente der fluoreszierenden Chlorophyllpools ist nur möglich, wenn ein Phasendifferenzwinkel zwischen den einzelnen, linear polarisierten Fluoreszenzbanden eines PSI-Komplexes aus den Fitfunktionen ermittelt werden kann. Während aus den Messdaten eines trimeren PSI-Komplexes eine mögliche lineare Polarisation für einzelne Chlorophyllpools nachgewiesen werden konnte, war es aber praktisch unmöglich gewesen, mehrere linear polarisierte Fluoreszenzemissionsbanden in einem Komplex nachzuweisen. Die Ursachen hierfür liegen in der trimeren Struktur von PSI. Durch die dreifache Ausführung der einzelnen fluoreszierenden Chlorophyllpools wird einerseits die Detektion einer linearen Polarisation der Fluoreszenz sehr unwahrscheinlich (*siehe oben*), andererseits wird die spektrale Auflösung der einzelnen Banden sehr viel ungenauer, so dass eine einzelne Bande nicht mehr präzise genug bestimmt werden kann, um eventuelle Fluoreszenzmodulationen mit einer \cos^2 -Funktion fitten zu können. Durch Verwendung von PSI-Monomeren steigt deshalb die Wahrscheinlichkeit der Detektion linear polarisierten Fluoreszenzlichtes an. Zusätzlich sollte eine exaktere Bestimmung der Fluoreszenzemissionsbanden möglich sein, da diese nicht mehr das Ergebnis der Überlagerung von drei „Kopien“ eines Chlorophyllpools ist.

Im nächsten Abschnitt wird die Fluoreszenzpolarisationsanalyse der Emission fluoreszierender Chlorophyllpools in monomeren PSI-Komplexen diskutiert.

8.3.2 Untersuchung der Fluoreszenzbanden der roten Chlorophyllpools einzelner Photosystem I-Monomere auf lineare Polarisation

Die Photosystem I-Monomere aus *TS. elongatus* wurden wie die Photosystem I-Trimere in einem Kryostaten auf 1,6 K abgekühlt und die Polarisation der emittierten Fluoreszenz mittels eines Polarisators analysiert. Pro Polarisatorstellung wurde ein Fluoreszenzemissionsspektrum aufgenommen. Die Spektren eines jeden PSI-Monomers, wurden zu einem 2D-Plot zusammengefasst. Die Intensität ist wie bei den PSI-Trimeren farbkodiert. **Abb. 8.10** zeigt exemplarisch den 2D-Plot eines einzelnen Photosystem I-Monomers, für das insgesamt vier Banden mit ausreichender Intensität bestimmt werden konnten.

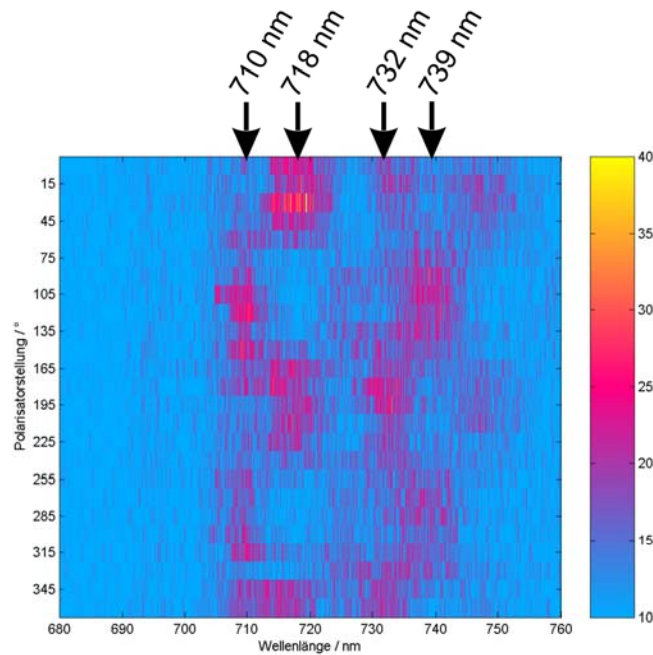


Abb. 8.10 2D-Plot eines PSI-Monomers, in dem die Spektren für jede Polarisatorstellung hintereinander aufgereiht wurden und die Intensität farbkodiert ist. Insgesamt konnten für diesen Komplex vier Banden bei 710 nm, 718 nm, 732 nm und 739 nm mit ausreichender Intensität bestimmt werden.

Die PSI-Monomere zeigen in der Regel mehr Fluoreszenzemissionsbanden, deren Intensität in Abhängigkeit der Polarisatorstellung zu- bzw. abnehmen, als die PSI-Trimere. Die Anzahl der Fluoreszenzbanden, für die eine Polarisationsanalyse durchgeführt wurde, ermittelte sich aus den Spektren und dem 2D-Plot. Eine Einteilung der Banden und die Zuordnung der Banden zu den entsprechenden Chlorophyllpools der PSI-Monomere erfolgten auf der Grundlage der Fluoreszenzemissionsbanden und der Chlorophyllpools der PSI-Trimere aus *TS. elongatus* (siehe Kapitel 6 „Optische Einzelmolekülspektroskopie an Photosystem I-Komplexen aus *Thermosynechococcus elongatus*“). Auf dieser Grundlage konnten maximal vier Banden nachgewiesen werden. **Abb. 8.11** zeigt Beispiele für PSI-Monomere, deren 2D-Plot zwei (**Abb. 8.11A**) bzw. drei Banden (**Abb. 8.11B**) erkennen lassen.

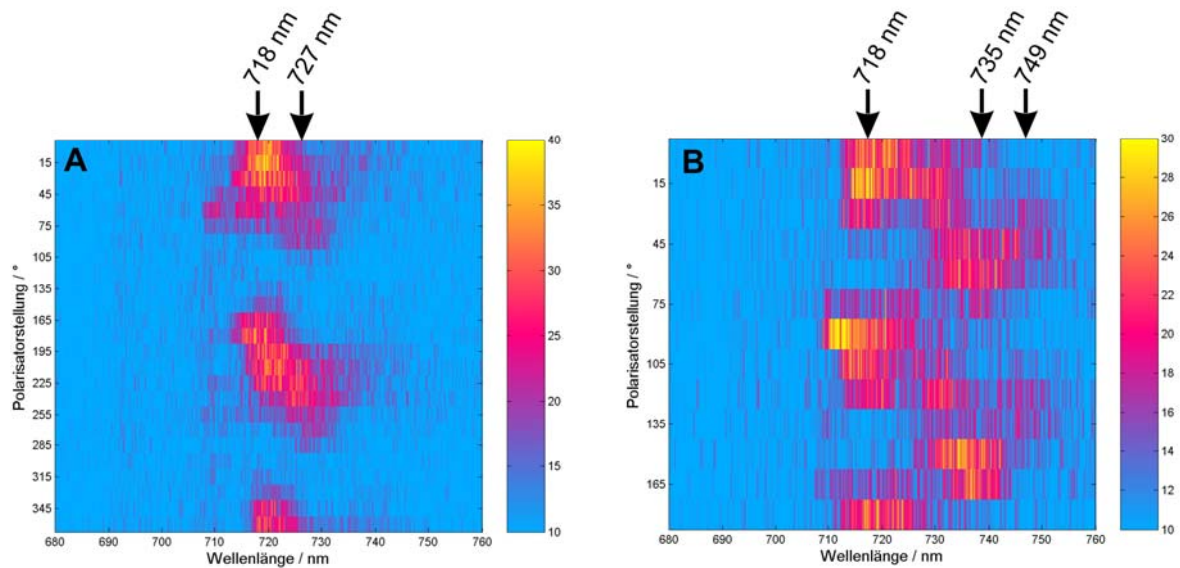


Abb. 8.11 2D-Plots von PSI-Monomeren, für die zwei (A) bzw. drei (B) auswertbare Fluoreszenz-emissionsbanden detektiert werden konnten. Die Fluoreszenzintensität fluktuiert mit der Polarisatorstellung.

Die Fluoreszenz-emissionsbanden liegen aufgrund spektraler Diffusion und Linienbreite oft sehr dicht zusammen oder überlappen einander, so dass die einzelnen Banden in den Spektren und im dazugehörigen 2D-Plot den einzelnen Chlorophyllpools nicht immer eindeutig zugeordnet werden können. Aus diesem Grund wurden die einzelnen Spektren einer GAUSS-Zerlegung unterzogen, die bis zu vier GAUSS-Funktionen berücksichtigt. Eine GAUSS-Zerlegung hat den Vorteil, dass die Entwicklung der einzelnen Fluoreszenz-emissionsbanden bzw. die Intensitätsmodulationen der einzelnen Banden nicht mehr unabhängig voneinander betrachtet werden, wie es noch bei den PSI-Trimeren möglich war. Bei den trimeren PSI-Komplexen konnte die Fluoreszenzintensität der einzelnen linear polarisierten Banden aufgrund ihrer geringen Anzahl und einer ausreichend großen spektralen Auftrennung unabhängig voneinander durch Integration der Fluoreszenzbande bestimmt werden. Für das in **Abb. 8.10** dargestellte Beispiel, ist in **Abb. 8.12B** für fünf (von insgesamt 25) Spektren die dazugehörige GAUSS-Zerlegung gezeigt. Die GAUSS-Zerlegung wurde mit einem auf diese Problematik abgestimmten Programm namens FITSPEC durchgeführt. In diesem Programm wurden für die Analyse der Spektren die Anzahl der Banden, deren Halbwertsbreite und die dazugehörigen Toleranzen sowie Start- und Endpunkt des interessanten Wellenlängenbereichs individuell eingegeben. Eine Übersicht der verwendeten Variablen für das in **Abb. 8.10** vorgestellte PSI-Monomer gibt **Abb. 8.12A** wieder.

Zusammenfassung von Molekül_01	

Spektren: Anzahl der gemessenen Spektren.....	25
Spektren: Anzahl der Datenpunkte pro Spektrum.....	1340
Spektren: Rauschunterdrückung (# Datenpunkte).....	50

Plot Amplituden-Fit: Schrittweite des Polarisators	15

Fit: Anzahl der Linien, die zu fitten sind [1-4].....	4
Fit: Beginn Fit-Daten / nm.....	700
Fit: Ende Fit-Daten / nm.....	745

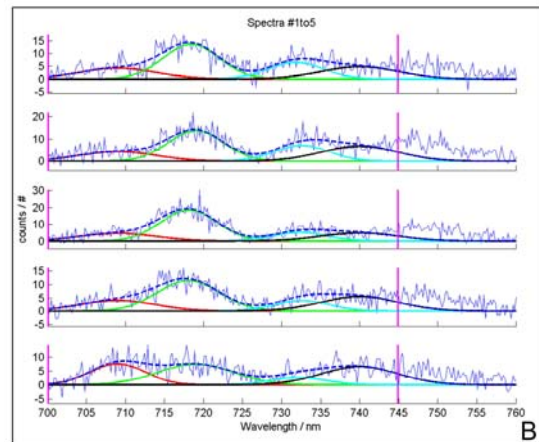
Fit: Spektrale Position erste Linie / nm.....	710
Fit: Spektrale Breite erste Linie / nm.....	6
Fit: Toleranz Spektrale Position erste Linie / nm.....	1
Fit: Toleranz Spektrale Breite erste Linie / nm.....	1

Fit: Spektrale Position zweite Linie / nm.....	718
Fit: Spektrale Breite zweite Linie / nm.....	6
Fit: Toleranz Spektrale Position zweite Linie / nm.....	1
Fit: Toleranz Spektrale Breite zweite Linie / nm.....	1

Fit: Spektrale Position dritte Linie / nm.....	732
Fit: Spektrale Breite dritte Linie / nm.....	6
Fit: Toleranz Spektrale Position dritte Linie / nm.....	1
Fit: Toleranz Spektrale Breite dritte Linie / nm.....	1

Fit: Spektrale Position vierte Linie / nm.....	739
Fit: Spektrale Breite vierte Linie / nm.....	6
Fit: Toleranz Spektrale Position vierte Linie / nm.....	1
Fit: Toleranz Spektrale Breite vierte Linie / nm.....	1

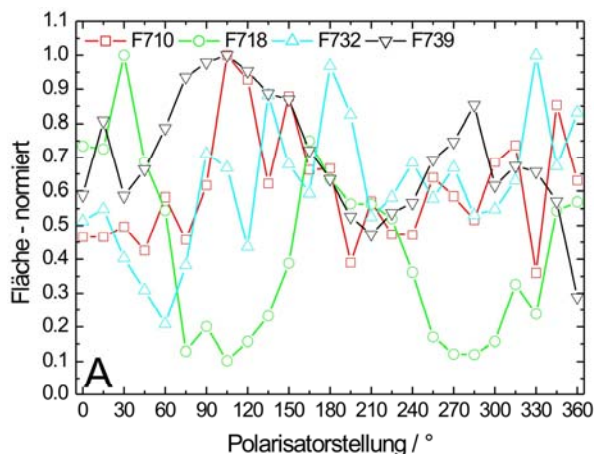
A



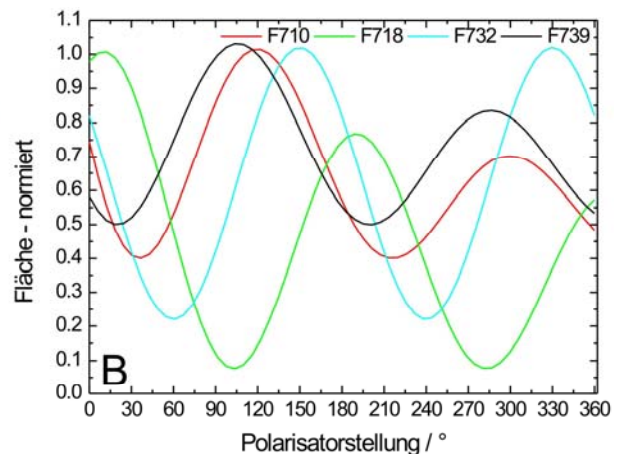
B

Abb. 8.12 (A) zeigt eine Übersicht der eingesetzten Parameter für das in **Abb. 8.10** vorgestellte PSI-Monomer mit vier unterscheidbaren Banden. In (B) ist die dazugehörige graphische GAUSS-Zerlegung für fünf von insgesamt 25 Spektren gezeigt.

Insgesamt können vier Banden aus den Spektren extrahiert werden (in **Abb. 8.12B** in den Farben rot, cyan, grün und schwarz gezeigt). Die blaue Kurve gibt die Einhüllende der Spektren wieder.



A



B

Abb. 8.13 In (A) sind die aus der GAUSS-Zerlegung ermittelten Flächen für die jeweiligen Fluoreszenz-emissionsbanden in Abhängigkeit der Polarisatorstellung gezeigt. Diese Abhängigkeit wurde mit Hilfe der Gleichung $y = y_0 + A \cdot \exp -(\alpha / b) \cdot \cos (\alpha - \alpha_p)^2$ gefittet (B). Kann die Abhängigkeit der Intensität von der Polarisatorstellung mittels einer \cos^2 -Funktion beschrieben werden, dann ist die emittierte Fluoreszenz linear polarisiert.

Zur weiteren Analyse bzw. zur Überprüfung der Intensitätsschwankungen auf lineare Polarisation werden die berechneten Werte (Fläche unterhalb der Kurve) für die einzelnen Fluoreszenzemissionsbanden in Abhängigkeit der Polarisatorstellung aufgetragen (**Abb. 8.13A**) und mit Gleichung (8.2) gefittet. **Abb. 8.13B** zeigt die Fitkurven der vier Fluoreszenzemissionsbanden des PSI-Monomers.

Anhand eines solchen Diagramms können aus der Phasenverschiebung der Fitkurven die Phasendifferenzwinkel $\Delta\varphi$ und somit die relative Orientierung der projizierten Übergangsdipolmomente der einzelnen Chlorophyllpools zueinander berechnet werden. In **Tab. 8.1** und **Tab. 8.2** ist einerseits die Zuordnung der Fluoreszenzbanden zu den Chlorophyllpools und die ersten Intensitätsmaxima sowie die Phasendifferenzwinkel $\Delta\varphi$ für das in **Abb. 8.10** dargestellte PSI-Monomer gezeigt.

Tab. 8.1 Zusammenstellung der Daten für das in **Abb. 8.10** vorgestellte PSI-Monomer. Neben einer Zuordnung der Banden zu den Chlorophyllpools, sind in der Tabelle die ersten Intensitätsmaxima der Fitkurven der einzelnen Banden aufgelistet.

Fluoreszenzmaximum / nm	Zugeordneter Chlorophyllpool	Erstes Intensitätsmaximum / °
710	Chl705	126
718	Chl708	13
732	Chl719	150
739	Chl745	110

Tab. 8.2 Berechnete Phasendifferenzwinkel $\Delta\varphi$ der projizierten Übergangsdipolmomente der einzelnen Chlorophyllpools.

Untersuchtes Chlorophyllpool-Paar	Phasendifferenzwinkel $\Delta\varphi$ / °
Chl705 - Chl708	113
Chl705 - Chl719	24
Chl705 - Chl745	16
Chl708 - Chl719	137
Chl708 - Chl745	87
Chl719 - Chl745	40

Folgende Abbildung zeigt die normierte Intensitätsmodulation in Abhängigkeit von der Polarisatorstellung für den Fall von zwei (Abb. 8.14A) bzw. drei (Abb. 8.14C) nachgewiesenen Banden. Aus den berechneten Fitfunktionen wurde die Lage des ersten Intensitätsmaximums bestimmt (Abb. 8.14B und Abb. 8.14D).

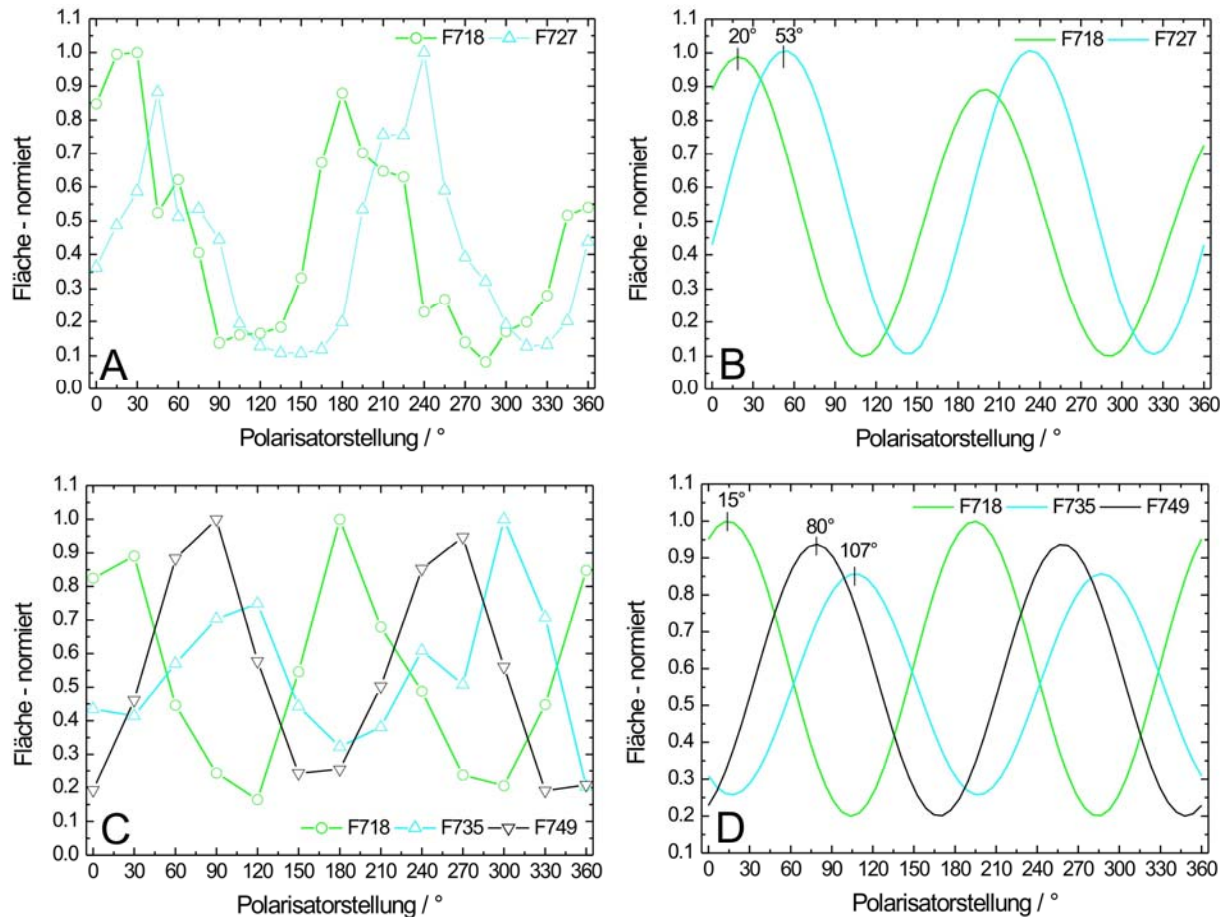


Abb. 8.14 Ergebnis der GAUSS-Zerlegung und der dazugehörigen nicht linearen Kurvenanpassung für den Fall, dass entweder zwei Banden (A und B) oder drei Banden (C und D) aus den Spektren und dem 2D-Plot bestimmt werden konnten. In B und D sind die ersten Intensitätsmaxima angegeben, aus denen der Phasendifferenzwinkel zwischen den verschiedenen Pools berechnet wurde.

Je nach Orientierung der PSI-Monomere und damit der Übergangsdipolmomente der fluoreszierenden Chlorophyllpools ergeben sich in der Projektion unterschiedliche Phasendifferenzwinkel. Die tatsächliche Orientierung der Übergangsdipolmomente lässt sich somit aus einer einzelnen Messreihe (= Vermessung eines einzelnen Komplexes) nicht bestimmen, da die jeweilige Orientierung der PSI-Komplexe in der Probe nicht bekannt ist. Durch die Messung vieler Komplexe und einer Analyse der Häufigkeitsverteilung der Phasendifferenzwinkel für

einzelne Chlorophyllpool-Paare lässt sich aber die tatsächliche relative Orientierung der Übergangsdipolmomente dieser Chlorophyllpools rekonstruieren.

8.3.3 Ermittlung der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente aus den Messergebnissen mittels Statistik

Die Rekonstruktion der relativen Orientierung zweier Übergangsdipolmomente soll im folgenden Abschnitt exemplarisch anhand einer Simulation näher erläutert werden.

8.3.3.1 Simulation der relativen Orientierung der roten Chlorophyllpools in einer isotrop verteilten PSI-Probe

Durch zufällige Rotation eines Einheitsvektors um die z-Achse (Polachse), beschrieben durch den Polarwinkel β , und um den Azimutwinkel χ (Rotation aus der Äquatorialebene), ergibt sich eine isotrope Verteilung der möglichen Orientierungen des Vektors auf einer Kugeloberfläche (**Abb. 8.15A**), wenn folgende Bedingungen erfüllt sind: (i) die Wahrscheinlichkeit W_{Pol} den Polarwinkel β anzutreffen, ist für alle Winkel gleich ($W_{Pol}(\beta) = const.$); (ii) die Wahrscheinlichkeit W_{Azi} den Azimutwinkel anzutreffen, muss von der Äquatorialebene zu den Polkappen hin abnehmen ($W_{Azi}(\chi) = \cos \chi$). Dabei laufen der Polarwinkel β von 0° bis 360° und der Azimutwinkel χ von -90° bis 90° . Jede dieser möglichen Orientierungen des Vektors wird auf die xy -Ebene projiziert, die in der Versuchsanordnung der Fokusebene entsprechen soll (**Abb. 8.15B**).

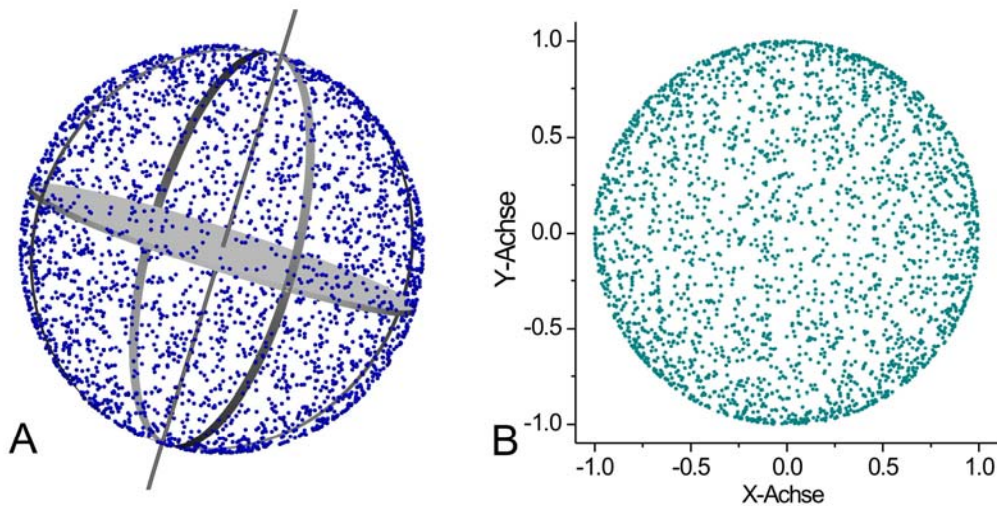


Abb. 8.15 (A) *Isotrope Verteilung von Orientierungen eines Vektors im dreidimensionalen Raum, dargestellt durch Punkte auf einer Kugeloberfläche.* (B) *Projektion der zufällig verteilten Orientierungen eines Vektors auf die xy-Ebene. Die Projektion ist invariant gegenüber Rotation.*

Aufgrund der Kugelkrümmung wird der Abstand der Punkte in der Projektionsebene zum Rand hin kleiner. Dadurch zeigt sich in der Projektion eine vermehrte Anhäufung der Orientierungen an den Rändern der Ebene und damit der Orientierungen, die nahezu parallel zur Projektionsebene liegen. Wird ein weiterer Vektor in das System eingeführt, dann verhält sich dieser entsprechend dem ersten Vektor. Zusätzlich schließt der zweite Vektor mit dem ersten Vektor einen festen Winkel ein, wodurch ein weiterer Freiheitsgrad berücksichtigt werden muss, nämlich die Rotation um ihre Winkelhalbierende. Auch bei der Projektion der Orientierungen, die durch Rotation um die Winkelhalbierende entstehen, sind wiederum die Orientierungen bevorzugt, bei denen beide Vektoren nahezu parallel zur Projektionsebene angeordnet sind. Dies verstärkt den Effekt einer Anhäufung von Ereignissen am Rand der Projektionsebene.

Aus den projizierten Orientierungen der Vektoren kann der von den Vektoren tatsächlich eingeschlossene Winkel berechnet werden. Anhand einer Häufigkeitsverteilung der projizierten Phasendifferenzwinkel $\Delta\varphi$ lässt sich letztendlich der tatsächliche Winkel zwischen den zwei Vektoren θ bestimmen. **Abb. 8.16** zeigt simulierte Häufigkeitsverteilungen für verschiedene vorgegebene θ von 15° - 90° .

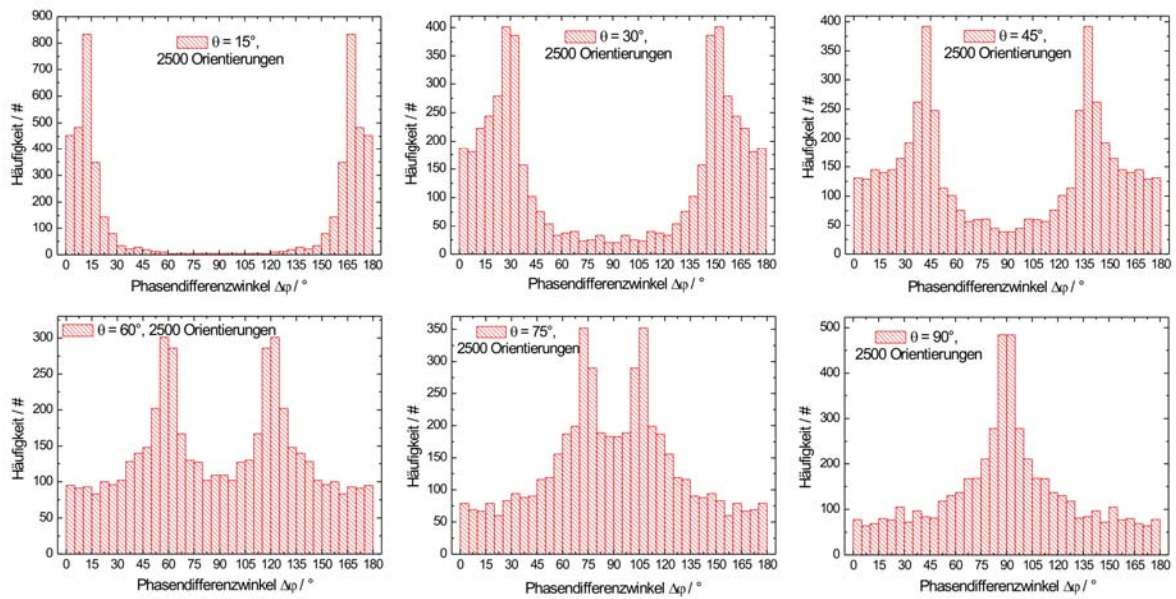


Abb. 8.16 Simulierte Häufigkeitsverteilungen für verschiedene vorgegebene Winkel θ zweier Vektoren. Die Vektoren schließen Winkel zwischen 15° und 90° ein. Je Simulation wurden 2500 Werte eingesetzt. Aus den Histogrammen können Vorzugswinkels abgelesen werden, die der tatsächlichen Lage der zwei Vektoren θ zueinander entsprechen. Aus Symmetriegründen sind in den Häufigkeitsverteilungen zusätzlich zum Vorzugswinkel zwischen 0° und 180° , der komplementäre Winkel 180° minus dem Vorzugswinkel zu sehen.

Die Simulation hat gezeigt, dass eine Bestimmung der tatsächlichen relativen Orientierung von zwei Vektoren zueinander aus einer isotropen Verteilung dieser Vektoren im Raum möglich ist, indem eine Häufigkeitsverteilung der projizierten Phasendifferenzwinkel $\Delta\varphi$ erstellt wird. Die Maxima im Histogramm zeigen den tatsächlichen Winkel θ zwischen den Vektoren an. Dies liegt an der Tatsache, dass in der Projektion Orientierungen mit dem tatsächlichen Winkel zwischen den Vektoren häufiger auftreten. Durch mehrfache Messung einer zweidimensionalen Größe im dreidimensionalen Raum können somit Rückschlüsse auf die dreidimensionale Größe gezogen werden.

Im Experiment werden die Häufigkeitsverteilungen zusätzlich von einem weiteren Faktor beeinflusst. Die Chlorophyllpools können vereinfacht durch Übergangsdipolmomente beschrieben werden, deren Abstrahlcharakteristik analog des HERTZschen Dipols ist (**Abb. 8.17**). Demnach werden vor allem die Chlorophyllcluster detektiert, deren Übergangsdipolmoment parallel zur Fokusebene liegt. Chlorophyllcluster, deren Übergangsdipolmoment senkrecht zur Fokusebene ausgerichtet ist, können nicht detektiert werden. Dadurch wird zusätzlich ein gewisser Grad an Orientierung erzielt. In den Simulationen wurde dieser Effekt nicht berücksichtigt.

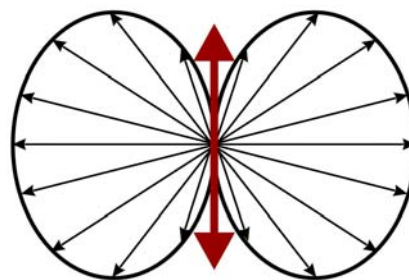


Abb. 8.17 Abstrahlcharakteristik eines HERTZschen Dipols. Die Länge der Pfeile ist ein Maß für die abgestrahlte Intensität in die jeweilige Richtung.

8.3.3.2 Statistische Auswertung der berechneten Phasendifferenzwinkel

Aus insgesamt 80 untersuchten PSI-Komplexen konnten letztendlich 57 Komplexe (~ 71%) zur Erstellung einer Statistik herangezogen werden. Es wurden nur Komplexe in die Statistik aufgenommen, in deren Spektren mindestens zwei Fluoreszenzemissionsbanden zu sehen waren, die bestimmten Chlorophyllpools zugeordnet werden konnten. Trotz Detektion einer Modulation der Fluoreszenzintensität zeigte ein Teil der integrierten Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Polarisatorstellung keine \cos^2 -Abhängigkeit. In 5 Komplexen (~ 6%) der 57 Komplexe konnten 4 Banden nachgewiesen werden, deren Fluoreszenz eine lineare Polarisierung zeigten. 14 Komplexe (~ 18%) zeigten 3 auswertbare Banden und in den Spektren von 38 Komplexen (~ 48%) konnten 2 entsprechende Banden detektiert werden. Bei insgesamt 23 PSI-Monomeren (~ 29%) konnte keine erfolgreiche GAUSS-Zerlegung bzw. eine Analyse der Intensitätsfluktuationen durch eine \cos^2 -Funktion durchgeführt werden. Ursachen hierfür waren vor allem frühzeitiges Ausbleichen oder eine zu geringe Intensität der Banden. Zusätzlich lagen in einem Teil der Spektren die einzelnen Fluoreszenzbanden so dicht zusammen, dass die Anfangs- und Endpunkte der Fluoreszenzbanden nur abgeschätzt werden konnten.

Eine Übersicht über die Anzahl der Einträge in den Häufigkeitsverteilungen der projizierten Phasendifferenzwinkel zwischen den einzelnen Chlorophyllpool-Paaren ist in **Tab. 8.3** gezeigt.

Tab. 8.3 Übersicht über die Anzahl an Einträgen in den einzelnen Histogramme der verschiedenen Chlorophyllpool-Paare.

Chlorophyllpool-Paare	Anzahl der Einträge in den Histogrammen
Chl705 – Chl708	20
Chl705 – Chl719	20
Chl705 – Chl745	16
Chl708 – Chl719	76
Chl708 – Chl745	36
Chl719 – Chl745	48

Abb. 8.18 zeigt exemplarisch eine Häufigkeitsverteilung der berechneten (projizierten) Phasendifferenzwinkel zwischen den Chlorophyllpools Chl708 und Chl719. Insgesamt sind vier Maxima zu erkennen, die bei Winkeln von ca. 40°, 80°, 100° und 140° liegen. Die simulierten Histogramme zeigen jedoch im Bereich von 0° bis 180° lediglich zwei Maxima.

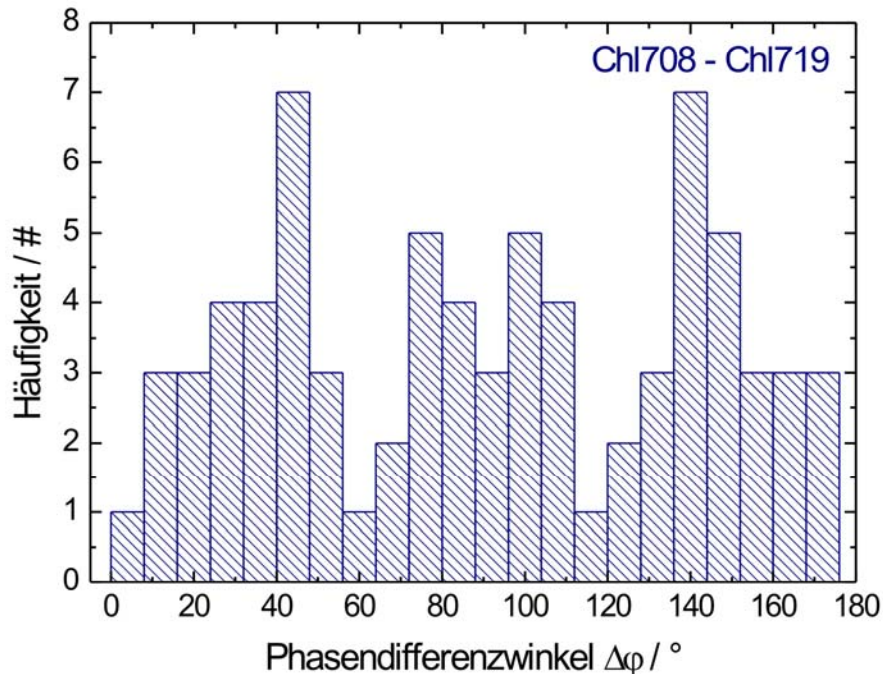


Abb. 8.18 Häufigkeitsverteilung der Phasendifferenzwinkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der Chlorophyllpools Chl708 und Chl719.

Da im Experiment nicht unterschieden werden kann, wie PSI bezüglich der Fokusebene ausgerichtet ist (stromale Seite kann nach oben bzw. unten zeigen) genügt es nicht, den experimentell ermittelten Phasendifferenzwinkel, sondern auch den dazugehörigen komplementären Winkel im Histogramm zu berücksichtigen. Im Bereich zwischen 0° und 180° liegen in der simulierten Häufigkeitsverteilung immer zwei Maxima, in der Häufigkeitsverteilung der experimentell ermittelten Phasendifferenzwinkel für das Chlorophyllpool-Paar Chl708 und Chl719 sind aber vier Maxima zu sehen (**Abb. 8.18**). Das Auftreten mehrerer Maxima in den Histogrammen der experimentell ermittelten Phasendifferenzwinkel kann mehrere Ursachen haben. Eine spektrale Überlappung der einzelnen Fluoreszenzemissionsbanden als Folge spektraler Diffusion kann zu einer falschen Zuordnung der Fluoreszenzbanden zu den einzelnen Chlorophyllpools führen. Die für ein Chlorophyllpool-Paar aufgestellte Häufigkeitsverteilung ist dann das Resultat der Überlagerung mehrerer Histogramme verschiedener Chlorophyllpool-Paare, die je nach Häufigkeit des Zuordnungsfehlers unterschiedlich stark gewichtet sind. Eine weitere Ursache für das Auftreten von vier Maxima bzw. von vier Vorzugswinkeln in einem Histogramm, liegt in der Möglichkeit, dass ein Chlorophyllpool aus mehreren Chlorophyllclustern besteht, wie von VAITEKONIS in [54] beschrieben. Wie bereits in Kapitel 6 „*Optische Einzelmolekülspektroskopie an PSI-Komplexen aus TS. elongatus*“ diskutiert, sind die Fluoreszenzspektren der Photosystem I-Komplexe sehr heterogen. Für einen PSI-Komplex kann die Fluoreszenz einer Bande linear polarisiert sein, während für einen anderen PSI-Komplex für genau diese Bande keine lineare Polarisation festgestellt werden kann. Linear polarisiertes Fluoreszenzlicht kann nur dann detektiert werden, wenn die Fluoreszenz entweder von einem einzigen Chlorophyll-Molekül, von einem stark koppelnden Chlorophyllcluster oder aber von Chlorophyllen, die kollinear zueinander ausgerichtet sind, emittiert wird. Besteht ein Chlorophyllpool aus mehreren Chlorophyllclustern mit unterschiedlicher Ausrichtung der Übergangsdipolmomente, dann ist die Fluoreszenz des Chlorophyllpools nicht mehr linear polarisiert, wenn mehr als ein Chlorophyllcluster fluoresziert. Bei linearer Polarisation der Fluoreszenz und bei nicht kollinearer Ausrichtung der Cluster bzw. der Chlorophylle, emittiert nur ein einzelnes Chlorophyll bzw. ein einziger Chlorophyllcluster. Dies ist dann möglich, wenn die anderen beteiligten Cluster eine Abregung beispielsweise über interne Konversion erfahren, oder wenn die energetische Kopplung zu diesen Chlorophyllen unterbrochen ist. Dabei muss es sich bei dem fluoreszierenden Chlorophyllcluster nicht immer um dieselbe Chlorophyllgruppe handeln. Die einzelnen Chlorophyllcluster eines Chlorophyllpools können somit aufgrund

einer unterschiedlichen Ausrichtung im Protein mit einem zweiten Chlorophyllpool unterschiedliche Winkel einschließen. Fluoresziert mit genügend großer Häufigkeit jeweils nur ein einziger Chlorophyllcluster eines Chlorophyllpools, dann macht sich dies durch mehrere Maxima in einem Histogramm bemerkbar. Für die Häufigkeitsverteilung in **Abb. 8.18** können beide Ursachen für das Auftreten der vier Maxima verantwortlich sein: sowohl kann eine spektrale Überlappung der Fluoreszenzbanden als auch die Zusammensetzung des Chlorophyllpools Chl708 aus verschiedenen Chlorophyllclustern als mögliche Ursachen nicht ausgeschlossen werden. **Abb. 8.19** zeigt eine simulierte Häufigkeitsverteilung für die zwei relativen Winkel 40° und 80° , die als Vorzugswinkel aus dem experimentell ermittelten Histogramm abgelesen werden konnten. Bei der Simulation dieser Häufigkeitsverteilung wurde zusätzlich die Anzahl an Einträgen entsprechend **Abb. 8.18** verwendet.

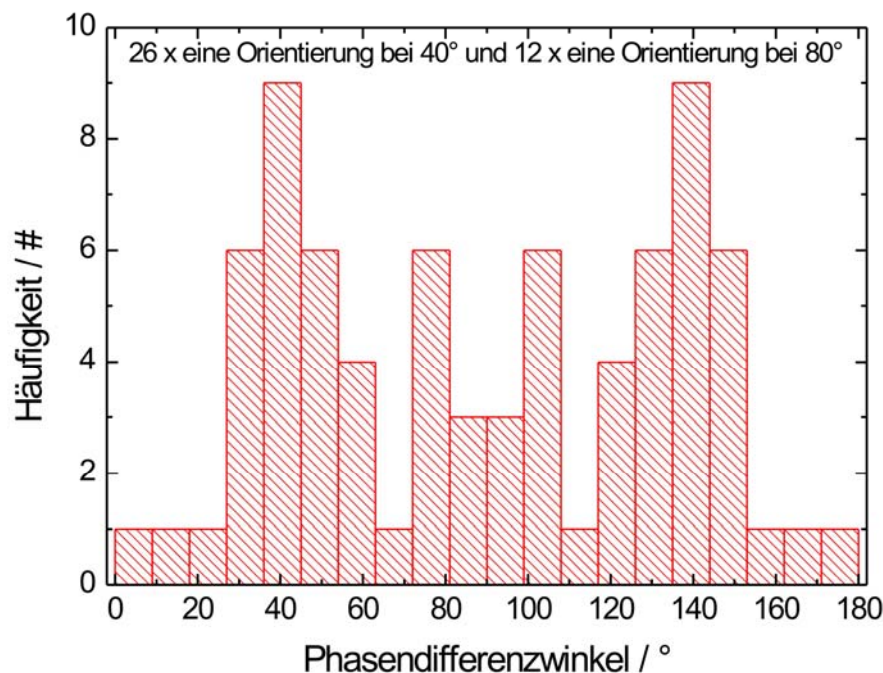


Abb. 8.19 Simuliertes Histogramm mit zwei verschiedenen relativen Orientierungen. Zusätzlich wurde die Anzahl an Einträgen für die entsprechenden Winkel gemäß der Häufigkeit der Vorzugswinkel aus der experimentell ermittelten Häufigkeitsverteilung gewählt und in der Simulation berücksichtigt. Der Winkel bei 40° wurde demnach 26mal berücksichtigt, die Orientierung bei 80° 12mal.

Wie in **Abb. 8.19** zu sehen, ergibt die Simulation eines Histogramms mit den zwei Vorzugswinkeln von 40° und 80° qualitativ eine Häufigkeitsverteilung wie sie in **Abb. 8.18** für das Chlorophyllpool-Paar Chl708 und Chl719 zu sehen ist. Die Häufigkeitsverteilung des

Chlorophyllpool-Paars Chl708-Chl719 könnte demnach durchaus das Ergebnis einer Überlagerung von zwei verschiedenen Histogrammen sein, in denen die Winkel zwischen zwei unterschiedlichen Chlorophyllcluster-Paaren in ein gemeinsames Histogramm eingetragen wurden.

Aufgrund der strukturellen Unterschiede der einzelnen Protein-Pigment-Komplexe, die unter anderem die Fluoreszenzemission beeinflussen können, und durch die Auswahlkriterien für die Beurteilung der linearen Polarisation der Fluoreszenz und der Zuordnung der Banden zu den Chlorophyllpools, nimmt die Anzahl an Einträgen in den Häufigkeitsverteilungen der Phasendifferenzwinkel zwischen verschiedenen Chlorophyllpools stark ab. Durch eine ausgeprägte spektrale Diffusion der einzelnen Banden, gestaltet sich die Zuordnung der Banden zu bestimmten Pools teilweise als sehr schwierig. Ebenso können sowohl die GAUSS-Zerlegung als auch die anschließende Analyse mittels einer \cos^2 -Funktion, mit Fehlern behaftet sein. Zusätzlich wird eine eindeutige Beurteilung der Fluoreszenzfluktuationen durch photophysikalische Prozesse wie dem Ausbleichen und dem Blinken, die die Fluoreszenzintensität beeinflussen, erschwert. Diese Faktoren führen zu einer Verbreiterung der Maxima in den Häufigkeitsverteilungen. In Extremfällen, vor allem bei wenigen Einträgen, kann dadurch eine Gleichverteilung entstehen, wie beispielsweise für das Chlorophyllpool-Paar Chl705-Chl708 gesehen (Histogramm nicht gezeigt). Eine Aussage zu möglichen Vorzugswinkeln kann auf der Grundlage solcher Histogramme nicht gemacht werden.

Ein Vergleich der aus den Histogrammen ermittelten Winkel, die von zwei Chlorophyllpools bzw. deren Übergangsdipolmomenten eingeschlossen wird, mit Literaturdaten, kann im Augenblick nur für die Chlorophyllpools Chl708 und Chl719 von PSI aus *TS. elongatus* durchgeführt werden.

Die Chlorophyllpools Chl705 und Chl745 wurden bis jetzt nur in fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen bei tiefen Temperaturen und auf Einzelmolekülebene nachgewiesen. Die Zahlen 705 und 745 bezeichnen deshalb die Wellenlänge des jeweiligen Fluoreszenzmaximums des Chlorophyllpools und nicht das Absorptionsmaximum, wie es in der Literatur allgemein die Regel ist. In der Literatur gibt es keine weiteren Angaben über die Chlorophyllpools Chl705 und Chl745 und somit auch keinen Vorschlag zu möglichen Kandidaten, die für diese Pools verantwortlich sein könnten. Ein Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit Daten aus der Literatur ist somit ausschließlich für die Chlorophyllpools Chl708, Chl715 und Chl708 möglich. Der Chlorophyllpool Chl715 konnte jedoch in den Fluoreszenzemissionsspektren nicht eindeutig einer Bande zugeordnet werden

(siehe Kapitel 6 „*Optische Einzelmolekülspektroskopie an Photosystem I-Komplexen aus Thermosynechococcus elongatus*“). Bis dato ist auch nicht bekannt, ob dieser Pool überhaupt Fluoreszenz emittiert. Aus diesen Gründen wurde der Chlorophyllpool Chl715 nicht berücksichtigt. Dies könnte eine zusätzliche Fehlerquelle sein, die die Häufigkeitsverteilungen der Phasendifferenzwinkel verfälscht, wenn dieser Pool doch fluoreszieren sollte.

Für die erstellten Häufigkeitsverteilungen bedeutet dies, dass aus den sechs möglichen Histogrammen nur eine Häufigkeitsverteilung aufgrund ihrer Qualität und aufgrund der vorhandenen Literaturdaten weiter ausgewertet werden kann. Für das Chlorophyllpool-Paar Chl708 und Chl719 konnten aus der entsprechenden Häufigkeitsverteilung die Winkel 40° , 80° bzw. 100° und 140° abgelesen werden. Im Folgenden soll ein Vergleich dieser Winkel mit Literaturdaten durchgeführt werden.

8.3.3.3 Bestimmung der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten einzelner Chlorophyllpools anhand von Literaturdaten

Um von diesen Winkeln auf die tatsächliche Lage der Chlorophyllpools im Protein schließen zu können, müssen die Übergangsdipolmomente der einzelnen Chlorophylle der Chlorophyllpools bekannt sein. Die Ausrichtung der Übergangsdipolmomente lässt sich aus den *site*-Energien und den Kopplungen der Chlorophylle untereinander und zu ihrer Umgebung berechnen. JORDAN [15] lieferte 2001 mit der Aufklärung der Kristallstruktur von PSI aus *TS. elongatus* bei einer Auflösung von 2,5 Å die Grundlage für die Berechnung der *site*-Energien und der Kopplungen der Chlorophylle in PSI. In den folgenden Jahren wurden mehrere Publikationen veröffentlicht, in denen unter Verwendung verschiedener Rechenmethoden die Wechselwirkungen und die *site*-Energien der Chlorophylle in PSI berechnet wurden. Auf diesen Arbeiten basieren verschiedene Vorschläge, die bestimmte Chlorophylle der Antenne den roten Chlorophyllpools zuordnen [54,101,102]. **Tab. 8.4** ist eine Zusammenfassung der Chlorophylle, die als rote Chlorophylle in Frage kommen; **Abb. 8.20** zeigt ihre Lokalisierung in der Antenne von PSI.

Tab. 8.4 Zusammenfassung aller möglichen Kandidaten, die für die roten Chlorophyllpools in Frage kommen. Die Vorschläge der Kandidaten beruhen auf unterschiedlichen Berechnungsmethoden.

	JORDAN (2001) [15]	SENER (2002) [102]	DAMJANOVIC (2002) [101]	VAITEKONIS (2005) [54]
Grundlage der Zuordnung	Orientierung der Chlorophylle und Annahme einer starken exzitonischen Kopplung als Ursache für die Rotverschiebung	Berücksichtigung der stärksten exzitonischen Kopplung, ebenso wie der größten Oszillatorstärke im nieder-energetischen Zustand	Tiefste Zustände entsprechen den roten Chlorophyllen; <i>site</i> -Energien durch quantenchemische Berechnungen ermittelt (INDO/S-CIS)	Tiefste Zustände entsprechen den roten Chlorophyllen; <i>site</i> -Energien durch genetischen Algorithmus berechnet
Chl708	Nur Kandidaten, keine genaue Zuordnung <i>B31-B32-B33</i>	<i>B22-B34</i>	<i>A26-A27</i>	<i>A19-A20-A21</i> <i>A2-A3-A4</i> <i>B11</i>
Chl715	<i>A32-B7 (Chl719)</i> <i>A38-A39</i>	<i>A33-A34</i> <i>A24-A35</i>	<i>B24-B25</i>	<i>B31-B32-B33</i> <i>A38-A39</i>
Chl719	<i>B37-B38</i>	<i>A32-B7</i>	<i>A31-A32-B6-B7</i>	<i>A31-A32-B07-B6</i>

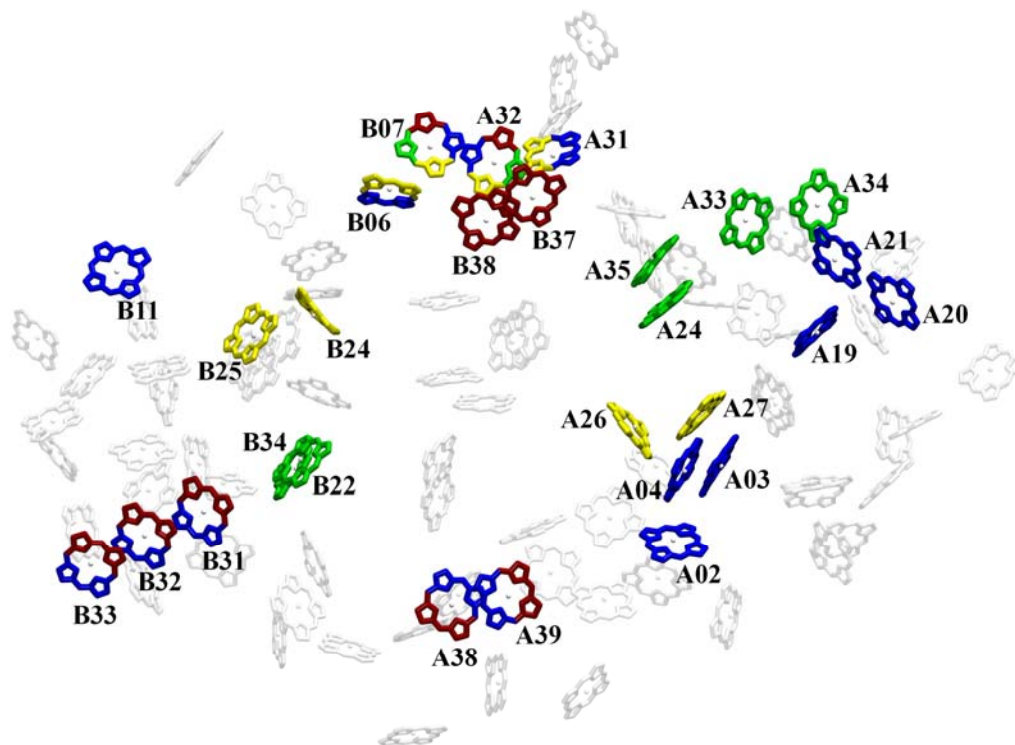


Abb. 8.20 Mögliche Kandidaten für die roten Chlorophyllpools Chl708, Chl715 und Chl719. Die unterschiedlichen Farben entsprechen unterschiedlichen Literaturquellen: rot - JORDAN, grün - SENER, gelb - DAMJANOVIC, blau - VAITEKONIS. Übereinstimmende Kandidaten sind mehrfarbig eingezeichnet. Aufsicht von der stromalen Seite auf das Antennensystem.

Die Vorschläge für die Kandidaten der einzelnen roten Chlorophyllpools unterscheiden sich je nach verwendetem Rechenansatz. Während JORDAN [15] nur Mutmaßungen über die Lokalisation der roten Chlorophylle aufgrund der strukturellen Anordnung aufgestellt hat, berücksichtigt ein erster, einfacher theoretischer Ansatz nur die exzitonische Kopplung der Chlorophylle in der Antenne untereinander, um die Rotverschiebung der roten Chlorophyllpools zu erklären. Weder die *site*-Energien der einzelnen Chlorophylle noch der Umstand, dass die roten Chlorophylle teilweise Ladungstransfercharakter besitzen, wurde berücksichtigt. Die Wechselwirkungen zwischen den Chlorophyllen wurden mit der Full-Coulomb-Näherung ermittelt, die elektrostatische Wechselwirkungen in einer Multipol-Entwicklung einbezieht (SENER [102]). Eine Zuweisung der roten Chlorophylle erfolgte in diesem Fall aber nicht aufgrund der neuen, berechneten Zustände, sondern nur aufgrund der Stärke der exzitonischen Kopplung untereinander. Im Gegensatz hierzu, berücksichtigt DAMJANOVIC

[101] mehrere Kopplungsmechanismen zwischen den Chlorophyllen untereinander und zwischen den Chlorophyllen und dem Proteingerüst. Neben der Dipol-Dipol-Näherung für weit entfernte Chlorophyllpaare werden exzitonische Kopplung, Ladungstransfercharakter der angeregten Chlorophylle und die spezifischen *site*-Energien der einzelnen Chlorophylle in der Antenne in die Berechnung der Energieeigenwerte bzw. der Übergangsdipolmomente miteinbezogen. Die *site*-Energien wurden quantenmechanisch unter expliziter Berücksichtigung der Umgebung der einzelnen Chlorophylle über eine semiempirische Methode namens INDO/S-CIS (*intermediate neglect of differential overlap method, parametrized for spectroscopy*, zusammen mit *single excited configuration interaction*) berechnet. Diese wurde ebenfalls zur Ermittlung der exzitonischen Kopplungen eingesetzt. Der Ladungstransfercharakter wurde über eine zusätzliche Verschiebung der *site*-Energien der beteiligten Chlorophylle erfasst. Mit den *site*-Energien für jedes Chlorophyll und den dazugehörigen Kopplungen kann der effektive Hamiltonian für die 96 Chlorophylle in einem monomeren PSI-Komplex aufgestellt werden. Durch Diagonalisieren der 96×96-Matrix ergeben sich die neuen Energieeigenwerte und Eigenvektoren (Zustände) der Chlorophylle in PSI. Die neuen Zustände k berechnen sich entsprechend folgender Gleichung

$$|k\rangle = \sum_{i=1}^{96} c_{ik} |Chl_i\rangle, \quad (8.3)$$

mit c_k als Gewichtungsfaktor, der angibt, inwieweit das Chlorophyll i $|Chl_i\rangle$ zum jeweiligen neuen Zustand k beiträgt. Entsprechendes gilt für die Übergangsdipolmomente $\vec{\mu}_k$ der neuen Zustände:

$$\vec{\mu}_k = \sum_{i=1}^{96} c_{ik} \vec{\mu}_{Chl_i}. \quad (8.4)$$

DAMJANOVIC geht davon aus, dass die tiefsten Zustände den roten Chlorophyllen entsprechen. Demnach erhält man als mögliche Kandidaten für den Chlorophyllpool Chl719 die Chlorophylle *A31-A32-B06-B07* und für den Chlorophyllpool Chl715 die Chlorophylle *A26-A27*. Ein Vorschlag für die Kandidaten des Chlorophyllpools Chl708 erfolgt ausschließlich über die Symmetrie innerhalb des Heterodimers PsaA/PsaB.

Als Kandidaten für den Chlorophyllpool Chl708 werden die Chlorophylle *B24* und *B25* vorgeschlagen; diese liegen rotations-symmetrisch zu *A26* und *A27*. Für die Kandidaten der roten Chlorophyllpools wurde das Übergangsdipolmoment für den Q_y -Übergang entsprechend Gleichung (8.4) berechnet. **Abb. 8.21** zeigt die von DAMJANOVIC vorgeschlagenen Kandidaten und die Ausrichtung der dazugehörigen Übergangsdipolmomente. Die Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der vermeintlichen Chlorophyllpools sind in **Tab. 8.5** wiedergegeben.



Abb. 8.21 Gezeigt sind die möglichen Kandidaten der Chlorophyllpools Chl708, Chl715 und Chl719 mit den zugehörigen Übergangsdipolmomenten basierend auf den quantenchemischen Berechnungen von DAMJANOVIC. Aufsicht von der stromalen Seite des Proteins.

Tab. 8.5 Übersicht der Winkel, die von zwei Übergangsdipolmomenten verschiedener Chlorophyllpools eingeschlossen werden, nach DAMJANOVIC [101].

Chlorophyllpool-Paar	Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten
Chl719 – Chl715	28°
Chl719 – Chl708	30°
Chl715 – Chl708	3°

Im Jahr 2005 wurde eine weitere Publikation von VAITEKONIS [54] veröffentlicht, die den Berechnungen der Eigenwerte und Eigenvektoren der Chlorophylle in PSI einen generischen Algorithmus zugrunde legt, mit dem die *site*-Energien für die einzelnen Chlorophylle berechnet wurden. Die Zuordnung der *site*-Energien wurde dabei solange verändert, optimiert und wiederholt, bis die Absorptionsspektren von PSI aus *TS. elongatus* erklärt werden konnten. Im Hamiltonian für PSI selbst wurden neben den so berechneten *site*-Energien auch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen eingesetzt. Der Ladungstransfercharakter der angeregten Chlorophylle wurde nachträglich nach Berechnung der neuen Zustände berücksichtigt. Als mögliche

Kandidaten für die verschiedenen Chlorophyllpools kommen auf der Grundlage dieser Berechnungsmethode mehrere Chlorophyllcluster für einen Chlorophyllpool in Frage. Eine Übersicht dieser Chlorophyllcluster und die dazugehörigen Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten gibt **Tab. 8.6** wieder. **Abb. 8.22** zeigt die Ausrichtung der Übergangsdipolmomente der an den roten Chlorophyllpools beteiligten Chlorophylle bzw. Chlorophyllcluster.

Tab. 8.6 Übersicht über die möglichen Kandidaten und der Winkel, die von zwei Übergangsdipolmomenten der verschiedenen Chlorophyllpools eingeschlossen werden (nach VAITEKONIS [54]). Ein Chlorophyllpool kann aus mehreren Chlorophyllcluster bestehen.

Chlorophyllpool-Paar	Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten
Chl719-Chl715	
<i>A31-A32-B07-B06 / B31-B32-B33</i>	32°
<i>A31-A32-B07-B06 / A38-A39</i>	53°
Chl719-Chl708	
<i>A31-A32-B07-B06 / A19-A20-A21</i>	19°
<i>A31-A32-B07-B06 / A2-A3-A4</i>	84°
<i>A31-A32-B07-B06 / B11</i>	140°
Chl715-Chl708	
<i>B31-B32-B33 / A19-A20-A21</i>	51°
<i>B31-B32-B33 / A2-A3-A4</i>	52°
<i>B31-B32-B33 / B11</i>	69°
<i>A38-A39 / A19-A20-A21</i>	34°
<i>A38-A39 / A2-A3-A4</i>	45°
<i>A38-A39 / B11</i>	36°

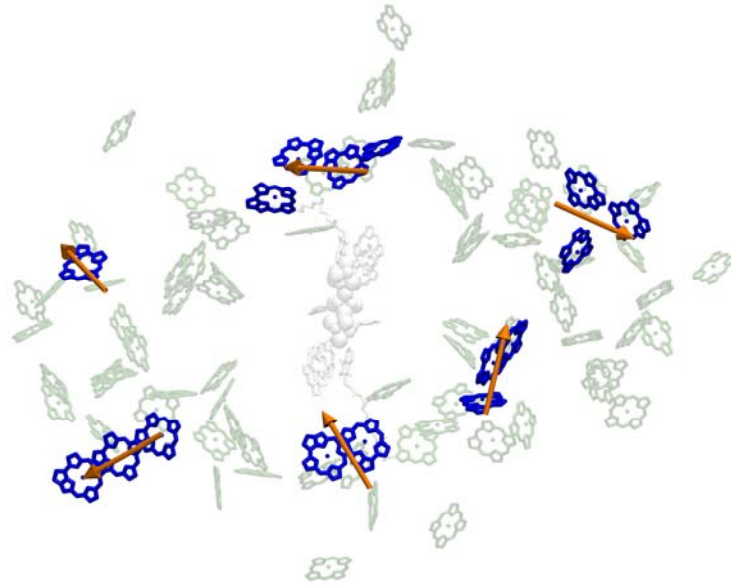


Abb. 8.22 Mögliche Kandidaten für die Chlorophyllpools Chl708, Chl715 und Chl719 mit den dazugehörigen Übergangsdipolmomenten, die das Ergebnis der Anwendung eines generischen Algorithmus sind. Es wird nicht nur ein Chlorophyll oder ein Chlorophyllcluster für einen Chlorophyllpool vorgeschlagen. Ein Chlorophyllpool kann aus mehreren Clustern bzw. Chlorophyllen bestehen. Aufsicht von der stromalen Seite des Proteins.

8.3.3.4 Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit den Literaturdaten

Die Publikation von VAITEKONIS ist bis dato das aktuellste Paper, das sich mit der Zuordnung bestimmter Antennenchlorophylle zu den roten Chlorophyllpools beschäftigt. Die in diesem Paper vorgeschlagenen Kandidaten stimmen zum Teil mit den Kandidaten von JORDAN und DAMJANOVIC vorhergesagten roten Chlorophyllen überein. Da DAMJANOVIC allein aus Symmetriegründen die Chlorophylle A26 und A27 für den Chlorophyllpool Chl708 vorschlägt, diese aber nicht explizit berechnet, sollen die Kandidaten aus dem Paper von VAITEKONIS, bei dem alle Chlorophyllpools direkt das Ergebnis der tiefsten berechneten Eigenzustände sind und das zudem das aktuellste Paper darstellt, die Grundlage für die weitere Diskussion der Ergebnisse der Fluoreszenzpolarisationsanalyse sein.

Vergleicht man die Winkel aus der Häufigkeitsverteilung für das Chlorophyllpool-Paar Chl708 und Chl719 mit den aus den Literaturdaten berechneten Winkeln, ergibt sich eine Übereinstimmung der Winkel bei ca. 80° (experimentell ermittelter Wert) und bei 84° (aus den Literaturangaben berechneter Winkel) für die Chlorophyllcluster A31-A32-B07-B06 (Chl719) und A2-A3-A4 (Chl708). Außerdem kann der experimentell ermittelte Winkel bei

140° dem berechneten Winkel von 140° zwischen dem Chlorophyllcluster *A31-A32-B07-B06* und dem Chlorophyll *B11* (Chl708) zugeordnet werden.

Tab. 8.7 Die Tabelle zeigt die Übereinstimmungen zwischen den durch die Fluoreszenzpolarisationsanalyse ermittelten Winkel des Chlorophyllpool-Paares Chl708 und Chl719 bzw. deren dazugehörigen Chlorophyllclustern und den aus der Literatur berechneten Winkel.

Experimentell ermittelte Winkel zwischen den Chlorophyllpools Chl708 und Chl719	Übereinstimmungen aus den Literaturdaten von VAITEKONIS für das Chlorophyllpool-Paar Chl708 – Chl719
40°	-
80°	✓ (Berechneter Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten bei 84°)
100°	-
140°	✓ (Berechneter Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten bei 140°)

Tab. 8.7 zeigt die Übereinstimmungen zwischen den durch die Fluoreszenzpolarisationsanalyse ermittelten Winkeln und den auf der Grundlage von VAITEKONIS berechneten Winkeln zwischen den Übergangsdipolmomenten möglicher Kandidaten des roten Chlorophyllpool-Paares Chl708 und Chl719. Die zwischen Experiment und Literatur übereinstimmenden Kandidaten sind in **Abb. 8.23** rot gekennzeichnet.

Während der Chlorophyllcluster des Chlorophyllpools Chl719 $A31-A32-B07-B06$ in der Literatur mehrfach als Kandidat für die roten Chlorophyllpools vorgeschlagen wird, wird der Chlorophyllcluster $A2-A3-A4$ und das Chlorophyll $B11$ lediglich von VAITEKONIS vorgeschlagen. Erstaunlich ist, dass gerade ein einzelnes Chlorophyll als möglicher Kandidat genannt wird, da die Rotverschiebung unter anderem auf eine exzitonische Kopplung zwischen den Chlorophyll-Molekülen zurückgeführt wird. Zusätzlich beeinflussen noch Kopplungen zur lokalen Umgebung, d.h. Wechselwirkungen zu benachbarten Aminosäuren sowie ein möglicher Ladungstransfer

zwischen den Molekülen die spektralen Eigenschaften eines Chlorophylls. Diese Kopplungen, mit Ausnahme der exzitonischen Kopplung, müssten für das Chlorophyll $B11$ so stark sein, dass der elektronische Zustand dieses Chlorophylls eine Absenkung um mehr als 25 nm erfährt.

Durch eine Orientierung der PSI-Komplexe in der Probe würde sich das Aufstellen der Häufigkeitsverteilung und damit die Notwendigkeit der Mittelung über viele Messungen eliminieren lassen. Jede Messung eines PSI-Komplexes würde dann direkt die tatsächliche relative Orientierung der Chlorophyllpools als Ergebnis haben. Eine Orientierung wäre beispielsweise durch Rekonstitution einzelner PSI-Komplexe in einer Phospholipid-Doppelmembran oder durch Immobilisierung der PSI-Komplexe auf einer Goldoberfläche möglich.

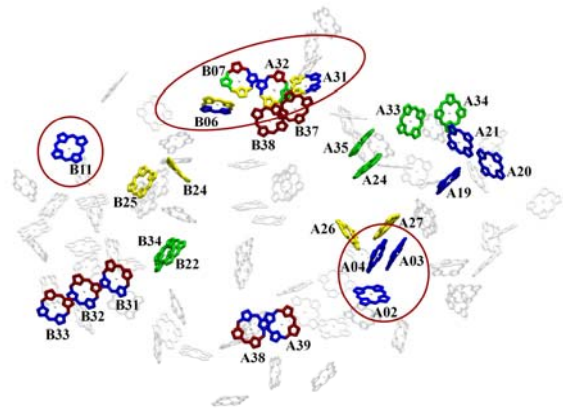


Abb. 8.23 Gezeigt sind die in der Literatur für die roten Chlorophyllpools vorgeschlagenen Kandidaten. Nach Vergleich der Winkel, die die Übergangsdipolmomente dieser Kandidaten einschließen, mit den aus der Fluoreszenz-polarisationsanalyse erhaltenen Winkel, erhält man eine Übereinstimmung zwischen den Chlorophyllclustern $A31-A32-B07-B06$ und $A2-A3-A4$ bzw. $A31-A32-B07-B06$ und dem Chlorophyll $B11$ (rot gekennzeichnet). Aufsicht von der stromalen Seite des Proteins.

8.4 Zusammenfassung des Kapitels

Im Kapitel „*Fluoreszenzpolarisationsanalyse*“ werden die Ergebnisse der Untersuchung der Fluoreszenzemissionsbanden verschiedener Chlorophyllpools in PSI aus *TS. elongatus* auf lineare Polarisation vorgestellt. Bei Existenz linearer Polarisation der einzelnen Fluoreszenzbanden kann auf die relative Orientierung der Chlorophyllpools im Protein-Pigment-Komplex geschlossen werden. Auf dieser Grundlage basierend, sollten die detektierten Chlorophyllpools bestimmten Antennen-Chlorophyllen zugeordnet werden.

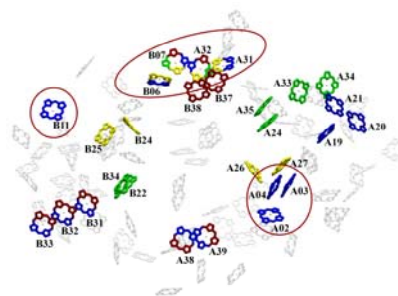
Voraussetzung für linear polarisierte Fluoreszenz ist eine bestimmte räumliche Anordnung der emittierenden Moleküle. Neben einzelnen Emittieren können gekoppelte Systeme aus mehreren Emittieren oder Emitter, die kollinear zueinander ausgerichtet sind, linear polarisiertes Licht emittieren. Zum Nachweis linear polarisierter Fluoreszenz wird vor dem Spektrometer ein rotierender Polarisator eingebaut und die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Polarisatorstellung aufgezeichnet. Die Intensitätsfluktuationen werden durch Integration quantifiziert und mit einer \cos^2 -Funktion gefittet. Die Winkelfunktion liefert zum einen den Nachweis der linearen Polarisation und zum anderen den Phasendifferenzwinkel $\Delta\varphi$ zwischen den einzelnen Fluoreszenzbanden. Durch Erstellen einer Häufigkeitsverteilung der Phasendifferenzwinkel für ein Chlorophyllpool-Paar ergibt sich der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der zwei Chlorophyllpools. Ein Vergleich des experimentell ermittelten Winkels mit dem auf Literaturdaten basierenden Winkel ermöglicht die Zuordnung der roten Chlorophyllpools zu bestimmten Chlorophyllen des Antennensystems.

Die Fluoreszenzpolarisationsanalyse der einzelnen Chlorophyllpools wurde sowohl mit PSI-Trimeren als auch an monomerem PSI durchgeführt. Trotz dreifacher Ausführung der einzelnen Chlorophyllpools in trimeren Photosystem I-Komplexen konnten in den Fluoreszenzemissionsspektren einzelne Banden mit linearer Polarisation nachgewiesen werden. Lineare Polarisation der Fluoreszenzbanden kann im Fall von PSI-Trimeren nur auftreten, wenn die detektierte Fluoreszenzbande entweder das Ergebnis der Emission einer monomeren Ausfertigung des Chlorophyllpools darstellt oder sich die Fluoreszenzbanden der drei Kopien des Pools spektral auflösen lassen. Zusätzlich zu berücksichtigen ist, dass eine Kopie eines Pools in einer monomeren Untereinheit des trimeren PSI-Komplexes laut Literatur aus mehreren Chlorophyllclustern bestehen kann [54]. Der positive Nachweis einer linearen Polarisation lässt aber die Schlussfolgerung zu, dass es durchaus möglich ist, dass nur ein Chlorophyllcluster fluoresziert. Ob immer derselbe Chlorophyllcluster fluoresziert, kann nicht

mit Sicherheit gesagt werden. Ein Argument dagegen wäre, dass die Fluoreszenzbanden nicht immer linear polarisiert sind, was einerseits auf die Fluoreszenzemission verschiedener Chlorophyllcluster zurückzuführen ist oder andererseits das Ergebnis der dreifachen Ausführung des Chlorophyllpools im PSI-Trimer ist. Der Grund eines solchen unterschiedlichen spektralen Verhaltens könnte seine Ursache in den strukturellen Unterschieden haben, die dazu führen, dass ein Energietransfer zum Chlorophyllpool oder von diesem Chlorophyllpool gefördert oder unterbunden wird.

Exemplarisch wurden zwei trimere PSI-Komplexe gezeigt, bei denen einmal die Bande mit einem Fluoreszenzmaximum von 691 nm und die Bande bei 714 nm lineare Polarisation aufweist. Die röttesten Chlorophyllpools sind aber bei den PSI-Trimeren zum großen Teil nicht linear polarisiert. Auch zeigen die meisten Fluoreszenzemissionsspektren nicht mehr als eine linear polarisierte Fluoreszenzbande. Zur Bestimmung des Phasendifferenzwinkels sind mindestens zwei Fluoreszenzbanden mit linearer Polarisation erforderlich. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, linear polarisierte Banden zu detektieren, wurden deshalb die Untersuchungen an PSI-Monomeren fortgeführt. Die Fluoreszenzemissionsspektren und die 2D-Plots der Spektren monomerer PSI-Komplexe zeigen, dass mehrere Banden eines Spektrums in ihrer Intensität fluktuieren. Mittels einer GAUSS-Zerlegung wurden die Banden unter Berücksichtigung der spektralen Diffusion und einer möglichen spektralen Überlappung zu benachbarten Banden „isoliert“ und integriert. Durch Analyse der Intensitätsmodulation der einzelnen Banden mit einer \cos^2 -Funktion konnte der Phasendifferenzwinkel zwischen verschiedenen Banden ermittelt werden. Die Banden wurden entsprechend Kapitel 6 „*Optische Einzelmolekülspektroskopie an Photosystem I-Komplexen aus *TS. elongatus**“ einzelnen Chlorophyllpools zugeordnet. Zur Ermittlung der relativen Orientierung der Chlorophyllpools wurden für verschiedene Chlorophyllpool-Paare Häufigkeitsverteilungen erstellt, deren Maximum dem Winkel entspricht, den die Übergangsdipolmomente der Chlorophyllpools einschließen. Aus der Literatur erhält man Angaben zum Übergangsdipolmoment für die Chlorophyllpools Chl708, Chl715 und Chl719. Da die Chlorophyllpools Chl705 und Chl745 in der Literatur sowohl experimentell als auch theoretisch noch nicht beschrieben wurden, kann keine Zuordnung dieser Pools zu bestimmten Antennen-Chlorophyllen erfolgen. Ebenso konnte der Chlorophyllpool Chl715 nicht berücksichtigt werden, da diesem Pool keine explizite Bande in den Fluoreszenzemissionsspektren zugewiesen werden konnte.

Auf der Grundlage quantenchemischer Berechnungen und einem generischen Algorithmus wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen mögliche Kandidaten für die Chlorophyllpools Chl708 und Chl719 ermittelt. Ein Vergleich der Winkel, die von den Übergangsdipolmomenten dieser Kandidaten eingeschlossen werden, mit den Winkeln aus den Häufigkeitsverteilungen des Chlorophyllpool-Paares Chl708 – Chl719 ergibt zwei Übereinstimmungen: zwischen dem Chlorophyllcluster *A31-A32-B07-B06* (Chl719) und *A2-A3-A4* (Chl708) und zwischen dem Chlorophyllcluster *A31-A32-B07-B06* (Chl719) und dem Chlorophyll *B11* (Chl708). Simulationen, in denen zufällige Orientierungen von Vektoren in einem dreidimensionalen Raum erzeugt wurden, untermauern diese Vorgehensweise zur Bestimmung der relativen Orientierung der Chlorophyllcluster zueinander. Auch bei einer isotropen Verteilung der Photosystem I-Komplexe im Raum und Projektion der relativen Orientierungen auf eine Ebene, ergibt sich durch Erstellen einer Häufigkeitsverteilung der dabei auftretenden Winkel, dass die tatsächliche relative Orientierung von zwei Vektoren zueinander über die Maxima im Histogramm ermittelt und durch anschließenden Vergleich mit vorhandenen Literaturdaten zugeordnet werden kann.



9 Optische Spektroskopie an Photosystem I-Komplexen aus *Arthrospira platensis*

9.1 Zielsetzung

Die roten Chlorophylle des Photosystem I-Komplexes aus *A. platensis* wurden in der Vergangenheit vor allem spektroskopisch durch Fluoreszenzspektroskopie [10,74], LD-Spektroskopie [78] oder mittels STARK-Spektroskopie [59] untersucht. Alle Untersuchungen beschränkten sich auf Messungen im Ensemble. Im nachfolgenden Kapitel werden neben Fluoreszenzmessungen von Bulk-Proben, Fluoreszenzemissionsspektren einzelner Photosystem I-Komplexe gezeigt und analysiert. Die Fluoreszenzemissionsspektren zeigen, wie spektroskopisch unterschiedlich Photosystem I-Komplexe innerhalb ein und derselben PSI-Probe sein können. Diese Information geht in Bulk-Untersuchungen vollständig verloren.

9.2 Die roten Chlorophyllpools

Das filamentöse Cyanobakterium *Arthrospira platensis* (früher: *Spirulina platensis*) besitzt einen trimeren Photosystem I-Komplex, der sich durch zwei rote Chlorophyllpools auszeichnet, deren Absorptionsmaxima bei 708 nm (Chl708) sowie bei 735 nm (Chl735) liegen. Damit besitzt *A. platensis* mit Chl735 den Chlorophyllpool, mit dem am weitesten im roten Spektralbereich existierenden Absorptionsmaximum [6]. Bei tiefen Temperaturen liegen die entsprechenden Fluoreszenzemissionsbanden für den Chlorophyllpool Chl708 bei 725 nm (F725) und für den Chlorophyllpool Chl735 bei 760 nm (F760) [6,9]. Die Anzahl der roten Chlorophyllpools in Photosystem I aus *A. platensis* ist abhängig vom Oligomerisierungsgrad des Protein-Pigment-Komplexes [6,10]. Während PSI-Trimere bei tiefen Temperaturen zwei Fluoreszenzbanden bei 725 nm und 760 nm zeigen, konnte für PSI-Monomere nur ein Chlorophyllpool (Chl708) mit einer Absorptionsbande bei 708 nm und einer Fluoreszenz-emissionsbande bei 725 nm nachgewiesen werden [10].

Tab. 9.1 gibt einen Überblick über die roten Chlorophyllpools von Photosystem I aus *A. platensis*. Neben den Absorptions- und Emissionsmaxima für unterschiedliche Temperaturen ist die Anzahl an Chlorophyll *a*-Molekülen angegeben, aus denen der jeweilige Chlorophyllpool vermutlich besteht. Berechnungen basierend auf der Integration der Absorptionsbanden ergeben einen Gesamtbetrag an roten Chlorophyllen in PSI-Trimeren von ca. 6,4% und in PSI-Monomeren von ca. 5,2% [10].

Die Tabelle soll nicht den Anspruch auf Vollständigkeit erfüllen; sie soll vielmehr einen Einblick in die Vielfältigkeit der roten Chlorophyllpools in verschiedenen Cyanobakterien geben und deren Abhängigkeit von äußeren Bedingungen wie Temperatur und Oligomerisierungsgrad darstellen. Je nach Mess- oder Berechnungsmethode werden verschiedene Absorptions- und Emissionsmaxima erhalten. Im Laufe der Zeit und mit der Entwicklung empfindlicherer Messmethoden musste die Anzahl an roten Chlorophyllpools immer wieder nach oben korrigiert werden. So konnten beispielsweise mittels einer GAUSS-Zerlegung der Absorptionsspektren für trimere Photosystem I-Komplexe fünf rote Chlorophyllpools ermittelt werden, die bei 705 nm, 714 nm, 726 nm, 737 nm und 746 nm absorbieren [10].

In der Tabelle sind ausschließlich Chlorophyllpools genannt, die experimentell ermittelt werden konnten, da im nachfolgenden Text auch nur diese berücksichtigt werden sollen.

Tab. 9.1 Übersicht über die roten Chlorophyllpools der PSI-Trimere und PSI-Monomere aus *A. platensis* mit den entsprechenden Literaturverweisen. Gezeigt sind die Absorptionsmaxima bei Raumtemperatur und bei tiefen Temperaturen (zwischen 77 K und 4 K), sowie die entsprechenden Fluoreszenzemissionsbanden. Die Anzahl, der an den roten Chlorophyllpools beteiligten Chlorophyll *a*-Moleküle wurde durch eine GAUSS-Zerlegung der Absorptionsspektren ermittelt.

	Trimere		Monomere
	Bande 1	Bande 2	Bande 1
Absorptionsspektrum (RT)	A703 GOBETS (2001)	A709 JENNINGS (1998) A715 GOBETS (2001)	A702 (als Schulter) GOBETS (2001)
Absorptionsspektrum (TT)	A708 GOBETS (2001)	A735 SHUBIN (1991) A740 GOBETS (2001)	A708 GOBETS (2001) A711 SHUBIN (1995)
Fluoreszenzspektrum (RT)	F715 KARAPETYAN (1997) (nur als Schulter von F685) SHUBIN (1992) F714 GOBETS (2001)	F730-740 KARAPETYAN (1997) (nur als Schulter von F685) SHUBIN (1991) F733 GOBETS (2001)	F715 KARAPETYAN (1997)
Fluoreszenzspektrum (TT)	F725 KARAPETYAN (1997) F720-F730 SHUBIN (1991) F728 SHUBIN (1995)	F760 KARAPETYAN (1997) GOBETS (2001) F762 SHUBIN (1995) F756 -F759 SHUBIN (1991)	F725 KARAPETYAN (1997) F728 SHUBIN (1995) F730 GOBETS (2001)
Chlorophyllpool	Chl708 GOBETS (2001) Chl710 KARAPETYAN (1999)	Chl735 SHUBIN (1995)	Chl708 GOBETS (2001)

Fortsetzung der **Tab. 9.1:**

	Trimere		Monomere
	Bande 1	Bande 2	Bande 1
Anzahl an Chlorophyllen	7 GOBETS (2001) SCHLODDER (2004)	3 GOBETS (2001) SCHLODDER (2004)	5-7 GOBETS (2001)

Die Anzahl der an den roten Chlorophyllpools beteiligten Chlorophylle kann aus den Absorptionsspektren berechnet werden. Welche Pigmente aber genau für die Chlorophyllpools Chl708 und Chl735 verantwortlich sind, kann aufgrund einer fehlenden Kristallstruktur nicht gesagt werden. Verschiedene Messergebnisse lassen aber Vermutungen bezüglich der Lokalisation von Chl735 zu. Wie bereits erwähnt, zeigen PSI-Monomere im Gegensatz zu PSI-Trimeren nur eine einzige Fluoreszenzemissionsbande bei 725 nm [7]. Man geht deshalb davon aus, dass der rötteste Chlorophyllpool Chl735 durch Chlorophylle entsteht, die auf benachbarten Monomeren lokalisiert sind. Erst durch Trimerisierung der PSI-Monomere werden die an Chl735 beteiligten Chlorophylle so zusammengelagert, dass sie miteinander interagieren können und den röttesten Chlorophyllpool bilden [10,105-107,121]. Nachgewiesen werden kann der rötteste Chlorophyllpool Chl735 am deutlichsten über die Fluoreszenzemission bei tiefen Temperaturen, wenn der Elektronendonator P700 reduziert vorliegt. Dieser Sachverhalt wird im folgenden Unterkapitel näher erörtert.

9.2.1 Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität F760 des Chlorophyllpools Chl735 vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors P700

Wie bereits im Kapitel 3 „Photosystem I - Aufbau und Funktionsweise“ beschrieben, sind sowohl Absorptions- als auch Fluoreszenzverhalten der roten Chlorophyllpools von sehr vielen Faktoren, wie beispielsweise dem Oligomerisierungsgrad des Protein-Pigment-Komplexes oder der Temperatur abhängig. Ein Teil der roten Chlorophyllpools zeigt zusätzlich eine Abhängigkeit der Fluoreszenzemission vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors P700. Die Fluoreszenzintensität des Chlorophyllpools Chl735 in PSI-Trimeren aus *A. platensis* ist vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors P700 abhängig, während Chl708 keine entsprechende Abhängigkeit zeigt [6,9]. Liegt der erste Elektronendonator P700 neutral vor, ist die Fluoreszenzemission des roten Chlorophyllpools Chl735 sehr viel stärker als wenn P700

oxidiert als Radikalkation $P700^{+\bullet}$ vorliegt; in diesem Fall wird ein Großteil der Fluoreszenzemission durch $P700^{+\bullet}$ gequencht. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzmissionsbande F760 vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors P700 ist nur bei tiefen Temperaturen zu detektieren, bei Raumtemperatur konnte eine derartige Abhängigkeit der Fluoreszenzemission des Chlorophyllpools Chl735 vom Redoxzustand nicht nachgewiesen werden [6,7].

Neben *A. platensis* zeigen noch weitere photosynthetische Bakterien wie das *Heliobacterium chlorum* oder *Rhodospseudomonas viridis* einen auf ein oxidiertes Reaktionszentrum zurückzuführenden Quenchmechanismus der Fluoreszenzemission eines Chlorophyllpools [122,123]. Auch die Fluoreszenzemission des Chlorophyllpools Chl719 aus Photosystem I des Cyanobakteriums *TS. elongatus* weist eine Abhängigkeit vom Reaktionszustand des Reaktionszentrums auf, obwohl man anfänglich davon ausgegangen ist, dass die Fluoreszenzintensität der roten Chlorophylle in PSI aus *TS. elongatus* vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors unabhängig ist [4]. Zwischenzeitlich hat man herausgefunden, dass die Fluoreszenzintensität der roten Chlorophylle in PSI aus *TS. elongatus* bei tiefen Temperaturen bis zu 50% abnimmt, wenn P700 oxidiert vorliegt [77]. Dagegen konnten sowohl in PSI-Monomeren aus *A. platensis* [9] wie auch in dem Photosystem I des Cyanobakteriums *Synechocystis* [64] und in pflanzlichem PSI [47], keine roten Chlorophyllpools nachgewiesen werden, deren Fluoreszenzintensität vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors P700 abhängig ist [4,64]. In trimeren PSI-Komplexen ist das Radikalkation $P700^{+\bullet}$ anscheinend ein sehr viel stärkerer Quencher als das neutrale P700, wohingegen in PSI-Monomeren P700 und $P700^{+\bullet}$ gleich starke Quencher sind. In PSI-Monomeren ist deshalb kein Unterschied der Fluoreszenzemission der roten Chlorophyllpools bei neutralem und oxidiertem Zustand von P700 zu sehen [9,47]. Durch die Bildung des Radikalkations $P700^{+\bullet}$ scheinen sich die energetischen Verhältnisse im PSI-Komplex neu auszubilden. Eine Ladungstrennung lässt P700 in PSI-Komplexen von *A. platensis* energetisch soweit absinken, dass das Radikalkation $P700^{+\bullet}$ eine Absorptionsbande zwischen 725 nm und 850 nm zeigt [9]. Die Anregungsenergie wird durch die Bildung der neuen energetischen Falle im PSI-Komplex vom röttesten Chlorophyllpool Chl735 auf das Radikalkation $P700^{+\bullet}$ weitergeleitet [6,9].

Eine Übertragung der Energie innerhalb des Photosystem I-Komplexes erfolgt in der Regel über den FÖRSTER-Mechanismus. Der FÖRSTER-Mechanismus wird bestimmt durch den Abstand zwischen den beteiligten Chlorophyllen, der Orientierung der Chlorophylle zueinander und dem spektralen Überlapp zwischen Akzeptor- und Donormolekül.

Die Chlorophylle an der Oberfläche eines Monomers haben ungefähr einen Abstand von 33-35 Å zu P700. Da der FÖRSTER-Radius für das entsprechende Donor-Akzeptor-Paar ca. 50 Å beträgt, liegen die Chlorophylle des Chlorophyllpools Chl735 und des Elektronendonors P700 innerhalb des FÖRSTER-Radius, so dass ein Quenchen der Fluoreszenz von Chl735 über $P700^{+\bullet}$ aufgrund des Abstandes prinzipiell möglich ist [10].

Beim Übergang von P700 zu $P700^{+\bullet}$ bleibt sowohl die räumliche Anordnung als auch die Orientierung des Übergangsdipolmoments unverändert [9,124]. Eine Veränderung des Energietransfers ist deshalb auf den unterschiedlichen spektralen Überlapp zwischen Emissionsbande des Donors und Absorptionsbande des Akzeptors zurückzuführen. Der spektrale Überlapp muss zwischen F760 und $P700^{+\bullet}$ größer sein als zwischen F760 und P700 [9].

Durch Voroxidation der PSI-Trimere mittels eines Oxidationsmittels oder durch Einfrieren unter Licht nimmt deshalb durch Bildung des Radikalkations $P700^{+\bullet}$ die Intensität von F760 bei tiefen Temperaturen stark ab. Im Vergleich zu einer reduzierten Probe und damit zu neutralem P700 verringert sich die Intensität von F760 bei Anwesenheit von $P700^{+\bullet}$ um ca. eine Größenordnung. Die „Reste“ der 760 nm-Bande sind als Schulter von F725 zu sehen. Im Gegensatz hierzu zeigt das Fluoreszenzemissionsspektrum der PSI-Trimere bei tiefen Temperaturen nach Vorreduktion eine intensive Bande bei 760 nm und eine vergleichsweise schwache Bande bei 725 nm.

Die Fluoreszenzbande des Chl708 Pools ist, wie bereits erwähnt, unabhängig vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors. Der Grund ist eine zu geringe spektrale Überlappung der Emissionsbande des Donors Chl708 und der Absorptionsbande des Akzeptors $P700^{+\bullet}$, wodurch eine Energieübertragung von Chl708 zu $P700^{+\bullet}$ nicht möglich ist.

Die Untersuchung der Intensität der Fluoreszenzemissionsbande des röttesten Chlorophyllpools Chl735 in PSI-Trimeren aus *A. platensis* ermöglicht es somit, den Reaktionszustand des Reaktionszentrums über die Bestimmung des Redoxzustandes des ersten Elektronendonors festzustellen. Ist P700 zum Radikalkation $P700^{+\bullet}$ oxidiert, spricht man von einem geschlossenen Reaktionszentrum; das Reaktionszentrum ist nach erfolgter Ladungstrennung photochemisch inaktiv. Wird das Reaktionszentrum entweder durch eine Rekombinationsreaktion innerhalb der Elektronentransferkette (zyklischer Elektronentransfer) oder mittels eines Reduktionsmittels, das *in vivo* Cytochrom c6 oder *in vitro* ein Reduktionsmittel, wie Ascorbat oder Natriumdithionit, sein kann, reduziert, liegt P700 neutral vor. Das Reaktionszentrum befindet sich nach erfolgter Reduktion in einem photochemisch aktiven Zustand und kann

nach Anregung eine Ladungstrennung durchführen. Man spricht in diese Fall von einem offenen Reaktionszentrum [72].

Erstaunlich ist, dass bei hohen Anregungsleistungen zwischen der Fluoreszenzintensität von F760 und dem Anteil an oxidiertem bzw. reduziertem P700 in PSI-Trimeren keine lineare Abhängigkeit besteht. Man nimmt deshalb an, dass nach Oxidation von P700 eines Reaktionszentrums des PSI-Trimers die Anregungsenergie von der Antenne einer monomeren Untereinheit mit reduziertem P700 zu der monomeren Untereinheit mit dem oxidierten P700 wandert und dort gequencht wird. Die Anregungsenergie wird über den rötesten Chlorophyllpool von einem Monomer zum benachbarten Monomer geleitet, was eine energetische Konnektivität voraussetzt. Die Chlorophylle von Chl735 ermöglichen einen Energieaustausch zwischen den Antennen der einzelnen Monomere in einem Trimer. Die von $P700^{+•}$ aufgenommene Energie wird als Wärme an die Umgebung abgegeben (Abb. 9.1).

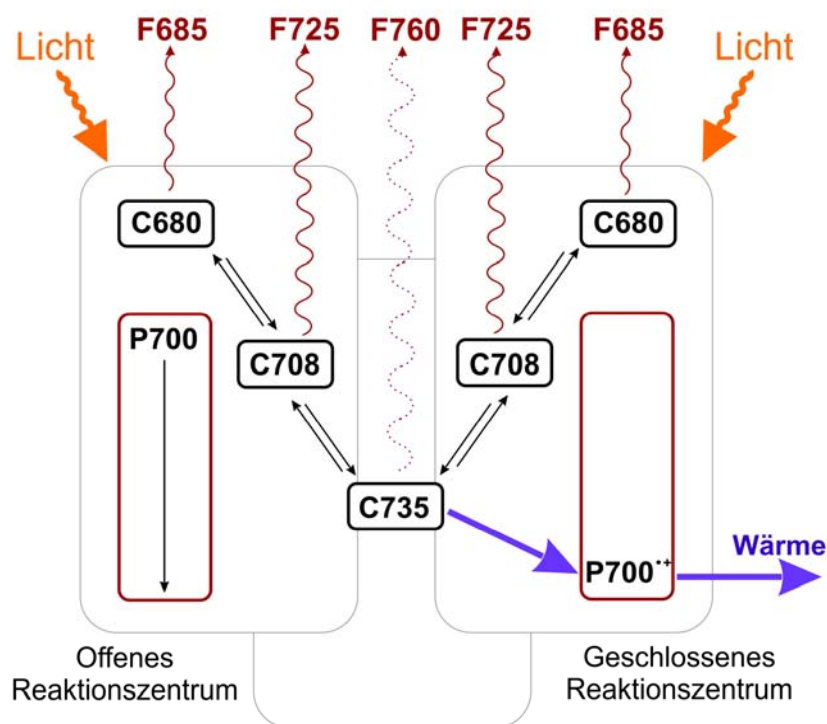


Abb. 9.1 Energieübertragung in einem trimeren PSI-Komplex, mit einem offenen und einem geschlossenem Reaktionszentrum. Der Chlorophyllpool Chl735 emittiert Anregungsenergie als Fluoreszenz, solange P700 neutral vorliegt. Sobald eines der drei Reaktionszentren oxidiert ist, wird die Anregungsenergie über den rötesten Chlorophyllpool Chl735 zum geschlossenen Reaktionszentrum weitergeleitet, von wo die Energie dissipativ als Wärme an die Umgebung abgegeben wird. Dadurch sinkt die Fluoreszenzintensität des rötesten Chlorophyllpools. Die Fluoreszenzintensität von Chl708 ist hingegen unabhängig vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors.

Prinzipiell stellt die Bildung von $P700^{+\bullet}$ und damit die Erzeugung einer energetischen Falle eine Schutzfunktion für die monomere Untereinheit dar, da dadurch eine Zerstörung der Antenne durch überschüssige Energie im System verhindert wird. Die Konnektivität innerhalb des Trimers und damit die Ableitung sämtlicher Anregungsenergie auf das jeweils geschlossene Reaktionszentrum würde aber eine Verringerung der Effizienz bedeuten.

Derart hohe Lichtintensitäten, wie sie beispielsweise in Experimenten verwendet werden, treten *in vivo* jedoch nicht auf, so dass dieser Effekt keinen Nachteil für den Organismus darstellen würde. Unter physiologischen Bedingungen wird $P700^{+\bullet}$ so schnell reduziert, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass innerhalb der mittleren Rekombinationszeit von $P700^{+\bullet}$ ein zweites Photon absorbiert wird und damit ein weiteres Reaktionszentrum innerhalb des Trimers oxidiert vorliegt. Durch eine energetische Konnektivität in trimeren PSI-Komplexen würde hier die Effektivität des Antennensystems erhöht werden, da die Anregungsenergie allen Reaktionszentren innerhalb des Trimers zur Verfügung steht. Zusätzlich könnte bei Zerstörung eines Reaktionszentrums die Antenne dieses Monomers durch die Reaktionszentren der benachbarten Monomere genutzt werden.

Eine Verbindung der Reaktionszentren ist nicht ungewöhnlich; neben Photosystem I aus *A. platensis*, zeigen noch andere Protein-Pigment-Komplexe eine energetische Konnektivität [9,22,125].

Die Existenz sowie die Eigenschaften und die möglichen Funktionen der roten Chlorophylle sind von dem Organismus abhängig, aus dem der Protein-Pigment-Komplex isoliert wurde. Daneben beeinflussen die äußeren Bedingungen die roten Chlorophyllpools. Je nach Lebensraum, d.h. je nach Nährstoffangebot und Lichtverhältnissen können sich die Photosystem I-Komplexe an die Gegebenheiten dadurch adaptieren, dass sie entweder als Monomer oder Trimer vorliegen können und sich damit auch die Anzahl an roten Chlorophyllpools verändert. Durch die Existenz der roten Chlorophyllpools kann *in vivo* die Effizienz des Antennensystems einerseits durch eine Erweiterung des spektralen Absorptionsbereichs sowie durch eine Kopplung der monomeren Untereinheiten erhöht werden. Protein-Pigment-Komplexe stellen somit ein sehr flexibles System dar, das sich den entsprechenden Umweltbedingungen anpassen kann.

In vitro kann der rötteste Chlorophyllpool Chl735 durch seine Fluoreszenzabhängigkeit als interner Marker für PSI-Trimere aus *A. platensis* bei tiefen Temperaturen verwendet werden. Mit Hilfe der optischen Spektroskopie wird es möglich, den Reaktionszustand des Photosystem I-Komplexes und die dazugehörigen kinetischen Parameter zu untersuchen.

9.3 Ergebnisse und Diskussion

9.3.1 Absorptionsspektrum von Photosystem I aus *Arthrospira platensis*

Zur Kontrolle der Integrität der PSI-Komplexe wurde das Absorptionsspektrum von PSI aus *A. platensis* im Ensemble mit einem UV/VIS-Spektrometer (PERKIN ELMER, Lambda 16) bei Raumtemperatur aufgenommen.

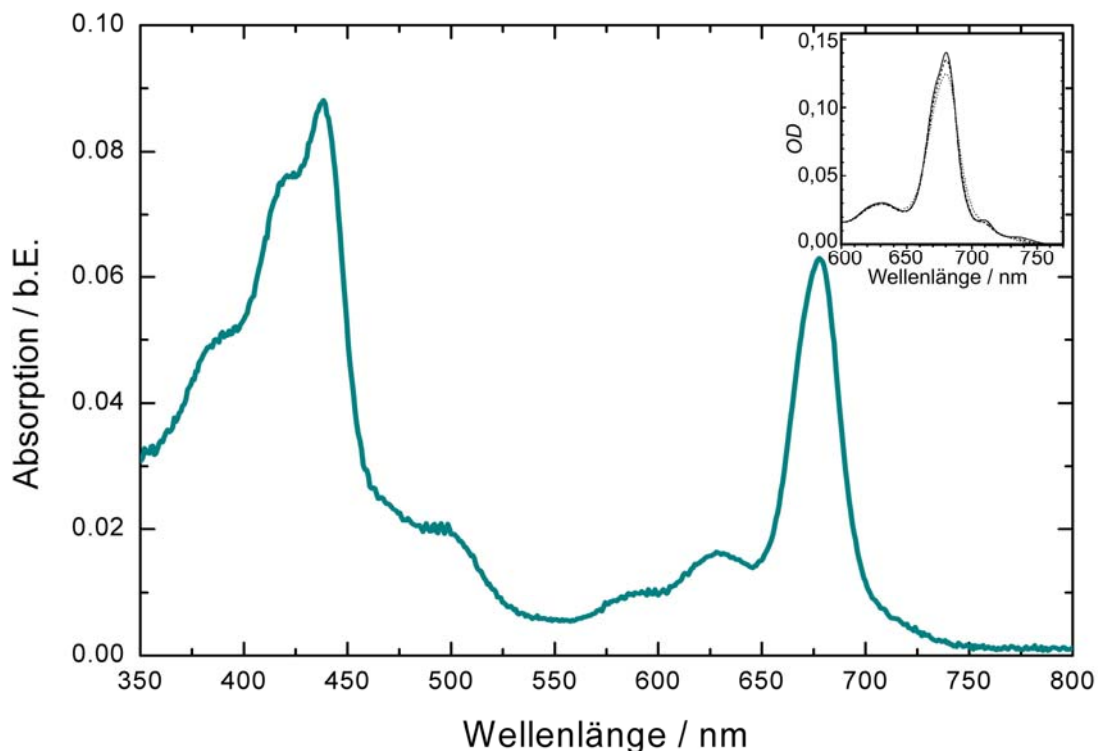


Abb. 9.2 Absorptionsspektrum trimerer PSI-Komplexe aus *A. platensis*, aufgenommen bei Raumtemperatur. Im Inset ist die Absorption der Antennen-Chlorophylle und der roten Chlorophylle für verschiedene Temperaturen gezeigt. Mit abnehmender Temperatur sind die Absorptionsbanden der roten Chlorophyllpools immer deutlicher zu erkennen (durchgezogene Linie) [79].

Das Absorptionsspektrum von PSI stellt eine Überlagerung der optischen Übergänge aller Pigmente des photosynthetischen Komplexes dar. Da der Hauptbestandteil der Pigmente Chlorophyll *a* ist, bestimmen vor allem Chlorophyll *a*-Moleküle das Absorptionsverhalten und somit das Absorptionsspektrum von Photosystem I. Das Absorptionsspektrum von PSI aus *A. platensis* in **Abb. 9.2** zeigt die typischen Merkmale eines Absorptionsspektrums für Chlorophyll *a* mit der SORET-Bande bei 430 nm und den Q-Banden im roten Spektralbereich.

Im Kapitel 3 „Photosystem I - Aufbau und Funktionsweise“ wurde das Absorptionsspektrum von Chlorophyll *a* bereits näher erklärt. Die rötteste Absorptionsbande, die im Absorptionsspektrum von **Abb. 9.2** zu sehen ist, ist die Q_y-Bande der Antennen-Chlorophylle. Das Absorptionsmaximum liegt bei ca. 678 nm. Die Flanke auf der roten Seite dieser Bande erstreckt sich bis ca. 750 nm. Unter dieser Flanke verbergen sich die sehr schwachen Q_y-Banden der roten Chlorophyllpools.

In den folgenden Fluoreszenzemissionsspektren wurden vor allem die Veränderungen der Q_y-Banden der roten Chlorophylle untersucht. Besonderes Augenmerk lag deshalb auf dem Spektralbereich zwischen 680 nm und 780 nm.

9.3.2 Abhängigkeit der Fluoreszenzemission der roten Chlorophylle von der Anregungsleistung

Durch das Absorptionsspektrum wurde nachgewiesen, dass PSI intakt ist. Nach Abkühlen einer Ensemble-Probe von trimeren PSI-Komplexen auf 1,6 K und Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren sollten deshalb die zwei roten Chlorophyllpools des trimeren Photosystem I-Komplexes aus *A. platensis* anhand ihrer Emissionsbanden nachgewiesen werden können.

In den Fluoreszenzemissionsspektren von **Abb. 9.3** sind deutlich die zwei Fluoreszenzemissionsbanden der roten Chlorophyllpools Chl708 und Chl735 bei den Wellenlängen 730 nm und 760 nm zu erkennen. Für das Maximum der Fluoreszenzemissionsbande des Chlorophyllpools Chl708 werden in der Literatur Wellenlängen zwischen 725 nm [10] und 730 nm [6-9] angegeben. Mögliche Ursachen für eine solche Varianz sind in der Isolierungsmethode und im verwendeten Lösungsmittel zu suchen oder auf den Einfrierprozess zurückzuführen.

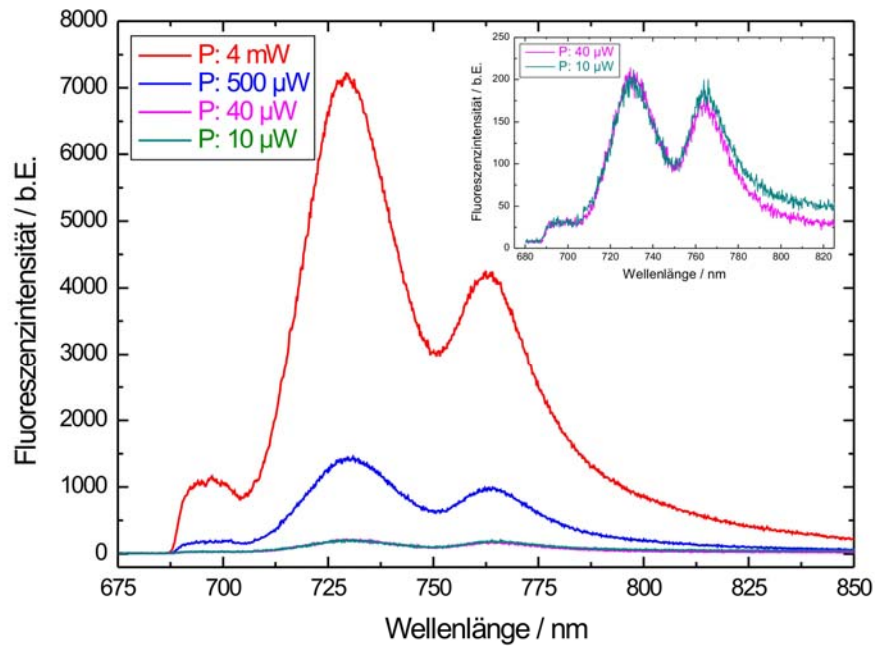


Abb. 9.3 Übersicht der Bulk-Fluoreszenzmissionsspektren trimerer Photosystem I-Komplexe aus *A. platensis*, aufgenommen bei 1,6 K für verschiedene Anregungsleistungen. Im Inset sind der Klarheit wegen die zwei Fluoreszenzmissionsspektren für die niedrigsten Anregungsleistungen gezeigt. Während die Fluoreszenzintensität der zwei Banden bei niedrigen Anregungsleistungen vergleichbar stark ist, ist die Fluoreszenzmissionsbande F760 für hohe Anregungsleistungen im Vergleich zu der Fluoreszenzmissionsbande F725 sehr viel schwächer.

Aus den Fluoreszenzmissionsspektren kann eine unterschiedliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der Emissionsbanden F725 und F760 von der Anregungsleistung beobachtet werden. Zur Analyse der unterschiedlichen Entwicklung der Fluoreszenzintensitäten der zwei Fluoreszenzbanden in Abhängigkeit von der Anregungsleistung wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von F725 und F760 berechnet. Es wurde das Verhältnis der Intensitäten gewählt, da hier die unterschiedliche Abhängigkeit von der Anregungsleistung deutlicher zu sehen ist. **Tab. 9.2** zeigt neben dem Intensitätsverhältnis I_{725}/I_{760} die zur Berechnung des Intensitätsverhältnisses verwendeten Intensitäten von F725 und F760 für unterschiedliche Anregungsleistungen.

Tab. 9.2 Berechnung des Intensitätsverhältnisses der Fluoreszenzbanden F725 und F760 für verschiedene Anregungsleistungen.

Anregungsleistung [mW]	I_{725} [b.E.]	I_{760} [b.E.]	I_{725}/I_{760}
0,01	203	188	1,08
0,04	215	181	1,19
0,5	1431	1004	1,43
4	7117	4195	1,7

In **Abb. 9.4** ist das berechnete Intensitätsverhältnis $F725:F760$ gegen die Anregungsleistung aufgetragen.

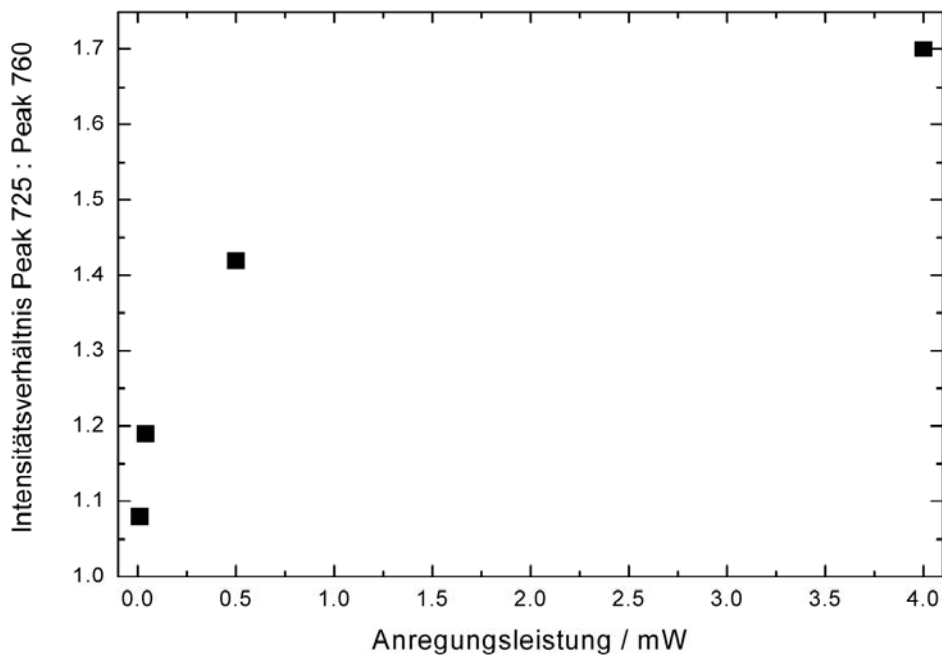


Abb. 9.4 Das Intensitätsverhältnis der Bande F725 zur Bande F760 ist gegen die Anregungsleistung aufgetragen.

Das Verhältnis steigt bei niedrigen Anregungsleistungen steil an. Bei höheren Anregungsleistungen flacht der Anstieg des Verhältnisses ab. Dieser Verlauf kann nur erreicht werden, wenn sich die Fluoreszenzintensitäten der beiden roten Chlorophyllpools in Abhängigkeit der Anregungsleistung unterschiedlich verhalten.

Im Folgenden soll versucht werden, mit Hilfe eines einfachen Modells den qualitativen Verlauf dieser Kurve zu beschreiben. Dazu werden für die zwei Chlorophyllpools Ratengleichungen erstellt.

Eine Ratengleichung beschreibt allgemein die Änderung der Besetzungswahrscheinlichkeit eines Zustandes durch die Summe aller möglichen Be- und Entvölkerungsprozesse dieses Zustandes (sog. Master-Gleichung)

$$\frac{\partial}{\partial t} P_n(t) = \sum_m (k_{mn} P_m(t) - k_{nm} P_n(t)) . \quad (9.1)$$

Die Änderung der Besetzungswahrscheinlichkeit des Zustandes n in Abhängigkeit der Zeit ist gleich der Summe über alle Zustände m , aus denen der Zustand n bevölkert und in die der Zustand n entvölkert wird. Der Übergang zwischen zwei Zuständen ist neben der Besetzungswahrscheinlichkeit durch die Übergangsrate k bestimmt.

Da die Fluoreszenzintensität von der Besetzungswahrscheinlichkeit des emittierenden Zustandes abhängt, ist eine Abschätzung der Fluoreszenzintensität des emittierenden Chlorophyllpools demnach über eine Abschätzung der Besetzungswahrscheinlichkeit des angeregten Zustandes der Chlorophyllpools Chl708 und Chl735 mit Hilfe der zugehörigen Ratengleichungen möglich.

9.3.2.1 Herleitung der Ratengleichung für den Chlorophyllpool Chl708

Die Fluoreszenzintensität des Chlorophyllpools Chl708 ist im Gegensatz zur Fluoreszenzemission des Chlorophyllpools Chl735 unabhängig vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors. Allgemein wird die Fluoreszenzintensität durch die Anregungsleistung, der Sättigungsintensität I_S und der maximalen Fluoreszenzintensität I_∞ entsprechend Gleichung (9.2) beeinflusst [12]. Die Sättigungsintensität und die maximale Fluoreszenzintensität sind Systemparameter, die unter anderem von den Depopulationsraten des ersten angeregten Zustandes bestimmt werden.

$$I_{Fl} = I_\infty \cdot \frac{P_{ex}/I_S}{1 + P_{ex}/I_S} \quad (9.2)$$

Die Fluoreszenzintensität steigt annähernd proportional mit der Anregungsleistung an ($I(F725) \sim P_{ex}$), bis eine Sättigung des angeregten elektronischen Zustands von Chl708 erreicht wird. **Abb. 9.5** zeigt vereinfacht den qualitativen Verlauf der Fluoreszenzintensität F725 in Abhängigkeit von der Anregungsleistung.

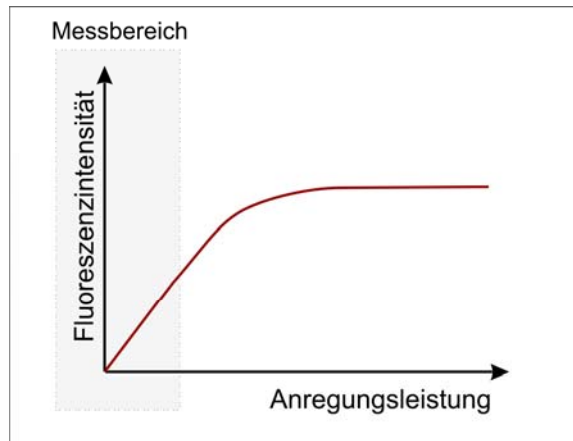


Abb. 9.5 Qualitativer Verlauf der Fluoreszenzintensität F725 in Abhängigkeit von der Anregungsleistung.

Die Messungen wurden für geringe Anregungsleistungen durchgeführt, weshalb man annehmen kann, dass die Messungen im linearen Bereich der Kurve erfolgten. Da die Fluoreszenzintensität allein von der Besetzungswahrscheinlichkeit des ersten angeregten Singulettzustandes abhängt, kann die Fluoreszenzintensität des Chlorophyllpools Chl708 durch die Besetzungswahrscheinlichkeit dieses Zustandes $n_1(\text{Chl708})$ ersetzt werden. Unter den gemachten Annahmen erhält man für den Chlorophyllpool Chl708 eine vereinfachte Ratengleichung gültig für geringe Anregungsleistungen, d.h. für den linearen Bereich in **Abb. 9.5**, entsprechend der Gleichung

$$n_1(\text{Chl708}) = c_1 \cdot P_{ex} \quad (9.3)$$

9.3.2.2 Herleitung der Ratengleichung für den Chlorophyllpool Chl735

Die Fluoreszenzintensität des Chlorophyllpools Chl735 (F760) zeigt neben einer Abhängigkeit von der Anregungsleistung eine Abhängigkeit vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors. Betrachtet man nur die Abhängigkeit von der Anregungsleistung ergibt sich ein vergleichbarer Verlauf wie für F725, linear mit $I(F760) \sim P_{ex}$. Zusätzlich wird die Fluoreszenzintensität von der Wahrscheinlichkeit beeinflusst, P700 als Radikalkation $P700^{+\bullet}$ vorzufinden. F760 sinkt antiproportional mit dem Gehalt an $P700^{+\bullet}$ gemäß $I(F760) \sim 1/n(P700^{+\bullet})$

ab, ebenfalls bis eine Sättigung eintritt und der erste Elektronendonator P700 zu 100% als $P700^{+\bullet}$ vorliegt. Der qualitative Verlauf beider Prozesse ist in **Abb. 9.6** gezeigt.

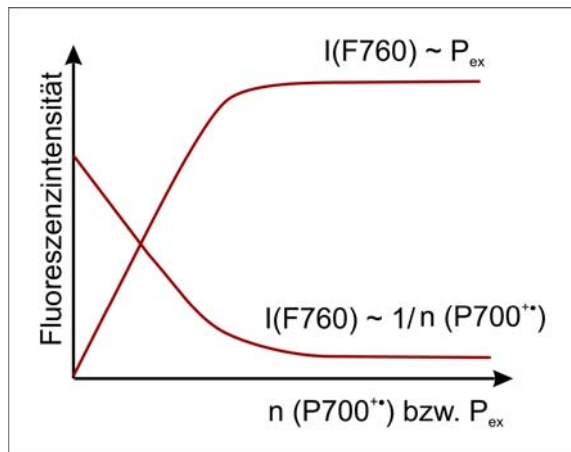


Abb. 9.6 Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität F760 von der Anregungsleistung wie vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors.

Der effektive Verlauf der Fluoreszenzintensität von F760 ergibt sich aus der Summe dieser Prozesse. Sowohl Anregungsleistung als auch die Wahrscheinlichkeit P700 als Radikalkation $P700^{+\bullet}$ vorzufinden, beeinflussen demnach die Besetzungswahrscheinlichkeit des ersten angeregten Singulettzustandes des Chlorophyllpools Chl735 ($n_1Chl735$).

Zur Aufstellung der Ratengleichung müssen alle Prozesse berücksichtigt werden, die zu einer Be- und Entvölkerung dieses Zustandes führen.

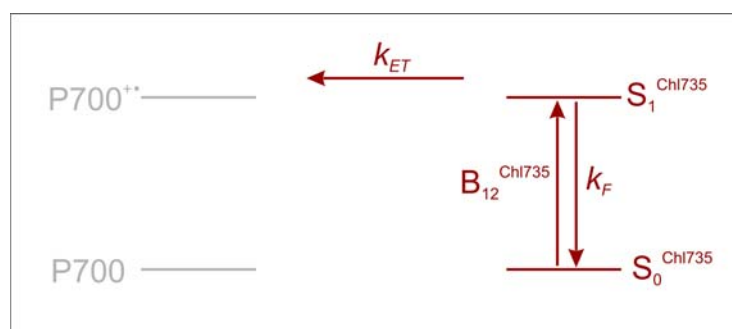


Abb. 9.7 Be- und Entvölkerungsprozesse der elektronischen Singulettzustände S_0 und S_1 von Chl735, gezeigt in rot. Die Bevölkerung des ersten elektronischen Zustandes S_1 erfolgt durch den Übergang von S_0 nach S_1 , bestimmt durch die Absorptionseffizienz $B_{12}(Chl735)$ für den roten Chlorophyllpool Chl735. Durch Fluoreszenzemission und Energietransfer der Anregungsenergie zum oxidierten P700 wird S_1 entvölkert. Die zugehörigen Übergangsraten sind k_F für die Fluoreszenzemission bzw. k_{ET} für den Energietransfer.

Die zeitliche Änderung der Besetzungswahrscheinlichkeit $n_1(\text{Chl735})$ des ersten angeregten Zustandes S_1 von Chl735 ermittelt sich einerseits aus der Entvölkerung von $n_1(\text{Chl735})$ durch die Energieübertragung der Anregungsenergie zum oxidierten Elektronendonator und aus der Fluoreszenzemission, andererseits aus der Bevölkerung von S_1 durch den Übergang aus dem Grundzustand S_0 , charakterisiert durch die Absorptionseffizienz $B_{12}(\text{Chl735})$. Bestimmt werden die Entvölkerungsprozesse durch die Übergangsraten k_F und k_{ET} (**Abb. 9.7**)

Der Einfachheit halber wird im Fall des ersten Elektronendonors P700 bzw. $\text{P700}^{+\bullet}$ ebenso von der Besetzungswahrscheinlichkeit gesprochen.

$$\begin{aligned} \dot{n}_1(\text{Chl735}) = & -k_{ET} \cdot n_1(\text{Chl735}) \cdot n(\text{P700}^+) \\ & + B_{12}(\text{Chl735}) \cdot n_0(\text{Chl735}) \cdot P_{ex} - k_F \cdot n_1(\text{Chl735}) \end{aligned} \quad (9.4)$$

Entsprechendes gilt für die zeitliche Änderung der Besetzungswahrscheinlichkeit $n_0(\text{Chl735})$ des Singulett-Grundzustands. Neben einer Zunahme der Bevölkerung durch die Fluoreszenzemission aus S_1 , erhöht sich die Bevölkerung von S_0 durch die Übertragung der Anregungsenergie des angeregten Zustands S_1 auf den oxidierten Elektronendonator, wodurch der Chlorophyllpool Chl735 aus dem angeregten Zustand S_1 in den Grundzustand S_0 übergeht. Eine Entvölkerung des Grundzustands S_0 erfolgt durch Anregung des Chlorophyllpools.

Für die Besetzung von P700 und $\text{P700}^{+\bullet}$ kann in gleicher Weise wie für den Chlorophyllpool Chl735 verfahren werden. In **Abb. 9.8** wird gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit $n(\text{P700})$, den ersten Elektronendonator als neutrales Molekül vorzufinden, von der Rekombination des Radikalkations $\text{P700}^{+\bullet}$ zu P700 und von der Entvölkerung des neutralen Elektronendonors P700 durch Anregung mit anschließender Ladungstrennung abhängig ist (die Anregung von P700 und Ladungstrennung erfolgen praktisch zeitgleich). Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$\dot{n}(\text{P700}) = +k_{rec} \cdot n(\text{P700}^+) - B_{12}(\text{P700}) \cdot P_{ex} \cdot n(\text{P700}). \quad (9.5)$$

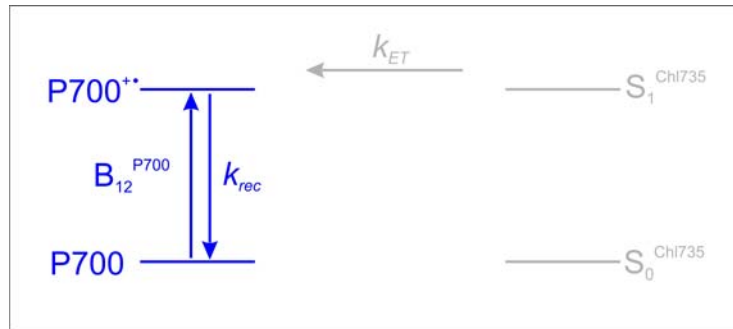


Abb. 9.8 Ladungstrennung des ersten Elektronendonors P700 und Rekombination des Radikalkations $P700^{+\bullet}$, gezeigt in blau. Die Wahrscheinlichkeit einer Ladungstrennung nimmt mit steigender Anregungsleistung zu und wird zusätzlich durch die Absorptionseffizienz des ersten Elektronendonors P700 bestimmt. Sobald P700 angeregt ist, erfolgt die Ladungstrennung quasi instantan, so dass die Anregung von P700 und die nachfolgende Ladungstrennung als ein Schritt zusammengefasst werden kann, der durch $B_{12}(P700)$ charakterisiert wird. Die Rekombination vom Radikalkation $P700^{+\bullet}$ zum neutralen P700 wird durch die Rekombinationsrate k_{rec} charakterisiert.

Im Gegensatz zum neutralen ersten Elektronendonor P700 wird das Radikalkation $P700^{+\bullet}$ durch Rekombination entvölkert und durch die Anregung bzw. Ladungstrennung von P700 bevölkert.

Zwischen den Bevölkerungs- und den Entvölkerungsraten besteht ein dynamisches Gleichgewicht, so dass sich die Besetzungswahrscheinlichkeiten der elektronischen Zustände bzw. für P700 und $P700^{+\bullet}$ zeitlich nicht ändern. Die Ratengleichungen (9.4) und (9.5) können deshalb gleich Null gesetzt werden.

Da sich der Chlorophyllpool Chl735 bzw. der erste Elektronendonor P700 entweder im Grundzustand oder im ersten angeregten Zustand befinden bzw. als neutrales Dimer oder als Radikalkation vorliegen müssen, ergeben sich zusätzlich folgende Zusammenhänge:

$$n_0(\text{Chl735}) + n_1(\text{Chl735}) = 1, \quad (9.6)$$

$$n(\text{P700}) + n(\text{P700}^{+\bullet}) = 1. \quad (9.7)$$

Mit Hilfe der Gleichungen (9.4) bis (9.7) lässt sich die Besetzungswahrscheinlichkeit $n_1(\text{Chl735})$ zu

$$n_1(\text{Chl735}) = \frac{B_{12}(\text{Chl735})}{\frac{k_{ET} \cdot B_{12}(\text{Chl735})}{P_{ex} \cdot B_{12}(\text{P700}) + k_{rec}} + B_{12}(\text{Chl735}) + \frac{k_F}{P_{ex}}} \quad (9.8)$$

berechnen. Die Parameter der Gleichung (9.8) und ihre Bedeutung sind in nachfolgender Tabelle (Tab. 9.3) zusammengefasst:

Tab. 9.3 Zusammenstellung der Parameter, die in der Ratengleichung des Chlorophyllpools Chl735 verwendet wurden, und ihre Bedeutung.

$n_1(\text{Chl735})$	Besetzungswahrscheinlichkeit des ersten angeregten elektronischen Zustandes von Chl735
$B_{12}(\text{Chl735})$	Anregungseffizienz des Chlorophyllpools Chl735, die den Übergang aus dem Singulett-Grundzustand in den angeregten Zustand beschreibt
k_{ET}	Übergangsrate der Anregungsenergie vom angeregten Chlorophyllpool Chl735 auf das Radikalkation P700 ⁺
$B_{12}(\text{P700})$	Anregungseffizienz des ersten Elektronendonors P700, die den Übergang vom neutralen Elektronendonator P700 zum oxidierten Radikalkation P700 ⁺ beschreibt
k_{rec}	Rekombinationsrate zwischen dem oxidierten Elektronendonator P700 ⁺ und dem neutralen Elektronendonator P700
k_F	Fluoreszenzrate vom angeregten Zustand des Chlorophyllpools Chl735 zum Grundzustand über Fluoreszenzemission
P_{ex}	Anregungsleistung

9.3.2.3 Qualitative Analyse des Intensitätsverhältnisses $I(F725):I(F760)$

Da die Fluoreszenzintensität des Chlorophyllpools Chl735 proportional zu der Besetzungswahrscheinlichkeit des angeregten ersten Singulettzustandes des Chlorophyllpools $n_1(\text{Chl735})$ ist, gilt für das Intensitätsverhältnis zwischen F725 und F760 unter Berücksichtigung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Besetzungswahrscheinlichkeit des ersten angeregten Singulettzustands für Chl708

$$\frac{I(F725)}{I(F760)} = \frac{c_2 \cdot n_1(\text{Chl708})}{c_3 \cdot n_1(\text{Chl735})}, \quad (9.9)$$

und damit folgende Funktion:

$$\frac{I(F725)}{I(F760)} = \frac{P_{ex} \cdot C}{\frac{B_{12}(Chl735)}{\frac{k_{ET} \cdot B_{12}(P700)}{P_{ex} \cdot B_{12}(P700) + k_{rec}} + B_{12}(Chl735) + \frac{k_F}{P_{ex}}}} \quad (9.10)$$

Die Messwerte für das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzbanden der roten Chlorophyllpools sollten auf der Grundlage der Ratengleichungen unter Berücksichtigung der Literaturwerte für die Rekombinationsrate k_{rec} , für die Energietransferrate zwischen dem angeregten Zustand von Chl735 und dem oxidierten ersten Elektronendonator k_{ET} und für die Fluoreszenzrate k_F des Chlorophyllpools Chl735 qualitativ wiedergegeben werden können.

Für k_{ET} wurde ein Wert von $4 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ (25 ps)⁻¹ angenommen. Dieser Wert ergibt sich für Berechnungen der Energietransferrate nach FÖRSTER [36,126] zwischen dem Chlorophyllpool Chl735 und dem Radikalkation P700^{+•} für T = 77 K [9].

Die Literaturwerte für die Fluoreszenzrate variieren stark mit den äußeren Bedingungen wie Lösungsmittel, Temperatur oder Anregungsleistung bzw. mit der lokalen Umgebung der Chlorophylle oder des Chlorophyllpools. Während Chlorophyll *a* in Photosystem I eine Fluoreszenzrate von ca. $0,6 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ ($1,5 \text{ ns}$)⁻¹ besitzt [77], zeigen die roten Chlorophyllpools in trimeren PSI-Komplexen aus *A. platensis* eine Fluoreszenzrate von $1,25 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ ($0,8 \text{ ns}$)⁻¹ für F760 und $3,3 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ ($0,3 \text{ ns}$)⁻¹ für F725 bei 77 K [9]. KARUKSTIS sagt, dass allgemein die Fluoreszenz-Lebensdauer von Chlorophyll *a* in Lösung bei ca. 7 ns liegt, für Chlorophyll-Moleküle in photosynthetischen Systemen aber bis zu 0,2 ns absinken kann [114].

Nach KARAPETYAN [10] ist die Energietransferrate k_{ET} 15mal größer als die Fluoreszenzrate $k_{ET} = 15 \cdot k_F$. Mit dem entsprechenden Wert für $k_{ET} = 4 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ (25 ps)⁻¹ erhält man dann für k_F einen Wert von $2,5 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ ($0,4 \text{ ns}$)⁻¹, was im Rahmen der Literaturwerte liegt. Dieser Wert wurde in Gleichung (9.10) verwendet. Die Energieübertragungsrate k_{ET} zwischen Chl735 und P700^{+•} ist somit um ca. eine Größenordnung größer als die Fluoreszenzrate k_F des Chlorophyllpools Chl735. Dadurch wird ein Quenchen der Fluoreszenz von F760 in Anwesenheit von P700^{+•} erst in diesem Ausmaß möglich.

Die Rekombinationsrate k_{rec} wurde von GOLBECK für tiefe Temperaturen experimentell ermittelt. Sie hat einen Wert von $8,3 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (120 ns)⁻¹ [127].

Unter Berücksichtigung dieser Literaturwerte ist mit Gleichung (9.10) eine qualitative Beschreibung des Intensitätsverhältnisses entsprechend **Abb. 9.9** möglich. Nach dem Verlauf

der Kurve befinden sich die Photosystem I-Komplexe für die angelegten Anregungsleistungen noch nicht in einem Sättigungszustand, der an einem konstanten Wert für das Intensitätsverhältnis zu erkennen wäre.

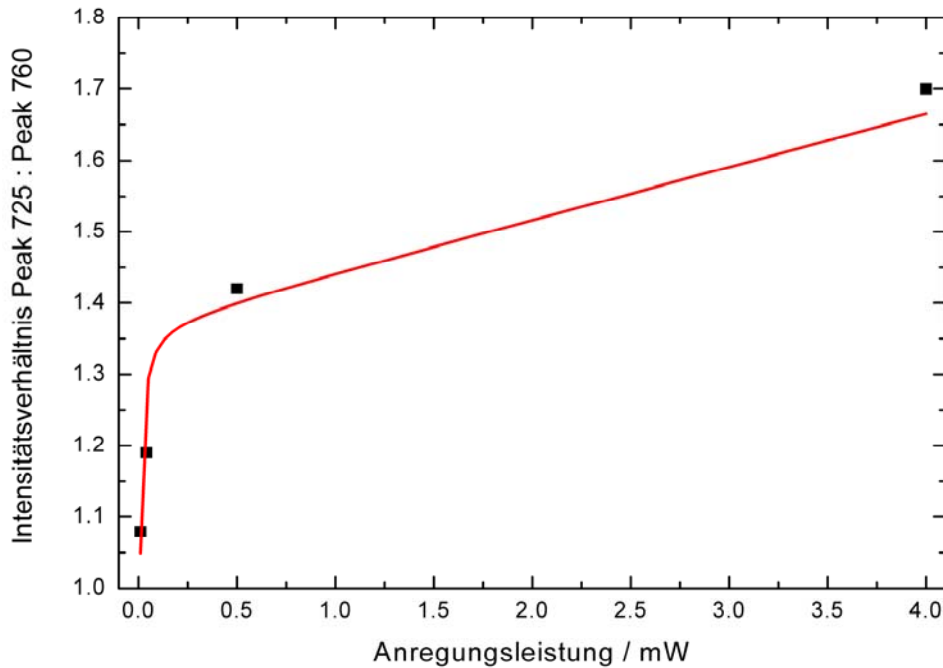


Abb. 9.9 Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses $I(F725):I(F760)$ von der Anregungsleistung. Die Messdaten (schwarze Punkte) können mit der Gleichung (9.10) gefittet werden. Unter Berücksichtigung der Literaturwerte für die Übergangsraten k_{rec} , k_{ET} und k_F erhält man die rote Fitkurve. Als Fitparameter wurden die Absorptionseffizienz $B_{12}(P700)$ für P700 und $B_{12}(Chl735)$ für den roten Chlorophyllpool verwendet.

Mit den gemachten Annahmen konnte somit gezeigt werden, dass die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der roten Chlorophyllpools von der Anregungsleistung qualitativ durch ein vereinfachtes Modell, basierend auf den Ratengleichungen der beteiligten Moleküle und deren elektronischen Zuständen beschrieben werden kann (**Abb. 9.9**). Grundlage hierfür ist der unterschiedliche Verlauf der Fluoreszenzintensitäten F725 und F760 der Chlorophyllpools Chl708 bzw. Chl735 in Abhängigkeit der Anregungsleistung, der sich wie folgt konstruieren lässt:

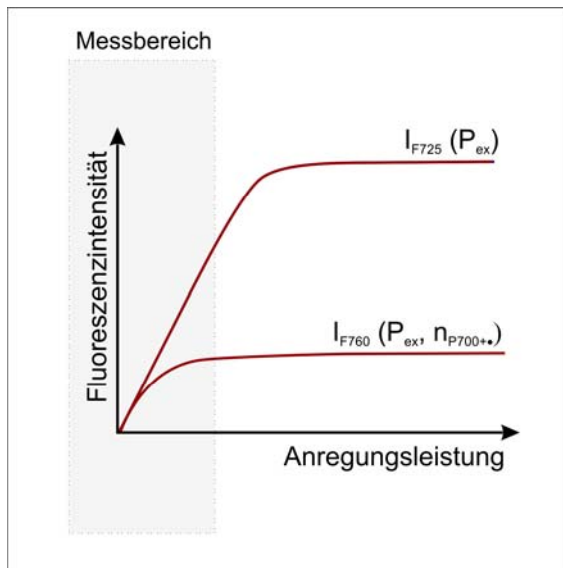


Abb. 9.10 Qualitativer Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von F725 und F760 in Abhängigkeit der Anregungsleistung.

Die Fluoreszenzintensität beider Fluoreszenzemissionsbanden steigt für kleine Anregungsleistungen linear mit der Anregungsleistung an. Die Fluoreszenzintensität des Chlorophyllpools Chl735 erreicht aber im Gegensatz zu der Fluoreszenzintensität des Chlorophyllpools Chl708 bei sehr viel kleineren Anregungsleistungen eine Sättigung. Durch die zusätzliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Chlorophyllpools Chl735 vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors, der unter den für diese Messungen typische Anrengungsbedingungen bereits größtenteils oxidiert vorliegt, sollte das Intensitätsverhältnis bereits bei geringen Anregungsleistungen stark ansteigen. Dieser Verlauf konnte experimentell nachgewiesen werden und wurde in **Abb. 9.4** dargestellt und in **Abb. 9.9** gefittet. Bei ansteigenden Anregungsleistungen geht das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzemissionsbanden allmählich in einen Sättigungsverlauf über, bis letztendlich ein konstanter Wert erreicht wird. Die Messungen zeigen, dass der konstante Wert noch nicht erreicht ist, da das Verhältnis immer noch ansteigt.

Abweichungen der Fitkurve von den Messdaten (**Abb. 9.9**) können sowohl durch Ungenauigkeiten innerhalb der Messserie herrühren, als auch durch die verwendeten Literaturwerte verursacht werden, die wie erwähnt, stark von den äußeren Bedingungen abhängig sind. Eine weitere Fehlerquelle ist die Beschränkung des Modells auf die direkt an der Besetzung beteiligten Prozesse. Außer Acht gelassen wurden Prozesse wie die Energieequilibrierung, die Weiterleitung der Energie zu Chl735 bzw. P700 und die dazugehörigen Anregungsprozesse, strahlungslose Prozesse oder sonstige Quenchprozesse.

9.3.3 Fluoreszenzemissionsspektren einzelner trimerer Photosystem I-Komplexe aus *Arthrospira platensis*

Die roten Chlorophyllpools können bei tiefen Temperaturen nachgewiesen werden, indem die Fluoreszenz dieser Chlorophylle detektiert wird. Während bei Raumtemperatur sowohl Antennen-Chlorophylle als auch die roten Chlorophylle die Anregungsenergie zum Reaktionszentrum weiterleiten, ist eine Energieübertragung bei tiefen Temperaturen zwischen P700 und den roten Chlorophyllen nicht mehr möglich. Der Energieunterschied zwischen P700 und den roten Chlorophyllen ist sehr klein und liegt bei Raumtemperatur innerhalb $k_B T$, wodurch die Anregungsenergie mit großer Wahrscheinlichkeit von den roten Chlorophyllpools auf den ersten Elektronendonator übertragen wird. Daraus ergibt sich bei Raumtemperatur eine geringe Fluoreszenzquantenausbeute der roten Chlorophylle. Die Fluoreszenzquantenausbeute der roten Chlorophyllpools wird durch die Erniedrigung der Temperatur stark erhöht, da eine Energieübertragung zum ersten Elektronendonator aufgrund des Energieunterschiedes von $k_B T$ und somit der geringen Besetzungswahrscheinlichkeit der Schwingungsmoden nicht mehr möglich ist. Eine Abregung der angeregten roten Chlorophylle erfolgt entweder durch Fluoreszenzemission oder durch einen strahlungslosen Übergang.

9.3.3.1 Fluoreszenzemissionsspektren vorreduzierter und voroxidierter trimerer Photosystem I-Komplexe

Wie bereits erwähnt, ist die Fluoreszenzintensität des roten Chlorophyllpools Chl735 aus *A. platensis* vom Redoxzustand des ersten Elektronendonors P700 abhängig. Durch Vorreduktion bzw. Voroxidation der Photosystem I-Komplexe sollte ein definierter Reaktionszustand (offenes/geschlossenes Reaktionszentrum) des Reaktionszentrums eingestellt und damit die Fluoreszenzintensität des Chlorophyllpools Chl735 kontrolliert werden.

Unter Lichteinstrahlung bestimmter Wellenlängen, kann die Antenne Licht absorbieren. Die Anregungsenergie wird von der Antenne zum Reaktionszentrum weitergeleitet, wo eine Ladungstrennung stattfindet und der erste Elektronendonator als Radikalkation $P700^{+\bullet}$ vorliegt. Das Elektron wird in isolierten Photosystem I-Komplexen entlang der verschiedenen Elektronenakzeptoren bis zum terminalen Eisen-Schwefel-Cluster weitergeleitet, von wo es bei Raumtemperatur zum Radikalkation $P700^{+\bullet}$ rekombinieren kann. Ist P700 reduziert, kann nach einer weiteren Anregung erneut eine Ladungstrennung stattfinden. Bei tiefen Temperaturen hingegen ist das Elektron irreversibel an den terminalen Eisen-Schwefel-Cluster gebunden. Der erste Elektronendonator liegt dann permanent als Radikalkation $P700^{+\bullet}$ vor. Aus

diesem Grund sollte die Fluoreszenzemission des Chlorophyllpools Chl735 im Vergleich zu einer Probe mit neutralem P700 stark gequenchet sein.

Durch Vorreduktion von PSI werden dem System von außen Elektronen zugeführt und die terminalen Eisen-Schwefel-Cluster liegen reduziert vor. Bei einer nachfolgenden Ladungstrennung ist eine permanente Bindung des Elektrons an die FeS-Cluster nicht mehr möglich und fällt auf $P700^{+\bullet}$ zurück. Das Elektron kann sich in einem zyklischen Kreislauf zwischen dem ersten Elektronendonator und einem Teil der Elektronenakzeptoren der Elektronentransferkette aufhalten. Je nach Reduktionsbedingungen können mehrere Elektronenakzeptoren des Photosystem I-Komplexes reduziert werden. Von reduziertem PSI spricht man definitionsgemäß, wenn P700 im Dunkeln als neutrales Dimer vorliegt. Nach Lichteinstrahlung erfolgt eine Ladungstrennung und das Elektron kann sich wieder innerhalb der Elektronentransferkette bewegen.

Durch eine Voroxidation von Photosystem I hingegen wird der Elektronentransferkette ein Elektron entzogen. Da keine Möglichkeit einer Rekombination oder eines Elektronentransfers zum ersten Elektronendonator im Falle eines isolierten PSI besteht, verbleibt der erste Elektronendonator vor allem in der oxidierten Form als Radikalkation $P700^{+\bullet}$ und das Reaktionszentrum ist geschlossen. **Abb. 9.11** zeigt zwei Fluoreszenzemissionsspektren für eine vorreduzierte PSI-Probe (A) bzw. für eine voroxidierte PSI-Probe (B).

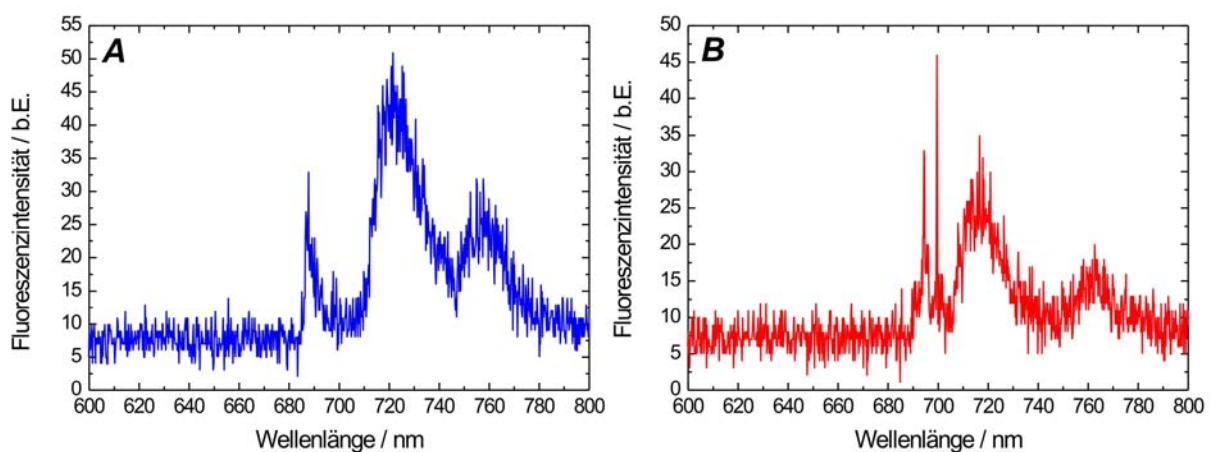


Abb. 9.11 Fluoreszenzemissionsspektren einzelner Photosystem I-Komplexe, aufgenommen bei 1,6 K.. Während in (A) das Fluoreszenzemissionsspektrum einer vorreduzierten PSI-Probe zu sehen ist, zeigt (B) das Fluoreszenzemissionsspektrum einer voroxidierten PSI-Probe.

Trotz unterschiedlicher chemischer Vorbehandlung ist in den Fluoreszenzemissionsspektren, aufgenommen bei 1,6 K, keine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des rötlichsten Chloro-

phyllpools von der chemischen Vorbehandlung zu sehen. Nach SHUBIN [6] sollte durch die Vorreduktion von PSI der erste Elektronendonator P700 größtenteils als neutrales Dimer vorliegen und die Bande bei 760 nm im Vergleich zu der 725 nm Bande sehr viel intensiver sein. Nach Voroxidation der PSI-Probe sollte jedoch der erste Elektronendonator als Radikalkation $P700^{+\bullet}$ vorliegen und demnach die Fluoreszenzintensität von Chl735 im Vergleich zu F725 durch einen Energietransfer der Anregungsenergie vom röttesten Chlorophyllpool zu $P700^{+\bullet}$ stark absinken. Die Fluoreszenzintensität des Chlorophyllpools Chl708 sollte unbeeinflusst vom Funktionszustand des Reaktionszentrums bleiben.

Da mit dieser Messmethode die Fluoreszenzemissionsspektren keine Unterschiede zwischen der vorreduzierten und der voroxidierten PSI-Probe zeigen, ist anzunehmen, dass die hier zur Durchführung der Einzelmolekülspektroskopie notwendigen Bedingungen, den Redoxzustand des ersten Elektronendonors beeinflussen. Unter Annahme, dass die Fluoreszenzemission des röttesten Chlorophyllpools Chl735 vom Redoxzustand des Reaktionszentrums abhängt, kann deshalb geschlussfolgert werden, dass bei solchen starken Anregungsleistungen, wie sie bei dieser Untersuchungsmethode verwendet werden müssen, Photosystem I im Mittel überwiegend im oxidierten Zustand mit P700 als $P700^{+\bullet}$ vorliegt, unabhängig davon, ob PSI einer Vorreduktion oder einer Voroxidation unterzogen wurde. Unter diesen Versuchsbedingungen kann deshalb ein Einfluss des Reaktionszentrums auf die Fluoreszenzemission des roten Chlorophyllpools Chl735 ausgeschlossen werden. Eventuell auftretende Intensitätsfluktuationen des roten Chlorophyllpools haben folglich ihre Ursachen in anderen Mechanismen, die in diesem Kapitel näher untersucht werden.

9.3.3.2 Analyse von Fluoreszenzeinzelmolekülspektren trimerer Photosystem I-Komplexe

Die Fluoreszenzemissionsspektren einzelner Photosystem I-Komplexe sehen selbst bei gleicher Probenpräparation und gleichen Versuchsbedingungen sehr unterschiedlich aus (Abb. 9.12). Die Fluoreszenzemissionsspektren einzelner trimerer Photosystem I-Komplexe zeigen eine unterschiedliche Anzahl von Fluoreszenzbanden; zusätzlich variieren die Fluoreszenzbanden in den Spektren in Position, Linienbreite und Linienform.

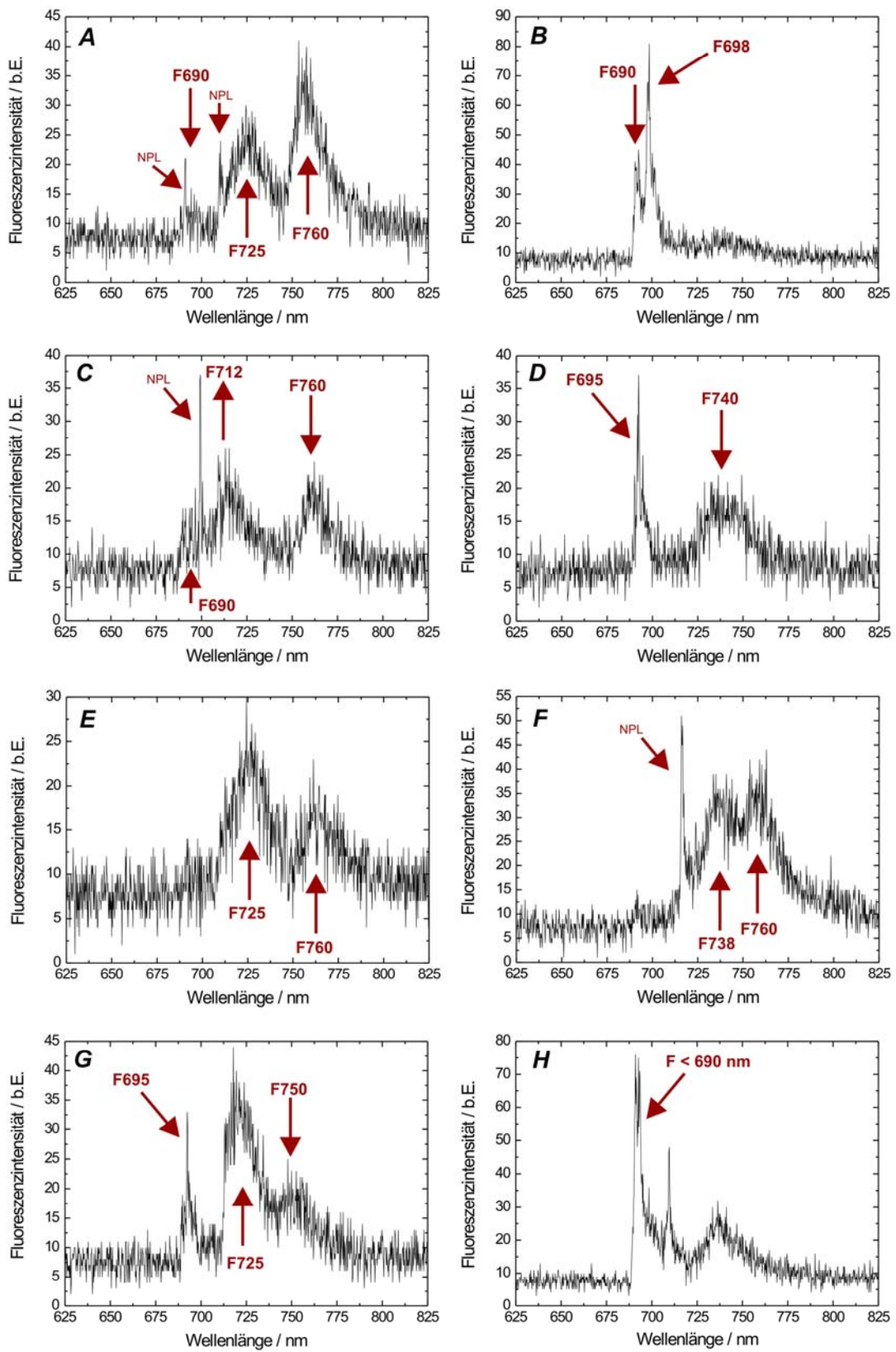


Abb. 9.12 Auswahl an Fluoreszenzemissionsspektren einzelner trimerer PSI-Komplexe mit identischer Vorbehandlung. Die Pfeile weisen auf die wichtigsten Banden im Spektrum hin.

Anzahl an Banden

Die Anzahl der Fluoreszenzemissionsbanden variiert zwischen zwei und drei breiten Banden. Zeigt ein Spektrum drei Banden, liegen die Fluoreszenzmaxima bei Wellenlängen zwischen 690-700 nm, 710-730 nm und 740-760 nm. Die Anzahl der Banden hängt sowohl von der Beleuchtungsdauer der einzelnen Komplexe, als auch von der energetischen Kopplung der einzelnen Pools zum Reaktionszentrum ab. Während in **Abb. 9.12A** drei Banden bei 690 nm, 725 nm und 760 nm zu sehen sind, sind in **Abb. 9.12B** die Fluoreszenzemissionsbanden bei 725 nm und 760 nm ausgebleicht. Da einige Chlorophyllpools photosensitiver sind als andere, bleichen diese durch eine hohe Anregungsleistung oder bei kontinuierlicher Bestrahlung sehr schnell aus, was sich im Spektrum durch das Fehlen von Banden bemerkbar macht. Auch durch Kopplung eines Chlorophyllpools mit dem Reaktionszentrum oder mit anderen Chlorophyllpool kann ein Chlorophyllpool keine Fluoreszenz emittieren. Durch die Kopplung zwischen Chlorophyllpool und Reaktionszentrum bzw. zwischen Chlorophyllpool und einem weiteren Chlorophyllpool wird die Anregungsenergie von diesem besagten Chlorophyllpool zum Reaktionszentrum bzw. zu einem anderen Chlorophyllpool weitergeleitet, wodurch keine Abstrahlung der Anregungsenergie mehr erfolgen kann. Dies ist vor allem bei einem Chlorophyllpool zu beobachten, der bei kürzeren Wellenlängen als P700 emittiert. Neben den roten Chlorophyllpools Chl708 und Chl735, die bei größeren Wellenlängen als 700 nm absorbieren bzw. emittieren, ist in einem Teil der Spektren eine weitere Bande mit einem Fluoreszenzmaximum von ca. 690 nm zu sehen (**Abb. 9.12C** und **Abb. 9.12D**). Diese Bande wird wahrscheinlich von Chlorophyllen erzeugt, die dem Verbund der Antennen-Chlorophylle nicht mehr direkt angehören und energetisch ungekoppelt in PSI vorliegen. Dadurch kann ein Energietransfer sowohl zu den roten Chlorophyllen als auch zum Reaktionszentrum nicht mehr erfolgen; die Anregungsenergie wird als Fluoreszenz emittiert.

Linienbreite

Die Bande bei ca. 690 nm ist im Vergleich zu den Fluoreszenzemissionsbanden der roten Chlorophyllpools sehr viel schmaler. Eine schmale Bande ist ein Indiz dafür, dass die Fluoreszenz von einem einzelnen Chlorophyll-Molekül und nicht von einer exzitonisch gekoppelten Chlorophyllgruppe stammt. Verglichen mit Molekülgruppen bleiben die Kernkoordinaten eines einzelnen Moleküls bei einer elektronischen Anregung aus dem Grundzustand S_0 in den ersten angeregten Singulettzustand S_1 fast unverändert.

Im Gegensatz dazu besitzen die Fluoreszenzemissionsbanden der roten Chlorophyllpools Chl708 und Chl735 sehr viel größere Linienbreiten. Man geht davon aus, dass die roten Chlorophyllpools durch die Zusammenlagerung mehrerer Chlorophyll-Moleküle entstehen, die so dicht zusammen liegen, dass sie energetisch koppeln und ein neues Quantensystem ausbilden. Nach optischer Anregung dieser Chlorophyllpools entstehen Exzitonen mit Ladungstransfercharakter. Dieser Umstand erklärt die extreme Rotverschiebung der Absorption bzw. der Fluoreszenz im Vergleich zu isoliertem Chlorophyll *a* in Lösung ($\lambda_{abs} = 662 \text{ nm}$ [45]) oder den Antennen-Chlorophyllen ($\lambda_{abs} = 660\text{-}690 \text{ nm}$ [6,64,84,128]). Der elektronische Anregungszustand des Chlorophyllpools hat durch den Ladungstransfercharakter viel größere Bindungszustände und die Kernabstände im Molekül können nicht mehr als konstant angesehen werden. Eine elektronische Anregung in höhere vibronische Zustände ist deshalb möglich. Durch interne Konversion geht das System in den tiefsten Schwingungszustand des ersten angeregten Singulettzustands über, von wo es unter Beibehaltung der Kernkoordinaten in den Grundzustand wechselt. Durch diese Besetzung der vibronischen Übergänge verbreitert sich die Fluoreszenzemissionsbande der roten Chlorophyllpools.

Linienposition

Vergleicht man die Spektren einzelner PSI-Komplexe aus *A. platensis*, kann man eine Verteilung der Fluoreszenzmaxima der einzelnen Banden erkennen. Die Ursache für diese Heterogenität der Emissionsmaxima kann unter anderem auf das Abkühlen der Probe zurückgeführt werden. Durch den Einfrierprozess kann sich die Umgebung bzw. die Proteinmatrix, in der das Pigment eingebettet ist, in der Art und Weise verändert haben, dass die photophysikalischen Eigenschaften der Chlorophylle beeinflusst werden. Die räumlichen Veränderungen könnten auch die Ursache dafür sein, dass in einem kleinen Anteil der Spektren, die 690 nm-Bande nicht mehr zu sehen ist (**Abb. 9.12E**). Durch die Veränderung des Proteingerüsts könnte sich die räumliche Orientierung der Chlorophylle so verändern, dass eine Kopplung des Chlorophylls der 690 nm-Bande zu benachbarten Chlorophyllen entsteht. Das Chlorophyll der 690 nm-Bande emittiert dann die Anregungsenergie nicht als Fluoreszenz, sondern leitet die Energie an die Antennen-Chlorophylle bzw. an das Reaktionszentrum weiter.

Aber nicht nur Spektren unterschiedlicher PSI-Komplexe, sondern auch mehrere Spektren eines einzelnen PSI-Komplexes zeigen verschiedene Fluoreszenzmaxima, die bis zu $\pm 10 \text{ nm}$ variieren können. Grund hierfür ist die spektrale Diffusion, die vor allem in der Einzel-

molekülspektroskopie in Erscheinung tritt. Induziert werden spektrale Sprünge durch die kontinuierliche Beleuchtung des Komplexes und die damit verbundene Energiezufuhr, die strukturelle Veränderungen des Protein-Pigment-Komplexes und dessen Umgebung zur Folge haben kann. Wegen der Mittelungszeit der Spektren (ca. 10 s) macht sich die spektrale Diffusion innerhalb eines Spektrums durch eine Verbreiterung der Banden bemerkbar. Aufgrund der geringen Fluoreszenzquantenausbeute der Photosystem I-Komplexe selbst bei tiefen Temperaturen, müssen die Fluoreszenzemissionsspektren der Photosystem I-Komplexe über eine gewisse Zeitdauer akkumuliert werden. In diesem Zeitraum können bis zu 10^{10} optische Übergänge erfolgen. Die wirkliche Anzahl an Übergängen ergibt sich aus der Fluoreszenzintensität dividiert mit der Detektionseffizienz des Aufbaus von 10^{-2} .

Die zeitliche Mittelung kann näherungsweise aufgrund der strukturellen Veränderungen, die ein PSI-Komplex während der Messung erfährt, durch einen Ensemblemittelwert beschrieben werden (Ergodenhypothese). Die Fluoreszenzemissionsspektren der einzelnen Photosystem I-Komplexe entsprechen dann aufgrund der induzierten Konformationsänderungen annähernd dem Spektrum eines ergodischen Systems. Für die roten Chlorophyllpools liegt diese inhomogene Linienverbreiterung zwischen $200\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ [4,75,79,84]. Durch eine geringere Akkumulierungszeit wäre es möglich, die Dynamik der spektralen Sprünge aufzulösen. Dies würde aber aufgrund eines schlechteren Signal-Rausch-Verhältnisses, auf Kosten der spektralen Auflösung geschehen. Eine genaue Aussage über Position und Linienbreite ist dann nicht mehr möglich.

Teilweise zeigen die Einzelmolekülspektren der Photosystem I-Komplexe für die roten Chlorophyllpools schmale Banden, die einer breiten Bande vorausgehen (**Abb. 9.12F**) oder dieser aufgesetzt (**Abb. 9.12A**) sind. Die schmale Bande ist die Nullphononenlinie (NPL), die breite Bande die Phononenseitenbande (PSB) eines elektronischen Übergangs zwischen S_0 und S_1 . Bei manchen Banden liegt die NPL direkt vor der PSB, wodurch die Bande asymmetrisch wird, mit einem steilen Anstieg auf der blauen Kante der Bande und einem flachen Abstieg an der roten Flanke der Bande (**Abb. 9.12G**, F725). Durch die NPL und die PSB erhalten die Fluoreszenzemissionsbanden eine starke Strukturierung, was die Zuordnung der Banden zu bestimmten Chlorophyllpools zusätzlich erschwert. Aufgrund der komplexen Struktur des Photosystem I-Komplexes ist die NPL, d.h. der reine 0,0-Übergang des emittierenden Chlorophyllpools nicht immer zu sehen. Durch die Messung bei tiefen Temperaturen besteht die Möglichkeit, die NPL zu sehen. Bei Raumtemperatur-Messungen würde

sie von der PSB verdeckt werden. Die Nullphononenlinie und die Phononenseitenbande sind typische Merkmale der Spektren einzelner Moleküle [91].

Abb. 9.12H zeigt ein Beispiel für einen Photosystem I-Komplex, der teilweise zerstört vorliegt. Neben den Fluoreszenzbanden der roten Chlorophyllpools erkennt man eine sehr intensive Bande bei ca. 690 nm, mit einer scharfen Kante auf der blauen Flanke. Im Vergleich zu der Bande, die man in einem Teil der Spektren bei dieser Wellenlänge detektieren kann, ist diese Bande sehr viel intensiver, ebenso im Vergleich zu den Banden der roten Chlorophyllpools. Diese Bande kann den Antennen-Chlorophyllen zugeordnet werden. Bei tiefen Temperaturen sind die Antennen-Chlorophylle nicht in der Lage zu fluoreszieren, da die gesamte Anregungsenergie entweder auf das Reaktionszentrum oder auf die roten Chlorophylle übertragen wird. Durch die Zerstörung des Protein-Pigment-Komplexes und somit des Antennensystem kann die Anregungsenergie die energetischen Fallen nicht mehr erreichen und geben die Energie als Fluoreszenz ab. Diese Photosystem I-Komplexe wurden bei den verschiedenen Untersuchungen nicht berücksichtigt.

9.3.4 Summation der Einzelmolekülspektren zum Nachweis intakter einzelner Photosystem I-Komplexe

Auch wenn die Spektren einzelner Photosystem I-Komplexe sehr unterschiedlich aussehen, sollte bei intakten PSI-Komplexen die Summe der Einzelmolekülspektren das Spektrum einer Ensemble-Messung ergeben. Ist dies der Fall, dann kann man davon ausgehen, dass die einzelnen Photosystem I-Komplexe überwiegend intakt sind.

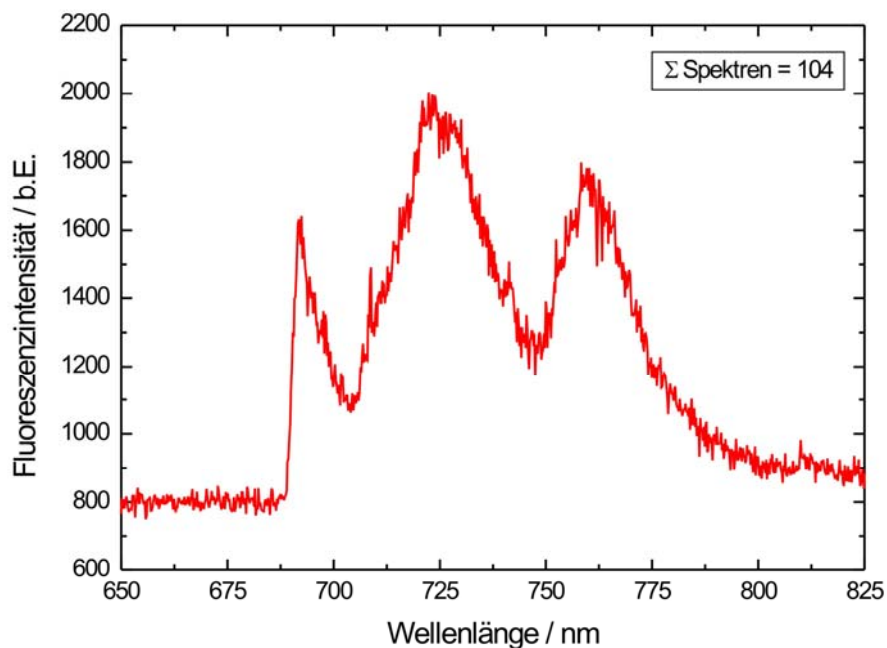


Abb. 9.13 Summe von insgesamt 104 Fluoreszenzemissionsspektren einzelner vorreduzierter PSI-Komplexe. In dem Bulk-Spektrum kann man wie in den Einzelmolekülspektren alle drei beschriebenen Banden bei ca. 690 nm, 725 nm und 760 nm erkennen.

Im aufsummierten Bulk-Spektrum von **Abb. 9.13** sind die Fluoreszenzemissionsbanden bei 690 nm, 725 nm und 760 nm zu erkennen, wobei die Banden der roten Chlorophyllpools sehr viel intensiver sind als die 690 nm Bande. Man kann deshalb davon ausgehen, dass die untersuchten PSI-Komplexe während der Messung größtenteils intakt waren.

9.3.5 Zeitliche Untersuchung des Ausbleichverhaltens von einzelnen trimeren Photosystem I-Komplexen

Im Laufe einer Messung, die bis zu 5 min andauern kann, kann die Intensität der Fluoreszenz-emissionsbanden variieren. In der Regel nimmt die Intensität der Banden ab. Zur Untersuchung des Ausbleichverhaltens wurden von einem PSI-Komplex insgesamt 100 Spektren aufgenommen. Die Mittlungszeit eines einzelnen Spektrums betrug 3 s. Dadurch konnte die spektrale Dynamik eines Photosystem I-Komplexes bzw. der roten Chlorophyllpools während kontinuierlicher Beleuchtung untersucht werden.

Insgesamt kann man vier verschiedene Ausbleichverhalten unterscheiden, die im Folgenden näher beschrieben werden (Abb. 9.14 bis Abb. 9.17). Gezeigt werden jeweils drei ausgewählte Spektren: das erste Spektrum, welches zurzeit $t = 0$ s der Messung aufgenommen wurde, ein Spektrum nach einer Beleuchtungsdauer von 150 s und das letzte Spektrum der Messreihe, nach einer Beleuchtung von 300 s. Der Deutlichkeit wegen wurden die Spektren geglättet. Der zeitliche Verlauf des Ausbleichverhaltens ist durch den dazugehörigen, farbkodierten 2D-Plot gezeigt. Im 2D-Plot sind alle 100 Spektren hintereinander aufgelistet. Dadurch ist das spektrale Verhalten eines jeden Photosystem I-Komplexes über den gesamten Verlauf der Messung zu erkennen.

Fall 1: Vollständiges Ausbleichen der fluoreszierenden Chlorophyllpools

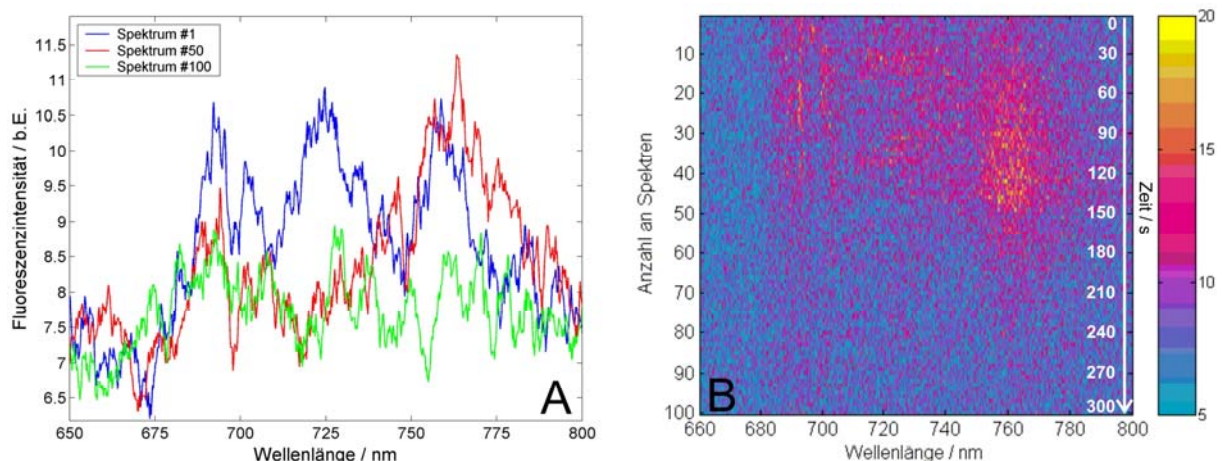


Abb. 9.14 Vollständiges Ausbleichen der roten Chlorophyllpools des PSI-Komplexes aus *A. platensis*. In (A) ist das erste Spektrum der Messserie blau dargestellt; Spektrum 50 in rot und das letzte Spektrum der Messserie in grüner Farbe. (B) zeigt den dazugehörigen 2D-Plot der Messreihe.

Im 2D-Plot der **Abb. 9.14B** ist deutlich zu erkennen, dass die Chlorophyllpools des untersuchten PSI-Komplexes im Laufe der Messung ausbleichen. Sowohl der rötteste Chlorophyllpool Chl735 als auch der Chlorophyllpool Chl708 und die Bande bei 690 nm emittieren bereits nach ca. 180 s keine Fluoreszenz mehr. In den drei überlagerten Fluoreszenzemissionsspektren der **Abb. 9.14A** ist aber auch zu erkennen, dass die Chlorophyllpools unterschiedliche Photostabilität aufweisen. Der Chlorophyllpool Chl735 ist photostabiler als der Chlorophyllpool Chl708, der bereits bei der Aufnahme von Spektrum 50, d.h. nach 150 s keine Fluoreszenz mehr emittiert.

Fall 2: Spektrale Sprünge der Fluoreszenzemissionsbanden im Verlauf einer Messserie von 100 Spektren

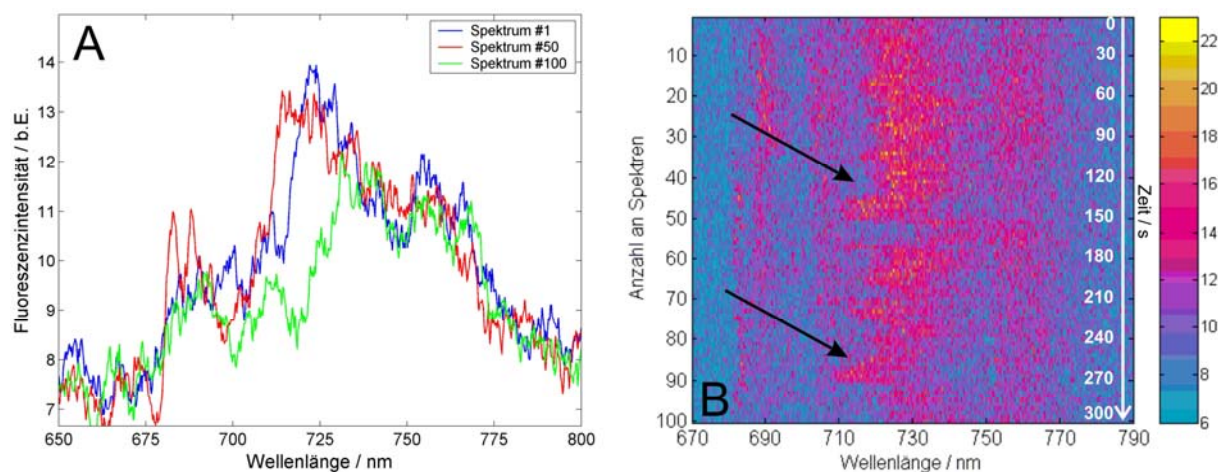


Abb. 9.15 Während die Fluoreszenzemissionsbanden bei 690 nm und 760 nm bezüglich der Wellenlänge und der Intensität stabil sind, zeigt die Fluoreszenzemissionsbande F725 des Chlorophyllpools Chl708 im Laufe der Messung spektrale Sprünge und bleicht teilweise aus.

Ein weiteres Phänomen einzelner PSI-Komplexen, welches generell bei spektroskopischen Untersuchungen einzelner Moleküle beobachtet werden kann, wird in **Abb. 9.15B** im 2D-Plot für die Fluoreszenzbande F725 deutlich. Im Laufe der Messung ändert sich die Emissionswellenlänge der Fluoreszenzemissionsbanden. Dadurch geht die Intensität der Fluoreszenzemissionsbande an der Stelle der ursprünglichen Emissionswellenlänge im Spektrum verloren, während die Intensität in der Nachbarschaft der ursprünglichen Bande plötzlich stark ansteigt. Dieses Emissionsverhalten nennt man spektrale Diffusion. Für die fluoreszierenden Chlorophyllpools in Photosystem I können die spektralen Sprünge bis zu ± 10 nm betragen (**Abb. 9.15B**). Spektrale Sprünge werden durch eine reversible Veränderung in

der direkten Umgebung der emittierenden Chlorophyllpools bzw. durch transiente, sterische Veränderung des emittierenden Pigments hervorgerufen. Auch durch Lichteinstrahlung induzierte transiente Ladungsverschiebungen können die energetischen Eigenschaften eines Pigmentes so verändern, dass sich die Absorptions- und Fluoreszenzwellenlängen ändern. Die spektrale Diffusion wird nur bei der Einzelmolekülspektroskopie sichtbar, in Bulk-Messungen führen spektrale Sprünge in der Regel zur inhomogenen Linienverbreiterung der Banden.

Fall 3: Über einen längeren Zeitraum photostabiler Photosystem I-Komplex, der das Phänomen des Blinkens zeigt

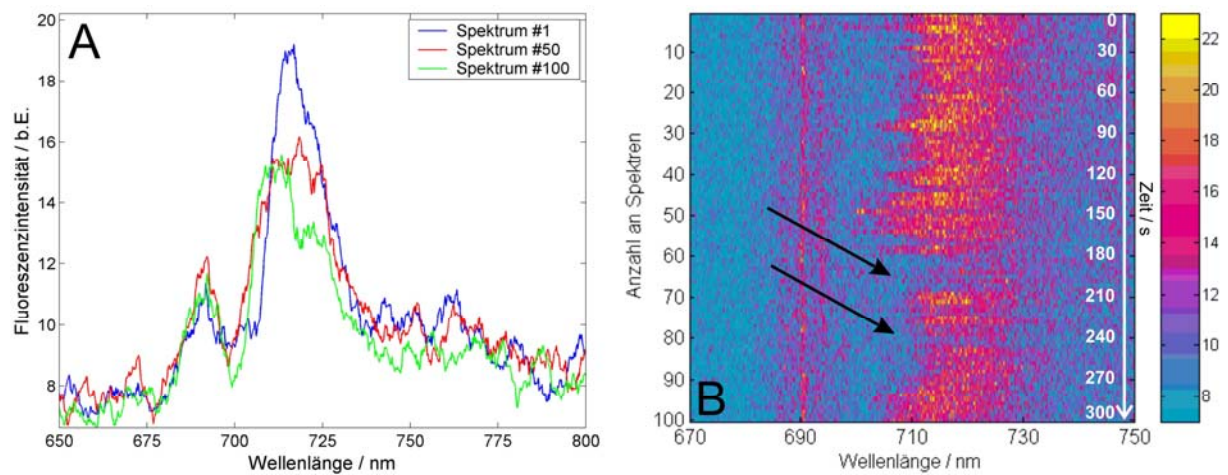


Abb. 9.16 Trotz kontinuierlicher Beleuchtung des Photosystem I-Komplexes sind die Fluoreszenz-emissionsbanden des Komplexes über einen Zeitraum von 300 s annähernd photostabil (A). Die Fluoreszenzbande des Chlorophyllpools Chl708 zeigt daneben ein Blinkverhalten (B).

Neben sehr photolabilen Photosystem I-Komplexen, gibt es Photosystem I-Komplexe, die über einen längeren Zeitraum photostabil sind. Bei der Untersuchung dieser Komplexe konnte ein Phänomen untersucht werden, das als „Blinken“ bekannt ist (**Abb. 9.16**). Fluoreszierende Zustände gehen in einen Zustand über, der keine Photonen emittiert. Ein solcher Dunkelzustand könnte beispielsweise durch den Übergang des emittierenden Systems in einen Triplettzustand hervorgerufen werden. Zu sehen ist die zwischen 180 s und 210 s (d.h. zwischen Spektrum 60 und 70), ebenso nach 240 s (Spektrum 80).

Fall 4: Unterschiedliche Photostabilität der fluoreszierenden Chlorophyllpools

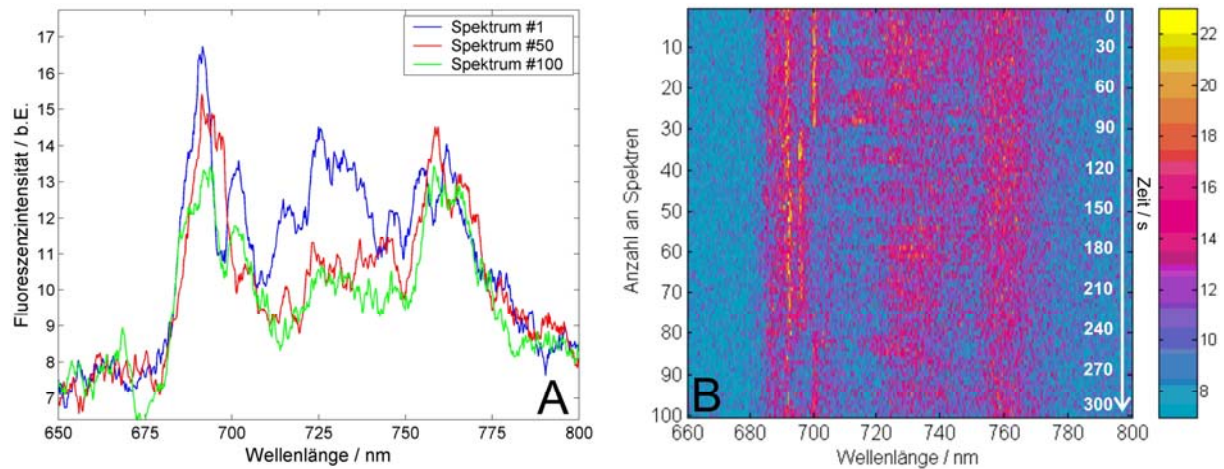


Abb. 9.17 Die Chlorophyllpools von PSI zeigen eine unterschiedliche Photostabilität. Während die Fluoreszenzemissionsbanden bei 690 nm und 760 nm sehr stabil sind, bleicht die Fluoreszenzbande bei 725 nm im Laufe der Messung aus.

Verglichen mit den Banden F690 und F760 bleicht die Bande bei ca. 725 nm sehr viel schneller aus. Der Chlorophyllpool Chl708 ist somit viel photosensitiver als der Chlorophyllpool Chl735 und das Chlorophyll, das für die Fluoreszenzemission bei 690 nm verantwortlich ist. Während nach einer kontinuierlichen Beleuchtung von 5 min sowohl F690 als auch F760 nur sehr wenig an Intensität verloren haben, zeigt die Bande bei 725 nm einen starken Intensitätsverlust bis hin zum Untergrund. Zur Verdeutlichung zeigt **Abb. 9.18** zwei Fluoreszenz-emissionspektren eines Photosystems I-Komplexes, die zu einer Zeit $t = 0$ s und nach einer Beleuchtungsdauer von 300 s aufgenommen wurden. Bei den Spektren handelt es sich um die Rohdaten, die nicht geglättet wurden.

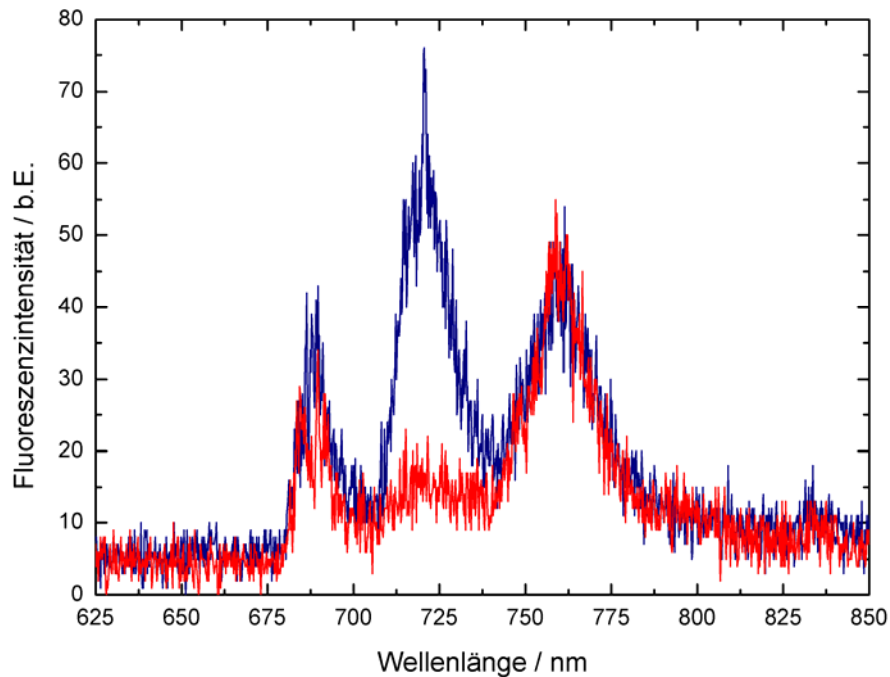


Abb. 9.18 Fluoreszenzmissionsspektren aufgenommen bei einer Beleuchtungsdauer von $t = 0$ s (blaues Spektrum) und bei einer Beleuchtungsdauer von $t = 300$ s (rotes Spektrum), ohne Nachbearbeitung. Das Ausbleichen des Chlorophyllpools Chl708 ist deutlich zu erkennen. Im Gegensatz hierzu ist die Fluoreszenzbande bei 690 nm und der Chlorophyllpool Chl708 photostabil.

Die Ursache der unterschiedlichen Photosensitivität der einzelnen Chlorophyllpools liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Umgebung der Pigmente, d.h. in der Proteinmatrix, in der die Chlorophylle eingebettet sind. Ein lichtinduziertes Ausbleichen (photobleaching) kann durch mehrere Prozesse ausgelöst werden. Prozesse, die ein Ausbleichen auslösen können, sind Isomerisierungsreaktionen, Dissoziationsreaktionen innerhalb des Moleküls oder Triplett-Triplett-Annihilierung innerhalb der Antenne. Die Umgebung eines Pigments kann diese Prozesse unterstützen oder unterbinden. So ist beispielsweise eine Übertragung des angeregten Elektrons nach Anregung des Pigments aufgrund der schwachen Bindung zum Rumpfmolekül vor allem dann möglich, wenn in der nahen Umgebung ein Elektronenakzeptor lokalisiert ist.

9.4 Zusammenfassung des Kapitels

Nach Prüfung der Photosystem I Probe aus *Arthrospira platensis* anhand eines Absorptionsspektrums wurden sowohl Fluoreszenzemissionsspektren einer Ensemble-Probe und einzelner trimerer Photosystem I-Komplexe aufgenommen. Im Ensemble konnte eine unterschiedliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der roten Chlorophyllpools Chl708 und Chl735 von der Anregungsleistung festgestellt und qualitativ durch ein vereinfachtes Modell, basierend auf den Rategleichungen der beteiligten Moleküle und deren elektronischen Zuständen, beschrieben werden. Für den Verlauf des Intensitätsverhältnisses $F725:F760$ ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$\frac{I(F725)}{I(F760)} = \frac{\frac{P_{ex} \cdot C}{B_{12}(Chl735)}}{\frac{k_{ET} \cdot B_{12}(P700)}{P_{ex} \cdot B_{12}(P700) + k_{rec}} + B_{12}(Chl735) + \frac{k_F}{P_{ex}}}$$

Eine qualitative Beschreibung des Kurvenverlaufs des Intensitätsverhältnisses $F725:F760$ in Abhängigkeit der Anregungsleistung ist unter Berücksichtigung der Literaturwerte für die Energietransferrate k_{ET} , die Fluoreszenzrate k_F und die Rekombinationsrate k_{rec} für Photosystem I aus *A. platensis* möglich.

Auf der Ebene der Einzelmolekülspektroskopie konnte gezeigt werden, dass durch sehr hohe Anregungsleistungen der erste Elektronendonator im zeitlichen Mittel überwiegend oxidiert vorliegt und die Fluoreszenzemissionsspektren deshalb keine typischen spektralen Merkmale einer vorreduzierten Probe zeigen. Die Fluoreszenzemissionsspektren einzelner Komplexe zeigen aber weitere interessante Merkmale. Zusätzlich zu den roten Chlorophyllpools wurde ein weiterer „Pool“ bei 690 nm detektiert. Aufgrund der Bandenbreite bzw. -form, kann diese Bande einem einzelnen Chlorophyll-Molekül zugeordnet werden.

Die Fluoreszenzemissionsbande F725 zeigt im Gegensatz zu F690 und F760 eine größere spektrale Dynamik. Neben dem Phänomen der spektralen Diffusion und dem Phänomen des Blinkens, weist F725 auch eine geringere Photostabilität auf. Auch wenn die anderen Chlorophyllpools diese Phänomene ebenfalls zeigen, sind sie häufiger bei F725 anzutreffen, was womöglich durch die Umgebung unterstützt wird. Diese kann beispielsweise die Abgabe von Elektronen auf Nachbarmoleküle fördern, wenn sich in der näheren Umgebung des Chlorophyllpools Elektronenakzeptoren befinden.

Allen drei Banden gemein ist aber, dass sie mit einigen Ausnahmen, bei denen alle drei Banden photostabil sind, bei kontinuierlicher Anregung im Verlauf der Zeit ausbleichen.

Die Fluoreszenzemissionsbanden der roten Chlorophylle setzen sich aus der Nullphononenlinie und der Phononenseitenbande zusammen; diese konnten teilweise in den Spektren detektiert werden, was auf einzelne Emitter für die jeweilige Bande schließen lässt und die Hypothese der energetische Konnektivität zwischen den einzelnen PSI-Monomeren untermauert.

Alle genannten Merkmale können in den Fluoreszenzmissionsspektren detektiert werden, sind aber nicht in jedem Spektrum zu sehen. Aufgrund des Aufbaus der Protein-Pigment-Komplexe und der dadurch auftretenden Mechanismen bzw. Phänomene und zusätzlich durch die Versuchsbedingungen, wie Einfrieren und Beleuchtung, kann sich die Struktur des Komplexes verändern. Dadurch können photophysikalische Eigenschaften modifiziert werden oder bestimmte Mechanismen auftreten bzw. nicht mehr stattfinden.

Durch Summation der sehr unterschiedlichen Einzelmolekülspektren wurde deshalb sichergestellt, dass PSI auch bei den angewendeten Versuchsbedingungen intakt ist.

10 Zusammenfassung der Dissertation

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der einzelnen Experimente zur Untersuchung der roten Chlorophyllpools in Photosystem I-Komplexen aus den Cyanobakterien *Thermosynechococcus elongatus* und *Arthrospira platensis* zusammenfassend vorgestellt werden.

Die emittierte Fluoreszenz der roten Chlorophyllpools in PSI aus *TS. elongatus* wurde spektral auf Einzelmolekülebene untersucht. Zusätzlich wurden sowohl photodynamische Eigenschaften mittels einer Autokorrelationsanalyse, als auch die Polarisations-eigenschaften der Fluoreszenz untersucht.

Die Untersuchungen der roten Chlorophylle von PSI aus *A. platensis* beschränkten sich auf die spektralen Eigenschaften von PSI auf Einzelmolekülebene und im Ensemble.

10.1 Untersuchung von Photosystem I aus *TS. elongatus*

In **Fluoreszenzemissionsspektren** trimerer PSI-Komplexe im Ensemble ist nur eine einzige dominante Bande mit einem Maximum bei 730 nm zu sehen, die dem roten Chlorophyllpool Chl719 zugeordnet wurde. Einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen zeigen, dass diese breite Bande die Überlagerung von mehreren schmalen Banden darstellt, die in Ensemble-Messungen nicht aufgelöst werden können. Die Fluoreszenzemissionsspektren der einzelnen PSI-Komplexe sind sehr heterogen und können eine unterschiedliche Anzahl an Banden aufweisen, wobei die Fluoreszenzemissionsbanden in Linienposition, Linienbreite und

Fluoreszenzintensität stark variieren. Die Ursachen hierfür liegen in der Größe und im komplexen Aufbau des Protein-Pigment-Komplexes selbst und in den photophysikalischen Eigenschaften des PSI-Komplexes. Neben einer Photosensitivität, die für die verschiedenen Chlorophyllpools der einzelnen Fluoreszenzemissionsbanden unterschiedlich ausgeprägt sein kann, treten in Einzelmolekülspektren von Protein-Pigment-Komplexen dynamische Prozesse wie Blinken oder spektrale Diffusion auf, wodurch einerseits die Fluoreszenzintensitäten fluktuieren und sich andererseits die Position der Banden verändert.

Eine statistische Analyse der Verteilung der Emissionswellenlängen aus den Fluoreszenzemissionspektren einzelner Photosystem I-Komplexe in Kombination mit Literaturdaten ermöglicht eine grobe Einteilung der Emissionswellenlängen in insgesamt fünf Fluoreszenzemissionsbanden, die zwischen 690 nm und ca. 750 nm liegen. Zwei der ermittelten Banden, die in einem Wellenlängenbereich zwischen 706 nm und 719 nm und zwischen 720 und 735 nm auftreten, konnten den bereits bekannten roten Chlorophyllpools Chl708 und Chl719 zugeordnet werden. Demnach fluoresziert neben dem Chlorophyllpool Chl719 auch der rote Chlorophyllpool Chl708, was in Bulk-Messungen nicht nachgewiesen werden konnte. Nach teilweisem Ausbleichen der auch in den Einzelmolekülspektren von PSI sehr dominanten Bande des roten Chlorophyllpools Chl719, konnte eine weitere Bande bei ca. 745 nm nachgewiesen werden, die bis jetzt mit keiner Untersuchungsmethode detektiert werden konnte.

Zusätzlich waren zwei weitere Banden zwischen 690 nm und 695 nm und zwischen 696 nm und 705 nm zu sehen, wobei die entsprechenden Chlorophyllpools aufgrund des Wellenlängenbereichs nicht eindeutig zu den roten Chlorophyllpools gezählt werden konnten. Während die Fluoreszenzemissionsbande zwischen 696 nm und 705 nm möglichen Verbindungschlorophyllen zugesprochen werden kann, die bei Raumtemperatur die Anregungsenergie auf das Reaktionszentrum übertragen, handelt es sich bei den Chlorophyllen, die für die Bande zwischen 690 nm und 695 nm verantwortlich sind, um Chlorophylle, die energetisch weder an die Antenne, noch an die roten Chlorophyllpools gekoppelt sind und deshalb fluoreszieren.

Eine **Autokorrelationsanalyse** der von Photosystem I emittierten Fluoreszenz ermöglicht die Untersuchung dynamischer Prozesse der emittierenden Chlorophyllpools.

Für die roten Chlorophyllpools ergibt sich aus den Autokorrelationsmessungen eine Intersystem Crossing-Rate von $(170 \text{ ns})^{-1}$. Im Gegensatz zu Chlorophyll *a* in Lösung, das eine Intersystem Crossing-Rate von ca. $(8,6 \text{ ns})^{-1}$ aufweist, ist die Intersystem Crossing-Rate der

roten Chlorophyllpools in PSI sehr viel kleiner. Die Intersystem Crossing-Ausbeute ϕ_{ISC} für PSI ermittelt sich aus der Fluoreszenz-Lebensdauer für Chlorophyll *a* mit 1,5 ns und der Intersystem Crossing Rate zu 0,01 und ist damit sehr viel kleiner als ϕ_{ISC} für gelöstes Chlorophyll *a*, welche mit 0,64 angegeben wird. Die Triplet-Lebensdauer der emittierenden Chlorophyllpools liegt im Mikrosekundenbereich und ist damit um zwei Größenordnungen kleiner als die Triplet-Lebensdauer von Chlorophyll *a* in Lösung. Eine erniedrigte Populationsrate gemeinsam mit einer erhöhten Depopulationsrate des Tripletzustandes bewirkt eine verringerte Bevölkerung des Tripletzustands der emittierenden Chlorophyllpools, wodurch dem Protein-Pigment-Komplex ein Schutzsystem gegeben ist, das das System vor Bildung des Singulett-Sauerstoffs oder vor ungewünschte Photoreaktionen bewahrt.

Mittels **Fluoreszenzpolarisationsanalyse** sollten die roten Chlorophyllpools bestimmten Chlorophyllen des Antennensystems von PSI zugeordnet werden. Dazu wurde die Fluoreszenz der einzelnen Chlorophyllpools auf lineare Polarisation überprüft. Für trimere PSI-Komplexe waren lediglich einzelne Banden in einem Fluoreszenzemissionsspektrum linear polarisiert. Eine für die Zuordnung der roten Chlorophylle notwendige Bestimmung des Phasendifferenzwinkels der Fluoreszenzmodulation einzelner Chlorophyllpool-Paare war deshalb für trimere Photosystem I-Komplexe nicht möglich. Ein Grund hierfür könnte der trimere Aufbau des PSI-Komplexes sein, durch den eine Fluoreszenzemissionsbande eines Chlorophyllpools das Ergebnis der Emission von drei Emittlern ist. Eine Untersuchung von monomeren PSI-Komplexen sollte deshalb die Wahrscheinlichkeit der Detektion von linear polarisiertem Fluoreszenzlicht erhöhen. Mit Hilfe einer GAUSS-Zerlegung der Spektren konnten gleichzeitig bis zu vier linear polarisierte Banden nachgewiesen werden. Simulationen der relativen Orientierung der roten Chlorophyllpools anhand ihrer Übergangsdipolmomente in einer Probe mit isotrop-verteilten Photosystem I-Monomeren zeigen, dass eine Bestimmung der relativen Lage der Chlorophyllpools prinzipiell möglich ist. Über eine statistische Analyse der Phasendifferenzwinkel für bestimmte Chlorophyllpool-Paare, die durch Fitten der linear polarisierten Banden mit einer \cos^2 -Funktion ermittelt werden, ergeben sich Vorzugswinkel zwischen den beteiligten Chlorophyllpools. Diese Vorzugswinkel wurden mit den Winkeln zwischen den Übergangsdipolmomenten möglicher Kandidaten aus der Literatur verglichen. Eine Übereinstimmung fand sich für den Chlorophyllcluster *A31-A32-B07-B06* des Chlorophyllpools Chl719 und dem Chlorophyllcluster *A2-A3-A4* des Chlorophyllpools Chl708. Eine weitere Zuordnung war für den Chlorophyllcluster

A31-A32-B07-B06 (Chl719) und für das Chlorophyll *BII*, das für den roten Chlorophyllpool Chl708 ermittelt wurde, möglich.

10.2 Optische Spektroskopie an Photosystem I-Komplexen aus *A. platensis*

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen trimerer Photosystem I-Komplexe im Ensemble lassen eine unterschiedliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität (F725 und F760) der roten Chlorophyllpools Chl708 und Chl735 von der Anregungsleistung erkennen. Der qualitative Verlauf des Intensitätsverhältnisses $F725:F760$ in Abhängigkeit von der Anregungsleistung konnte durch ein vereinfachtes Modell beschrieben werden. Dieses Modell basiert auf den Ratengleichungen der beteiligten Moleküle, in denen die Ratenkonstanten der Übergänge zwischen den elektronischen Zuständen und die Besetzung der Zustände berücksichtigt werden. Für den Verlauf des Intensitätsverhältnisses $F725:F760$ ergibt sich demnach folgender Zusammenhang:

$$\frac{I(F725)}{I(F760)} = \frac{P_{ex} \cdot C}{B_{12}(Chl735) \left(\frac{k_{ET} \cdot B_{12}(P700)}{P_{ex} \cdot B_{12}(P700) + k_{rec}} + B_{12}(Chl735) + \frac{k_F}{P_{ex}} \right)}$$

Unter Berücksichtigung der Literaturwerte für die Energietransferrate, die Fluoreszenzrate und die Rekombinationsrate des PSI-Komplexes aus *A. platensis* war eine qualitative Beschreibung des Kurvenverlaufs des Intensitätsverhältnisses $F725:F760$ in Abhängigkeit der Anregungsleistung möglich.

Neben Ensemble-Messungen wurden von PSI aus *A. platensis* Einzelmolekülspektren aufgenommen, die zeigen, dass trotz Vorreduktion oder Voroxidation der erste Elektronendonator P700 im zeitlichen Mittel vor allem als Radikalkation $P700^{+\bullet}$ vorliegt. Laut Literatur sollte nach einer Vorbehandlung des PSI-Komplexes aus *A. platensis* mit einem Reduktionsmittel das von P700 in die Elektronentransferkette abgegebene Elektron messbar mit dem Radikalkation $P700^{+\bullet}$ rekombinieren. Der rote Chlorophyllpool Chl735 hätte in diesem Fall als Sensor gedient, der bei geschlossenem Reaktionszentrum nicht mehr in der Lage gewesen wäre, die Anregungsenergie vollständig als Fluoreszenz zu emittieren. Durch die in der

Einzelmolekülspektroskopie notwendige Anregungsleistung liegt P700 nur sehr kurz als neutrales P700 vor, was mit diesem Aufbau nicht detektiert werden kann.

Auftretende Schwankungen in den Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Fluoreszenzbanden und vor allem von F760 sind deshalb nicht auf den Aktivitätszustand des Reaktionszentrums zurückzuführen. Trotzdem sehen die Einzelmolekülspektren der PSI-Komplexe aus *A. platensis* sehr heterogen aus. Im Gegensatz zu den Einzelmolekülspektren der trimeren PSI-Komplexe aus *TS. elongatus* zeigen die Einzelmolekülspektren der trimeren PSI-Komplexe aus *A. platensis* maximal zwei Fluoreszenzemissionsbanden zwischen 710 und 760 nm, die den roten Chlorophyllpools Chl708 und Chl735 zugeordnet werden konnten, und eine Fluoreszenzemissionsbande bei ca. 695 nm, die durch ungekoppelte Chlorophylle zustande kommt. Begleitet werden diese Banden teilweise von Nullphononenlinien – ein typisches Merkmal in Einzelmolekülspektren.

Die roten Chlorophyllpools Chl708 und Chl735 zeigen eine unterschiedliche Photostabilität; Chl708 ist im Gegensatz zu Chl735 und dem Chlorophyllpool bei 695 nm sehr viel photosensitiver und bleicht demnach sehr viel schneller aus. Ebenso konnte sowohl spektrale Diffusion als auch das Phänomen des Blinkens innerhalb des emittierenden Systems nachgewiesen werden.

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Bezeichnung	Seite
3.1	Übersicht der Protein-Untereinheiten von PSI aus <i>TS. elongatus</i>	36
3.2	Verteilung der Antennen-Chlorophylle auf die einzelnen Protein-Untereinheiten	46
3.3	Die roten Chlorophyllpools in PSI aus verschiedenen Cyanobakterien	58
5.1	Verwendete PSI-Proben	91
5.2	Chemikalienliste	92
6.1	Die roten Chlorophyllpools in PSI aus <i>TS. elongatus</i>	102
6.2	Zuordnung der experimentell ermittelten Fluoreszenzemissionsbanden zu den Chlorophyllpools in PSI	115
7.1	Zerfallsraten der Autokorrelationsfunktionen bei verschiedenen Anregungsleistungen	131
8.1	Übersicht über die aus den Spektren ermittelten Daten, am Beispiel eines monomeren PSI-Komplexes	153
8.2	Übersicht über die berechneten Phasendifferenzwinkel	153
8.3	Anzahl der Einträge in den Histogrammen für verschiedene Chlorophyllpool-Paare	159
8.4	Zusammenfassung aller Chlorophylle, die für die roten Chlorophylle in Frage kommen	164
8.5	Zusammenstellung der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten möglicher Kandidaten nach DAMJANOVIC	167
8.6	Zusammenstellung der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten möglicher Kandidaten nach VAITEKONIS	168
8.7	Vergleich der experimentell ermittelten Winkel mit Literaturdaten	170
9.1	Die roten Chlorophyllpools in PSI aus <i>A. platensis</i>	177
9.2	Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzbanden F725 und F760 bei verschiedenen Anregungsleistungen	186
9.3	Übersicht der Parameter, die zur Berechnung des Intensitätsverhältnisses verwendet wurden	192

Literaturverzeichnis

1. Peumans, P., Yakimov, A., and Forrest, S. R. (2003) Small molecular weight organic thin-film photodetectors and solar cells, *Journal of Applied Physics* 93, 3693-3723.
2. Redmond, G., Fitzmaurice, D., and Graetzel, M. (1994) Visible-Light Sensitization by *cis*-Bis(Thiocyanato)Bis(2,2'-Bipyridyl-4,4'-Dicarboxylato)ruthenium(II) of a Transparent Nanocrystalline ZnO Film Prepared by Sol-Gel Techniques, *Chemistry of Materials* 6, 686-691.
3. Jelezko, F., Tietz, C., Gerken, U., Wrachtrup, J., and Bittl, R. (2000) Single-molecule spectroscopy on photosystem I pigment-protein complexes, *Journal of Physical Chemistry B* 104, 8093-8096.
4. Pålsson, L. O., Dekker, J. P., Schlodder, E., Monshouwer, R., and van Grondelle, R. (1996) Polarized site-selective fluorescence spectroscopy of the long-wavelength emitting chlorophylls in isolated Photosystem I particles of *Synechococcus elongatus*, *Photosynthesis Research* 48, 239-246.
5. Pålsson, L. O., Flemming, C., Gobets, B., van Grondelle, R., Dekker, J. P., and Schlodder, E. (1998) Energy transfer and charge separation in photosystem I: P700 oxidation upon selective excitation of the long-wavelength antenna chlorophylls of *Synechococcus elongatus*, *Biophysical Journal* 74, 2611-2622.
6. Shubin, V. V., Murthy, S. D. S., Karapetyan, N. V., and Mohanty, P. (1991) Origin of the 77 K Variable Fluorescence at 758 nm in the Cyanobacterium *Spirulina Platensis*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1060, 28-36.
7. Shubin, V. V., Bezsmertnaya, I. N., and Karapetyan, N. V. (1992) Isolation from *Spirulina* Membranes of 2 Photosystem I Type Complexes, One of Which Contains Chlorophyll Responsible for the 77 K Fluorescence Band at 760 nm, *Febs Letters* 309, 340-342.
8. Shubin, V. V., Tsuprun, V. L., Bezsmertnaya, I. N., and Karapetyan, N. V. (1993) Trimeric Forms of the Photosystem I Reaction-Center Complex Pre-Exist in the Membranes of the Cyanobacterium *Spirulina Platensis*, *Febs Letters* 334, 79-82.
9. Shubin, V. V., Bezsmertnaya, I. N., and Karapetyan, N. V. (1995) Efficient Energy-Transfer from the Long-Wavelength Antenna Chlorophylls to P700 in Photosystem I Complexes from *Spirulina Platensis*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 30, 153-160.
10. Karapetyan, N. V., Dorra, D., Schweitzer, G., Bezsmertnaya, I. N., and Holzwarth, A. R. (1997) Fluorescence spectroscopy of the longwave chlorophylls in trimeric and monomeric photosystem I core complexes from the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biochemistry* 36, 13830-13837.

11. Basché, T., Moerner, W. E., Orrit, M., and Talon, H. (1992) Photon Antibunching in the Fluorescence of a Single Dye Molecule Trapped in a Solid, *Physical Review Letters* 69, 1516-1519.
12. Basché, T., Kummer, S., and Bräuchle, C. (1996) Excitation and Emission Spectroscopy and Quantum Optical Measurements, in *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy* (Basché, T., Moerner, W. E., Orrit, M., and Wild, U. P., Eds.) pp 31-67, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
13. Orrit, M. and Bernard, J. (1990) Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in a Para-Terphenyl Crystal, *Physical Review Letters* 65, 2716-2719.
14. Sick, B., Hecht, B., and Novotny, L. (2000) Orientational imaging of single molecules by annular illumination, *Physical Review Letters* 85, 4482-4485.
15. Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Ångstrom resolution, *Nature* 411, 909-917.
16. Schubert, W. D., Klukas, O., Saenger, W., Witt, H. T., Fromme, P., and Krauss, N. (1998) A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems: A comparison based on the structural model of photosystem I, *Journal of Molecular Biology* 280, 297-314.
17. Woese, C. R. (1994) There Must be A Prokaryote Somewhere - Microbiology's Search for Itself, *Microbiological Reviews* 58, 1-9.
18. Ben-Shem, A., Frolow, F., and Nelson, N. (2003) Crystal structure of plant photosystem I, *Nature* 426, 630-635.
19. Golbeck, J. H. (1992) Structure and Function of Photosystem-I, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 293-324.
20. Boekema, E. J., Dekker, J. P., Vanheel, M. G., Rogner, M., Saenger, W., Witt, I., and Witt, H. T. (1987) Evidence for A Trimeric Organization of the Photosystem-I Complex from the Thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus* Sp, *Febs Letters* 217, 283-286.
21. Kruij, J., Bald, D., Boekema, E., and Rogner, M. (1994) Evidence for the Existence of Trimeric and Monomeric Photosystem-I Complexes in Thylakoid Membranes from Cyanobacteria, *Photosynthesis Research* 40, 279-286.
22. Sener, M. K., Park, S., Lu, D. Y., Damjanovic, A., Ritz, T., Fromme, P., and Schulten, K. (2004) Excitation migration in trimeric cyanobacterial photosystem I, *Journal of Chemical Physics* 120, 11183-11195.
23. Rogner, M., Mühlhoff, U., Boekema, E. J., and Witt, H. T. (1990) Monomeric, Dimeric and Trimeric PS-I Reaction Center Complexes Isolated from the Thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus* Sp.: Size, Shape and Activity, *Biochimica et Biophysica Acta* 1015, 415-424.

24. Plato, M., Krauss, N., Fromme, P., and Lubitz, W. (2003) Molecular orbital study of the primary electron donor P700 of photosystem I based on a recent X-ray single crystal structure analysis, *Chemical Physics* 294, 483-499.
25. Fischer, N., Setif, P., and Rochaix, J. D. (1999) Site-directed mutagenesis of the PsaC subunit of photosystem I - F_B is the cluster interacting with soluble ferredoxin, *Journal of Biological Chemistry* 274, 23333-23340.
26. Golbeck, J. H. (1999) A comparative analysis of the spin state distribution of in vitro and in vivo mutants of PsaC - A biochemical argument for the sequence of electron transfer in Photosystem I as F_X -> F_A -> F_B -> ferredoxin/flavodoxin, *Photosynthesis Research* 61, 107-144.
27. Lakshmi, K. V., Jung, Y. S., Golbeck, J. H., and Brudvig, G. W. (1999) Location of the iron-sulfur clusters F_A and F_B in photosystem I: An electron paramagnetic resonance study of spin relaxation enhancement of P700⁺, *Biochemistry* 38, 13210-13215.
28. Fromme, P., Bottin, H., Krauss, N., and Setif, P. (2002) Crystallization and electron paramagnetic resonance characterization of the complex of photosystem I with its natural electron acceptor ferredoxin, *Biophysical Journal* 83, 1760-1773.
29. Scheer, H. (1991) Structure and Occurance of Chlorophylls, in *Chlorophylls* (Scheer, H., Ed.) pp 3-23, CRC Press, Boca Raton, Florida.
30. Gouterman, M. (1961) Spectra of Porphyrins, *Journal of Molecular Spectroscopy* 6, 138-163.
31. Gouterman, M., Snyder, L. C., and Wagniere, G. H. (1963) Spectra of Porphyrins. Part II. Four Orbital Model, *Journal of Molecular Spectroscopy* 11, 108-127.
32. Colbow, K. (1973) Energy-Transfer in Photosynthesis, *Biochimica et Biophysica Acta* 314, 320-327.
33. van Grondelle, R. (1985) Excitation-Energy Transfer, Trapping and Annihilation in Photosynthetic Systems, *Biochimica et Biophysica Acta* 811, 147-195.
34. Golbeck, J. H. and Bryant, D. A. (1991) Photosystem-I, *Current Topics in Bioenergetics* 16, 83-177.
35. Schubert, W. D., Klukas, O., Krauss, N., Saenger, W., Fromme, P., and Witt, H. T. (1997) Photosystem I of *Synechococcus elongatus* at 4 Ångstrom resolution: Comprehensive structure analysis, *Journal of Molecular Biology* 272, 741-769.
36. Förster, T. (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Annalen der Physik* 2, 55-75.
37. Takahashi, Y., Hirota, K., and Katoh, S. (1985) Multiple Forms of P700-Chlorophyll *a*-Protein Complexes from *Synechococcus Sp.*: the Iron, Quinone and Carotenoid Contents, *Photosynthesis Research* 6, 183-192.

38. Holzwarth, A. R. (1999) Die primären Prozesse der Photosynthese, in *Photosynthese* (Häder, D. P., Ed.) pp 1-20, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
39. Dexter, D. L. (1953) A Theory of Sensitized Luminescence in Solids, *Journal of Chemical Physics* 21, 836-850.
40. Frenkel, J. (1931) On the transformation of light into heat in solids I, *Physical Review Series II* 37, 17-44.
41. Frenkel, J. (1931) On the transformation of light into heat in solids II, *Physical Review Series II* 37, 1276-1294.
42. Wannier, G. H. (1937) The Structure of electronic excitation levels in insulating crystals, *Physical Review Series II* 52, 191-197.
43. Oxborough, K. (2004) Imaging of chlorophyll *a* fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance, *Journal of Experimental Botany* 55, 1195-1205.
44. Hagenbach, E. (1870) Untersuchungen über die optischen Eigenschaften des Blattgrüns, *Annalen der Physik* 9, 245-275.
45. Hoff, A. J. and Amesz, J. (2006) Visible Absorption Spectroscopy of Chlorophylls, in *Chlorophylls* (Scheer, H., Ed.) pp 723-738, CRC Press, Boca Raton, Florida.
46. Butler, W. L. (1961) A Far-Red Absorbing Form of Chlorophyll, in Vivo, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 93, 413-422.
47. Butler, W. L. (1978) Energy-Distribution in Photo-Chemical Apparatus of Photosynthesis, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 29, 345-378.
48. Duval, J. C., Thomas, J. C., and Choquet, Y. (1986) 77-K Fluorescence Quenching Induced by Reduction of Photosystem-I Primary Electron-Acceptors in a Cyanobacterium, *Biochimica et Biophysica Acta* 848, 352-358.
49. Mullet, J. E., Burke, J. J., and Arntzen, C. J. (1980) Chlorophyll Proteins of Photosystem-I, *Plant Physiology* 65, 814-822.
50. Den Blanken, H. J., Jongenelis, A. P. J. M., and Hoff, A. J. (1983) The Triplet State of the Primary Donor of the Photosynthetic Bacterium *Rhodospseudomonas Viridis*, *Biochimica et Biophysica Acta* 725, 472-482.
51. Van Dorssen, R. J., Vasmel, H., and Amesz, J. (1985) Antenna Organization and Energy Transfer in Membranes of *Heliobacterium Chlorum*, *Biochimica et Biophysica Acta* 809, 199-203.
52. Fleming, G. R. and van Grondelle, R. (1997) Femtosecond spectroscopy of photosynthetic light-harvesting systems, *Current Opinion in Structural Biology* 7, 738-748.

53. Katz, J. J., Bowman, M. K., Michalski, T. J., and Worcester, D. L. (1991) Chlorophyll Aggregation: Chlorophyll/Water Micelles as Models for in vivo long-wavelength Chlorophyll, in *Chlorophylls* (Scheer, H., Ed.) pp 211-235, CRC Press, Boca Raton, Florida.
54. Vaitekoniš, S., Trinkunas, G., and Valkunas, L. (2005) Red chlorophylls in the exciton model of photosystem I, *Photosynthesis Research* 86, 185-201.
55. Ihalainen, J. A., Rätsep, M., Jensen, P. E., Scheller, H. V., Croce, R., Bassi, R., Korppi-Tommola, J. E. I., and Freiberg, A. (2003) Red spectral forms of chlorophylls in green plant PSI - a site-selective and high-pressure spectroscopy study, *Journal of Physical Chemistry B* 107, 9086-9093.
56. Rätsep, M., Johnson, T. W., Chitnis, P. R., and Small, G. J. (2000) The red-absorbing chlorophyll *a* antenna states of photosystem I: A hole-burning study of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its mutants, *Journal of Physical Chemistry B* 104, 836-847.
57. Reinot, T., Zazubovich, V., Hayes, J. M., and Small, G. J. (2001) New insights on persistent nonphotochemical hole burning and its application to photosynthetic complexes, *Journal of Physical Chemistry B* 105, 5083-5098.
58. Zazubovich, V., Matsuzaki, S., Johnson, T. W., Hayes, J. M., Chitnis, P. R., and Small, G. J. (2002) Red antenna states of photosystem I from cyanobacterium *Synechococcus elongatus*: a spectral hole burning study, *Chemical Physics* 275, 47-59.
59. Frese, R. N., Palacios, M. A., Azzizi, A., van Stokkum, I. H. M., Kruip, J., Rogner, M., Karapetyan, N. V., Schlodder, E., van Grondelle, R., and Dekker, J. P. (2002) Electric field effects on red chlorophylls, beta-carotenes and P700 in cyanobacterial Photosystem I complexes, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1554, 180-191.
60. Karapetyan, N. V., Holzwarth, A. R., and Rogner, M. (1999) The photosystem I trimer of cyanobacteria: molecular organization, excitation dynamics and physiological significance, *Febs Letters* 460, 395-400.
61. Koehne, B. and Trissl, H. W. (1998) The cyanobacterium *Spirulina platensis* contains a long wavelength-absorbing pigment C₇₃₈ (F760/77K) at room temperature, *Biochemistry* 37, 5494-5500.
62. Trissl, H. W. (1993) Long-Wavelength Absorbing Antenna Pigments and Heterogeneous Absorption-Bands Concentrate Excitons and Increase Absorption Cross-Section, *Photosynthesis Research* 35, 247-263.
63. Holzwarth, A. R., Schatz, G., Brock, H., and Bittersmann, E. (1993) Energy Transfer and Charge Separation Kinetics in Photosystem I .1. Picosecond Transient Absorption and Fluorescence Study of Cyanobacterial Photosystem I Particles, *Biophysical Journal* 64, 1813-1826.
64. Van der Lee, J., Bald, D., Kwa, S. L. S., van Grondelle, R., Rögner, M., and Dekker, J. P. (1993) Steady-State Polarized Light Spectroscopy of Isolated Photosystem I Complexes, *Photosynthesis Research* 35, 311-321.

65. van Grondelle, R., Dekker, J. P., Gillbro, T., and Sundstrom, V. (1994) Energy-Transfer and Trapping in Photosynthesis, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1187, 1-65.
66. Wittmershaus, B. P., Berns, D. S., and Huang, C. (1987) Picosecond Time-Resolved Fluorescence from Detergent-Free Photosystem-I Particles, *Biophysical Journal* 52, 829-836.
67. Woolf, V. M., Wittmershaus, B. P., Vermaas, W. F. J., and Tran, T. D. (1994) Resolution of Low-Energy Chlorophylls in Photosystem-I of *Synechocystis Sp* Pcc-6803 at 77-K and 295-K Through Fluorescence Excitation Anisotropy, *Photosynthesis Research* 40, 21-34.
68. Croce, R., Zucchelli, G., Garlaschi, F. M., Bassi, R., and Jennings, R. C. (1996) Excited state equilibration in the Photosystem I light-harvesting I complex: P700 is almost isoenergetic with its antenna, *Biochemistry* 35, 8572-8579.
69. Valkunas, L., Liuolia, V., Dekker, J. P., and van Grondelle, R. (1995) Description of Energy Migration and Trapping in Photosystem-I by A Model with 2 Distance Scaling Parameters, *Photosynthesis Research* 43, 149-154.
70. Gobets, B. and van Grondelle, R. (2001) Energy transfer and trapping in photosystem I, *Biochimica et Biophysica Acta* 1507, 80-99.
71. Melkozernov, A. N. (2001) Excitation energy transfer in Photosystem I from oxygenic organisms, *Photosynthesis Research* 70, 129-153.
72. Karapetyan, N. V., Shubin, V. V., and Strasser, R. J. (1999) Energy exchange between the chlorophyll antennae of monomeric subunits within the Photosystem I trimeric complex of the cyanobacterium *Spirulina*, *Photosynthesis Research* 61, 291-301.
73. Andrizhiyevskaya, E. G., Schwabe, T. M. E., Germano, M., D'Haene, S., Kruip, J., van Grondelle, R., and Dekker, J. P. (2002) Spectroscopic properties of PSI-IsiA supercomplexes from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1556, 265-272.
74. Gobets, B., van Stokkum, I. H. M., Rogner, M., Kruip, J., Schlodder, E., Karapetyan, N. V., Dekker, J. P., and van Grondelle, R. (2001) Time-resolved fluorescence emission measurements of photosystem I particles of various cyanobacteria: A unified compartmental model, *Biophysical Journal* 81, 407-424.
75. Hayes, J. M., Matsuzaki, S., Rätsep, M., and Small, G. J. (2000) Red chlorophyll a antenna states of photosystem I of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803, *Journal of Physical Chemistry B* 104, 5625-5633.
76. Hsin, T. M., Zazubovich, V., Hayes, J. M., and Small, G. J. (2004) Red antenna states of PSI of cyanobacteria: Stark effect and interstate energy transfer, *Journal of Physical Chemistry B* 108, 10515-10521.

77. Byrdin, M., Rimke, I., Schlodder, E., Stehlik, D., and Roelofs, T. A. (2000) Decay kinetics and quantum yields of fluorescence in photosystem I from *Synechococcus elongatus* with P700 in the reduced and oxidized state: Are the kinetics of excited state decay trap-limited or transfer-limited?, *Biophysical Journal* 79, 992-1007.
78. Schlodder, E., Cetin, M., Byrdin, M., Terekhova, I. V., and Karapetyan, N. V. (2005) P700⁺- and ³P700-induced quenching of the fluorescence at 760 nm in trimeric Photosystem I complexes from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1706, 53-67.
79. Cometta, A., Zucchelli, G., Kavapetyan, N. V., Engelmann, E., Garlaschi, F. M., and Jennings, R. C. (2000) Thermal behavior of long wavelength absorption transitions in *Spirulina platensis* photosystem I trimers, *Biophysical Journal* 79, 3235-3243.
80. Croce, R., Zucchelli, G., Garlaschi, F. M., and Jennings, R. C. (1998) A thermal broadening study of the antenna chlorophylls in PSI-200, LHCI, and PSI core, *Biochemistry* 37, 17355-17360.
81. Hayes, J. M., Gillie, J. K., Tang, D., and Small, G. J. (1988) Theory for Spectral Hole Burning of the Primary Electron-Donor State of Photosynthetic Reaction Centers, *Biochimica et Biophysica Acta* 932, 287-305.
82. Zucchelli, G., Garlaschi, F. M., and Jennings, R. C. (1996) Thermal broadening analysis of the light harvesting complex II absorption spectrum, *Biochemistry* 35, 16247-16254.
83. Gibasiewicz, K., Szrajner, A., Ihalainen, J. A., Germano, M., Dekker, J. P., and van Grondelle, R. (2005) Characterization of low-energy chlorophylls in the PSI-LHCI supercomplex from *Chlamydomonas reinhardtii*. A site-selective fluorescence study, *Journal of Physical Chemistry B* 109, 21180-21186.
84. Gobets, B., Van Amerongen, H., Monshouwer, R., Kruij, J., Rogner, M., van Grondelle, R., and Dekker, J. P. (1994) Polarized Site-Selected Fluorescence Spectroscopy of Isolated Photosystem I Particles, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1188, 75-85.
85. Ihalainen, J. A., van Stokkum, I. H. M., Gibasiewicz, K., Germano, M., van Grondelle, R., and Dekker, J. P. (2005) Kinetics of excitation trapping in intact Photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Arabidopsis thaliana*, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1706, 267-275.
86. Melkozernov, A. N., Lin, S., and Blankenship, R. E. (2000) Femtosecond transient spectroscopy and excitonic interactions in Photosystem I, *Journal of Physical Chemistry B* 104, 1651-1656.
87. Melkozernov, A. N., Lin, S., and Blankenship, R. E. (2000) Excitation dynamics and heterogeneity of energy equilibration in the core antenna of photosystem I from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochemistry* 39, 1489-1498.

88. Melkozernov, A. N., Lin, S., Blankenship, R. E., and Valkunas, L. (2001) Spectral inhomogeneity of photosystem I and its influence on excitation equilibration and trapping in the cyanobacterium *Synechocystis sp* PCC6803 at 77 K, *Biophysical Journal* 81, 1144-1154.
89. Renger, T. (2004) Theory of optical spectra involving charge transfer states: Dynamic localization predicts a temperature dependent optical band shift, *Physical Review Letters* 93.
90. Kasha, M. (1950) Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules, *Discussions of the Faraday Society* 14-19.
91. Rebane, K. K. (1970) in *Impurity Spectra of Solids* Plenum Press, New York.
92. Jankowiak R. (2000) Fundamental Aspects of Fluorescence Line-Narrowing Spectroscopy, in *Shpol'skii Spectroscopy and Other Site-Selective Methods* (Gooijer, C. A. F. H. J. W., Ed.) pp 235-271, Wiley-Interscience, Weinheim.
93. Moerner, W. E. and Orrit, M. (1999) Illuminating single molecules in condensed matter, *Science* 283, 1670-1676.
94. Moerner, W. E. and Kador, L. (1989) Optical-Detection and Spectroscopy of Single Molecules in A Solid, *Physical Review Letters* 62, 2535-2538.
95. Draebenstedt, A., Hochaufösende Spektroskopie und Mikroskopie einzelner Moleküle und Farbzentren bei tiefen Temperaturen,(1999), TU Chemnitz.
96. Brown, R. H. and Twiss, R. Q. (1957) Interferometry of the Intensity Fluctuations in Light .1. Basic Theory - the Correlation Between Photons in Coherent Beams of Radiation, *Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences* 242, 300-324.
97. Brown, R. H. and Twiss, R. Q. (1958) Interferometry of the Intensity Fluctuations in Light .2. An Experimental Test of the Theory for Partially Coherent Light, *Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences* 243, 291-319.
98. Witt, I., Witt, H. T., Gerken, S., Saenger, W., Dekker, J. P., and Rögner, M. (1987) Crystallization of Reaction Center I of Photosynthesis Low-Concentration Crystallization of Photoactive Protein Complexes from the Cyanobacterium *Synechococcus. sp*, *Febs Letters* 221, 260-264.
99. Polm, M. and Brettel, K. (1998) Secondary pair charge recombination in photosystem I under strongly reducing conditions: Temperature dependence and suggested mechanism, *Biophysical Journal* 74, 3173-3181.
100. Trinkunas, G. and Holzwarth, A. R. (1994) Kinetic Modeling of Exciton Migration in Photosynthetic Systems .2. Simulations of Excitation Dynamics in 2-Dimensional Photosystem Core Antenna/Reaction Center Complexes, *Biophysical Journal* 66, 415-429.

101. Damjanovic, A., Vaswani, H. M., Fromme, P., and Fleming, G. R. (2002) Chlorophyll excitations in photosystem I of *Synechococcus elongatus*, *Journal of Physical Chemistry B* 106, 10251-10262.
102. Sener, M. K., Lu, D. Y., Ritz, T., Park, S., Fromme, P., and Schulten, K. (2002) Robustness and optimality of light harvesting in cyanobacterial photosystem I, *Journal of Physical Chemistry B* 106, 7948-7960.
103. Byrdin, M., Jordan, P., Krauss, N., Fromme, P., Stehlik, D., and Schlodder, E. (2002) Light harvesting in photosystem I: Modeling based on the 2.5-Ångstrom structure of photosystem I from *Synechococcus elongatus*, *Biophysical Journal* 83, 433-457.
104. Kratky, C. and Dunitz, J. D. (1977) Ordered Aggregation States of Chlorophyll *a* and Some Derivatives, *Journal of Molecular Biology* 113, 431-442.
105. Gibasiewicz, K., Ramesh, V. M., Lin, S., Redding, K., Woodbury, N. W., and Webber, A. N. (2003) Excitonic interactions in wild-type and mutant PSI reaction centers, *Biophysical Journal* 85, 2547-2559.
106. Laible, P. D., Zipfel, W., and Owens, T. G. (1994) Excited-State Dynamics in Chlorophyll-Based Antennae - the Role of Transfer Equilibrium, *Biophysical Journal* 66, 844-860.
107. Werst, M., Jia, Y. W., Mets, L., and Fleming, G. R. (1992) Energy-Transfer and Trapping in the Photosystem-I Core Antenna - A Temperature Study, *Biophysical Journal* 61, 868-878.
108. Bruggemann, B., Sznee, K., Novoderezhkin, V., van Grondelle, R., and May, V. (2004) From structure to dynamics: Modeling exciton dynamics in the photosynthetic antenna PS1, *Journal of Physical Chemistry B* 108, 13536-13546.
109. Flemming C., Charakterisierung der Antennensysteme von monomeren und trimeren Photosystem I Komplexen (Diplomarbeit),(1996), TU Berlin.
110. Hilbert, M., Wehling, A., Schlodder, E., and Walla, P. J. (2004) Two-photon-sensitized fluorescence and excitation spectra of photosystem I of *Thermosynechococcus elongatus*, *Journal of Physical Chemistry B* 108, 13022-13030.
111. Robinson, G. W. and Frosch, R. P. (1963) Electronic Excitation Transfer and Relaxation, *Journal of Chemical Physics* 38, 1187-1203.
112. Loudon, R. (1983) *The Quantum Theory of Light* Oxford University Press.
113. Kummer, S., Basche, T., and Bräuchle, C. (1994) Terrylene in P-Terphenyl - A Novel Single-Crystalline System for Single-Molecule Spectroscopy at Low-Temperatures, *Chemical Physics Letters* 229, 309-316.
114. Karukstis K.K. (1991) Chlorophyll Fluorescence as a physiological probe of the photosynthetic apparatus, in *Chlorophylls* (Scheer, H., Ed.) pp 769-795, CRC Press, Boca Raton.

115. Bowers, P. G. and Porter, G. (1967) Quantum Yields of Triplet Formation in Solutions of Chlorophyll, *Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences* 296, 435-441.
116. Bernard, J., Fleury, L., Talon, H., and Orrit, M. (1993) Photon Bunching in the Fluorescence from Single Molecules - A Probe for Intersystem Crossing, *Journal of Chemical Physics* 98, 850-859.
117. Chibisov, A. K., Slavnova, T. D., and Gorner, H. (2003) Effect of macromolecules and triton X100 on the triplet of aggregated chlorophyll in aqueous solution, *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 72, 11-16.
118. Gerken, U., Lupo, D., Tietz, C., Wrachtrup, J., and Ghosh, R. (2003) Circular symmetry of the light-harvesting 1 complex from *Rhodospirillum rubrum* is not perturbed by interaction with the reaction center, *Biochemistry* 42, 10354-10360.
119. Gerken, U., Spektroskopische Untersuchungen an einzelnen Lichtsammelkomplexen des Purpurbakteriums *R.rubrum* (Dissertation),(2003), Universität Stuttgart, 3. Physikalisches Institut.
120. Tietz, C., Untersuchung an einzelnen Pigmenten und Pigment-Protein-Komplexen (Dissertation),(2001), Universität Stuttgart, 3. Physikalisches Institut.
121. Kruip, J., Karapetyan, N. V., Terekhova, I. V., and Rogner, M. (1999) In vitro oligomerization of a membrane protein complex - Liposome-based reconstitution of trimeric photosystem I from isolated monomers, *Journal of Biological Chemistry* 274, 18181-18188.
122. Deinum, G., Kramer, H., Aartsma, T. J., Kleinherenbrink, F. A. M., and Amesz, J. (1991) Fluorescence Quenching in Heliobacterium-Chlorum by Reaction Centers in the Charge Separated State, *Biochimica et Biophysica Acta* 1058, 339-344.
123. Kleinherenbrink, F. A. M., Deinum, G., Otte, S. C. M., Hoff, A. J., and Amesz, J. (1992) Energy-Transfer from Long-Wavelength Absorbing Antenna Bacteriochlorophylls to the Reaction Center, *Biochimica et Biophysica Acta* 1099, 175-181.
124. Vrieze, J., Gast, P., and Hoff, A. J. (1993) The structure of the reaction center of photosystem I investigated with linear-dichroic absorbance-detected magnetic resonance at 1.2 K, in *Research in Photosynthesis* (Murata, N., Ed.) pp 553-556, Kluwer, Dordrecht.
125. Delepelaire, P. and Bennoun, P. (1978) Energy-Transfer and Site of Energy Trapping in Photosystem-I, *Biochimica et Biophysica Acta* 502, 183-187.
126. Shipman, L. L. and Housman, D. L. (1979) Förster Transfer Rates for Chlorophyll *a*, *Photochemistry and Photobiology* 29, 1163-1167.
127. Golbeck, J. H. (1987) Structure, Function and Organization of the Photosystem-I Reaction Center Complex, *Biochimica et Biophysica Acta* 895, 167-204.

128. Hastings, G., Hoshina, S., Webber, A. N., and Blankenship, R. E. (1995) Universality of Energy and Electron-Transfer Processes in Photosystem-I, *Biochemistry* 34, 15512-15522.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Diese Promotion wurde am 3. Physikalischen Institut der Universität Stuttgart durchgeführt. Mein Dank gilt zu allererst Prof. Dr. Jörg WRACHTRUP, der mir als Biochemikerin die Möglichkeit gewährt hat, an einem Physikalischen Institut zu promovieren.

Prof. Dr. Emil RODUNER danke ich für die Übernahme des Mitberichts und den Zuspruch den Schritt in die Interdisziplinarität gewagt zu haben. Ebenso danke ich Prof. Dr. Hans D. WOLF, der sich bereit erklärt hat, den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Fedor JELEZKO für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und für die unermüdliche Hilfsbereitschaft und nicht endende Geduld.

Eine wahrlich schwere Aufgabe hatte Andrew AIRD vollbracht, der stets versucht hat, mir die Denkweise eines Physikers näher zu bringen und nie aufgegeben hat. Zudem bin ich ihm zu tiefstem Dank verpflichtet, da er mir zu jeder Zeit sowohl wissenschaftlich als auch privat zur Seite stand.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich Lioba ELLI-MEIER und Dr. Sandra BARTH. Es ist wirklich schön zu wissen, dass es Menschen gibt, die einen auch in schwierigen und traurigen Situationen nicht alleine lassen.

Allen Mitarbeitern des 3. Physikalischen Instituts der Universität Stuttgart danke ich für die angenehme Atmosphäre.

Abschließend danke ich meinen Eltern, die immer hinter mir gestanden, mich ermutigt und immer an mich geglaubt haben.