

Humboldt-Universität zu Berlin

# **Zur Kinetik von Singulett- und Triplett- Anregungen im Lichtsammelkomplex des Photosystems II höherer Pflanzen (LHCII).**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

im Fach Physik

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

von  
Diplom Physiker René Schödel  
geboren am 6. November 1966 in Ludwigsfelde

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. J. Rabe

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Voigt (Humboldt-Universität zu Berlin)  
2. Prof. Dr. G. Renger (Technische Universität Berlin)  
3. Prof. Dr. P. Hoffmann (Humboldt-Universität zu Berlin)

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 1999



---

## Inhalt

---

<b>1. Grundlagen, verwendete Proben und Allgemeines zum experimentellen Aufbau</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Grundlagen</b>	<b>7</b>
1.1.1. Allgemeines zur Photosynthese	7
1.1.2. Die Photosynthese höherer Pflanzen	8
1.1.3. Der Lichtsammelkomplex des Photosystems II (LHCII)	10
1.1.3.1. Struktur und Funktion des LHCII	10
1.1.3.2. Die Pigmente des LHCII	11
1.1.3.3. Anregungszustände und Energietransfer im LHCII	13
<b>1.2. Charakterisierung der verwendeten Proben</b>	<b>17</b>
1.2.1. Vorbemerkung	17
1.2.2. LHCII Präparation	17
1.2.3. Chl a und Chl b in Lösung	18
<b>1.3. Allgemeines zum experimentellen Aufbau und zum Ablauf der Messungen</b>	<b>19</b>
1.3.1. Verwendete Laser	19
1.3.2. Die Stabilisierung des Anregungsgebietes	20
1.3.3. Die Bestimmung der Anregungsintensität in definierten Bereichen der Probenebene	22
1.3.4. Aufbau zur Vermeidung von Meß- Artefakten bei Pump-Test-Messungen der Transmission	23
1.3.5. Verarbeitung der elektronischen Detektorsignale	25
<b>2. Multiple Singulett-Anregungen im LHCII</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Einleitung</b>	<b>27</b>
<b>2.2. Die Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII als Funktion der Anregungsintensität</b>	<b>31</b>
2.2.1. Das Prinzip der räumlichen Selektivität	31
2.2.2. Meßaufbau	33
2.2.3. Ergebnisse der Messungen der intensitätsabhängigen Fluoreszenz	34
2.2.3.1. Wahl der Anregungswellenlänge	34
2.2.3.2. Einfluß der Anregungsintensität auf die Fluoreszenzspektren	35
2.2.3.3. Die normierte Fluoreszenzausbeute von solubilisiertem LHCII	35
2.2.3.4. Die normierte Fluoreszenzausbeute von Chl a in Lösung	36
2.2.4. Beschreibung der intensitätsabhängigen Fluoreszenz für Chl a in azetonischer Lösung	37

2.2.5. Theoretische Beschreibung der intensitätsabhängigen Fluoreszenz für solubilisierten LHCII	39
2.2.5.1. Ein Pauli-Master Gleichungsmodell	39
2.2.5.2. Mathematische Grenzfälle des Pauli-Master Gleichungsmodells und deren Anwendbarkeit	46
Das „Cluster - Modell“ für solubilisierten LHCII	46
Ratengleichungen mit quadratischen Termen	48
2.2.6. Vergleich mit den Ergebnissen anderer Meßmethoden	51
2.2.6.1. Abklingkinetik der Fluoreszenz	51
2.2.6.2. Die intensitätsabhängige Absorption	51
2.2.6.3. sub-ps-Kinetik von Absorptionsänderungen	54
<b>2.3. Schlußfolgerungen für den Energietransfer im LHCII</b>	<b>56</b>
<b>3. Triplett-Zustände im LHCII</b>	<b>59</b>
3.1. Einleitung	59
3.2. Eigenschaften von Chlorophyll-Tripletts in organischem Lösungsmittel und in vitro	61
3.2.1. Experimenteller Aufbau zur Charakterisierung von Triplett-Zuständen	61
3.2.2. T – S-Spektren von Chl a und Chl b in azetonischer Lösung	63
3.2.3. Das T – S-Spektrum von solubilisiertem LHCII	64
3.2.4. Relaxation von Karotinoid-Tripletts in solubilisiertem LHCII	65
3.3. Der Einfluß der Pump-Intensität auf die Karotinoid-Triplett-Besetzung in solubilisiertem LHCII	67
3.3.1. Die Relaxation von Karotinoid-Tripletts bei verschiedenen Pump-Impuls-Intensitäten	67
3.3.2. Die Karotinoid-Triplett-Besetzung als Funktion der Pump-Intensität	68
3.3.2.1. Wege der Karotinoid-Triplett-Bildung in solubilisiertem LHCII bei hohen Pump-Intensitäten	69
3.4. Untersuchungen zur ns-Kinetik der Karotinoid-Triplett-Bildung im LHCII	73
3.4.1. Meßaufbau mit optischer Verzögerung	73
3.4.2. Messungen an Chl b in Lösung zur Bestimmung der Apparatefunktion	74
3.4.3. Messungen mit optischer Verzögerung an solubilisiertem LHCII, kinetische Beschreibung und Diskussion	77
3.4.4. Schlußfolgerungen für die Funktionalität des LHCII	82
3.5. Untersuchungen zum Einfluß gebildeter Tripletts auf die Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII	83
3.5.1. Meßaufbau für Pump-Test-Messungen der Fluoreszenz	83
3.5.2. Ergebnisse der Messungen der Test-Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII als Funktion der Pump-Impuls-Intensität sowie der Verzögerungszeit	85
3.5.3. Die Löschung der Test-Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII auf einer $\mu$ s Zeitskala	86
3.5.4. Vergleichende Messungen von $\Delta OD$ bei 507 nm und 675 nm	89
3.5.5. Identifikation der Fluoreszenz-löschenden Populationen	91

3.5.6. Bestimmung der Ratenkonstanten für die Löschung der Fluoreszenz durch Triplettts in solubilisiertem LHCII	93
3.5.6.1. Karotinoid-Triplett-induziertes Fluoreszenz-Quenching bei geringen Pump-Intensitäten	93
3.5.6.2. Chlorophyll-Triplett-induziertes Fluoreszenz-Quenching	94
3.5.7. Schlußfolgerungen für die Funktionalität des LHCII	95
<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
1. Multiple Singulett-Anregungen im LHCII	97
2. Triplett-Zustände im LHCII	99
3. Singulett-Triplett-Wechselwirkung	101
<b>Anhang</b>	<b>103</b>
A1 Berechnung eines effektiven (molekularen) Absorptionsquerschnittes von Chl a in LHCII bei 645 nm	103
A2 Berücksichtigung des zeitlichen Anregungsverlaufes bei der Berechnung von $\Delta OD$	104
a) keine Verzögerung zwischen Pump- und Test-Impuls	104
b) Verzögerung zwischen Pump- und Test-Impuls	104
A3 Berücksichtigung der Abnahme der Pump-Intensität innerhalb der Probe bei Messungen von $\Delta OD$ als Funktion von $I_p$	105
A4 Abschätzung der relativen Karotinoid-Triplett-Besetzung in solubilisiertem LHCII aus $\Delta OD$ bei 507 nm	106
A5 Abschätzung der relativen Chlorophyll-Triplett-Besetzung in solubilisiertem LHCII aus $\Delta OD$ bei 675 nm	107
A6 Die zeitliche Entwicklung von Singulett- und Triplett- Zuständen von Chl b in Lösung	108
A7 Der Einfluß der Karotinoid-Grundzustandsabsorption im LHCII bei 507 nm	109
A8 Einfluß der Pump-Impuls Intensität auf den Zeitverlauf der (angeregten) Chlorophyll-Singulett-Zustände	109
A9 Illustration der zeitlichen Entwicklung von Triplett-Zuständen in solubilisiertem LHCII	110
<b>Literatur</b>	<b>113</b>
Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit	120
Bereits erschienene Arbeiten:	120
In Vorbereitung:	120
<b>! Danksagung !</b>	<b>121</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>123</b>
<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>125</b>

# 1. Grundlagen, verwendete Proben und Allgemeines zum experimentellen Aufbau

---

## 1.1. Grundlagen

---

### 1.1.1. Allgemeines zur Photosynthese

---

Die Photosynthese dient der Umwandlung solarer Energie in freie chemische Reaktionsenthalpie und deren Speicherung in stabilen chemischen Verbindungen. Eine sehr allgemeine Form der Definition der Photosynthese ist durch folgende Gleichung gegeben:



Dabei ist  $2H_2A$  ein oxidierbares Substrat (in dieser allgemeinen Form repräsentiert es eine große Anzahl organischer und anorganischer Verbindungen).  $CH_2O$  stellt eine Kohlenwasserstoffverbindung dar. Die obige Reaktion kann als Reduktion von  $CO_2$  durch Wasserstoff aufgefaßt werden, der durch  $H_2A$  bereitgestellt wird. Die verbrauchte Lichtenergie wird dadurch in chemische Bindungsenergie von Kohlenwasserstoffmolekülen umgewandelt.

Die bei der Photosynthese ablaufenden Prozesse untergliedern sich in Licht- und Dunkelreaktionen. Lichtreaktionen umfassen die Absorption von Licht und eine Folge von Energietransfer- sowie Elektronentransferschritten. Sie ermöglichen die Oxidation von  $H_2A$  unter Bildung von reduzierten energietragenden chemischen Komponenten NADPH/NADH und ATP. Die Dunkelreaktion wird durch NADPH/NADH und ATP angetrieben. Dabei wird Kohlenstoff gebunden, was zur Bildung von organischen Molekülen und zum Abbau von  $CO_2$  führt.

Photosynthetische Organismen können in zwei Gruppen gegliedert werden: anoxygene und oxygene. Letztere produzieren Sauerstoff und nutzen deshalb  $H_2O$  als Elektronendonator. Dagegen finden bei der anoxygenen Photosynthese (anaerobe Bakterien) eine Vielzahl von anorganischen und organischen Substanzen als Verwendung (z. B.  $H_2S$ , aber auch organische Säuren).

Oxygene Organismen sind durch das Vorhandensein von Chl *a* gekennzeichnet. Unterschiede gibt es hinsichtlich Zellorganisation sowie sekundärer Pigmentierung. Zu den oxygenen Organismen zählen:

- Höhere Pflanzen und Grünalgen (enthalten Chl *b*)
- Rotalgen (enthalten Phycobiline)
- Braunalgen (enthalten Chl *c*)
- Chryptophyten (enthalten Phycobiline und Chl *c*)
- Cyanobakterien bzw. Blaualgen (enthalten Phycobiline)
- Prochlorophyten (enthalten Chl *b*)

Anoxygene Organismen (Photosynthesebakterien) können entsprechend ihrem Reaktionszentrum in folgende Klassen eingeteilt werden (zur Übersicht siehe Clayton und Sistrom., 1983; Renger, G., 1999a):

- Purpurbakterien, grüne fädige Bakterien
- grüne Schwefelbakterien und Heliobakterien

### **1.1.2. Die Photosynthese höherer Pflanzen**

---

Der Photosyntheseapparat höherer Pflanzen befindet sich in speziellen Zellorganellen, den Chloroplasten. Diese sind linsenförmig und haben einen Durchmesser von 4 - 8  $\mu\text{m}$ . Im Inneren sind die Chloroplasten von einem Netz von Membranen durchzogen, den Thylakoiden. Die Thylakoidmembranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht. Man unterscheidet lamellare (Stroma-) und gestapelte (Grana-) Thylakoide. In diese Membranen sind die Bestandteile des Photosyntheseapparates eingebettet, die sich wiederum aus verschiedenen Pigment-Protein Komplexen zusammensetzen (für eine detaillierte Darstellung siehe Irrgang, 1999).

Bei allen oxygenen Photosyntheseorganismen ist der lichtgetriebene Elektronentransport vom  $\text{H}_2\text{O}$  zu  $\text{NADP}^+$  durch das Zusammenspiel zweier Photosysteme (PS), PSI und PSII gekennzeichnet. Ausgangspunkt ist die Absorption von Photonen durch die Pigmentmoleküle des Antennensystems (Chl *a*, Chl *b* und Karotinoide). Bei höheren Pflanzen ist der Hauptteil der nicht kovalent gebundenen Antennenpigmente in die sogenannten Lichtsammelkomplexe (***Light Harvesting Complexes***, LHC) eingebaut. Man unterscheidet hierbei den Lichtsammelkomplex des Photosystems I (LHCI) sowie den des Photosystems II (LHCII). Durch den Transfer der durch Licht gebildeten Anregungszustände wird die Energie zu den photochemisch aktiven Pigmenten weitergeleitet (siehe Renger, G., 1992, 1999a, b). Diese sind in den sogenannten Reaktionszentren lokalisiert und werden dem PSI bzw. dem PSII zugeordnet. Das photochemisch aktive Pigment des PSI besteht aus einem Chl *a* Dimer, das nach seinem Absorptionsmaximum bei etwa 700 nm P700

benannt wird. Das entsprechende Pigment im PSII wird als P680 bezeichnet. Da es sich auch hier sehr wahrscheinlich um ein Dimer handelt, wird häufig in Analogie zu den Reaktionszentren der anoxygenen Photosynthesebakterien die Bezeichnung „*special pair*“ verwendet.

Die elektronisch angeregten Singulett-Zustände induzieren eine Kette von Elektronen- und Protonen-Transportreaktionen. Dabei wird von dem  $^1\text{P680}^*$  zunächst ein Elektron auf den primären Elektronenakzeptor, das Pheophytin (Pheo), übertragen und das so gebildete Radikalpaar  $\text{P680}^{+\bullet}\text{Pheo}^-$  durch einen schnellen Transfer zum Chinonakzeptor,  $\text{Q}_\text{A}$ , stabilisiert. Das auf diese Weise erzeugte  $\text{Q}_\text{A}^{\bullet-}$  reduziert ein zweites Chinon  $\text{Q}_\text{B}$ . Ist dieses zweifach reduziert, spaltet es sich vom Reaktionszentrum ab und diffundiert in der Thylakoidmembran zum Cytochrom  $\text{b}_6\text{f}$  Komplex. Von dort werden die Elektronen über das Plastocyanin (PC) zum Photosystem I transportiert, wo das  $\text{P700}^{+\bullet}$  wieder reduziert wird. Das Elektron des (vorher) oxidierten P700 wird über eine Kette von Elektronenakzeptoren zu den terminalen Eisen-Schwefel-Zentren übergeben. An der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (FNR) wird letztlich NADP<sup>+</sup> zu NADPH reduziert. Die Reduktion von  $\text{P680}^{+\bullet}$  erfolgt durch einen Tyrosin-Rest, der in seiner oxidierten Form seinerseits durch Elektronen reduziert wird, die durch die Oxidation von Wasser bereitgestellt werden. Weil die Oxidation von Wasser ein vier-Elektronen Prozeß ist (Wasserspaltung:  $2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ ), ist eine viermalige Anregung des P680 erforderlich, um ein Sauerstoffmolekül zu erzeugen.

Die Reaktionszentren sind anisotrop in die Thylakoidmembran so eingebaut, daß die Akzeptorseite ( $\text{Q}_\text{A}$ ,  $\text{Q}_\text{B}$ ) zum Cytoplasma und die Donatorseite zum Periplasma hin orientiert sind. Dadurch führt der lichtinduzierte Ladungstransfer zum Aufbau einer elektrischen Potentialdifferenz über die Membran. Die mit den Redoxreaktionen gekoppelte Aufnahme und Abgabe von Protonen findet damit an unterschiedlichen Seiten der Membran statt. Die dadurch hervorgerufene Konzentrationsdifferenz für Protonen liefert zusammen mit der elektrischen Potentialdifferenz die Triebkraft für die ATP-Synthase aus ADP und Phosphat.

Die hier zusammengefaßten Reaktionsfolgen sollen nur einen Überblick über die Vielzahl von Elektronentransferschritten geben, die mit der Lichtreaktion verbunden sind. An diesem Teilgebiet der Photosyntheseforschung besteht großes Interesse, um insbesondere den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion besser zu verstehen. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Messungen und aus den Ergebnissen abgeleiteten Modelle beschränken sich auf die Prozesse des Anregungsenergie transfers in der Antenne. Deshalb wird auf eine Darstellung der Prozesse der sich anschließenden Dunkelreaktion, die letztlich zur Bildung von Kohlenwasserstoffmolekülen führt, verzichtet.



### 1.1.3. Der Lichtsammelkomplex des Photosystems II (LHCII)

#### 1.1.3.1. Struktur und Funktion des LHCII

Das Schlüsselkonzept der Lichtabsorption und der Umwandlung in chemische Energie wurde durch Experimente von Emerson und Arnold (1932) entwickelt. Diese entdeckten an *Chlorella*-Zellen, daß an der Bildung eines Sauerstoffmoleküls in einer „*photosynthetic unit*“ mindestens 2500 Chlorophyllmoleküle beteiligt sind. Berechnungen von Gaffron und Wohl (1936) führten zu der Schlußfolgerung, daß der überwiegenden Mehrzahl der Chlorophyllmoleküle eine „Antennen“-Funktion zukommt (für eine Übersicht siehe Renger, 1992, 1999b). Der Energietransfer zum Reaktionszentrum ist äußerst effektiv. Von 100 absorbierten Photonen lösen etwa 98 eine Ladungstrennung im *special pair* aus (Bassi and Dainese, 1990).

Um die zur Verfügung stehende Sonnenstrahlung optimal auszunutzen sowie eine Anpassung an variierende Lichtverhältnisse zu ermöglichen, bildeten sich im Laufe der Evolution geeignete Antennensysteme heraus. Diese bestehen aus Pigment-Protein-Komplexen, die entweder in die Thylakoidmembran eingebettet sind (intrinsisch) oder aber als extrinsische Einheiten an die Membran gebunden sind (siehe Gantt, 1986; Thornber et al., 1991; Irrgang, 1999).

Der am häufigsten vorkommende Lichtsammelkomplex (LHC) ist der LHCII, der dem Photosystem II zugeordnet wird <sup>/1</sup>. In ihm sind etwa 50 % des Gesamtchlorophyllgehaltes der Thylakoidmembran gebunden.

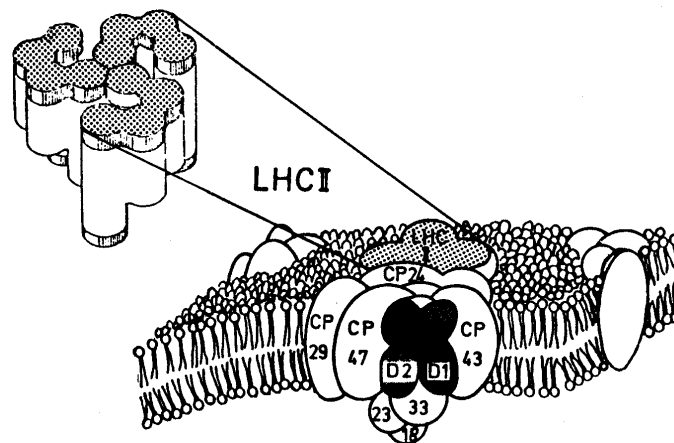


Abbildung 1

Vereinfachte Darstellung der Einbettung des LHCII in die Thylakoidmembran höherer Pflanzen (Quelle: Renger, 1992).

Der LHCII kann aus dem Photosyntheseapparat isoliert und damit für sich

<sup>/1</sup> Ein Teil des LHCII (der sich in seinen biochemischen Eigenschaften nicht vom übrigen LHCII unterscheidet) wird mittlerweile als selbständiger Membran-Proteinkomplex angesehen und ist damit nicht mehr nur dem PSII zugeordnet.

genommen untersucht werden. Durch die Entwicklung einer Vielfalt von biochemischen und spektroskopischen Untersuchungsmethoden konnten immer detailliertere Kenntnisse über den LHCII gewonnen werden (siehe z. B. Hemelrijk et al., 1992). Dieser ist, wie jeder Pigment-Protein-Komplex, als eine Einheit zu betrachten. Das heißt, die spektroskopischen Eigenschaften des LHCII werden sowohl durch die Pigmente selbst, als auch durch deren spezifische Anordnung bestimmt. Letztere wird durch die Proteinmatrix realisiert, in der die Pigmente nichtkovalent eingebunden sind.

Detaillierte Informationen über die Anordnung der Pigmente in der Proteinmatrix liefert das von Kühlbrand et al. (1994) auf der Grundlage von Elektronenbeugungsuntersuchungen entwickelte Strukturmodell. Dabei war es gelungen, 2-dimensionale Kristalle aus isoliertem LHCII zu erzeugen und durch die Methode der Elektronen-Kristallographie ein Modell mit 3,4 Å Auflösung zu erhalten. Bei dieser Auflösung ist es zwar noch nicht möglich, alle Pigmente genau zuzuordnen (nur indirekte Unterscheidung von Chl *a* und Chl *b*), jedoch konnten grundlegende Erkenntnisse gewonnen bzw. bestätigt werden. Der LHCII weist demnach eine trimere Struktur dreier symmetrisch angeordneten Monomere auf. Jedes Monomer besitzt drei Membran-spannende  $\alpha$ -Helizes, mindestens 12 Chlorophylle (7 Chl *a* und 5 Chl *b*) und zwei Karotinoide. Die Chlorophyllmoleküle sind ungefähr in zwei Ebenen angeordnet und entsprechen in etwa der Ober- bzw. Unterseite der Lipid-Doppelschicht.

### **1.1.3.2. Die Pigmente des LHCII**

---

Den größten Beitrag zur Absorption des Lichts in höheren Pflanzen liefern die Chlorophylle. Abb. 2 stellt die gemessenen Absorptionsspektren der in LHCII vorkommenden Chl *a* und Chl *b*-Moleküle (in azetonischer Lösung) dem Absorptionsspektrum des LHCII gegenüber. Die dabei verwendeten Chl-Konzentrationen in einer 1 mm Probenküvette waren vergleichbar groß (0,1 mg/ml für Chl *a* und Chl *b* in Lösung bzw. 0,2 mg(Chl *a* + *b*)/ml für LHCII). Zusätzlich ist das Absorptionsspektrum von den in LHCII vorkommenden Karotinoiden (siehe Kap. 1.2.2. auf S. 17), eingezeichnet (aus Siefermann-Harms, 1987; willkürliche OD-Einheiten).

Es wird ersichtlich, daß die spektralen Eigenschaften von Chl *a*, *b* und den Karotinoiden prägend für das Absorptionsverhalten des LHCII sind. Demnach wird das Absorptionsmaximum des LHCII bei 645 nm dem Chl *b* und jenes bei 675 nm dem Chl *a* zugeordnet. Die Verschiebung zu jeweils höheren Wellenlängen bei LHCII wird auf den Einfluß der Proteinumgebung (Unterschied zum organischen Lösungsmittel) sowie andere Wechselwirkungseffekte (siehe unten) zurückgeführt.

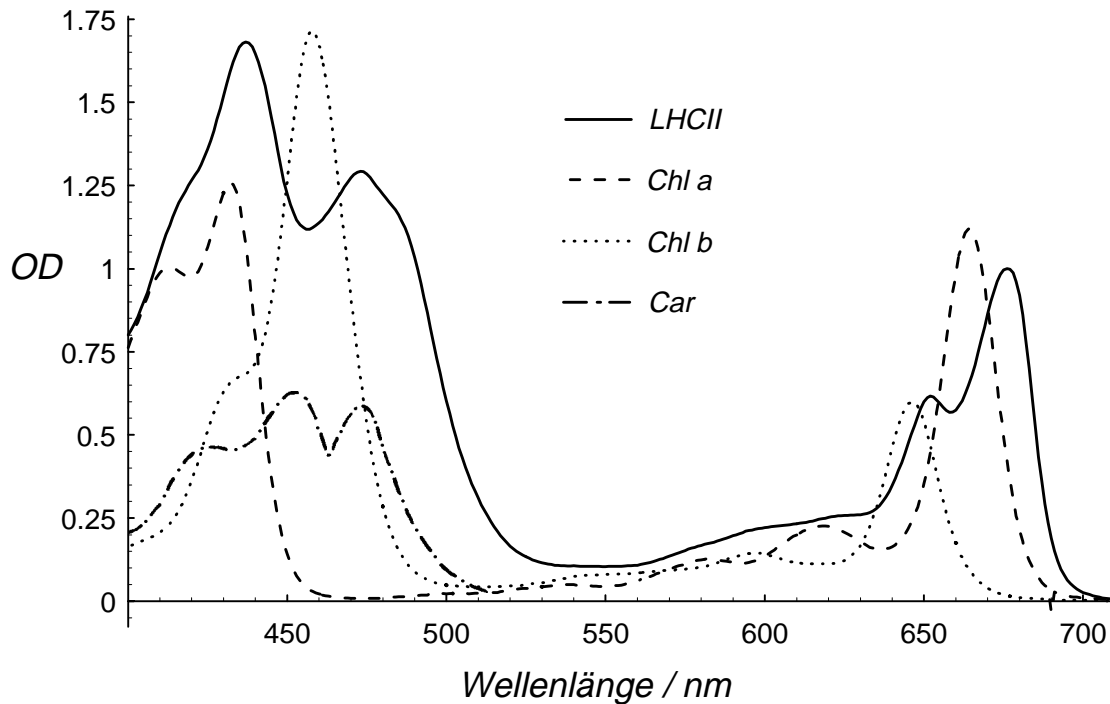


Abbildung 2

Raumtemperatur-Absorptionsspektren von Chl *a* und Chl *b* (in azetonischer Lösung; eigene Messung mit ca. 0.1 mg Chl *a*, *b* /ml) sowie den in LHCII vorkommenden Karotinoiden (aus Siefertmann-Harms, 1987) in einer gemeinsamen Darstellung mit solubilisiertem LHCII (eigene Messung mit ca. 0.2 mg Chl *a* + *b*/ml). Eigene Messungen mit Shimadzu UVPC

Bei der Charakterisierung des Absorptionsspektrums von LHCII hat sich in der Literatur ein Sprachgebrauch durchgesetzt, der sehr stark an die Eigenschaften von Chl *a* und Chl *b* angelehnt ist. So wird die breite Bande im blauen Bereich des Absorptionsspektrums des LHCII als Soret-Bande bezeichnet, die in ihrer Bedeutung auf den Singulett-Übergang  $S_0 \rightarrow S_3$  von Chl *a/b* zurückgeht. Analog dazu sind Bezeichnungen wie  $Q_x$  und  $Q_y$ -Bande geläufig, um den roten Spektralbereich des Absorptionsspektrums von LHCII zu benennen. Diese gehen auf die Singulett-Übergänge  $S_0 \rightarrow S_1$  ( $Q_y$ ) sowie  $S_0 \rightarrow S_2$  ( $Q_x$ ) von Chl *a/b* Molekülen zurück. Das Absorptionsspektrum des LHCII läßt sich in Sub-Banden zerlegen. Letztere werden oftmals verschiedenen sogenannten "Chlorophyll-Formen" zugeordnet, die ihre spektrale Position durch die jeweils individuelle Proteinumgebung erhalten sollen und damit "pigment-pools" darstellen (z. B. Connelly et al., 1997a). Durch Einbeziehung von weiteren spektroskopischen Untersuchungsmethoden (LD-, CD-, und Starkeffekt-Spektroskopie) wurden bis zu 12 "Chlorophyll – Formen" pro Monomer erhalten (Nußberger et al. 1994). Damit wurde jedem einzelnen Chlorophyllmolekül im Monomer genau eine Bande im Absorptionsspektrum zugeordnet. Die Besetzung der angeregten Zustände der spektralen Formen von Chl *a* ist, unabhängig von der Anregungswellenlänge, in etwa thermisch verteilt, d.h. sie nimmt eine Boltzmann-Verteilung ( $\propto e^{-h\nu/T}$ ) ein (Schrötter et al., 1994; Kehrberg et al., 1995; Voigt et al., 1996).

Der Begriff "Chlorophyll-Formen" wird ebenfalls im Zusammenhang mit Zuständen exzitonisch gekoppelter Pigmente (siehe Kapitel 1.1.3.3.) gebraucht (Lokstein et al., 1995).

Einen zusätzlichen Beitrag zur Absorption des Lichtes im blauen und grünen Spektralbereich liefern Karotinoide (zur Übersicht siehe Siefermann-Harms; 1985; Frank und Cogdell, 1996). Im LHCII werden die Xanthophylle Lutein, Neoxanthin als auch Violaxanthin nachgewiesen. Die aufgenommene Energie wird sehr effektiv zu den Antennenchlorophyllen (Peterman et al., 1997b) und möglicherweise auch direkt zum Reaktionszentrum transferiert (Connelly et al., 1997b). Neben ihrer Funktion als zusätzliche Lichtabsorber sind Karotinoide auch wichtig für den strukturellen Zusammenhalt des LHCII (Heinze et al., 1997). Karotinoide spielen ebenfalls eine Schlüsselrolle im Violaxanthin-Zeaxanthin Zyklus beim Mechanismus des nichtphotochemischen Quenching (Lokstein et al., 1994; Demming-Adams et al., 1995; Horton et al., 1996).

Die wichtigste Funktion der Karotinoide ist jedoch der Schutz gegen den toxischen Singulett-Sauerstoff (zur Übersicht siehe Siefermann-Harms, 1987). In dieser Rolle üben sie eine Doppelfunktion aus: Erstens sorgen sie sehr effektiv für den Abbau von Chlorophyll-Triplets ( $^3\text{Chl}$ ), die sonst zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führen würden. Zweitens sind sie in der Lage, vorhandenen Singulett-Sauerstoff direkt abzubauen (Foote, 1976). Aus beiden Reaktionen gehen Karotinoid-Triplets ( $^3\text{Car}$ ) hervor. Diese relaxieren strahlungslos in den Grundzustand. Der Triplet-Transfer von  $^3\text{Chl}$  zu Car ist Bestandteil der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit (siehe Kap. 3. auf S. 59 und insbesondere Kap.3.4. auf S. 73).

### **1.1.3.3. Anregungszustände und Energietransfer im LHCII**

---

Durch die Absorption von Photonen werden elektronische Anregungszustände generiert, die im intakten Photosyntheseapparat zu den Reaktionszentren weitergeleitet werden. Die Lokalisation der Anregungsenergie am Reaktionszentrum wird als "*trapping*" bezeichnet. Das photochemische *trapping* durch das P680 ist ein effektiver Prozeß (zur Übersicht siehe Renger, G., 1992, 1999; Holzwarth, 1989; van Grondelle et al., 1994). Die *trapping*-Zeiten sind kürzer (ps Bereich) als die reziproken Zeitkonstanten der Relaxation der ersten angeregten Singulett-Zustände im LHCII (einige ns). Es wurde gezeigt, daß es sich beim PSII um ein sogenanntes „trap-limitiertes“ System handelt (siehe Renger, G., 1992). Durch das photochemische *trapping* werden die Reaktionszentren in ein Radikalpaar überführt und bleiben damit für eine gewisse Zeit für weiteres photochemisches *trapping* „geschlossen“. Anregungen, die währenddessen erzeugt werden, diffundieren entweder solange (Energietransfer), bis sie auf ein „offenes“ Reaktionszentrum stoßen oder sie werden durch nichtphotochemische Abbaukanäle (Fluoreszenz, strahlungslose Prozesse) in den elektronischen Grundzustand überführt. Gleiches gilt für isolierte LHCII-Komplexe, da diese keine Reaktionszentren enthalten.

Trotz zahlreicher experimenteller und theoretischer Untersuchungen werden die Energietransferschritte und die Rolle der strukturellen Organisation im LHCII noch immer nicht hinreichend gut verstanden. Entsprechend dem Kühlbrandt'schen Modell (siehe oben) liegen die Mittelpunktsabstände benachbarter Pigmente im Bereich von 9 - 14 Å. Damit sind diese vergleichbar mit den geometrischen Ausdehnungen der Pigmente selbst, und deshalb ist zu erwarten, daß die gegenseitige Pigment-Pigment-Wechselwirkungen einen Einfluß auf die Energiezustände ausübt. Tatsächlich gibt es zahlreiche experimentelle und theoretische Untersuchungen, die einen starken Einfluß der exzitonischen Wechselwirkung zwischen den Pigment-Zuständen vermuten lassen. Tieftemperatur-CD-Spektren an LHCII (Kwa et al.; 1992) zeigen, daß eine komplizierte Struktur vorliegt, die als Summe von mehreren exzitonischen Zuständen interpretiert werden kann. Nussberger et al. (1994) kamen zu dem Ergebnis, daß eine exzitonische Wechselwirkung sogar dann eine Rolle spielt, wenn sich die (wechselwirkenden) Pigmente in verschiedenen monomeren Untereinheiten des LHCII befinden. Schubert et al. (1997) vermuten, daß sich die Ergebnisse der Messungen an LHCII, die mittels NPLF – Spektroskopie <sup>/2</sup> gewonnen wurden, mit einem Modell verstehen lassen, das die exzitonische Kopplung zwischen den Chlorophyllen berücksichtigt.

Der Charakter der Anregungszustände innerhalb des LHCII ist jedoch bis heute nicht hinreichend geklärt. Grund dafür ist die Unkenntnis der genauen Geometrie der Übergangsdipolmomente sowie die Vielzahl von Wechselwirkungsmöglichkeiten und Umgebungseffekten. Insbesondere ist ungeklärt, ob die exzitonische Kopplung von Pigmenten eine Delokalisierung der Anregungsenergie über mehrere Pigmente ermöglicht. Offene Fragen gibt es auch bezüglich der Rolle der Proteinschwingungen beim Anregungsenergietransfer.

Zur quantenmechanischen Charakterisierung von angeregten Zuständen müssen alle diese Wechselwirkungen in den Hamilton-Operator einbezogen werden. Dies stellt eine extreme Herausforderung dar, der sich die Theoretische Physik mit zunehmendem Interesse widmet (z. B. Mukamel and Rupasov 1995, Renger, T und May, 1997). Viele quantentheoretische Studien gehen von einer Coulomb-Wechselwirkungen in Punktdipolnäherung zwischen verschiedenen Pigmenten aus (siehe Renger, T, 1998 und darin enthaltene Zitate). In diesem Bild sind Prozesse wie Exzitonen-Transfer sowie die Annihilation (Fusion) von Exzitonen einheitlich durch Dichtematrixelemente beschreibbar.

Aus jüngsten Modellrechnungen wurde geschlossen, daß jeweils Paare aus Chl *a* und Chl *b* in sehr engem Kontakt zueinander stehen und damit Hetero-Dimere bilden Renger, T, 1998. Es war jedoch noch nicht möglich, die Wechselwirkung des Dimers mit den restlichen Pigmenten des LHCII zu berücksichtigen oder gar eine

---

<sup>/2</sup> NPLF steht für "Nichtlineare Polarisationspektroskopie in der Frequenzdomäne"

Beschreibung zu finden, die die Pigmente im LHCII als Multimer auffaßt. /<sup>3</sup>.

Neben der Coulomb'schen Wechselwirkung werden auch andere Pigment–Pigment-Wechselwirkungen innerhalb von Lichtsammelkomplexen diskutiert (z. B. Harcourt et al., 1994; Scholes et al., 1997): i) In Abhängigkeit von der Überlappung der Wellenfunktionen (und damit vom geometrischen Abstand) können Ladungstransfer-Wechselwirkungen einen signifikanten Anteil an der elektronischen Wechselwirkung darstellen ii) Auch Dexter-Typ Wechselwirkungen führen zu einer Delokalisation der Elektronen zwischen den (wechselwirkenden) Pigmenten und zu einer Verzerrung der Elektronendichte.

Ungeachtet der tatsächlich vorherrschenden Komplexität der Zusammenhänge ist eine einfache Charakterisierung der elektronischen Anregungszustände des LHCII anhand der Zuordnung zu den Zuständen der beteiligten Pigmentmoleküle üblich. Abb. 3 zeigt das sich daraus ergebende vereinfachte Bild aller am (Singulett-) Anregungsenergietransfer (*Excitation Energy Transfer*, EET) beteiligten Zustände der Pigmente.

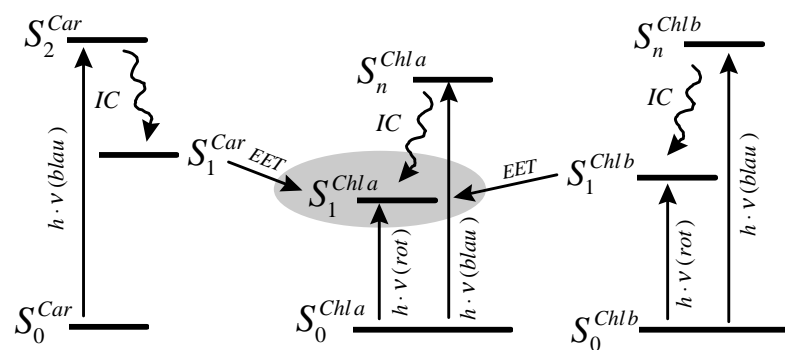


Abbildung 3

Singulett-Anregungszustände ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_n$ ) im LHCII. In dieser Darstellung wird die Bedeutung der Pigment-Pigment und Pigment-Protein Wechselwirkung für die Spezifik der Zustände nicht berücksichtigt (siehe Text). Durch Absorption von Photonen ( $h \cdot \nu$ ) in bestimmten Spektralbereichen werden angeregte Singulett-Zustände von Chl a, Chl b und Car erzeugt ( $S_n$  mit  $n \geq 1$ ). Interne Konversionsprozesse (IC) und direkte Anregung führen zum Zustand  $S_1^{Chl a}$ . Von Chl b nach Chl a sowie von Car nach Chl a findet Anregungsenergietransfer (EET) statt.

Das dargestellte Schema vermittelt ein auf Pigmentzustände reduziertes Bild des Energietransfers im LHCII. Nicht gekennzeichnet ist dabei der Energietransfer zwischen verschiedenen Chlorophyll-Formen (siehe Kap. 1.1.3.2. auf S. 11). Jeder angeregte Zustand wird, ungeachtet der Anregungswellenlänge, zu Chl a transferiert, von wo aus die Fluoreszenz des LHCII zu beobachten ist. Die Spektren der Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII bei verschiedenen Temperaturen sind in Abb. 4 dargestellt. Es gibt keinen Hinweis auf eine Fluoreszenz anderer Pigmente als Chl a. Quantitative Interpretationen bzw. Analysen von Spektren und deren Temperaturabhängigkeit sind eine Möglichkeit, Informationen über die Struktur

/<sup>3</sup> Es sei darauf hingewiesen, daß Begriffe wie Dimer, Trimer usw. sowohl für Proteine als auch Pigmente verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Begriff Pigment-Multimere nur für Pigmentaggregate innerhalb des Protein-Monomers verwendet.

elektronischer Zustände zu gewinnen (z. B. Voigt et al., 1994).

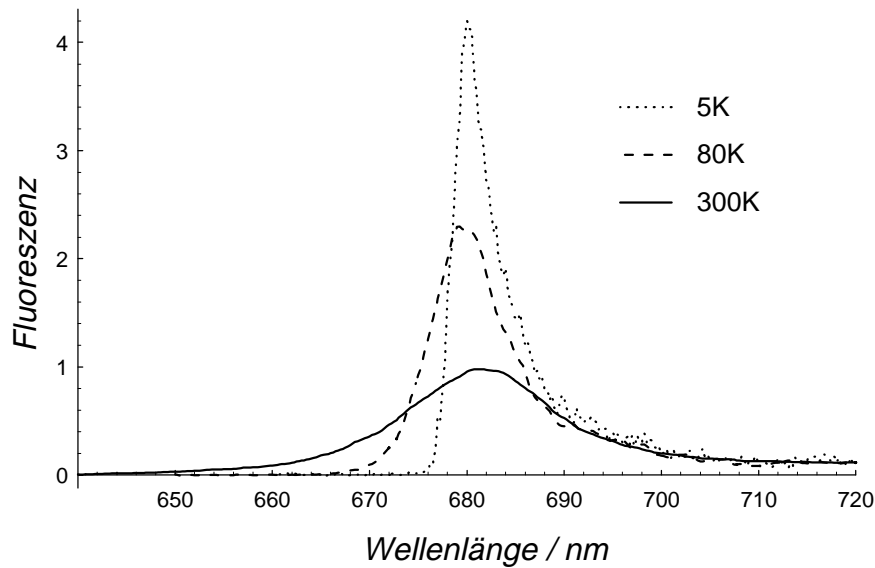


Abbildung 4

Fluoreszenzemissionsspektren des LHCII bei verschiedenen Temperatur (Die Messung erfolgte bei geringen Anregungsintensitäten mit Doppelmonochromator GDM 1000 bei  $\lambda_{exc} = 645$  nm)

Der Energietransfer von Chl *b* nach Chl *a* war Gegenstand vieler Untersuchungen, mit denen man in immer kürzere Zeitbereiche vorgedrungen ist. Seit einigen Jahren stehen Laserimpulse mit ca. 50 fs Impulsdauer zur Verfügung. In Pump-Test-Experimenten wird im Chl *b*-Bereich gepumpt (d.h. Absorption bei 645 nm). "Getestet" wird im Chl *a*-Bereich. Dabei sind zwei prinzipiell unterschiedliche Meßprinzipien einsetzbar: (i) Zeitaufgelöste Messungen der Chl *a*-Fluoreszenz. Dabei geht man davon aus, daß die Fluoreszenz des LHCII ausschließlich von Chl *a* emittiert wird (siehe oben). Um eine hohe zeitliche Auflösung zu erhalten muß hier die Methode der *Fluorescence-Upconversion* (z. B. Du et al., 1994) verwendet werden. (ii) Zeitaufgelöste Messungen der Transmissionsänderung im Bereich der Chl *a* Absorption (z. B. Bittner et al. 1994). Beide Methoden ergaben, daß die Reaktion im Chl *a*-Bereich (Chl *a*-Fluoreszenz bzw. Absorptionsänderung) nahezu instantan mit der Anregung im Chl *b* Bereich zu beobachten ist (Du et al., 1994: 200 – 300 fs; Bittner et al., 1994: 150 fs). Es wird nicht ausgeschlossen, daß die auf diese Weise ermittelten ultrakurzen Zeiten durch die zeitliche Auflösung der Apparatur begrenzt sind. Du et al. (1994) weisen auf das generelles Problem dieser Messungen hin, das darin besteht, daß die Chl *a*-Absorption bei der Pump-Wellenlänge von 645 nm nicht verschwindet (vergleiche Abb. 2).. Die gemessene ultra-schnelle Änderung der Chl *a*-Absorption bzw. die quasi instantan auftretende Chl *a*-Fluoreszenz entspräche dann lediglich einer internen Schwingungsrelaxation in Chl *a*-Molekülen.

## **1.2. Charakterisierung der verwendeten Proben**

---

### **1.2.1. Vorbemerkung**

---

Voraussetzung für die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen war das Vertrauen in die Qualität der Untersuchungsobjekte. Die von Dr. Klaus Irrgang bereitgestellte Präparation des LHCII in solubilisierter Form wird allen experimentellen Ansprüchen vorzüglich gerecht. Das betrifft Eigenschaften wie Reproduzierbarkeit, optische Qualität sowie Vergleichbarkeit mit Präparationen, die in anderen Laboren Verwendung fanden. Der hier benutzte solubilierte LHCII wurde mit zahlreichen experimentellen Techniken untersucht, deren Ergebnisse sich in einer Vielzahl von Veröffentlichungen wiederfinden. Für die Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurden keine zusätzlichen Veränderungen an Parametern der Präparation vorgenommen (bzgl. Detergenzkonzentration etc.).

### **1.2.2. LHCII Präparation**

---

PS II Membranfragmente wurden nach der Methode von Berthold et al. (1981) mit einigen Modifikationen (nach Völker et al., 1985) aus Spinatblättern isoliert. Die Isolation von LHCII wurde in Gegenwart von  $\beta$ -Dodecylmaltoside durchgeführt (beschrieben in Irrgang et al., 1988). Die LHCII Präparation wurde bei Raumtemperatur anhand des Absorptionsspektrums charakterisiert. Die Lage der Absorptionsmaxima (im roten Spektralbereich) war:  $652 \pm 1$  und  $675 \pm 1$  nm. Die Pigmentkonzentrationen von Chl *a* und Chl *b* wurden mittels der Methode von Porra et al. (1989) bestimmt. Das sich daraus ergebende Chl *a*/Chl *b* Verhältnis war  $1.35 \pm 0.05$ . Der relative Anteil von Apoproteinen der verschiedenen Pigment-Protein-Komplexe, die im LHCII enthalten sind, wurde mittels eines Silber gefärbten SDS/urea/Polyacrylamid-Gels abgeschätzt (Desaga Quick Scan Densitometer). Demnach konnten 84.7 % der Apoproteine den lhcb1-3 Genprodukten und 12.6 % den untergeordneten lhcb5/6 zugeordnet werden (von lhcb4 wurden nur Spuren gefunden).

Die LHCII Präparation wurde in einem Puffer gelöst. Dieser enthielt folgende Bestandteile: 30 mM MES – NaOH, pH = 6.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 % w/v Saccharose und 0.025 % w/w  $\beta$ -Dodecylmaltoside. Die Gesamtchlorophyllkonzentration in der Probe betrug 0.20 mg Chl/cm<sup>3</sup>.

Der Gehalt an  $\beta$ -Karotin und der Xanthophylle wurde spektroskopisch bestimmt



(Messung der Absorption bei 470 nm in 80 % v/v Azeton und Berechnung nach den Gleichungen von Wellburn und Lichtentaler, 1984). Die Karotinoid-Zusammensetzung der Proben wurde durch RP-HPLC mittels einer Nucleosil 100 C - 18 Säule (Knauer; 25 cm × 4 mm; ID: 5 µm) in Kombination mit dem Lösungsmittelsystem Methanol/Tetrahydrofuran (v/v: 9/1) analysiert. Die Pigmente wurden bei einer Flußrate von 1 ml/min getrennt. Als Standard wurden Chl *a* (Fluka), Lutein (Sigma) und β-Karotin (Fluka) verwendet. Die aus der HPLC - Analyse resultierende mittlere Pigmentzusammensetzung von zehn LHCII Proben war: 0.2 Lutein, 0.078 Violaxanthin, 0.078 Neoxanthin und 0.015 β-Karotin pro Chl *a* (mol/mol). Diese Werte sind mit denen von Peterman et al. (1997b) und Bassi et al. (1997) vergleichbar. Dabei wies der Gehalt an Neoxanthin die höchste Variabilität auf. Bei einigen Proben konnte kein Neoxanthin nachgewiesen werden. Diese wurden nicht für die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Messungen benutzt. Eine Labilität bezüglich Neoxanthin wurde auch von Kühlbrandt et al. (1994) nachgewiesen. Möglicherweise ist Neoxanthin in peripheren Bereichen des Pigment-Protein-Komplexes lokalisiert.

Die LHCII Präparation enthält solubilisierte nicht-aggregierte trimere Komplexe (siehe auch Vasil'ev et al., 1997a).

### **1.2.3. Chl *a* und Chl *b* in Lösung**

---

Die als Vergleichsstandard verwendeten Chl *a*- und Chl *b*-Proben lagen zunächst in trockener Form vor (Sigma) und wurden je nach gewünschter Konzentration in einer definierten Menge Azeton (80 % v/v) aufgelöst.

## 1.3. Allgemeines zum experimentellen Aufbau und zum Ablauf der Messungen

Im folgenden sollen die grundlegende Elemente des experimentellen Aufbaus vorgestellt werden. Weiterhin werden einige im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden erläutert, die für alle später vorgestellten Messungen von Bedeutung sind. Weitere Methoden, die nur für bestimmte Messungen entwickelt wurden, sind in die entsprechenden Kapitel eingebunden.

### 1.3.1. Verwendete Laser

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Messungen wurden mit verschiedenen ns-Lasersystemen durchgeführt. Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Spezifikationen sowie die Art der Messungen, die mit dem jeweiligen System durchgeführt wurden.

Lasersystem	Verwendung
Zwei Farbstoff - Laser (LAS LDL 105) gepumpt durch einen Nd <sup>3+</sup> -YAG- Laser: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Durchstimmbarer Bereich: 550 nm bis 740 nm</li> <li>• Impulsdauer: ca. 2.5 ns</li> <li>• spektrale Breite: 0.04 cm<sup>-1</sup> (ca. 0.002 nm)</li> <li>• maximale Impulsenergie: ca. 500 µJ</li> <li>• Strahldivergenz: &lt;0.5 mrad</li> </ul>	⇒ Als Anregungslaser bei Einstrahl-Experimenten ⇒ Als Pump- und Testlaser bei Pump-Test-Experimenten ohne Verzögerung und mit optischer Verzögerung
Kompaktes Lasersystem VSL-Dye (Laser Science Inc.) bestehend aus einem N <sub>2</sub> - Lasermodul mit nachgestelltem Farbstofflaser: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Durchstimmbarer Bereich: 350 nm bis 700 nm</li> <li>• Impulsdauer: ca. 2.5 ns</li> <li>• spektrale Breite: 6 cm<sup>-1</sup> (ca. 0.3 nm)</li> <li>• maximale Impulsenergie: ca. 30 µJ</li> <li>• Strahldivergenz: ca. &lt;1 mrad</li> </ul>	⇒ Als Pump- und Testlaser bei Pump-Test-Experimenten mit optischer Verzögerung ⇒ Als Testlaser bei Pump-Test-Experimenten mit elektronischer Verzögerung

Tabelle 1

Der zeitliche Verlauf der Laserimpulse,  $i(t)$ , wurde mit einem Hochfrequenz-Oszilloskop (Tektronix 684A) im Einzelschußbetrieb gemessen. Trotz geringfügiger Abweichungen kann  $i(t)$  für beide Lasersysteme näherungsweise als Gauß-Impuls

der Form  $\Gamma(t) = \frac{1}{\Delta \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{t^2}{2\Delta^2}}$  mit dem Parametern  $\Delta = 1.1$  ns und  $I$  (variable integrale Intensität) angesehen werden:

$$i(t) = I \cdot \Gamma(t) \quad (\text{E2})$$

Die Kalibrierung des Kompaktlasersystems VSL Dye bezüglich der Wellenlänge erfolgte mittels des hochauflösenden Spektrometers PGS2.

### 1.3.2. Die Stabilisierung des Anregungsgebietes

Die Variation der Anregungsintensität (bzw. Pump-Intensität) ist ein Grundprinzip fast aller in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Messungen. Grundsätzlich kann es zu beträchtlichen Meßfehlern kommen, wenn die Geometrie der Anordnung nicht auf das Verhalten der optischen Elemente abgestimmt ist. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt, die es gestattet, ein wohl definiertes Anregungsgebiet innerhalb der Probenebene zu erzeugen, das nur minimalen Schwankungen unterlegen ist. Im folgenden wird darauf genauer eingegangen.

Um einen möglichst großen Intensitätsbereich zu erhalten, ist es nötig, dessen obere Grenze zu maximieren. Die Intensität des Lichtes wird durch die Anzahl von Photonen je  $\text{cm}^2$  und Laser-Impuls bestimmt. Deshalb stellt eine Verringerung der Anregungsfläche bei vorhandener (stets begrenzter) Impulsenergie die einzige Möglichkeit dar, hohe Intensitäten zu erzeugen. Dies wird durch Fokussierung des Anregungsstrahles erreicht. Wie in Abb. 5 dargestellt, reduziert sich der Durchmesser eines parallelen Strahlenbündels vom Wert  $d$  bildseitig im Brennpunkt auf einen Minimalwert  $d'_{\text{Min}}$ . Die Größe dieses Wertes ist lediglich von Abbildungsfehlern der Linse sowie durch die Divergenz innerhalb des Parallelstrahlenbündels abhängig. Abbildungsfehler konnten durch den Einsatz spezieller Objektive (Newport) minimiert werden. Bei den meisten Messungen kam ein Objektiv mit  $f = 140$  mm zum Einsatz. Messungen des Strahlquerschnitts in dessen Fokus ergaben Werte von ca. 20  $\mu\text{m}$ . Ordnet man diesem Wert eine Strahldivergenz zu, so ergibt sich ein (sehr geringer) Wert von 0.15 mrad. Letztere ist in Abb. 5 durch den Winkel  $\alpha$  verdeutlicht. Nach Abb. 5 ist  $d'_{\text{Min}}$  gegeben durch:  $d'_{\text{Min}} = \alpha \cdot f$ . Außerhalb der Brennebene ergibt sich der folgende Strahlquerschnitt:

$$d' = \alpha \cdot f + 2 \cdot s \cdot \frac{d}{f} \quad (\text{E3})$$

wobei  $s$  den Abstand zur Brennebene darstellt. Zum Beispiel ergibt sich bei einem

Strahlquerschnitt von  $d = 5 \text{ mm}$  und einem Abstand  $s = 1 \text{ mm}$  von der Fokusebene eines  $f = 140 \text{ mm}$  Objektivs ein Durchmesser von ca.  $100 \mu\text{m}$ .

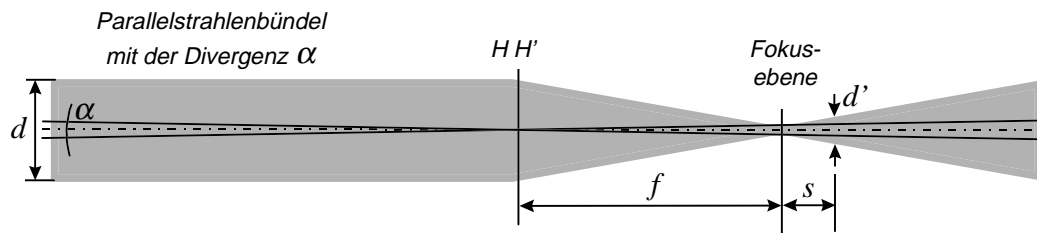


Abbildung 5

Fokussierung eines Parallelstrahlenbündels. Die Strahldivergenz  $\alpha$  ist stark übertrieben eingezeichnet. Abbildungsfehler sind nicht berücksichtigt.

Gl. (E3) ermöglicht die Abschätzung geometrischer Parameter in Bezug auf die Größe eines Anregungsgebietes. Dementsprechend läßt sich die Intensität abschätzen, die sich bei der Wahl bestimmter Werte für  $s$ ,  $f$  und  $d$  bei gegebener Impulsenergie ergibt. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß die Intensitätsverteilung in der Probenebene durch separate Messungen ermittelt wurde (siehe Kapitel 1.3.3.).

Die Variation der Anregungsintensität erfolgte durch definierte Abschwächung der maximalen Intensität. Dazu wurden Kombinationen verschiedener (reflektierender) Neutraldichtefilter (Melles Griot bzw. Newport) verwendet. Auf diese Weise war es möglich, einen Dynamikbereich von ca. 8 Größenordnungen zu erhalten. Bezüglich der Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge bieten diese Filter sehr gute Eigenschaften (Transmission nahezu konstant bezüglich der Wellenlänge). Allerdings erfährt ein Parallelstrahl beim Durchgang durch einen dieser Neutralfilter eine bestimmte Ablenkung. Die Gesamtablenkung beim Durchgang durch mehrere Filter war etwa  $2 \text{ mrad}$ .

Abb. 6 zeigt, wie sich diese Richtungsänderung auswirkt. Dargestellt sind zwei Parallelstrahlenbündel, die eine (stark übertrieben gezeichnete) Winkeländerungen erfahren haben (verursacht durch jeweils unterschiedliche Neutralfilter). In der Brennebene ergibt sich eine um den Wert  $\delta$  versetzte Position der Strahlenbündel. Messungen in dieser Ebene, in der der Querschnitt der Bündel minimal ist, führen zu extrem großen Meßwertschwankungen bei verschiedenen Intensitätswerten und sind deshalb unbrauchbar.

Unabhängig davon, welche Ablenkung ein Strahlenbündel erfährt, gibt es eine definierte Position, an der die optische Achse bildseitig geschnitten wird (Länge  $y$ ). Dieser Schnittpunkt ergibt sich aus der Abbildung des objektseitigen Schnittpunktes

(Länge  $x$ ) mit der optischen Achse nach der Abbildungsgleichung:  $\frac{1}{y} = \frac{1}{f} - \frac{1}{x}$ .

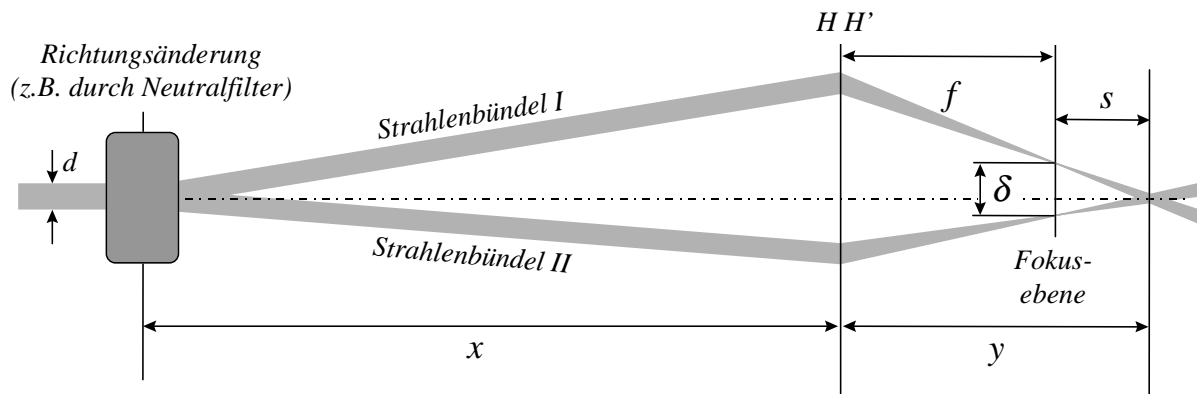


Abbildung 6

Schematische Darstellung des Einflusses der Richtungsänderung des Anregungsstrahles auf die Position in der Brennebene.

Ein gegenüber beliebiger Winkeländerung invariantes Strahlprofil befindet sich demnach im Abstand  $s = f^2 / (x - f)$  vom (bildseitigen) Brennpunkt. An dieser Stelle ergibt sich nach Gl. (E3) der Querschnitt:

$$d' = f \cdot \left( \alpha + \frac{2 \cdot d}{x - f} \right) \quad (\text{E4})$$

Will man die Größe eines (stabilisierten) Anregungsgebietes vorgeben, so muß die optische Anordnung entsprechend Gl. (E4) gewählt werden. Offensichtlich muß  $x \gg f$  gewählt werden, anderenfalls wird der Strahlquerschnitt  $d'$  zu groß um hohe Intensitäten zu erhalten.

Diese Methode fand im Rahmen dieser Arbeit bei allen Messungen Anwendung. Dadurch konnten, im Vergleich zu früheren Messungen, Meßfehler drastisch reduziert werden.

### 1.3.3. Die Bestimmung der Anregungsintensität in definierten Bereichen der Probenebene

Die Stabilisierung des Anregungsgebietes nach der im vorigen Kapitel beschriebenen Methode ist lediglich der erste Schritt auf dem Weg zu definierten Anregungsbedingungen. Innerhalb der Probenebene liegt eine Verteilung der Anregungsintensität vor, die Meßgrößen sollen jedoch bestimmten Intensitäten zugeordnet werden können. Das heißt, daß Bereiche innerhalb des Strahlprofils selektiert werden müssen, um das Verhalten der Meßgrößen innerhalb dieser Auswahl zu untersuchen. Die Auswahl eines begrenzten Gebietes, dem man eine nahezu konstante Anregungsintensität zuordnen kann, hängt von der Art der Messung ab und ist in den entsprechenden Kapiteln beschrieben. Im folgenden ist lediglich erläutert, wie die Berechnung der Intensität erfolgte.

Um das Strahlprofil visuell beurteilen zu können, wurde statt der Probe ein Proben-

normal verwendet, dessen Oberfläche sich in der Objektebene eines Mikroskops befand. Auf gleicher Höhe wie die zu messende Probenebene befand sich eine Lochblende (Durchmesser:  $5\ \mu$ ). Durch seitliche Verschiebung des Meßtisches (Translationselemente) wurde diese in die Probenebene gebracht. Abweichungen in Richtung der optischen Achse machten sich dadurch bemerkbar, daß das Bild der Lochblende im Mikroskop unscharf war. Dies wurde durch entsprechende Justage der Position der Lochblende korrigiert. Hinter der Lochblende befindet sich ein Detektor. Nach dem Start des Meßprogramms wurde die Position der Lochblende innerhalb eines festgelegten Bereiches mittels Schrittmotoren verändert und die Detektor-Signale aufgenommen. Das Ergebnis dessen war eine diskrete Verteilung der Anregungsintensität in der Probenebene.

Entsprechend der Größe des durch die nachfolgende Messung ausgezeichneten Gebietes wurde innerhalb des Gesamtprofiles ein Bereich  $B$  ausgewählt, dessen Detektor-Daten summiert wurden. Setzt man diesen Wert zur Summe über die Detektor-Daten des gesamten Strahlprofiles in Relation so erhält man den Anteil  $E^B$  der Gesamtenergie der Anregungsimpulse. Letztere wurde mit dem Energiemesser DigiRad bestimmt. Somit ist der Teil der Energie bekannt, der auf den ausgewählten Bereich der Fläche  $F^B$  auftrifft. Entsprechend der Wellenlänge ergibt sich die (zeitlich integrale) Intensität der Impulse:

$$I_p^{\max} = \frac{\lambda}{h \cdot c} \cdot E^B / F^B \quad (\text{E5})$$

Der Index „max“ deutet an, daß es sich hier um die ungeschwächte (also maximale) Intensität handelt. Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurden bei variabler Intensität durchgeführt. Dies wurde durch die Variation von Neutralfiltern erreicht. Damit ergibt sich:

$$I_p = I_p^{\max} \cdot 10^{-OD^{NF}(\lambda)} \quad (\text{E6})$$

Hierbei ist  $OD^{NF}(\lambda)$  der Wert der (leicht) von der Wellenlänge abhängigen optischen Dichte (Summe aller verwendeten Neutralfilter).

### 1.3.4. Aufbau zur Vermeidung von Meß- Artefakten bei Pump-Test-Messungen der Transmission

Da der Intensitätsunterschied zwischen Pump- und Teststrahl bei den vorliegenden Messungen bis zu 6 Größenordnungen beträgt, besteht die Hauptschwierigkeit der Pump-Test Messungen darin, einen Beitrag des Pumpstrahles zum Mess-Signal auszuschalten bzw. zu minimieren. Wie in Abb. 7 skizziert, wurde dazu ein nicht paralleler Strahlengang zwischen beiden Strahlen gewählt. Der Winkel mußte allerdings klein genug sein, um eine Veränderung der Pump-Intensität innerhalb der Probe in Richtung des Teststrahles gering zu halten.

Es wurde eine Anordnung aufgebaut, die mit Hilfe von Blenden ein Optimum für das Verhältnis aller beteiligten Öffnungswinkel schafft. Das Öffnungsverhältnis des Pumpstrahles muß groß sein, um die Stabilität des Anregungsgebietes bei variabler Pump-Intensität zu gewährleisten (siehe Kapitel 1.3.2.). Demzufolge ist Blende 1 relativ groß, jedoch notwendig, um zu verhindern, daß Randbereiche des Pumpstrahles direkt durch Blende 3 gelangen können (siehe Abb. 7).

Bei hohen Pump-Intensitäten ist die Streuung des Pumpstrahles an dem in Abb. 7 dargestellten Spiegel signifikant. Um den Strahlengang dieses isotrop ausgesendeten Anteiles (z. B. gestrichelte Linie) zu unterbrechen, wurde eine Halbblende vor der Probe angebracht, die Blende 3 von dieser Strahlung abschattet.

Bei den Vorbereitungen zu den in dieser Arbeit vorgestellten Pump-Test-Messungen stellte sich heraus, daß die Geometrie des Teststrahles (nach der Probe) durch den Pumpstrahl beeinflusst wird. Bei hohen Pump-Intensitäten ist in der Ebene der Blende 3 eine Deformation des Teststrahlprofils sogar visuell feststellbar. Bedingt durch diese Deformation vergrößert sich das Öffnungsverhältnis des Teststrahles - er wird aufgeweitet.

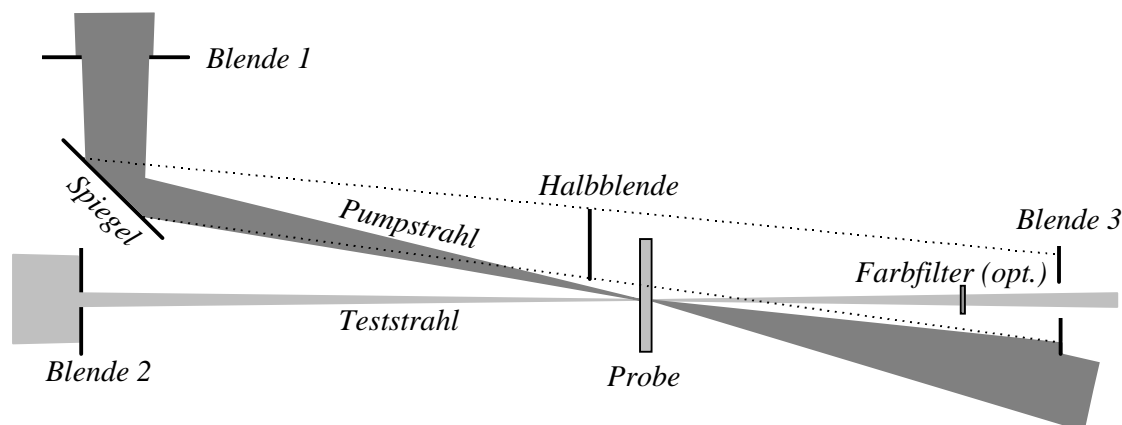


Abbildung 7

Schematische Darstellung der Geometrie zur Abtrennung des Pumpstrahles bei Pump-Test-Messungen der Transmission

Die Berücksichtigung dieses Effektes ist von großer Bedeutung. Einerseits muß

Blende 3 möglichst klein sein, um den Anteil des durch die Probe isotrop gestreuten Pumpstrahles so gering wie möglich zu halten. Andererseits darf es nicht dazu kommen, daß eine Pumpstrahl- bedingte Veränderung der Geometrie des Teststrahles zur Folge hat, daß aufgeweitete Anteile nicht durch Blende 3 gelangen können. Letzteres würde zu einer Verfälschung der Meßergebnisse führen, denn Ziel der Untersuchungen ist der Einfluß des Pumpstrahles auf die Transmission des Teststrahles innerhalb der Probe. Gelöst wurde das Problem dadurch, daß das Öffnungsverhältnis des Teststrahles mittels Blende 2 sehr gering gehalten wurde. Blende 3 wird im Vergleich dazu sehr groß gewählt. Wie Testmessungen zeigten, ist dann auch die absolute Deformation des Teststrahles geringer. Der Erfolg dieser Methode besteht darin, daß selbst ein stark deformierter Teststrahl ungehindert die Blende 3 passieren kann. Es sei darauf hingewiesen, daß die Deformation des Teststrahles ebenso bei dessen Abbildung auf die Empfängerdiode berücksichtigt wurde. Zum Einsatz kam dabei eine kurzbrennweitige Linse, deren Fokus etwa 2 mm hinter der Diode liegt.

Zur weiteren Reduzierung des Pump-Streuanteiles im Strahlengang des Teststrahles wurde optional ein geeigneter Farbglasfilter verwendet.

### **1.3.5. Verarbeitung der elektronischen Detektorsignale**

---

Als Detektoren dienten kompakte Dioden-Verstärker-Module (Analog Modules) mit Silizium- bzw. Avalanche-Diode. Die Detektorsignale wurden zeitlich integriert (BCI 280 mit 10 ns Torbreite), digitalisiert (Advantech PCL 812) und an das (selbst erstellte) PC (Turbo-Pascal-)Steuerprogramm weitergeleitet.





## 2. Multiple Singulett-Anregungen im LHCII

---

### 2.1. Einleitung

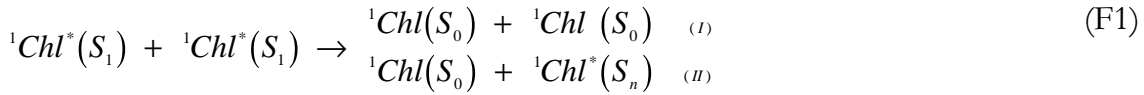
---

Die Verfügbarkeit von Laserlichtimpulsen erweiterte das Spektrum der Meßmöglichkeiten zur Untersuchungen photosynthetischer Organismen bereits in den 70er Jahren. Dies betrifft die Möglichkeit qualitativ neue Anregungsbedingungen im Hinblick auf spektrale Güte, aber auch zeitliche Definiertheit zu erreichen. Zusätzlich bietet Laserlicht die Möglichkeit, hohe Intensitäten zu erzeugen, um mit der Methode der nichtlinearen Laserspektroskopie neue Erkenntnisse bei der Charakterisierung von Zustandsbesetzungen zu erhalten.

Messungen der Fluoreszenzquantenausbeute (an *Chlorella*) zeigten, daß diese mit steigender Anregungsintensität drastisch abnimmt. Dies war der Beginn einer in den nachfolgenden Jahren ausgiebig geführten Diskussion um Prozesse, die zur Vernichtung von Anregungsenergie in photosynthetischen Systemen führen (siehe unten). Es zeigte sich, daß bei Verwendung relativ kurzer Anregungsimpulse (7 ns FWHM in Mauzerall et al., 1976a, b) keine Sättigung der Fluoreszenz zu beobachten ist. Damit waren die gemessenen Abhängigkeiten nicht im Einklang mit einer „*single hit Poisson saturation*“ (siehe Mauzerall et al., 1976a). Letzteres würde bedeuten, daß die Fluoreszenzquantenausbeute multipler Anregungszustände verschwindet. Der im Gegensatz dazu gefundene „breite Charakter“ der Fluoreszenzquantenausbeute, d.h. deren Abfallen bei relativ geringen Intensitäten einerseits und das nicht sättigende Verhalten bei hohen Intensitäten andererseits, führten zu der Hypothese, daß Vernichtungsprozesse (beim Vorhandensein mehrerer Anregungszustände) auf einer vom Absorptionsakt unabhängigen Zeitskala ablaufen.

Die Ergebnisse von Messungen, die mit 20 ps Laserimpulsen durchgeführt wurden (Campillo et al., 1976 a,b), stimmten mit denen von Mauzerall nahezu überein. Daraus wurden gefolgert, daß für  $\Delta t \geq 7$  ns die Fluoreszenzausbeute als Funktion der Anregungsintensität unabhängig von der Dauer der verwendeten Anregungsimpulse ist. Folglich sollten Triplett-Zustände bei Einzelimpuls-experimenten (mit  $\Delta t \geq 7$  ns) keine Rolle für die Vernichtung von Anregungszuständen spielen. Unter den genannten Bedingungen wurde die Abnahme der Fluoreszenzausbeute der Wechselwirkung von angeregten Singulett-Zuständen zugeordnet („*singlet-singlet-exciton-annihilation*“). Dabei betrachtet man

Stöße zwischen jeweils zwei einfach angeregten Chlorophyll Anregungen,  ${}^1\text{Chl}^*(S_1)$ . Als Folgeprodukte entstehen ein Chlorophyll-Singulett-Grundzustand,  ${}^1\text{Chl}(S_0)$ , sowie entweder ein zweiter Grundzustand (siehe (v) in Gl. (F1)) oder ein höher angeregter Zustand,  ${}^1\text{Chl}^*(S_n)$  (siehe (vi) in Gl. (F1)). Letzterer relaxiert sehr schnell in den Zustand  ${}^1\text{Chl}^*(S_1)$  („*internal conversion*“).



Die mit der Abnahme der Fluoreszenzausbeute einher gehende Verkürzung der Lebensdauer des fluoreszierenden  ${}^1\text{Chl}^*(S_1)$  Zustandes (Seibert und Alfons, 1974; Paschenko et al., 1975; Beddard et al., 1975; Campillo et al., 1976a, b) wurde ebenfalls „Stößen“ diffundierender Exzitonen zugeordnet (zur Übersicht siehe Breton und Geacintov, 1980).

Ausgehend von der Idee einer Wechselwirkung zwischen Exzitonen wurden verschiedene Modelle entwickelt, um die obigen experimentellen Befunde quantitativ zu beschreiben. Abb. 8 skizziert die dabei jeweils zu Grunde gelegten Näherungen.

Die überwiegende Mehrzahl der Modelle geht von der Annahme (a) aus, daß sich sehr schnell eine zufällige räumliche Verteilung von Anregungszuständen einstellt („*random exciton distribution*“). Demnach ist bei dieser Betrachtung unbedeutend, wie weit entfernt die jeweiligen Absorptionsvorgänge (die zu den später wechselwirkenden Exzitonen geführt haben) stattgefunden haben. Die Wahrscheinlichkeit für Stöße von jeweils zwei Exzitonen ergibt sich demnach aus der Anzahl möglicher Kombinationen  $C_i^2 = \frac{1}{2}i(i-1)$ . Paillotin et al. (1979) legen eine durch einen  $\delta$ -Impuls erzeugte Anzahl  $i$  von Exzitonen zugrunde. Deshalb sind die Terme für die bimolekulare Annihilation gegeben durch:

$$T^{(\alpha)}(i \rightarrow i - \alpha) = \frac{1}{2}i(i-1) \cdot \gamma^{(\alpha)} \quad (\text{F2})$$

$\gamma^{(\alpha)}$  bezeichnet die bimolekularen Annihilationsraten mit  $\alpha = 1$  für Prozeß (v) und  $\alpha = 2$  für (vi) (siehe Gl. (F1)). Unter Vernachlässigung von Entleerungseffekten war es gelungen, ein entsprechendes System von Pauli Master Gleichungen analytisch zu lösen und damit sowohl die Daten der Fluoreszenzausbeute als auch die der Fluoreszenzkinetik als Funktion der Anregungsintensität zu beschreiben (siehe (aab) in Abb. 8). Als Grenzfall für unendlich große Systeme (wo gilt  $i(i-1) \approx i^2$ ) ergab sich das von Swenberg et al. (1976) vorgestellte Ratengleichungssystem (siehe (ab) in Abb. 8).

Es sei auf zwei drastische Näherungen hingewiesen, die zur Herleitung der analytischen Ausdrücke zur Beschreibung der genannten Meßgrößen von Paillotin et

al. (1979) notwendig waren: i) Auf eine Berücksichtigung von Entleerungseffekten insbesondere der Grundzustandsentleerung wurde verzichtet. ii) Die Berechnungen gehen von einer willkürlich existierenden Anzahl von Exzitonen aus. Damit werden Effekte, die während der Anregung eine Rolle spielen könnten, von vornherein ausgeschlossen. Vom theoretischen Standpunkt aus gesehen stellen die Annahmen i) und ii) keinen Mangel des Paillotin'schen Modells. Jedoch sind Experimente, deren Ergebnisse mit diesem Modell erklärt wurden, kritisch bezüglich der genannten Punkte zu betrachten.

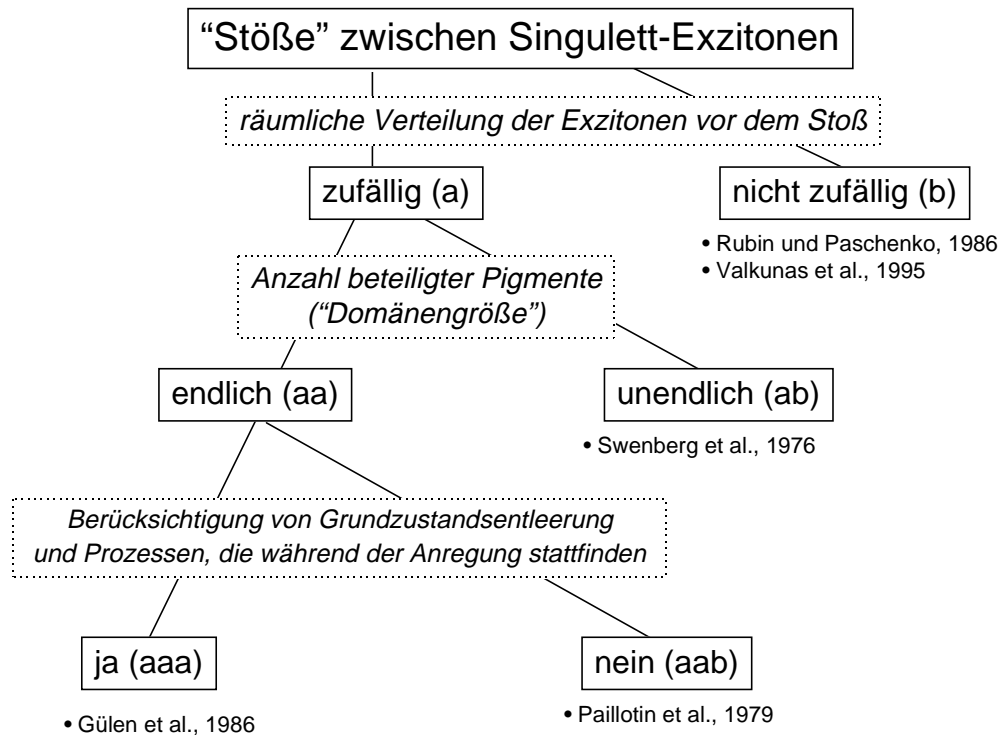


Abbildung 8

Schematische Darstellung der sich aus unterschiedlichen Voraussetzungen ergebenden Modelle zur quantitativen Beschreibung der Singulett - Singulett Vernichtung.

Ein völlig anderer Zugang zur Modellierung von Exziton-Exziton Vernichtungsprozessen ergibt sich, wenn man deren Vorgeschichte, d.h. dem Ort des Absorptionsaktes, eine Bedeutung zuschreibt. Dies ist der Fall, wenn die charakteristische Zeit für die zufällige Verteilung der Exzitonen vergleichbar (oder kleiner) wird als jene, welche die Annihilation beschreibt (siehe (b) in Abb. 8). Ausgehend von den Überlegungen von Agranovich und Galanin (1982) wurde eine Zeitabhängigkeit der „Konstanten“  $\gamma$  (verantwortlich für die Stärke der Exziton-Exziton Annihilation, siehe Gl. (F2)) zugelassen (Rubin und Paschenko, 1986). Die entsprechende Ratengleichung für die Besetzung von (einfach) angeregten Singulett - Zuständen wurde direkt mit den Meßergebnissen der Fluoreszenzkinetik verknüpft um die Zeitabhängigkeit  $\gamma(t)$  zu berechnen. Valkunas et al. (1995) stellte ein erweitertes Modell dieser Beschreibung der Exziton-Exziton Annihilation für quasi-homogene und deshalb unendlich große photosynthetische Antennenkomplexe vor.

Es werden ebenfalls zeitabhängige Annihilationsraten betrachtet, jedoch auch Prozesse während der Anregung sowie die Besetzung höher angeregter Zustände betrachtet (siehe Gl. (F1)).

Eine wesentliche Erweiterung des Paillotin'schen Pauli-Master-Gleichungs-Formalismus (siehe oben) stellte das von Gülen et al. (1986) aufgestellte Modell dar (siehe (aaa) in Abb. 8). Dieses wurde speziell für Systeme entwickelt, die nur wenige Pigmente beinhalten. Ausgangspunkt waren die Ergebnisse der Messungen der Fluoreszenzkinetik an LHCII, die von Nordlund und Knox (1981) durchgeführt wurden. In letzteren zeigte sich bei einer nichtaggregierten (die Komplexe sind räumlich voneinander getrennt) LHCII Präparation (im Gegensatz zu einer aggregierten), daß die Lebensdauer des (fluoreszierenden) Singulett - Zustandes unabhängig von der Intensität der verwendeten 20 ps Anregungsimpulse ist. Gülen mußte demnach Prozesse, die während der Anregung stattfinden, berücksichtigen. Des weiteren wurde die Besetzung höher angeregter Singulett-Zustände sowie die Entleerung von Grund- und einfach angeregten Singulett-Zuständen explizit in das Pauli-Master-Modell mit einbezogen. Es wurde ein Rechteckimpuls variabler Länge angenommen. Mit diesem Modell konnte Gülen das von Nordlund und Knox (1981) gewonnene Ergebnis (keine Verkürzung der Fluoreszenzkinetik, siehe oben) durch eine instantan einsetzende Exziton-Exziton-Annihilation während des 20 ps Impulses erklären. Daraus folgt, daß die integrale Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII ein sättigendes Verhalten bezüglich der Abhängigkeit von der Anregungsintensität zeigen müßte. Diese Frage konnte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden und ist Gegenstand der folgenden Kapitel.

## 2.2. Die Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII als Funktion der Anregungsintensität

### 2.2.1. Das Prinzip der räumlichen Selektivität

Auf den Einfluß eines nicht homogenen Anregungsgebietes bei der Messung der intensitätsabhängigen Fluoreszenz hat bereits Paillotin et al. (1983a) hingewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Realisierung eines homogenen Anregungsgebietes höchstes Augenmerk gerichtet. Diese Homogenität wurde durch die räumliche Selektion eines definierten Bereiches erreicht, in dem die Anregungsintensität lediglich um  $\pm 20\%$  variiert.

Das folgende Beispiel soll die Notwendigkeit des Prinzips der räumlichen Selektion illustrieren: Betrachtet sei eine Probe, deren Fluoreszenz ein sättigbares Verhalten aufweist. Dieses Verhalten kann man sich analog zu einem fotografischen Film vorstellen, der ab einer bestimmten Belichtungsstärke überbelichtet ist. Als Anregung sei eine Gaußförmige Intensitätsverteilung angenommen, deren Halbwertsbreite etwa  $60 \mu\text{m}$  beträgt. Bei geringer Anregungsintensität (linearer Bereich) ist die Stärke des von der Probe ausgesandten Fluoreszenzsignales direkt proportional zur Anregungsintensität. Deshalb ist die räumliche Intensitätsverteilung der Fluoreszenz in diesem Fall identisch zu der Verteilung der Anregungsintensität selbst (siehe Abb. 9a).

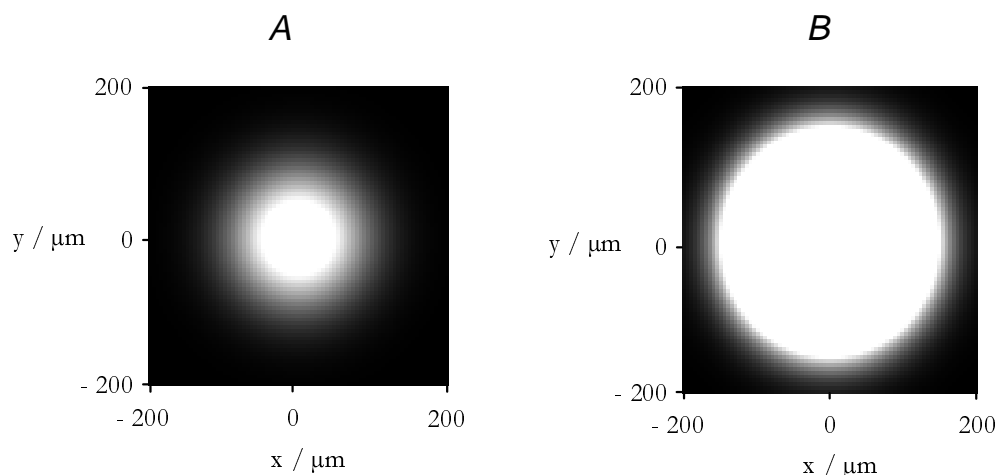


Abbildung 9

Räumliche Verteilung der Fluoreszenz bei verschiedenen Anregungsintensitäten  
(Darstellung in der Probenebene bei identischer räumlicher Verteilung der Anregungsintensität)

A: Bei geringer Anregungsintensität

B: Bei Sättigung der Fluoreszenz (zentraler Bereich)  
durch erhöhte Anregungsintensität

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zur nichtlinearen Fluoreszenz ist diese Proportionalität bei höheren Intensitäten jedoch nicht mehr gegeben. Es kommt zu einer Sättigung der Fluoreszenz in einem sehr großen räumlichen Gebiet (siehe Abb. 9b). Dadurch liefern Randgebiete, die um Größenordnungen weniger stark angeregt werden als das Zentrum, einen erheblichen Beitrag zur Gesamtfluoreszenz. Eine Messung der Intensitätsabhängigkeit der gesamten Fluoreszenz würde in diesem Falle keinen großen Informationsgewinn erbringen, da eine Zuordnung der Fluoreszenz zu einer definierten Intensität nicht möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Anordnung entwickelt, die eine räumliche Selektion der Fluoreszenz ermöglicht (siehe Abb. 10). Das Fluoreszenzgebiet wird auf eine Lochblende abgebildet, deren Durchmesser so gewählt wird, daß das Fluoreszenzlicht, das durch diese hindurchgeht, von einem Probengebiet ausgeht, dessen Anregungsintensität maximal um ca.  $\pm 20\%$  variiert. Als wichtige Nebenbedingung muß erfüllt sein, daß es durch die Dicke der Probe nicht zu Abbildungsverzerrungen kommt. Deshalb wurden nur Küvetten mit einer wirksamen Dicke von maximal  $200\ \mu\text{m}$  verwendet.

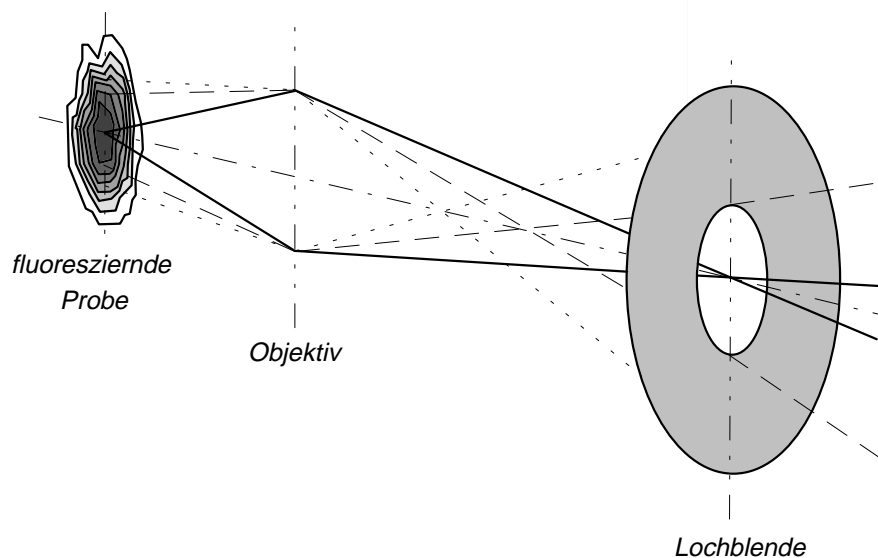


Abbildung 10  
Prinzip der räumlich selektiven Messung der Fluoreszenz

Die Realisierung der räumlichen Selektivität wird unter anderem durch die Güte der optischen Abbildung begrenzt. Durch die Wahl eines geeigneten Objektivs sowie einer Apertur, die einerseits groß genug ist, um möglichst viel Fluoreszenzlicht aufzunehmen, jedoch andererseits klein genug, um Öffnungsfehler gering zu halten, war es möglich, eine minimale Fleckgröße von ca.  $60\ \mu\text{m}$  zu erreichen. Mit einer Lochblende von  $50\ \mu\text{m}$  Durchmesser ist es bei dieser Fleckgröße möglich, räumlich selektive Fluoreszenzmessung selbst bei extrem hohen Anregungsintensitäten durchzuführen.

## 2.2.2. Meßaufbau

Die Erzeugung hoher, definierter Anregungsintensitäten in einer stabilisierten Probenebene erfolgte entsprechend den Beschreibungen der Kapitel 1.3.2. und 1.3.3. (S. 20 und S. 22). Die Kenntnis der jeweils verwendeten Filterkombination ermöglicht die Bestimmung der Intensität vor der Probe. Das von der Probe isotrop emittierte Fluoreszenzlicht aus dem Gebiet maximaler Anregung wurde mittels der beschriebenen Anordnung räumlich selektiert (siehe Kapitel 2.2.1.). Der vereinfachte Meßaufbau ist in Abb. 11 dargestellt. Um an der Probe gestreutes Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht zu separieren, wurde eine spektrale Trennung mit dem Doppelmonochromator GDM 1000 durchgeführt. Außerdem ermöglichte der Einsatz des Monochromators eine Messung des Fluoreszenzspektrums. Um den Strahlengang am/im Monochromator vom bis dorthin verlaufenden Strahlengang zu entkoppeln, wurde ein Monofaser-Lichtleitkabel verwendet (siehe Abb. 11). Dieses besitzt die Eigenschaft, daß bei sorgfältiger Einkopplung in die 200 µm dicke Faser kaum Verluste auftreten (ca. 90 % Transmission).

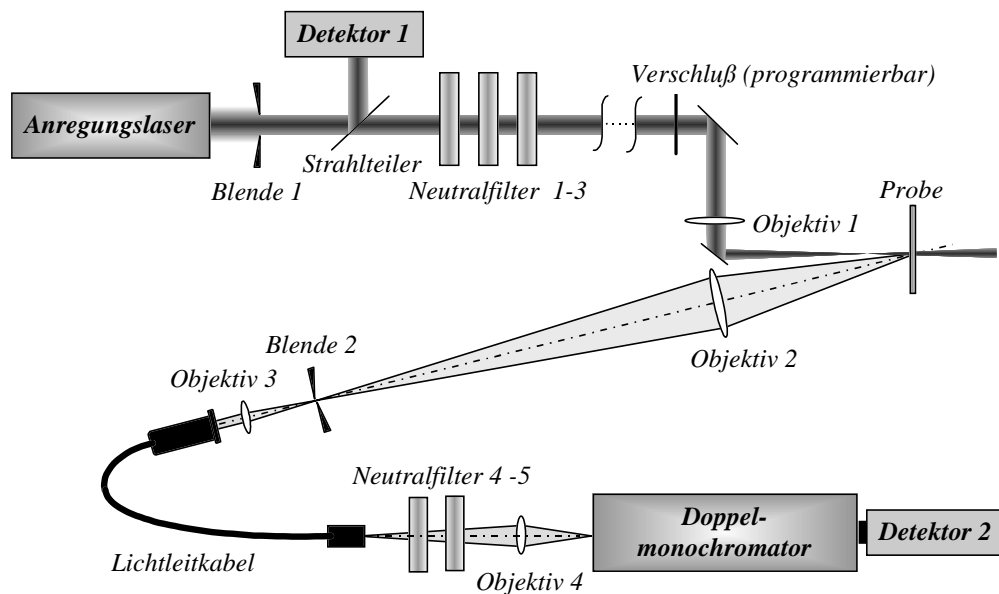


Abbildung 11

Schematische Darstellung des Meßaufbaus zur Messung der intensitätsabhängigen Fluoreszenz

Die Art der Detektoren sowie die Auswertelektronik ist in Kap. 1.3.5. auf S. 25 beschrieben.

Das Signal von Detektor 2 ist der integralen Fluoreszenz proportional, und Detektor 1 liefert ein der integralen Anregungsintensität proportionales Signal. Die bezüglich eines Untergrundsignals korrigierte Fluoreszenz ergibt sich somit aus:

$$F(I_p) \propto \left\{ \frac{S(\text{Detektor 2})}{S(\text{Detektor 1})} \uparrow - \frac{S(\text{Detektor 2})}{S(\text{Detektor 1})} \downarrow \right\}_{I_p} \quad (\text{F3a})$$

wobei die Pfeile den Zustand des Verschlusses (siehe Abb. 11) anzeigen ( $\uparrow$ : auf,



↓: zu). Die Fluoreszenzausbeute ergibt sich aus dem Quotient:

$$\Phi(I_p) \propto \frac{F(I_p)}{I_p} \quad (\text{F3b})$$

$I_p$  ist die nach Gl. (E6) berechnete variable integrale Impulsintensität. Für die Darstellung der Ergebnisse von  $\Phi(I_p)$  ist es üblich, auf  $\Phi(I_p \rightarrow 0)$  zu normieren (wo keine Abhängigkeit von  $I_p$  besteht). Das daraus resultierende Verhältnis  $\Phi(I_p)/\Phi(I_p \rightarrow 0)$  wird im folgenden mit  $\Phi^{norm}$  bezeichnet.

### 2.2.3. Ergebnisse der Messungen der intensitätsabhängigen Fluoreszenz

---

#### 2.2.3.1. Wahl der Anregungswellenlänge

---

Die Raumtemperatur-Fluoreszenzspektren von solubilisiertem LHCII und Chl *a* in Lösung sind von der Anregungswellenlänge,  $\lambda_p$ , unbeeinflusst. Sogar jene Fluoreszenzspektren, die an der langwelligen Grenze des Absorptionsspektrums angeregt wurden, zeigten keine Veränderung verglichen mit kürzeren Anregungswellenlängen (Daten nicht gezeigt). An solubilisiertem LHCII wurden Messungen bis zu  $\lambda_p = 695$  nm durchgeführt (bei noch größeren Wellenlängen war die Absorption zu gering, um ein meßbares Fluoreszenz-Signal zu erzeugen). Diese Wellenlänge ist ca. 15 nm oberhalb des Maximums im Fluoreszenzspektrum. Trotzdem blieb das spektrale Profil der Fluoreszenz unverändert gegenüber dem in Abb. 4 auf S. 16 gezeigten Raumtemperatur-Fluoreszenzemissionsspektrum.

Für die Messungen der nachfolgenden Kapitel wurde die Anregungswellenlänge 645 nm gewählt. Dies geschah aus folgendem Grund: Die bei der Wellenlänge 645 nm bei Raumtemperatur emittierte Fluoreszenz des LHCII beträgt lediglich ca. 1% des Maximalwertes (siehe Abb. 4 auf S. 16). Dies ist auch für Chl *a* in Lösung der Fall (siehe Schödel, 1993). Die stimulierte Emission hängt ebenso wie die Fluoreszenz von der energetischen (spektralen) Verteilung der Besetzung der Anregungszustände ab. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß die stimulierte Emission bei 645 nm eine zu vernachlässigende Rolle spielt (anders als im Fall  $\lambda_p = 680$  nm; wo ein effektiver Querschnitt,  $\sigma_{10}(680 \text{ nm})$ , für die stimulierte Emission betrachtet werden muß; siehe Kap. 2.2.6.3. auf S. 54). Dies ist für die spätere Beschreibung der intensitätsabhängigen Daten von Vorteil (Wegfall der unbekanntenen Größe  $\sigma_{10}$ ).

### **2.2.3.2. Einfluß der Anregungsintensität auf die Fluoreszenzspektren**

---

Um spektrale Einflüsse zu charakterisieren, wurden Fluoreszenzspektren von solubilisiertem LHCII und Chl *a* in acetonischer Lösung bei verschiedenen Intensitäten aufgenommen (nicht gezeigt). Diese wurden unter Bedingungen der räumlichen Selektivität gemessen. Es zeigte sich, daß - sogar bei den höchsten Intensitäten - die Spektren im wesentlichen unabhängig von der Anregungsintensität sind (geringfügige Abweichungen können auf lokale Erhitzungen und eine intensitätsabhängige Reabsorption zurückgeführt werden). Damit sind die Daten der Fluoreszenzausbeute als Funktion der Anregungsintensität frei von Einflüssen, die durch eine Veränderung (z.B. Verschiebung) des Fluoreszenzspektrums zurückzuführen wären.

Die Unabhängigkeit der Fluoreszenzspektren von der Anregungsintensität rechtfertigt außerdem die Annahme, daß selbst bei hohen Intensitäten die Fluoreszenz immer auf dem gleichen Wege erzeugt wird, d. h. durch Relaxation einfach angeregter Chl *a*-Singulett-Zustände in den Grundzustand.

Für LHCII sei noch auf folgendes hingewiesen: Bei der Anregungswellenlänge 645 nm überwiegt zwar die Absorption durch Chl *b*, die absorbierte Energie wird jedoch sehr effektiv zu Chl *a* transferiert, so daß es selbst bei hohen Anregungsintensitäten zu keiner nennenswerten Besetzung von elektronisch angeregten Chl *b*-Singulett-Zuständen kommen sollte. Die Unabhängigkeit der LHCII-Fluoreszenzspektren von der Anregungsintensität liefert den experimentellen Beweis dieser Annahme. Es kann so ausgeschlossen werden, daß Chl *b* Moleküle Fluoreszenz emittieren.

Die Tatsache, daß selbst bei extrem hohen Intensitäten keine Veränderung des Fluoreszenzspektrums auftritt ist ein zusätzlicher Beleg dafür, daß eine destruktive Veränderung der Proben bei den Messungen zur Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII ausgeschlossen werden kann.

### **2.2.3.3. Die normierte Fluoreszenzausbeute von solubilisiertem LHCII**

---

Abb. 12 zeigt die Meßergebnisse der Fluoreszenzausbeute von solubilisiertem LHCII, die bei unterschiedlicher Selektivität gemessen wurden. Es ist deutlich zu erkennen, daß die unter vollständiger räumlicher Selektierung (entsprechend obiger Beschreibung) gemessene Kurve (bei hohen Intensitäten) um Größenordnungen von den anderen abweicht.

Ein derart drastischer Abfall der Fluoreszenzausbeute um ca. 4 Größenordnungen war vorher nie beobachtet worden. Dahingegen sind die übrigen Kurven in Abb. 12 (□ und ▲) eher vergleichbar mit den in der Literatur diskutierten Ergebnissen

(„breiter Charakter“ z.B. Mauzerall et al, 1976) /<sup>4</sup>. Eine andere Darstellung der Daten (■) ist in Abb. 15 (siehe S. 44) gegeben. Dort ist  $F(I_p)$  (nach Gl. (F3a)) anstelle von  $\Phi^{norm}(I_p)$  (nach Gl. (F3b)) aufgetragen und das sättigende Verhalten der Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII direkt erkennbar.

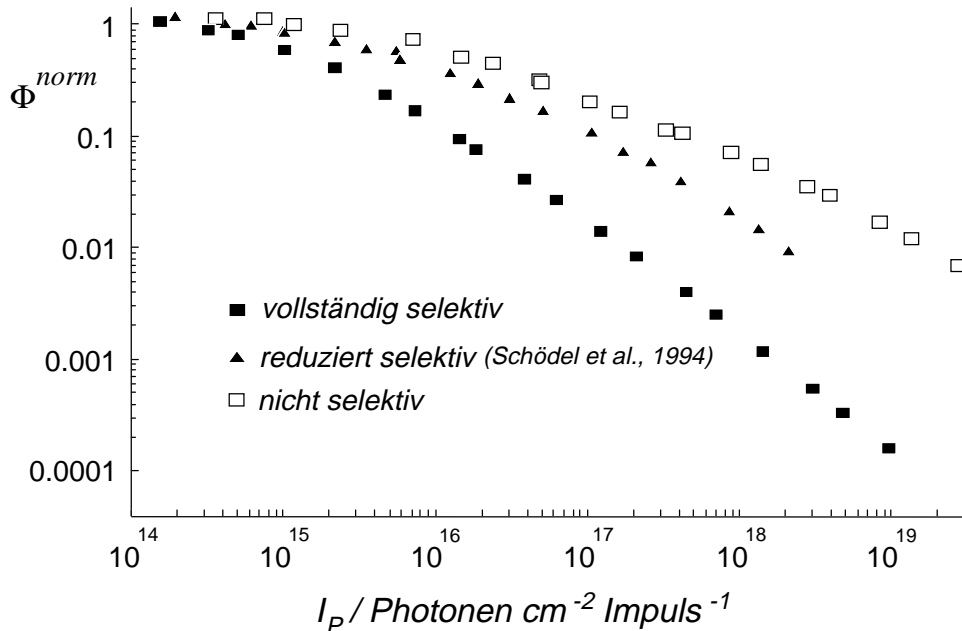


Abbildung 12

Normierte Fluoreszenzausbeute von solubilisiertem LHCII als Funktion von  $I_p$  bei unterschiedlicher räumlicher Selektivität

#### 2.2.3.4. Die normierte Fluoreszenzausbeute von Chl a in Lösung

Es wurden Messungen an Chl *a* in 80 % azetonischer Lösung durchgeführt, um die Ergebnisse mit denen von solubilisiertem LHCII zu vergleichen. Abb. 13 zeigt, daß die Kurvenform in beiden Fällen nahezu übereinstimmt. Zwischen beiden Verläufen existiert nur eine Verschiebung von ca. einer Größenordnung bezüglich der Anregungsintensität.

Da es sich bei Chl *a* in azetonischer Lösung um ein relativ einfaches System handelt, läßt sich die intensitätsabhängige Fluoreszenzausbeute unkompliziert modellieren. Dies ist im folgenden Kapitel beschrieben.

<sup>4</sup> Nach dem Erscheinen der Ergebnisse (Schödel et al., 1996) teilte mir Prof. David Mauzerall (Rockefeller University, New York) persönlich seine Freude über das entwickelte Prinzip der räumlichen Selektivität mit.

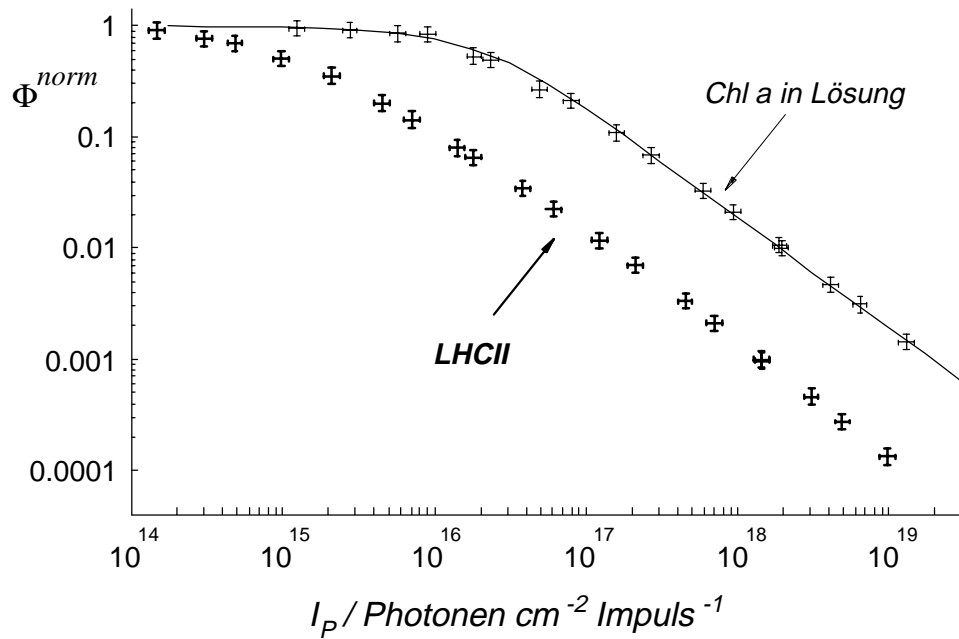


Abbildung 13

Normierte Fluoreszenzausbeute als Funktion der Anregungsintensität in solubilisiertem LHCII und Chl *a* in Lösung. Die Messungen erfolgten unter Nutzung des Prinzips der räumlichen Selektivität. Die durchgezogene Linie zeigt eine Anpassung der experimentellen Daten von  $\Phi^{norm}(I_p)$  für Chl *a* in Lösung. Dabei wurden das Ratengleichungssystem Gl. (F4) und Gl. (F5) sowie aus der Literatur bekannte Parameter zugrunde gelegt (siehe Kap. 2.2.4.).

#### 2.2.4. Beschreibung der intensitätsabhängigen Fluoreszenz für Chl *a* in azetonischer Lösung

Bei der verwendeten Konzentration von 0.2 mg/ml (0.22 mM) können Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Chl *a* Molekülen ausgeschlossen werden. Der Absorptionsquerschnitt,  $\sigma^{Chl a}$ , der Moleküle bestimmt die sogenannte „Trefferrate“ („hit rate“),  $\sigma^{Chl a} \cdot I_p$ . Diese gibt an, wie viele angeregte Zustände durch einen kurzen Impuls mit integraler Intensität  $I_p$ , siehe Gl. (E2)) erzeugt werden können, wenn keine Entleerung des Grundzustandes auftritt.

Für die Beschreibung bei höheren Intensitäten sowie zur Berücksichtigung des zeitlichen Anregungsprofiles,  $I(t)$  (siehe Gl. (E2)), und von Relaxationsprozessen (Relaxation in den Grundzustand sowie „intersystem crossing“ in einen langlebigen Triplettzustand) ist es notwendig und möglich (keine Wechselwirkung zwischen den Molekülen), das folgende Ratengleichungssystem zu betrachten:

$$\frac{d}{dt} x_1(t) = \sigma^{Chl a} \cdot I(t) \cdot x_0(t) - k \cdot x_1(t) \quad (F4a)$$

$$\frac{d}{dt} x_T(t) = k_{ISC} \cdot x_1(t) - k_T \cdot x_T(t) \quad (F4b)$$

$$x_0(t) + x_1(t) + x_T(t) = 1 \quad (F4c)$$

Dabei sind  $x_i(t)$  die relativen Populationen des Grundzustandes ( $i = 0$ ), des angeregten Singulett - Zustandes ( $i = 1$ ) sowie des metastabilen Triplett-Zustandes von Chl *a*.  $k$  ist die reziproke Lebensdauer der (fluoreszierenden) Population  $x_1(t)$ . Diese beträgt  $(5.5 \text{ ns})^{-1}$  (Vasil'ev et al., 1997b). Es gilt:  $k = k_{ISC} + k_{10}$ , wobei  $k_{10}$  die Rate für direkten Übergang  $1 \rightarrow 0$  ist. Die „intersystem crossing“ Rate  $k_{ISC}$  beträgt  $(7 \text{ ns})^{-1}$  (Bowers and Porter, 1967). Die Rate der Triplett-Relaxation ( $k_T$ ) ist um Größenordnungen kleiner als die übrigen Relaxationsraten (siehe Renger, G., 1992), weshalb der Term  $k_T \cdot x_T(t)$  in Gl. (F4) vernachlässigbar klein ist. Der Betrag des Absorptionsquerschnittes,  $\sigma^{Chl a}$ , bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 645 nm kann aus dem molekularen Extinktionskoeffizienten (Porra et al., 1989) berechnet werden (siehe Schödel et al., 1996). Es ergibt sich:  $\sigma^{Chl a}(645 \text{ nm}) \cong 0.63 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$ . Damit ist das durch Gl. (F4a-c) gegebene Ratengleichungssystem vollständig beschrieben.

Gl. (F4a-c) vernachlässigt die Population höher angeregter Singulett - Zustände., da diese sehr schnell in den einfach angeregten Zustand relaxieren (sub - ps Zeitskala) und eine indirekte Besetzung höher angeregter durch eine gegenseitige Wechselwirkung einfach angeregter Zustände bei der verwendeten Konzentration von Chl *a* in Lösung ausgeschlossen werden kann /<sup>5</sup>.

Die normierte Fluoreszenzausbeute kann aus der Lösung von Gl. (F4) berechnet werden:

$$\Phi^{norm}(I_p) = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} x_1(t) dt}{I_p} \bigg/ \left[ \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} x_1(t) dt}{I_p} \right]_{I_p \rightarrow 0} \quad (\text{F5})$$

Das Ergebnis ist in Abb. 13 als durchgezogene Linie eingezeichnet. Es ist zu erkennen, daß die Meßergebnisse von Chl *a* in Lösung durch das Gleichungssystem Gl. (F4a-c) sehr gut beschrieben werden. Dieses Resultat verdeutlicht das von Chl *a* zu erwartende (allerdings niemals vorher in diesem weiten Bereich der Anregungsintensität gemessene) Verhalten der Fluoreszenzausbeute, das durch eine drastische Entleerung der Grundzustandspopulation geprägt ist. Ein sehr wichtiger Aspekt, der sich aus der Übereinstimmung der experimentellen mit der berechneten Chl *a* - Kurve ergibt, ist die Tatsache, daß die experimentelle Anlage Daten liefert, welche von dem Chl *a* Testmolekül erwartet werden.

<sup>5</sup> Die Hinzunahme von zusätzlichen Prozessen sowie Zuständen stellt keine Schwierigkeit dar. Es soll hier jedoch das einfachste Modell für die Beschreibung der Fluoreszenzausbeute von Chl *a* in Lösung betrachtet werden, um die für diese Meßgröße wesentlichen Prozesse klar hervorzuheben.

## 2.2.5. Theoretische Beschreibung der intensitätsabhängigen Fluoreszenz für solubilisierten LHCII

---

In diesem Abschnitt soll das Verhalten der intensitätsabhängigen Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII quantitativ beschrieben werden. Ein Augenmerk soll hierbei auf die gemessene Kurvenform, d.h. das sättigende Verhalten der Fluoreszenz (für  $I_p > 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ ), aber auch die Position bezüglich der Intensitätsachse gelegt werden.

### 2.2.5.1. Ein Pauli-Master Gleichungsmodell

---

Zunächst wird von dem von Gülen et al. (1986) entworfenen Modell (siehe (aaa) in Abb. 8, S. 29) ausgegangen. Dort wurde allerdings ein Rechteck-förmiger Anregungsimpuls vorausgesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Modell so erweitert, daß es für beliebige Impulsformen anwendbar ist. Damit ist es nun möglich, die intensitätsabhängige Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII unter Beachtung der experimentellen Bedingungen durch ein erweitertes, auf *Pauli - Master - Gleichungen* basierendes, Model zu beschreiben. Dies ist im folgenden ausführlich dargestellt.

Es wird ein Komplex betrachtet, in dem sich  $\mathfrak{N}$  Pigmente befinden. Durch Absorption von Photonen kommt es zur Bildung von  $i$  einfach elektronisch angeregten Zuständen. Die gegenseitige Wechselwirkung von jeweils zwei einfach angeregten Zuständen (siehe S. 28) führt zur Vernichtung des einen und zur Überführung des anderen in einen höher angeregten Zustand. Höher angeregte Zustände können auch direkt durch Absorption aus einfach angeregten Zuständen hervorgehen. In beiden Fällen sind mindestens zwei absorbierte Photonen nötig, um höher angeregte Zustände zu erzeugen. Deshalb werden diese (wie auch in Gülen et al., 1986) im folgenden „doppelt angeregte Zustände“ genannt. Im Prinzip absorbieren doppelt angeregte Zustände ebenfalls, was zur Erzeugung dreifach angeregter Zustände usw. führt. Da letztere jedoch extrem schnell relaxieren, müssen sie nicht explizit berücksichtigt werden (siehe Gülen et al., 1986). Die Anzahl doppelt angeregter Zustände wird mit  $j$  bezeichnet. Relaxationsprozesse führen zum Abbau doppelt bzw. einfach angeregter Zustände und damit zur Verringerung von  $i$  und  $j$ .

Im Pauli - Master - Gleichungs - Formalismus wird die Wahrscheinlichkeit  $P(i, j)$  betrachtet, mit der sich in dem Komplex  $i$  einfach angeregte und  $j$  doppelt angeregte Zustände befinden.

Dabei ist die Indexmenge  $M = \{i, j\}$  gegeben durch:

$$M = \{i, j\} \text{ für die gilt: } \begin{cases} 0 \leq i, j \leq \aleph \\ 0 \leq i + j \leq \aleph \end{cases} \quad (\text{F6})$$

Die Anzahl der Mitglieder von  $M$ ,  $\aleph^{(M)}$ , ergibt demnach:  $\aleph^{(M)} = \frac{1}{2} \cdot (\aleph + 1) \cdot (\aleph + 2)$ . Für einen Komplex mit  $\aleph = 12$  ergeben sich also 91 zu berechnende Wahrscheinlichkeiten.

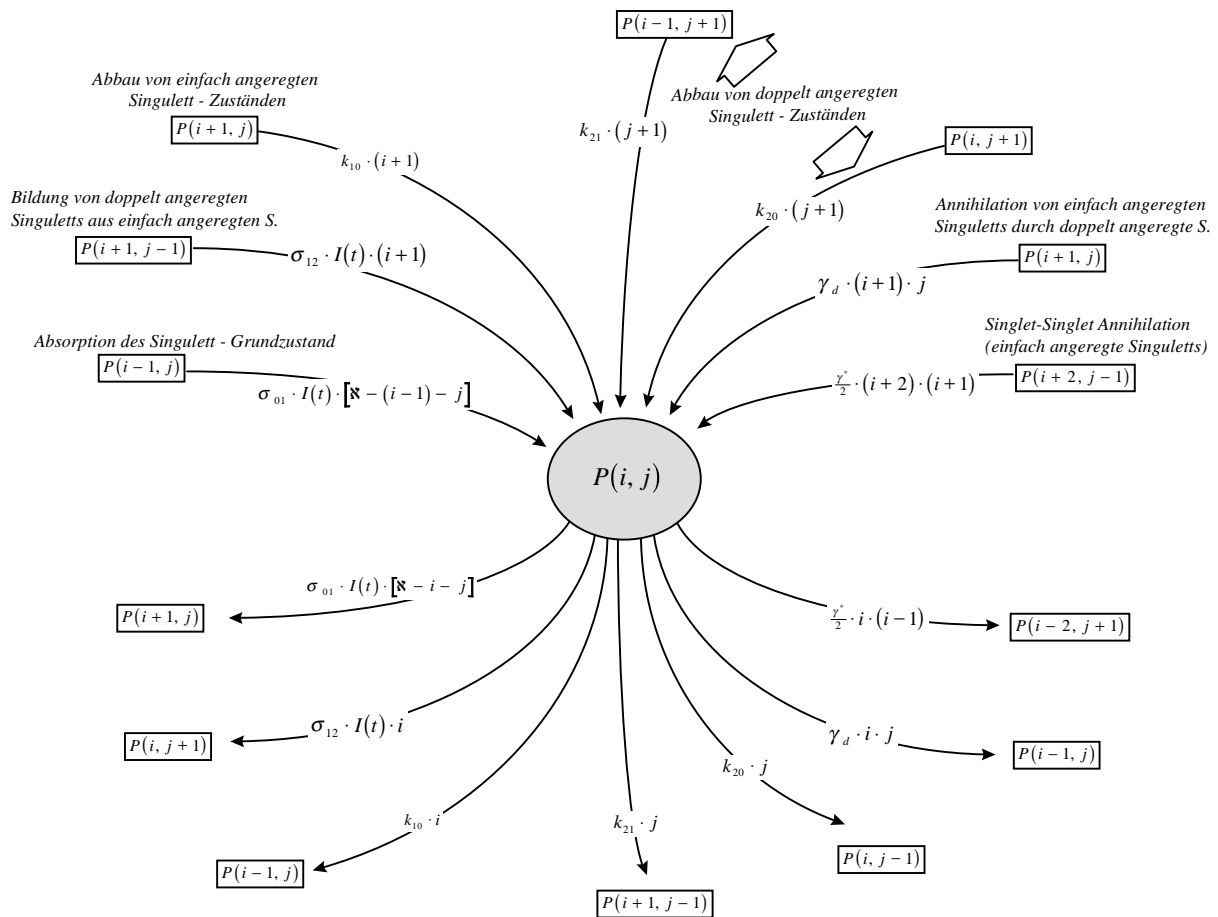


Abbildung 14

Zusammenfassende Darstellung aller betrachteten Prozesse, die einen Einfluß auf die Wahrscheinlichkeit,  $P(i, j)$ , dafür besitzen, daß sich in einem Komplex mit  $\aleph$  Gesamtzuständen (Chlorophyllen)  $i$  einfach und  $j$  doppelt angeregte Zustände befinden.

Abb. 14 stellt schematisch alle Prozesse dar, die einen Einfluß auf  $P(i, j)(t)$  besitzen. Der obere Teil der Abbildung umfaßt alle Prozesse, die im Prinzip zu einer Erniedrigung der Indizes  $i$  oder  $j$  führen (teilweise geht eine Erniedrigung des einen mit einer Erhöhung des anderen einher). In entsprechender Weise bewirken die gleichen Prozesse (unterer Abbildungsbereich) eine Erhöhung von  $i$  oder  $j$ .

In Abwesenheit von Photonen befindet sich der Komplex im Zustand  $\{0,0\}$ . Deshalb kann als Anfangsbedingung für die nachfolgenden Berechnungen folgendes gesetzt werden:

$$P(i, j)(t^{AB}) = \begin{cases} 1, & \text{wenn } i = j = 0 \\ 0, & \text{sonst} \end{cases} \quad (\text{F7})$$

Hierbei wurde  $t^{AB}$  auf  $-5 \cdot \Delta$  festgelegt (siehe Gl. (E6) auf S. 23).

Die Bedeutung der in Abb. 14 enthaltenen Parameter und deren Wirkung auf die Indizes  $i$  und  $j$  sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

	Beschreibung des Parameter	Wirkung bzgl. $i$ und $j$	Vorgabewert (siehe Text)
$\sigma_{01}$	Grundzustands - Absorptionsquerschnitt (bei 645 nm)	$i \rightarrow i+1$	$\sigma_{\text{eff}}^{\text{Chl } a}$ (645 nm) $\cong 1.32 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$ (siehe Anhang A1, S.103)
$\sigma_{12}$	Absorptionsquerschnitt von einfach angeregten Singulett	$(i, j) \rightarrow (i-1, j+1)$	$\approx \sigma_{01}$ bei 645 nm (siehe Hillmann, 1995)
$k_{10}$	Abbau - Rate von einfach angeregten Singulett	$i \rightarrow i-1$	$(4.3 \text{ ns})^{-1}$ (Vasil'ev et al., 1997b)
$k_{21}$	Abbau - Rate von doppelt angeregten Singulett unter Bildung von einfach angeregten Singulett	$(i, j) \rightarrow (i+1, j-1)$	$> (1 \text{ ps})^{-1}$ (siehe z.B. Gülen et al., 1986)
$k_{20}$	Abbau - Rate von doppelt angeregten Singulett unter Bildung von Singulett - Grundzuständen	$j \rightarrow j-1$	variabel
$\gamma^*$	Rate für die paarweise Annihilation von einfach angeregten Singulett.	$(i, j) \rightarrow (i-2, j+1)$	variabel
$\gamma_d$	Rate für die Annihilation von einfach angeregten durch doppelt angeregte Singulett.	$(i, j) \rightarrow (i-1, j) /^6$	variabel / <sup>7</sup>

Tabelle 2

Übersicht über Parameter, die für den im Pauli - Master Formalismus behandelten Komplex mit  $\mathfrak{N}$  absorbierenden Grundzuständen von Bedeutung sind. Die rechte Spalte zeigt an, ob feste Werte angegeben werden können oder ob der Parameter als variabel anzusehen ist.

<sup>/6</sup> Der Index  $j$  bleibt hier unbeeinflusst, weil davon ausgegangen wird, daß die über diesen Prozeß aus doppelt angeregten Zuständen gebildeten höher angeregten Zustände sehr schnell relaxieren (siehe S. 39).

<sup>/7</sup> Da doppelt angeregte Zustände sehr schnell relaxieren, bleibt deren Besetzungswahrscheinlichkeit sehr gering im Vergleich zu einfach angeregten Zuständen. Deshalb kommt der bimolekularen Wechselwirkungsrate  $\gamma_d$  eine untergeordnete Rolle zu (verglichen mit  $\gamma^*$ )



Damit ergibt sich ein Pauli-Master-Gleichungssystem von  $\aleph^M$  gekoppelten Differentialgleichungen für die jeweils gilt:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} P(i, j) = & - \left\{ \begin{aligned} & \sigma_{01} \cdot I(t) \cdot [\aleph - i - j] + i \cdot [\sigma_{12} \cdot I(t) + k] \\ & + j \cdot (k_{21} + k_{20}) + i \cdot \left[ \frac{\gamma_a^*}{2} \cdot (i-1) + \gamma_a \cdot j \right] \end{aligned} \right\} \cdot P(i, j)(t) \\ & + \sigma_{01} \cdot I(t) \cdot [\aleph - (i-1) - j] \cdot P(i-1, j)(t) \\ & + (i+2) \cdot (i+1) \cdot \frac{\gamma_a^*}{2} \cdot P(i+2, j-1)(t) \\ & + (i+1) \cdot j \cdot \gamma_a \cdot P(i+1, j)(t) \\ & + (i+1) \cdot k \cdot P(i+1, j)(t) \\ & + (i+1) \cdot \sigma_{12} \cdot I(t) \cdot P(i+1, j-1)(t) \\ & + (j+1) \cdot k_{21} \cdot P(i-1, j+1)(t) \\ & + (j+1) \cdot k_{20} \cdot P(i, j+1)(t) \end{aligned} \quad (F8)$$

für alle  $\{i, j\} \in M$

Im Gegensatz zu Gülen et al. (1986), wo an dieser Stelle zwei Zeitbereiche definiert werden ( $I(t) = I_0$  in  $0 \leq t \leq \Delta t$  und  $I(t) = 0$  sonst, siehe oben) und die Lösung über die Berechnung von Eigenwerten ermittelt wird, wurde bei den im folgenden beschriebenen Berechnungen die Zeitabhängigkeit der Anregungsintensität (nach Gl. (E2) auf S. 20) explizit berücksichtigt.

Durch das Erstellen umfangreicher Datenbanken aus den numerisch berechneten Ergebnissen der Pauli-Master-Gleichungen war es möglich, Gl. (F8) für eine Vielzahl von Parametern zu berechnen, um damit die Meßdaten der intensitätsabhängigen Fluoreszenz zu beschreiben. Letzteres ist im folgenden beschrieben.

Die von dem Komplex emittierte zeitabhängige Fluoreszenz ist der mittleren Zahl einfach angeregter Zustände,  $\langle i \rangle(t)$ , proportional (doppelt angeregte Zustände relaxieren strahlungslos). Diese ergibt sich aus der Lösung des Pauli-Master-Gleichungssystems:

$$f(t) \propto \langle i \rangle(t) = \sum_{(i,j) \in M} i \cdot P(i, j)(t) \quad (F9)$$

Die vom Komplex ausgesandte (zeitlich) integrale Fluoreszenz ergibt sich aus:

$$F \propto \int_{t^{AB}}^{\infty} f(t) dt \quad (F10)$$

Auf der Grundlage dieser Gleichungen wurde der Vergleich mit den experimentell ermittelten Daten der (zeitlich) integralen Fluoreszenz vollzogen. Darauf soll im folgenden näher eingegangen werden.

Der Verlauf der berechneten Kurven für die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Anregungsimpuls-Intensität wird auf unterschiedliche Weise von den in Tab. 2 zusammengefaßten Parametern beeinflusst.

Es zeigte sich insbesondere, daß die Kurvenform fast ausschließlich durch den Parameter  $\gamma^*$  bestimmt wird. Dahingegen wird die Position der berechneten Kurven bezüglich der  $I_p$ - Achse durch das Produkt aus der Anzahl  $\aleph$  der Pigmente (pro Komplex) mit deren Grundzustandsabsorptionsquerschnitt  $\sigma_{01}$  und damit durch einen Grundzustands - Gesamtabsorptionsquerschnitt  $\sigma_{01} \cdot \aleph$  bestimmt (siehe unten).

Die Werte aller übrigen Parameter (siehe Tab. 2) sind entweder bekannt (z.B.  $k_{10} = (4.3 \text{ ns})^{-1}$ ), an bestimmte Bedingungen geknüpft (z.B.  $k_{21} > (1 \text{ ps})^{-1}$ ) oder ihre Wirkung auf den Verlauf der Fluoreszenz-Kurve als Funktion von  $I_p$  ist gering ( $k_{20}$ ,  $\gamma_d$ ), weshalb auf deren Einfluß hier nicht näher eingegangen werden soll.

Abb. 15 zeigt als Fehlerkreuze die Daten der experimentell bestimmten Fluoreszenz als Funktion von  $I_p$ . Diese sind den in Abb. 13 (S. 37) dargestellten Daten der Fluoreszenzquantenausbeute komplementär. In dieser Darstellung ist das sättigende Verhalten der Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII am deutlichsten zu erkennen. In Abb. 15 sind zum Vergleich Kurven gezeigt, die mit dem beschriebenen Pauli-Master-Modell (Gl. (F10)) für verschiedene Parameter  $\gamma^*$  berechnet wurden. Offensichtlich existiert ein starker Einfluß auf die Kurvenform. Es ist zu erkennen, daß der sättigende Verlauf der Meßdaten nur für extrem große Werte von

$$\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$$

erreicht wird. In diesem Fall besitzt die Zahl  $\aleph$  der absorbierenden Grundzustände (bzw. im Komplex enthaltenen Grundzustände) keinen direkten Einfluß auf die berechnete Fluoreszenz.  $\aleph$  hat lediglich im Produkt mit  $\sigma_{01}$  eine Bedeutung und bestimmt damit die Position der berechneten Kurven.  $\sigma_{01} \cdot \aleph$  wurde variiert, um die durchgezogene Linie in Abb. 15 in Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zu bringen. Als Ergebnis ergibt sich:

$$\sigma_{01} \cdot \aleph = (2.3 \pm 0.6) \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2$$

Dieses Produkt gibt den Wert eines Gesamtabsorptionsquerschnittes des solubilisierten LHCII Komplexes an.

Zusammen mit dem aus der Kurvenform bestimmten Parameter  $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$  ist es damit möglich, den Verlauf der experimentellen Daten im gesamten Untersuchungsbereich von  $I_p$  sehr gut zu beschreiben (siehe Abb. 15). Es ist jedoch nötig, eine extrem große Annihilationsrate  $\gamma^*$  anzunehmen, um das sättigende Verhalten der Fluoreszenz als Funktion von  $I_p$  zu erklären. Das bedeutet anschaulich, daß eine Besetzung von mehreren ( $i > 1$ ) elektronischen Anregungszuständen (in einem Komplex mit  $\aleph$  Gesamtzuständen) sehr effektiv vernichtet wird.

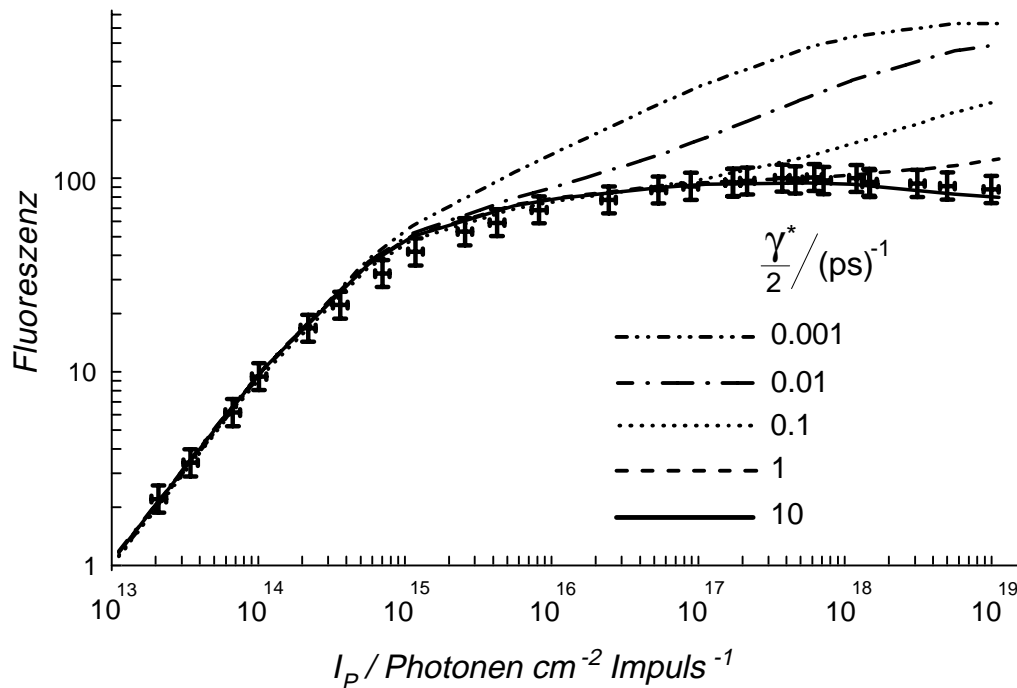


Abbildung 15

Das sättigende Verhalten der Fluoreszenz: Die Fehlerkreuze entsprechen den gemessenen Daten von solubilisiertem LHCII und sind den Werten der Fluoreszenzausbeute (siehe Abb. 13 auf S. 37) komplementär. Die dargestellten Kurven wurden mit dem Pauli-Master-Model berechnet. Dabei wurde das zeitliche Profil des Anregungsimpulses explizit berücksichtigt. Scharparameter ist die (die Kurvenform bestimmende) bimolekulare Singulett-Singulett-Annihilationsrate  $\gamma^*$  (siehe Legende). Die übrigen Parameter lauten:  $\sigma_{01} \cdot \mathfrak{K} = 2.3 \cdot 10^{15} \text{ cm}^2$ ,  $k_{10} = (4.3 \text{ ns})^{-1}$ ,  $\sigma_{12} = \sigma_{01}$ ,  $k_{21} = (0.5 \text{ ps})^{-1}$ ,  $k_{20} = 0.1 \cdot k_{21}$ ,  $\gamma_d = \gamma^*$ .

Abb. 16 illustriert dieses Verhalten anhand der zeitabhängigen Darstellung aller von Null verschiedenen Wahrscheinlichkeiten  $P(i, j)$  bei  $I_p = 5 \cdot 10^{18} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ . Die Parameter des Systems entsprechen denen der durchgezogenen Linie von Abb. 15. Bei nicht so extrem hoher Laserimpulsintensität (z. B.  $I_p = 5 \cdot 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ ) sind um so mehr  $P(i, j)$  vernachlässigbar klein. Zustände der Form  $P(i > 1, j \geq 1)$  (z.B.  $P(2,0)$ ,  $P(1,1)$ ,  $P(0,2)$  in Abb. 16) werden dann durch die Wirkung von  $\gamma^*$  quasi-instantan (das heißt noch während des Impulses) vernichtet. Da auch Zustände mit  $j > 0$  sehr schnell abgebaut werden ( $k_{21} > (1 \text{ ps})^{-1}$ ) wird der Komplex hauptsächlich durch den Zustand  $P(1,0)$  beschrieben. Aus diesem Grund ist auch kein Einfluß der Anregungsintensität auf die Fluoreszenzabklingkinetik von solubilisiertem LHCII zu erwarten. Dies wurde von Nordlund und Knox (1981) experimentell nachgewiesen (siehe Diskussion auf S. 30).

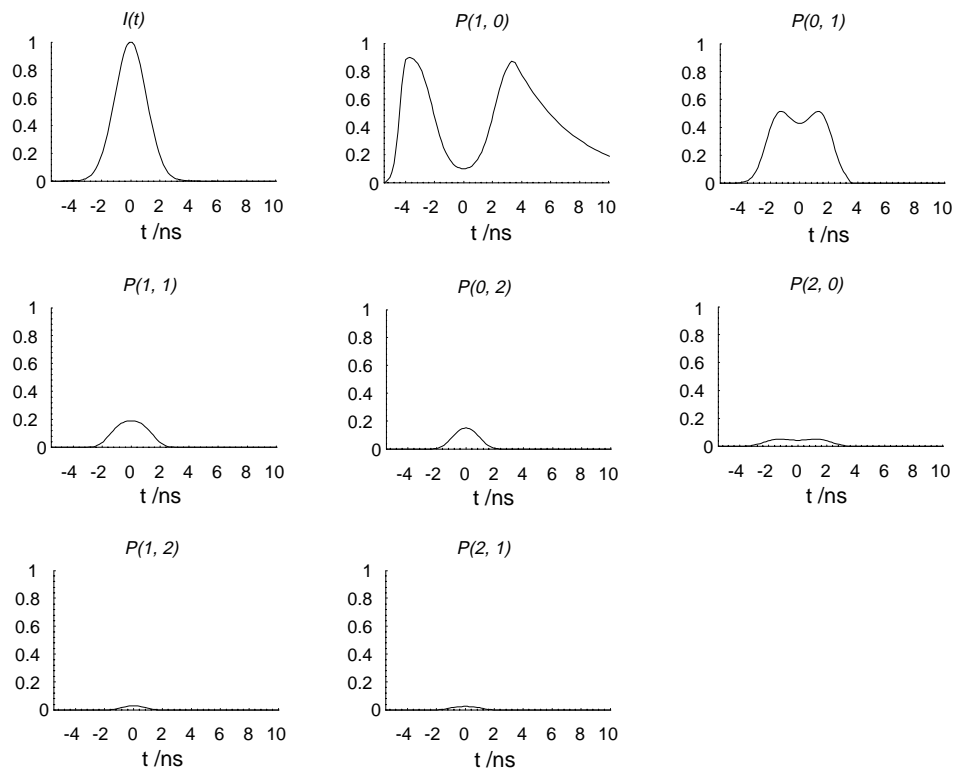


Abbildung 16

Zeitabhängige Darstellung von  $P(i, j)$  bei  $I_p = 5 \cdot 10^{18}$  Photonen  $\text{cm}^{-2}$  Impuls $^{-1}$  entsprechend den Parametern der durchgezogenen Linie von Abb. 15. Alle weiteren Lösungen ergeben Null.

Aufgrund der Eigenschaften von solubilisiertem LHCII kann von folgendem Bild ausgegangen werden: Die überwiegend bei 645 nm (Anregungswellenlänge) absorbierenden Chl *b* Moleküle transferieren die aufgenommene Anregungsenergie sehr schnell (Du et al., 1994; Bittner et al., 1994) zu Chl *a* Molekülen. Damit tragen diese (die Chl *b* Moleküle) effektiv zur Erzeugung von Chl *a* Anregungszuständen bei. Deshalb kann der Absorptionsquerschnitt  $\sigma_{01}$  mit dem effektiven Absorptionsquerschnitt,  $\sigma_{\text{eff}}^{\text{Chl } a}$  (645 nm), von Chl *a* Molekülen innerhalb der solubilisierten LHCII Komplexe identifiziert werden. Eine Abschätzung ergibt:  $\sigma_{\text{eff}}^{\text{Chl } a}$  (645 nm)  $\cong 1.32 \cdot 10^{-16}$   $\text{cm}^2$  (siehe Anhang A1, S.103). Dem steht der Gesamtabsorptionsquerschnitt von  $\sigma_{01} \cdot \aleph = (2.3 \pm 0.6) \cdot 10^{-15}$   $\text{cm}^2$  gegenüber, der aus der Anpassung der experimentellen Daten gewonnen wurde (siehe durchgezogene Linie in Abb. 15). Nach Voraussetzung entspricht die Anzahl  $\aleph$  der Anzahl von Chl *a* Molekülen im Komplex,  $\aleph^{\text{Chl } a}$ . Aus dem Vergleich von  $\sigma_{01} \cdot \aleph = \sigma_{\text{eff}}^{\text{Chl } a} \cdot \aleph^{\text{Chl } a}$  und  $\sigma_{\text{eff}}^{\text{Chl } a}$  läßt sich dementsprechend abschätzen, wie viele Chl *a* Moleküle sich innerhalb des Komplexes befinden. Es ergibt sich:

$$\aleph^{\text{Chl } a} = 18 \pm 5$$

Geht man davon aus, daß es sich bei dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten solubilisierten LHCII tatsächlich um Trimere handelt, dann ist diese Zahl konsistent mit der von Kühlbrandt et al. (1994) angegebenen Gesamtzahl von ca. 21 Chl *a*

Molekülen pro Trimer (siehe Kap. 1.1.3. auf S. 10).

Die Beschreibung der Fluoreszenzquantenausbeute von solubilisiertem LHCII durch das in diesem Abschnitt beschriebene Pauli-Master Gleichungsmodell führt damit zu der Hypothese, daß doppel- Anregungen von Chl *a* Molekülen innerhalb von LHCII-Trimeren (direkte und indirekte Anregung) quasi-instantan vernichtet werden. Dementsprechend können noch höhere Anregungen (dreifach etc.) ausgeschlossen werden. Diese Hypothese stellt ein „vernünftig erscheinendes“ Ergebnis dar. Allerdings basiert sie auf der Annahme von Anregungszuständen, die ausschließlich den einzelnen Pigmenten zugeordnet werden. Effekte, die auf einem kollektiven Verhalten der Pigmente basieren, sind scheinbar nicht enthalten. Das Pauli-Master Gleichungsmodell läßt jedoch kollektive Effekte zu, wenn man den Absorptionsquerschnitt nicht den einzelnen Pigmenten (Chl *a*), sondern einer Gruppe von Pigmenten zuordnet. Dies betrifft den Fall einer starken exzitonischen Kopplung zwischen den Pigmenten, wie sie beim bakteriellen Lichtsammelkomplex LH2 angenommen wird (siehe Stiel et al., 1997). Die Größe dieses kollektiven Absorptionsquerschnittes hat keinen Einfluß auf die berechneten Kurven der Fluoreszenz als Funktion von  $I_p$  solange gilt:  $\sigma_{01} \cdot \aleph = (2.3 \pm 0.6) \cdot 10^{-15} \text{cm}^2$  (siehe oben). Dabei stellt  $\aleph$  die Anzahl der (kollektiv absorbierenden) Grundzustände und  $\sigma_{01}$  deren Absorptionsquerschnitt dar.

Aus einer Vielzahl von möglichen Zuständen sind nur wenige wirklich von Bedeutung. Durch den drastisch hohen Wert von  $\gamma^*$  hat die Anzahl  $\aleph$  der im Komplex enthaltenen Zustände (Pigmente) nahezu keinen Einfluß auf die berechneten Kurven (siehe Abb. 15). Im Extremfall kann  $\aleph$  sogar 1 gesetzt werden. Dies führt auf eine qualitativ neue Stufe der Betrachtungen, da in diesem Falle eine paarweise Wechselwirkung zwischen angeregten Zuständen unmöglich ist ( $\aleph < 2$ ). Im folgenden Kapitel wird gezeigt, wie sich die Ergebnisse der Fluoreszenzquantenausbeute von solubilisiertem LHCII innerhalb dieses Modells auf sehr einfache Weise beschreiben lassen.

### **2.2.5.2. Mathematische Grenzfälle des Pauli-Master Gleichungsmodells und deren Anwendbarkeit**

#### **Das „Cluster - Modell“ für solubilisierten LHCII**

Die Stärke der destruktiven Wechselwirkung zwischen angeregten Chlorophyll-Singulett-Zuständen wird durch die Konstante  $\gamma^*$  (siehe Gl. (F8)) bestimmt. Ist diese sehr groß ( $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$ ), so werden Zustandswahrscheinlichkeiten  $P(i, j)(t)$  mit  $i > 1$  praktisch Null. Zum Beispiel wird der Zustand, dessen Wahrscheinlichkeit  $P(2, j)(t)$  beträgt (zwei einfach angeregte Singulett pro Komplex), quasi instantan in  $P(1, j+1)(t)$  überführt. Die Wahrscheinlichkeit der auf diese Weise erzeugten

doppelt angeregten Zustände bleibt ebenfalls sehr gering, da die Rate für deren Abbau gleichermaßen sehr groß ist ( $k_{21} > (1 \text{ ps})^{-1}$ ). Deshalb treten Besetzungswahrscheinlichkeiten  $P(i > 1, j > 1)(t)$  nur bei sehr hohen Intensitäten in Erscheinung (siehe Abb. 16 auf S. 45).

Der Komplex wird sich also in den meisten Fällen in einem der folgenden drei Zustände befinden:

- Grundzustand: ( $i = 0, j = 0$ )
- einfach angeregter Zustand: ( $i = 1, j = 0$ )
- doppelt angeregter Zustand: ( $i = 0, j = 1$ ).

Dies entspricht genau dem Fall  $\mathfrak{N} = 1$  (siehe Gl. (F6) auf S. 40).

Ein Komplex mit  $k_{21} > (1 \text{ ps})^{-1}$  und  $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$  unter Wirkung eines ns-Impulses kann demnach durch eine Art „Cluster“ mit  $\mathfrak{N} = 1$  beschrieben werden. Naturgemäß verschwinden in einem „Cluster - Modell“ alle bimolekularen Wechselwirkungsterme via  $\gamma^*$  (siehe Gl. (F8) auf S. 42). Deshalb läßt sich das „Cluster - Modell“ auf kinetische Gleichungen zurückführen (Gl. (F11)) und damit drastisch vereinfachen.

Es läßt sich explizit zeigen, daß Gl. (F8) unter den genannten Bedingungen in das folgende einfache System von Ratengleichungen übergeht:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} x_1 &= \sigma_{01} \cdot I(t) \cdot [1 - x_1 - x_2] - [\sigma_{12} \cdot I(t) + k_{10}] \cdot x_1 + k_{21} \cdot x_2 \\ \frac{d}{dt} x_2 &= \sigma_{12} \cdot I(t) \cdot x_1 - [k_{21} + k_{20}] \cdot x_2 \\ x_0 &= 1 - x_1 - x_2 \end{aligned} \tag{F11}$$

Dabei sind die zeitabhängigen  $x_i$  definiert durch:  $x_0 = P(0,0)$ ,  $x_1 = P(1,0)$ ,  $x_2 = P(0,1)$ .

Die Parameter  $k_{10}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{20}$  haben die gleiche Bedeutung wie in Kap. 2.2.5.1. auf S. 39. Die Absorptionsquerschnitte  $\sigma_{01}$  (Grundzustand) und  $\sigma_{12}$  (angeregter Zustand) sind jedoch dem Cluster zugeordnet.

Betrachtet man ein Ensemble aus diesen (nicht wechselwirkenden) Clustern mit einer Dichte von  $N^{\text{Cluster}}$  (in Einheiten  $\text{cm}^{-3}$ ), so kann  $x_k$  mit der relativen Besetzung von Clustern im Grundzustand ( $k = 0$ ), einfach angeregten Zustand ( $k = 1$ ) und doppelt angeregten Zustand ( $k = 2$ ) identifiziert werden (vergleiche das Ratengleichungssystem für nicht wechselwirkende Chl *a* Moleküle in Lösung in Kap. 2.2.4. auf S. 37). Die Fluoreszenz wird ausschließlich von einfach angeregten Clustern ausgesandt und ist folglich proportional dem Integral:

$$F^{\text{Cluster}} \propto \int_{-\infty}^{+\infty} x_1(t) dt \tag{F12}$$

Abb. 17 zeigt die experimentellen Daten der intensitätsabhängigen Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII zusammen mit einer mittels Gl. (F12) berechneten Kurve. Der Wert von  $\sigma_{01}$  wurde gleich dem des (oben bestimmten) Gesamtabsorptionsquerschnittes von  $(2.3 \pm 0.6) \cdot 10^{-15} \text{cm}^2$  gesetzt. Es ergibt sich eine gute Übereinstimmung der Modellkurve mit den experimentellen Daten. Der Verlauf dieser mit Gl. (F12) berechneten Kurve ist demnach nahezu identisch mit der in Abb. 15 (S. 44) dargestellten durchgezogenen Linie, für die gilt:  $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$  und  $\sigma_{01} \cdot \mathfrak{N} = (2.3 \pm 0.6) \cdot 10^{-15} \text{cm}^2$ .

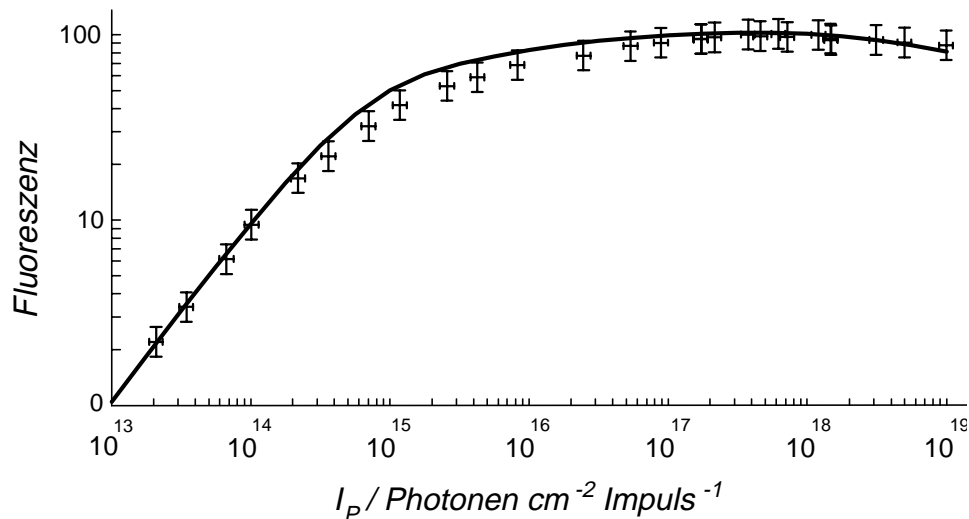


Abbildung 17

Anpassung der gemessenen intensitätsabhängigen Fluoreszenz durch das „Cluster - Modell“. Es wurden die folgenden Parameter benutzt:  $\sigma_{01} = 2.3 \cdot 10^{-15} \text{cm}^2$ ,  $k_{10} = (4.3 \text{ ns})^{-1}$ ,  $\sigma_{12} = \sigma_{01}$ ,  $k_{21} = (0.5 \text{ ps})^{-1}$ ,  $k_{20} = 0.1 \cdot k_{21}$ .

Das Verhalten der intensitätsabhängigen Fluoreszenz ist also durch ein viel einfacheres Modell erklärbar. In diesem - hier „Cluster - Modell“ genannten System - werden mögliche Anregungszustände identischen (nicht wechselwirkenden) Clustern zugeordnet. Die Absorption eines Photons durch ein Cluster führt zur Emission von Fluoreszenz. Absorbiert ein bereits angeregtes Cluster ein weiteres Photon, so kommt es zur Besetzung des doppelt angeregten Zustandes, der sehr schnell relaxiert. Dieser, bei Absorption von mehr als einem Photon pro Cluster einsetzende (der Anregungszustandsabsorption folgende) Relaxationsprozeß, sorgt für die effiziente Vernichtung von Mehrfachanregungen innerhalb der solubilisierten LHCII Komplexe.

### **Ratengleichungen mit quadratischen Termen**

Nutzt man die im Pauli-Master-Gleichungssystem enthaltenen Wahrscheinlichkeiten  $P(i, j)(t)$  (siehe Gl. (F8) auf S. 42) zur Definition von mittleren Erwartungswerten, so erhält man eine anschauliche Darstellung, die sich unter Umständen in ein Ratengleichungssystem umschreiben läßt. Dies soll im folgenden genauer gezeigt

werden:

Die mittlere Anzahl einfach angeregter Zustände ist gegeben durch:

$$\langle i \rangle = \sum_{\{i,j\} \in M} i \cdot P(i, j) \quad (\text{F13a})$$

Entsprechendes gilt für die mittlere Anzahl doppelt angeregter Zustände:

$$\langle j \rangle = \sum_{\{i,j\} \in M} j \cdot P(i, j) \quad (\text{F13b})$$

Die zeitliche Ableitung von  $P(i, j)(t)$  ist direkt durch die Pauli-Master-Gleichung gegeben (siehe Gl. (F8) auf S. 42). Deshalb ist es möglich, bei Vorgabe der Gesamtzahl von  $\aleph$  Pigmenten, die zeitlichen Ableitungen von  $\langle i \rangle$  und  $\langle j \rangle$  explizit zu berechnen:

$$\frac{d}{dt} \langle i \rangle = \sum_{\{i,j\} \in M} i \cdot \frac{d}{dt} P(i, j) \quad \text{und} \quad \frac{d}{dt} \langle j \rangle = \sum_{\{i,j\} \in M} j \cdot \frac{d}{dt} P(i, j) \quad (\text{F14})$$

Das Ergebnis dieser Berechnungen läßt sich so formulieren:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \langle i \rangle = & \sigma_{01} \cdot I(t) \cdot [\aleph - \langle i \rangle - \langle j \rangle] + k_{21} \cdot \langle j \rangle \\ & - [\sigma_{12} \cdot I(t) + k_{10}] \cdot \langle i \rangle - \gamma^* \cdot \langle i \cdot (i-1) \rangle - \gamma_d \cdot \langle i \cdot j \rangle \end{aligned} \quad (\text{F15a})$$

$$\frac{d}{dt} \langle j \rangle = \sigma_{12} \cdot I(t) \cdot \langle i \rangle + \frac{\gamma^*}{2} \cdot \langle i \cdot (i-1) \rangle - [k_{21} + k_{20}] \cdot \langle j \rangle \quad (\text{F15b})$$

wobei gilt:  $\langle i \cdot (i-1) \rangle = \sum_{\{i,j\} \in M} i \cdot (i-1) \cdot P(i, j)$  und  $\langle i \cdot j \rangle = \sum_{\{i,j\} \in M} i \cdot j \cdot P(i, j)$

Es ist tatsächlich so, daß die Konstante  $\gamma^*$  in Gl. (F15a) nicht in Verbindung mit dem Faktor 1/2 auftritt. Diese Eigenschaft tritt durch die Hinzunahme doppelt angeregter Zustände in Erscheinung.

Unter folgenden Bedingungen gehen die Gleichungen Gl. (F15a, b) in ein einfaches Ratengleichungssystem (siehe unten) über:

- i. Die Wechselwirkung einfach angeregter Zustände mit doppelt angeregten Zuständen über die Konstante  $\gamma_d$  muß vernachlässigt werden.
- ii. Es muß gelten:  $\langle i \cdot (i-1) \rangle \approx \langle i^2 \rangle$ .

Ohne Beschränkung der Allgemeinheit sei angenommen, daß Bedingung i) erfüllt ist. Dazu sei bemerkt, daß die Besetzung doppelt angeregter Pigment-Zustände nur bei extrem hohen Anregungsintensitäten eine Rolle spielt, da deren Relaxation über  $k_{21}$  und  $k_{20}$  sehr schnell ist.

Läßt man eine Abweichung von ca. 25 % zu, dann ist auch die Bedingung ii) erfüllt wenn gilt  $\langle i \rangle \geq 4$ . Dann erhält man aus Gl. (F15a, b) folgende einfache kinetische



Gleichungen für die Besetzung von Zuständen:

$$\frac{d}{dt}x_1 = \sigma_{01} \cdot I(t) \cdot [1 - x_1 - x_2] + k_{21} \cdot x_2 - [\sigma_{12} \cdot I(t) + k_{10}] \cdot x_1 - \gamma \cdot x_1^2 \quad (\text{F16a})$$

$$\frac{d}{dt}x_2 = \sigma_{12} \cdot I(t) \cdot x_1 + \frac{\gamma}{2} \cdot x_1^2 - [k_{21} + k_{20}] \cdot x_2 \quad (\text{F16b})$$

wobei  $x_k$  die relative Besetzung einfach angeregter ( $k = 1$ ) bzw. doppelt angeregter ( $k = 2$ ) Zustände bezeichnet. Es wurde gesetzt:  $x_1 = \frac{\langle i \rangle}{\mathfrak{N}}$  und  $x_2 = \frac{\langle j \rangle}{\mathfrak{N}}$ . Die Konstante  $\gamma$  steht für das Produkt:  $\gamma = \gamma^* \cdot \mathfrak{N}$ . Alle weiteren Konstanten sind identisch mit denen von Tab. 2 (siehe S. 41).

Gl. (F16a, b) ist ein einfaches System kinetischer Gleichungen für die Berechnung der Besetzung von einfach und doppelt angeregten Zuständen innerhalb eines Komplexes. Das Markante hierbei ist das Auftreten von quadratischen Gliedern, die für die Vernichtung von einfach angeregten Zuständen zugunsten eines Grund- und eines doppelt angeregten Zustandes sorgen. Gleichungen dieser Art lassen sich mit geringem Aufwand (numerisch) lösen. Deshalb fanden solche Lösungsansätze schon vor Jahrzehnten Verwendung.

So nutzte z. B. Swenberg et al. (1976) ein sehr einfaches kinetisches Modell mit quadratischem Term zur Beschreibung der intensitätsabhängigen Fluoreszenz von Chloroplasten. Die Erzeugung doppelt angeregter Zustände und sogar die Grundzustandsentleerung wurde vernachlässigt (siehe Abb. 8 auf S. 29) und damit das intensitätsabhängige Verhalten vollständig auf den quadratischen Term reduziert. Bis heute sind kinetische Gleichungen mit quadratischen Termen verbreitet, um Vernichtungsprozesse von Anregungszuständen auch in umfangreicheren Modellen zu beschreiben (z. B. Stiel et al., 1997).

Kinetische Gleichungen mit quadratischen Termen (siehe Gl. (F16a, b)) sind nur unter der Bedingung  $\langle i \cdot (i - 1) \rangle \approx \langle i^2 \rangle$  gerechtfertigt. Dafür muß gelten:  $\langle i \rangle \geq 4$  (siehe oben). Die Pauli-Master-Gleichungs-Analyse der Ergebnisse zur intensitätsabhängigen Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII führt allerdings zu dem Schluß (siehe Kap. 2.2.5.1. auf S. 39), daß die Wechselwirkung zwischen einfach angeregten Zuständen so schnell zu deren Vernichtung führt, daß es praktisch nicht möglich ist, mehr als einen einfach angeregten Zustand im Komplex zu erzeugen. Die Bedingung  $\langle i \rangle \geq 4$  ist damit keineswegs erfüllt, und es wäre nicht gerechtfertigt, das obige System kinetischer Gleichungen (Gl. (F16a, b)) zu verwenden.

Frühere Messungen an solubilisiertem LHCII (Schödel et al., 1994) sowie Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (für eine Übersicht siehe Breton und Geacintov, 1980) ergaben keine Sättigung der Fluoreszenz bei hohen Anregungsintensitäten. Dies war auf unzureichende bzw. fehlende räumliche Selektivität zurückzuführen. Die fehlerhaften Meßergebnisse ließen sich sehr gut durch kinetische Gleichungen

mit quadratischem Term anpassen und führten damit zu Fehlinterpretationen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf räumliche Selektivität gelegt (siehe Kap. 2.2.1. auf S. 31 sowie Abb. 12 auf S. 36).

## **2.2.6. Vergleich mit den Ergebnissen anderer Meßmethoden**

---

In diesem Abschnitt soll geprüft werden, ob die in Kap. 2.2. gewonnenen Erkenntnisse mit den Ergebnissen anderer Messungen konsistent sind.

### **2.2.6.1. Abklingkinetik der Fluoreszenz**

---

Obwohl die Intensitätsabhängigkeit der Fluoreszenzabklingkinetik an photosynthetischen Systemen Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war (siehe Kap. 2.1. auf S. 27), ist lediglich eine Meßreihe bekannt (Nordlund und Knox, 1981), die an einer definitiv nicht aggregierten (d.h. an einer solubilisierten) Präparation von LHCII durchgeführt wurde. Es sei darauf hingewiesen, daß mit einem Lasersystem gearbeitet werden muß, dessen Impulsfrequenz (Repetitionrate) hinreichend klein ist, um Effekte durch Triplets ausschließen zu können. Die Ergebnisse der Messungen zeigen, daß sich die Fluoreszenzabklingkinetik nicht verändert, wenn die Intensität des Anregungsimpulses erhöht wird.

Dieses Ergebnis wird durch den experimentellen Befund der intensitätsabhängigen Fluoreszenz der vorliegenden Arbeit gestützt. Schon Gülen et al. (1986) sagten ein sättigendes Verhalten der Fluoreszenz bezüglich der Anregungsintensität für nicht aggregierten LHCII voraus (siehe S. 30).

Auch aus den Ergebnissen der Berechnungen auf der Grundlage von Pauli - Master Gleichungen (siehe Kap. 2.2.5.1.) folgt, daß die Fluoreszenzabklingkinetik bei Annahme eines kurzen (ps - bzw. sub-ps -) Impulses nicht von dessen Intensität abhängt, wenn gilt:  $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$  (nicht gezeigt).

Das „Cluster - Modell“ (siehe Kap. 2.2.5.2.) liefert dieses Verhalten schon nach Voraussetzung (keine bimolekularen Terme).

### **2.2.6.2. Die intensitätsabhängige Absorption**

---

Die Erzeugung von Anregungszuständen beeinflusst nicht nur das Verhalten der Fluoreszenz, sondern führt auch zu einer Änderung der Absorption. Die Thematik der instantanen Änderung der Absorption war und ist Gegenstand anderer Arbeiten (z.B. Schrötter, 1992; Hillmann, 1995). Deshalb soll hier nur ein spezieller Punkt untersucht werden: Die (instantane) Änderung der Absorption (bzw. der optischen Dichte), die durch den Anregungsimpuls (bei 645 nm) hervorgerufen wird.

Die Beschreibung der relative Änderung der optischen Dichte auf der Grundlage der Ergebnisse der Berechnungen mit Pauli - Master Gleichungen (siehe Kap. 2.2.5.1.

auf S. 39) soll im folgenden kurz erklärt werden.

Ausgangspunkt ist das Vorhandensein der drei Populationen für den:

- Grundzustand:  $n_0 = N - n_1 - n_2$  ( $N$ : Gesamtkonzentration)
- einfach angeregten Zustand:  $n_1$
- doppelt angeregten Zustand:  $n_2$

Die Populationen sind in Einheiten  $\text{cm}^{-3}$  gegeben. Der (makroskopische) Absorptionskoeffizient lautet:  $\alpha = \sigma_{01} \cdot (N - n_1 - n_2) + \sigma_{12} \cdot n_1 + \sigma_{2n} \cdot n_2$ . Dabei ist  $\sigma_{01}$  der Grundzustandsabsorptionsquerschnitt,  $\sigma_{12}$  derjenige für den einfach angeregten Zustand und  $\sigma_{2n}$  der Absorptionsquerschnitt für den doppelt angeregten Zustand. Letzterer kann zwar für die Berechnung der Populationsdichten vernachlässigt werden (siehe S. 39), es ist jedoch anzunehmen, daß doppelt angeregte Zustände ebenfalls absorbieren.

Im Falle geringer Intensitäten erhält man den linearen Absorptionskoeffizienten:  $\alpha_0 = \sigma_{01} \cdot N$  /<sup>8</sup>. Deshalb ergibt sich für die relative Änderung des Absorptionskoeffizienten:

$$\frac{\Delta\alpha(t)}{\alpha_0} = \frac{\alpha(t) - \alpha_0}{\alpha_0} = x_1(t) \cdot \left( \frac{\sigma_{12} - \sigma_{01}}{\sigma_{01}} \right) + x_2(t) \cdot \left( \frac{\sigma_{2n} - \sigma_{01}}{\sigma_{01}} \right) \quad (\text{F17})$$

Hierbei ist  $x_1$  die relative Besetzung von einfach angeregten und  $x_2$  die von doppelt angeregten Zuständen ( $x_{1/2} = n_{1/2}/N$ ). Es sei darauf hingewiesen, daß aufgrund der Wellenlänge von 645 nm kein Querschnitt für die induzierte Emission in Gl. (F17) berücksichtigt ist (die Fluoreszenz von LHCII bei 645 nm ist marginal).

Gemessene Änderungen der optischen Dichte ( $\Delta OD^{\text{Meß}}$ ) entsprechen damit folgenden zeitlich integralen Ausdrücken (siehe Anhang A2a auf S. 104):

$$\Delta OD^{\text{Meß}} = -\lg \left[ \frac{T^{\text{Meß}}}{T_0} \right] = -\lg \left[ \int_{-\infty}^{\infty} \exp[-\Delta\alpha(t) \cdot d] \cdot \Gamma(t) dt \right] \quad (\text{F18})$$

wobei  $d$  für die Dicke der Probenküvette steht. Abb. 18 zeigt die von Hillmann (1995) bei 645 nm gemessenen Daten zusammen mit einer nach Gl. (F18) berechneten Kurve. Die in Gl. (F17) enthaltenen relativen Besetzungen wurden hierbei den Ergebnissen der obigen Pauli-Master-Gleichungsanalyse entnommen (siehe Abb. 15 auf S. 44).

---

<sup>/8</sup> Man beachte, daß  $N$  eine makroskopische Größe für die Konzentration von Zuständen bezeichnet und deutlich verschieden ist von der mikroskopischen Anzahl  $\mathbf{x}$  von Pigmenten pro Komplex.

Dabei gilt:

$$x_1(t) = \frac{\langle i \rangle}{\mathfrak{N}} = \frac{1}{\mathfrak{N}} \cdot \sum_{(i,j) \in M} i \cdot P(i, j)(t) \quad (\text{F19a})$$

$$x_2(t) = \frac{\langle j \rangle}{\mathfrak{N}} = \frac{1}{\mathfrak{N}} \cdot \sum_{(i,j) \in M} j \cdot P(i, j)(t) \quad (\text{F19b})$$

Die in Abb. 18 dargestellte berechnete Kurve ergibt sich, wenn gilt:  $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$  und beschreibt die experimentellen Daten gut. Hierbei wurde  $\sigma_{12}$  etwas größer (siehe Bildunterschrift) als  $\sigma_{01}$  gewählt, um die Zunahme der Absorption im Bereich von  $I_p = 10^{15} - 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  (durch Anregungszustandsabsorption) zu beschreiben <sup>9</sup>.

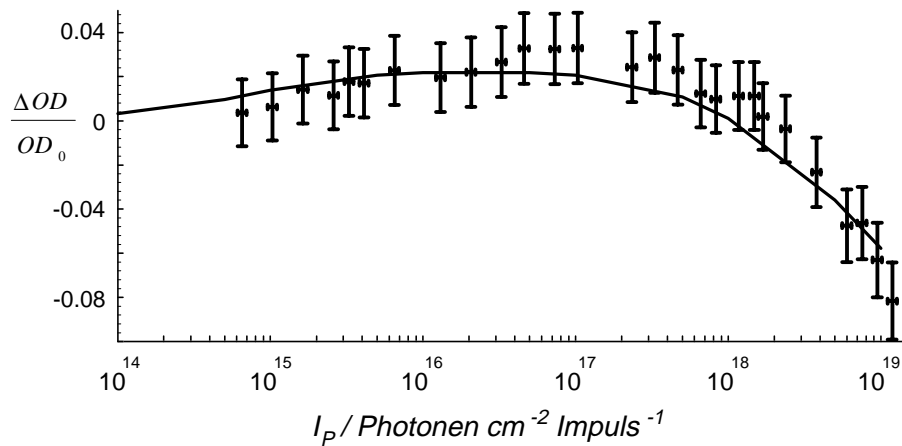


Abbildung 18

Experimentelle Daten (Fehlerkreuze) der relativen Änderung der optischen Dichte bei 645 nm in solubilisiertem LHCII als Funktion der Laserimpulsintensität (aus Hillmann 1995). Die durchgezogene Linie wurde auf Grundlage der Pauli - Master Gleichungen berechnet (siehe Text). Dabei wurden die Parameter der durchgezogenen Linie von Abb. 15 (S. 44) und folgendes gesetzt:  $\sigma_{12} = 1.3 \cdot \sigma_{01}$ ;  $\sigma_{2n} = 0.8 \cdot \sigma_{01}$ .

Ein identisches Verhalten der intensitätsabhängigen Absorption ergibt sich, wenn man das oben dargestellte „Cluster-Modell“ zugrunde legt (siehe Kap. 2.2.5.2. auf S. 46) und die in Abb. 17 und 18 enthaltenen Parameter benutzt.

In jedem Fall wird die Abnahme der Absorption bei extrem großen Intensitäten durch die Besetzung doppelt angeregter Zuständen hervorgerufen. Diese hängt zunächst hauptsächlich von der Relaxationsrate  $k_{21}$  ab, wird jedoch durch die Größe von  $\sigma_{2n}$  skaliert. Wird  $\sigma_{2n}$  vernachlässigt, so findet man genau einen Wert für  $k_{21}$ , mit dem sich die Daten in Abb. 18 anpassen lassen (Schödel et al., 1996). Lässt man einen von Null verschiedenen Wert von  $\sigma_{2n}$  zu, gilt dies nicht mehr. Aus diesem

<sup>9</sup> Dieser geringe Unterschied zu im Master-Gleichungsmodell angenommenen  $\sigma_{12} = \sigma_{01}$  hat praktisch keine Auswirkung auf die relative Besetzung  $x_2$ , da letztere hauptsächlich durch die Größe der Rate  $k_{21}$  bestimmt wird.

Grund soll hier nicht genauer auf weitere Effekte (geringerer Ordnung) eingegangen werden, welche einen Einfluß auf die zu beschreibende Meßgröße besitzen /<sup>10</sup>.

Der in Abb. 18 dargestellte Vergleich zwischen Theorie und Experiment zeigt, daß die aus den Messungen der intensitätsabhängigen Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII gewonnenen Ergebnisse konsistent mit dem intensitätsabhängigen Verhalten der (instantan beobachteten) Änderung der optischen Dichte sind.

### 2.2.6.3. *sub-ps-Kinetik von Absorptionsänderungen*

Für diese Betrachtung werden die Ergebnisse der sub-ps Pump-Test Messungen an solubilisiertem LHCII von Bittner et al. (1994) benutzt. Betrachtet sei die Wellenlänge der Test-Impulse bei 680 nm. Die Messungen zeigen ein schnelles Abklingverhalten (Abnahme der Absorption), das mit steigender Pump-Intensität zunimmt. Erst danach erfolgte die Relaxation mit der üblichen Zeitkonstante von 4.3 ns (Vasil'ev et al., 1997a).

Die Berechnung von  $\Delta OD$  auf der sub-ps Zeitskala auf der Grundlage der Pauli-Master-Gleichungen sei im folgenden kurz beschrieben.

Bei 680 nm muß der Querschnitt für die induzierte Emission,  $\sigma_{01}$  ebenfalls berücksichtigt werden. Deshalb ergibt sich die relative Änderung der optischen Dichte entsprechend der Gleichung (vergleiche obige Gl. (F17) ):

$$\frac{\Delta OD(t)}{OD_0} = x_1(t) \cdot \left( \frac{\sigma_{12} - \sigma_{01} - \sigma_{10}}{\sigma_{01}} \right) + x_2(t) \cdot \left( \frac{\sigma_{2n} - \sigma_{01}}{\sigma_{01}} \right) \quad (F20)$$

Die Berechnung der relativen Besetzungen  $x_{1/2}$  erfolgte entsprechend Gl. (F19a/b).

Abb. 19 zeigt, daß es möglich ist, Pump-Test-Messungen auf einer sub-ps Zeitskala (insbesondere das Auftreten des schnell relaxierenden Anteiles von  $\Delta OD$  bei 680 nm) mit Hilfe der obigen Modelle und den gewonnenen Parametern qualitativ zu beschreiben. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß kohärente Effekte, die in diesem Zeitbereich von Bedeutung sein könnten (Voigt und Redlin, Publikation in Vorbereitung) nicht berücksichtigt wurden.

<sup>10</sup> So wird in Schödel et al. (1996) der Einfluß der Intensitätsabhängigkeit des Absorptionskoeffizienten innerhalb der Probe bei der Beschreibung der Transmission explizit berücksichtigt.

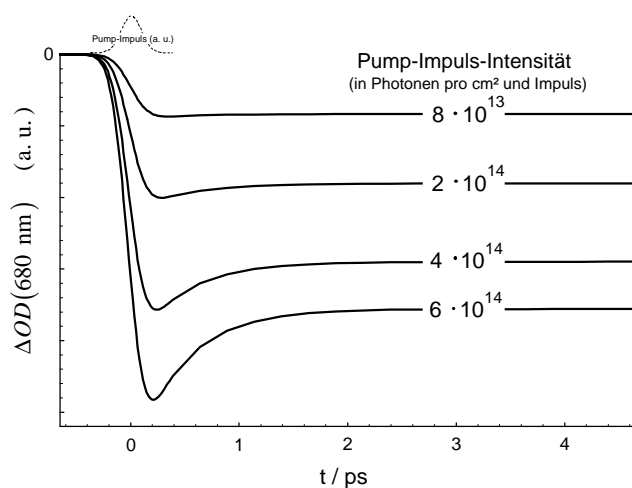


Abbildung 19

Berechnung von Absorptionsänderungen bei 680 nm auf einer sub - ps Zeitskala mit Hilfe des Pauli - Master Gleichungs - Formalismus (Gl. 20). Dabei wurden die Parameter der durchgezogenen Linie von Abb. 15 (S. 44) benutzt und  $\sigma_{12} = 0.7 \cdot \sigma_{01}$ ;  $\sigma_{2n} = 0.5 \cdot \sigma_{01}$ ;  $\sigma_{10} = \sigma_{01}$  gesetzt . Zugrunde gelegt wurde ein Pump-Impuls von 0.13 ps Länge und verschiedene Pump-Intensitäten entsprechend den experimentellen Bedingungen in Bittner et al. (1994).

### 2.3. **Schlußfolgerungen für den Energietransfer im LHCII**

---

Der Lichtsammelkomplex des Photosystem II (LHCII) hat die Aufgabe, möglichst viel Licht zu absorbieren und die Energie absorbierter Photonen so effektiv wie möglich zum Reaktionszentrum weiterzugeben. Dies erfordert, daß der Energietransfer so schnell wie möglich stattfindet, da sonst Energieverlustprozesse auftreten (siehe Kap. 1.1.3.3. auf S. 13).

Um Aussagen zum Energietransfer im LHCII zu gewinnen wurden zahlreiche zeitaufgelöste Messungen durchgeführt (siehe S. 16). Diese sollen Aufschluß zum Transfer der Anregungsenergie von Chl *b* nach Chl *a* geben. Abgesehen von dem Problem, daß die Chl *a* – Absorption bei der Pump - Wellenlänge von 645 nm nicht verschwindet (siehe S. 16) ergeben diese Messungen, daß der Chl *b* → Chl *a* Transfer der Anregungsenergie im sub-ps Zeitbereich erfolgt. Aussagen über Zeitkonstanten des Energietransfers in einem größeren Bereich des LHCII (z. B. innerhalb solubilisierter LHCII Komplexe) können aus diesen Messungen nicht gewonnen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit unter sorgfältiger Beachtung der räumlichen Selektivität erhaltene Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Laserimpulsintensität an solubilisiertem LHCII (siehe Kap. 2.2.3. auf S. 34) weist ein sättigbares Verhalten auf. Die Daten lassen sich durch ein Pauli-Master-Gleichungs-Modell beschreiben (siehe Kap. 2.2.5. auf S. 39), wobei die Vernichtung der Anregungszustände unabhängig vom Ort ihrer Erzeugung stattfindet und durch paarweise Wechselwirkung zwischen angeregten Zuständen erfolgt (*exciton-exciton-annihilation*, siehe Kap. 2.1. auf S. 27).

Zunächst ist festzustellen, daß die beschriebenen Ergebnisse keine direkten Aussagen über eine mögliche Delokalisation der Anregungsenergie über mehrere Pigmente zulassen. Letzteres würde zu einer Erhöhung der Absorptionquerschnitte im Vergleich zu denen einzelner Pigmente führen. Dieser Fall ist in dem beschriebenen Pauli-Master-Gleichungs-Modell (siehe Kap. 2.2.5. auf S. 39) enthalten: Statt einzelner Pigmente treten Pigmentgruppen mit gemeinsamen Grundzustand (und dessen Absorptionsquerschnitt) auf. Die Zahl  $\aleph$  entspricht dann nicht mehr der Anzahl von Pigmenten, sondern von Pigmentgruppen pro Komplex. Die über  $\gamma^*$  wechselwirkenden (einfach) angeregten Zustände werden durch Absorption von Photonen durch die Pigmentgruppen erzeugt. Das Ergebnis der Beschreibung der Abhängigkeit der Fluoreszenz von  $I_p$  führt in diesem Fall jedoch zum gleichen Ergebnis wie die Rechnung für einzelne Pigmente:  $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$

und  $\sigma_{01} \cdot \mathfrak{N} = (2.3 \pm 0.6) \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2$ .

Aus dem Ergebnis für die Rate der dissipativen Wechselwirkungen zwischen (einfach) angeregten Zuständen,  $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$ , folgt, daß bei Absorption von mehr als einem Photon durch einen solubilisierten Komplex eine sehr schnelle (quasi-instantanen) Vernichtung des zweiten einfach angeregten (Singulett-) Zustandes erfolgt. Wenn man voraussetzt, daß der Vernichtungsprozeß an einem Pigment erfolgt, so lassen sich Rückschlüsse über den Transfer der Anregungsenergie innerhalb des LHCII-Komplexes ziehen. Dieser muß extrem schnell sein, um die quasi-instantane Vernichtung von Anregungszuständen zu ermöglichen. Es muß also gelten:  $k^{EET} > (1 \text{ ps})^{-1}$ , wobei  $k^{EET}$  die Rate für den Transfer der Anregungsenergie innerhalb des solubilisierten LHCII-Komplexes symbolisiert. Aussagen über den Charakter des Energietransfers sind dabei allerdings nicht möglich. Die Bedingungen für einen reinen Förster-Transfer (Förster, 1948) sind aufgrund der geringen Molekülabstände und der deshalb versagenden Punkt-Dipol-Näherung nicht erfüllt (siehe auch Kap. 1.1.3.3. auf S. 13).

$\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$  entspricht auch dem alternativen Grenzfall, bei dem der LHCII als Gesamtensemble wirkt. Dies zeigt der Übergang vom Pauli-Master-Gleichungs-Modell zum „Cluster-Modell“ (siehe Kap. 2.2.5.2. auf S. 46). Die gewonnenen experimentellen Ergebnisse können demnach durch einen Gesamtabsorptionsquerschnitt des LHCII-Komplexes beschrieben werden. Obwohl dies unabhängig davon ist, welche Rolle eine mögliche Delokalisation der Anregungsenergie spielt (siehe oben), belegt es doch den für natürliche Bedingungen günstigsten Fall, nämlich einen sehr effektiven und ultra-schnellen Transfers der Anregungsenergie, der bei Vorhandensein von photochemisch aktiven Pigmenten (Reaktionszentren) die nachfolgenden Reaktionen der Photosynthese in Gang setzt.





## 3. Triplett-Zustände im LHCII

---

### 3.1. Einleitung

---

Besetzte Chlorophyll-Triplett-Zustände (im folgenden Chlorophyll-Triplets genannt) werden durch *intersystem crossing* aus angeregten Chlorophyll-Singulett-Zuständen gebildet. Bei Pigmenten in Lösung (z.B. Chl *a/b* in azetonischer Lösung) folgt dem Aufbau eine sehr langsame Relaxation der Triplett-Population (im ms-Zeitbereich) zurück in den Singulett-Grundzustand. In diesem Fall können Chl-Triplets als metastabile Zustände angesehen werden. Sie treten besonders dann in Erscheinung, wenn die Moleküle über längere Zeit einer Lichtanregung ausgesetzt sind (cw-Anregung, lange Lichtimpulse). Drastische Triplett-Besetzungen werden ebenfalls beobachtet, wenn hochrepetitive kurze Laserimpulse zur Anregung verwendet werden (Geacintov et al., 1978).

Auch bei der Anregung mit kurzen Einzelimpulsen werden Triplets gebildet. Dies äußert sich in langlebigen Absorptionsänderungen. Um Triplets von Chl *a* und Chl *b* in azetonischer Lösung und in LHCII zu charakterisieren, wurden Absorptionsänderungen als Funktion der Beobachtungswellenlänge untersucht (siehe unten). Die erhaltenen sogenannten Triplett-minus-Singulett-Spektren (T - S-Spektren) von Chl *a/b* unterscheiden sich drastisch von dem des LHCII. Dafür sind die Karotinoide verantwortlich, denn in LHCII werden Chlorophyll-Triplett-Zustände durch Karotinoide sehr effektiv vernichtet (siehe Kap. 1.1.3.2. auf S. 11). Als Folge des damit verbundenen Triplett-Transfers kommt es zur Bildung von Karotinoid-Triplets.

Der Triplett-Energietransfer von  $^3\text{Chl}$  zu Car erfordert eine Austauschwechselwirkung zwischen den Pigmenten (Dexter-Typ-Wechselwirkung). Dafür sind sehr geringe Pigmentabstände erforderlich (siehe Renger, G., 1992; van Grondelle, 1994). In dem von Kühlbrandt et al. (1994) aufgestellten Strukturmodell des LHCII (siehe Kap. 1.1.3.1. auf S. 10) beträgt der geringste Abstand zwischen den beiden Xanthophyllen (die als Luteine identifiziert wurden und eine interne Querverbindung herstellen) und den nächstliegenden Chlorophyllen etwa 4 Å. Deshalb sind die Bedingungen für einen Dexter-Mechanismus des Triplett-Transfer von  $^3\text{Chl}$  zu Car erfüllt.

Tatsächlich ist die Effizienz der Chlorophyll-Triplett-Vernichtung durch Karotinoide (bei Raumtemperatur) nahezu 100 % (Peterman et al., 1995). Die Rate für den Triplett-Transfer von  $^3\text{Chl}$  zu Car wurde von Kramer und Mathis (1980)

abgeschätzt auf  $(10 \text{ ns})^{-1}$ . Dieser Wert ist mit der Rate der Chlorophyll-Triplett-Bildung durch *intersystem crossing* vergleichbar und ist um mindestens eine Größenordnung kleiner als im Rahmen dieser Arbeit abgeschätzt wurde (siehe Schödel et al., 1998 und Kap. 3.4. auf S. 73).

Die Relaxation angeregter (Chl-)Singulettts führt zur Besetzung von (Chl- und letztlich Car-)Triplett-Zuständen. Durch Pump-Test-Messungen ist es möglich, die Wechselwirkung der Pump-Impuls-induzierten Triplettts mit den später durch einen schwachen Test-Impuls erzeugten (Chl-)Singulettts zu analysieren. Zahlreiche Untersuchungen an photosynthetischen Proben ergaben, daß (Chl-)Singulettts durch die Wechselwirkung mit Triplettts vernichtet werden (Breton et al., 1979, Breton and Geacintov, 1980, Mathis and Paillotin, 1981, Paillotin et al., 1983b, Kolubajev et al., 1985 und darin enthaltene Zitate). Die Vernichtung angeregter (Chl-)Singulettts äußert sich durch die Verringerung der Fluoreszenzausbeute des Test-Impulses, d.h. eine Fluoreszenz-Löschung.

Es ist üblich (z.B. Breton et al., 1979), Triplett-Effekte durch einen langen spektral breiten Test-Impuls zu analysieren, der einem kurzen Pump-Impuls folgt. Im allgemeinen finden dazu Blitzlampen Verwendung, die ms-Impulse liefern. Durch Variation des Beobachtungszeitfensters (Boxcar-Technik) bzw. durch oszillographische Aufzeichnung ist es dann möglich, Absorptionsänderungen in dem durch den Test-Impuls überdeckten Zeitbereich zu beobachten. Dies hat den Vorteil, daß es prinzipiell möglich ist, aus einem einzigen dem Pump-Impuls folgenden ms-Test-Impuls alle nötigen zeitlichen Informationen zu erhalten. Ein großer Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, daß die integrale Intensität des Test-Impulses relativ groß gewählt werden muß, um geringe Absorptionsänderungen zu definierten Zeiten nachzuweisen. Ein Einfluß des Test-Impulses auf die zu beobachtenden Absorptionsänderungen kann damit nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Fluoreszenz-Löschung, d. h. die Pump-Impuls-induzierte Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute von solubilisiertem LHCII, auf einer  $\mu\text{s}$ -Zeitskala untersucht (siehe Kap. 3.5. auf S. 83). Es wurde ein grundsätzlich anderer Weg beschritten, um sowohl die Fluoreszenz-Löschung als auch zeitabhängige Absorptionsänderungen zu analysieren. Anstelle eines zeitlich und spektral breiten Blitzlampen-Test-Impulses wurde ein zeitlich definierter und spektral schmaler ns-Laser-Impuls verwendet (siehe unten). Die durch diesen schwachen Impuls erzeugte zeitlich integrale Fluoreszenz wurde benutzt, um die Wechselwirkung der Pump-Impuls-induzierten Triplettts mit den später durch einen Test-Impuls erzeugten (Chl-)Singulettts zu untersuchen. Hervorgehoben sei an dieser Stelle, daß die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte räumlich selektive Messung der Test-Fluoreszenz (siehe Kap. 2.2.1. auf S. 31) die Grundvoraussetzung für aussagekräftige Meßdaten darstellte.

## 3.2. Eigenschaften von Chlorophyll-Tripletts in organischem Lösungsmittel und in vitro

### 3.2.1. Experimenteller Aufbau zur Charakterisierung von Triplet-Zuständen

Abb. 20 stellt den experimentellen Aufbau dar. Als Test-Impuls steht ein kurzer Laser-Impuls zur Verfügung. Da sich die zeitliche Position des Test-Impulses (bzgl. des Pump-Impulses) beliebig verschieben läßt, kann die Pump-Impuls-induzierte Absorptionsänderung in einem ausgedehnten Zeitbereich spektral schmal und variabel „getestet“ werden. Die integrale Intensität des Test-Impulses ist dabei sehr gering (ca.  $10^{12} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ ).

Es wurden zwei prinzipiell selbständige Lasersysteme verwendet. Als Pump-Laser diente der in Tab. 1 (S. 19) aufgeführte  $\text{Nd}^{3+}$ -YAG-Laser gepumpte Farbstoff-Laser. Dieser wurde bei einer Wellenlänge von 645 nm betrieben. Ein bezüglich des Pump-Impulses definiertes Trigger-Signal wurde benutzt, um das Test-Laser-System zu starten. Letzteres besteht aus einem  $\text{N}_2$ -Laser gepumpten Farbstoff-Laser (siehe Tab. 1), dessen Wellenlänge im Bereich 400 - 700 nm variiert wurde (Verwendung der Laser-Farbstoffe Stilben 3, Coumarin 2, Coumari 307, Rhodamin 6G, DCM (Lambda Physik) und Pyridin). Die Impulsdauer beider Laser (Pump- und Test-) ist etwa gleich (ca. 2 ns).

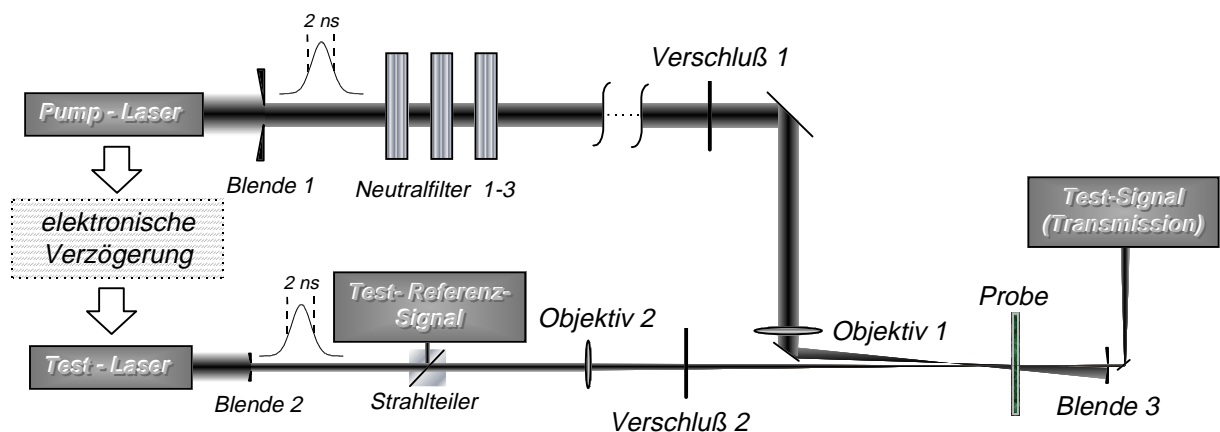


Abbildung 20

Schematische Darstellung des Meßaufbaus zur Charakterisierung von Tripletts

Um die Zeit zwischen Pump- und Test-Impuls einzustellen, wurde das Trigger-Signal definiert verzögert. Dazu diente eine programmierbare elektronische Verzögerungseinheit.

Das Beobachtungszeitfenster (des BCI 280) für die Auswertung des elektronischen Signals (Transmission) wurde mit dem Test-Laser synchronisiert. Die Art der Detektoren sowie die Auswerteelektronik ist in Kap. 1.3.5. auf S. 25 beschrieben.

Die Erzeugung definierter Pump-Impuls-Intensitäten in einer stabilisierten Probenebene erfolgte entsprechend den Beschreibungen der Kap 1.3.2. und 1.3.3. (S. 20 und S. 22). Die Kenntnis der jeweils verwendeten Filterkombination ermöglichte die Bestimmung der Intensität vor der Probe. Die Ausblendung Pumpstrahl-bedingter Einflüsse am Test-Detektor, die nicht auf Absorptionsänderungen in der Probe zurückzuführen sind, wurde entsprechend den Erläuterungen in Kap. 1.3.4. (S. 23) vorgenommen.

Die Änderung der Transmission der Probe wirkt sich auf die Intensität des transmittierten Test-Impulses aus. Die relative Transmission ist gegeben durch:

$$\frac{T}{T_0} = \frac{I_T}{I_T^0}. \text{ Dabei ist } I_T \text{ die Intensität des transmittierten Teststrahls, die in}$$

Abwesenheit des Pump-Impulses den Wert  $I_T^0$  annimmt.

Experimentell wurde die relative Transmission bestimmt aus:

$$\frac{T}{T_0} = \frac{S(\text{Pump} \uparrow \text{Test} \uparrow) - S(\text{Pump} \uparrow \text{Test} \downarrow)}{S(\text{Pump} \downarrow \text{Test} \uparrow) - S(\text{Pump} \downarrow \text{Test} \downarrow)} \quad (\text{T1})$$

Dabei kennzeichnet  $S$  das Signal am Test-Detektor (siehe Abb. 20) und die Pfeile den Zustand der Verschlüsse 1 und 2 ( $\text{Pump} \uparrow / \downarrow$ : Verschuß 1 auf/zu;  $\text{Test} \uparrow / \downarrow$ : Verschuß 2 auf/zu).

Gl. (T1) liefert wegen  $T = 10^{-OD}$  die für die Auswertung anschaulicheren Werte für die Änderung der optischen Dichte der Probe:

$$\Delta OD = -\lg \left[ \frac{T}{T_0} \right] \quad (\text{T2})$$

Der hier beschriebene Meßaufbau wurde im wesentlichen für die Messung von  $\Delta OD$  als Funktion der Test-Wellenlänge (T - S-Spektren; Kap. 3.2.2. und 3.2.3.) bzw. Pump-Impuls-Intensität (Kap. 3.3.2.) bei konstanter Verzögerungszeit sowie von  $\Delta OD$  als Funktion der Verzögerungszeit im sub- $\mu\text{s}$  und  $\mu\text{s}$ -Bereich (Kap. 3.2.4. und 3.3.1.) verwendet.

Um die Kinetik der Karotinoid-Triplett-Bildung bzw. den Einfluß der gebildeten Triplets auf die Fluoreszenz (Kap. 3.4. bzw. 3.5.) zu untersuchen, wurden Erweiterungen vorgenommen, die in den entsprechenden Unterkapiteln beschrieben sind (siehe Kap. 3.4.1. auf S. 73 und Kap. 3.5.1. auf S. 83).

### 3.2.2. T – S-Spektren von Chl *a* und Chl *b* in azetonischer Lösung

Die folgenden Messungen an Chl *a* und Chl *b* in Lösung wurden durchgeführt, um Aussagen über Triplet-Absorptionsquerschnitte zu gewinnen, die in Kap. 3.4.3. (S. 77) benötigt werden und um den Unterschied zum LHCII (siehe Kap. 3.2.3.) zu verdeutlichen. Mit dem beschriebenen Meßaufbau ergaben sich die in Abb. 21 dargestellten T – S-Spektren ( $\Delta OD$ ) von Chl *a/b*. Diese spiegeln offensichtlich das spektrale Verhalten der Grundzustands-Absorption ( $OD_0$ ) wider. Daher treten die gebildeten Chlorophyll-Triplets hauptsächlich indirekt durch die Entleerung der Chlorophyll-Grundzustands-Besetzung in Erscheinung. Eine ausgeprägte spektrale Charakteristik der Triplet-Absorption ist daher nicht zu erwarten.

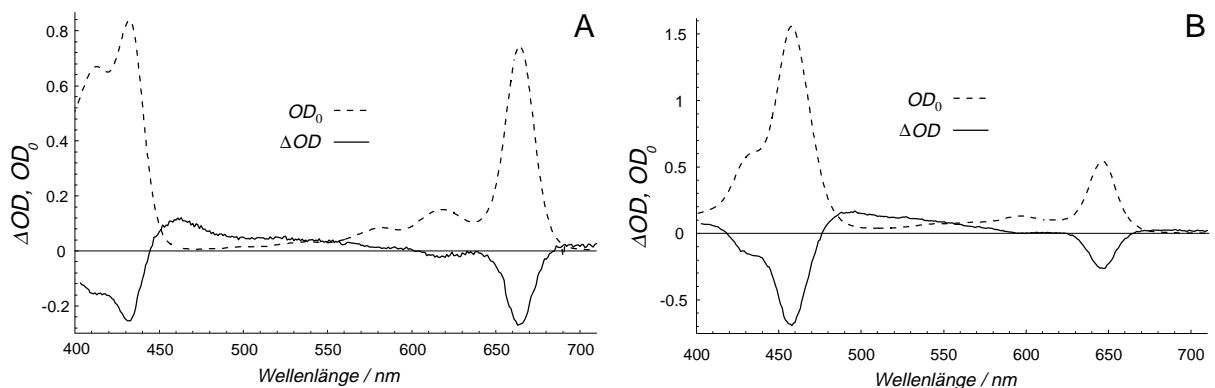


Abbildung 21

Pump-Impuls induzierte Änderung der optischen Dichte ( $\Delta OD$ ) gemessen nach 50 ns an Chl *a* (A) und Chl *b* (B) in 80 % azetonischer Lösung. Zum Vergleich sind die entsprechenden Absorptionsspektren ( $OD_0$ ) dargestellt.

Pump-Intensität: ca.  $10^{17}$  Photonen  $\text{cm}^{-2}$  Impuls $^{-1}$  bei 645 nm

Dies wird im folgenden explizit anhand von Absorptionsquerschnitten gezeigt:

Die Extinktionskoeffizienten (für den Grundzustand) von Chl *a/b* in wässrig-azetonischer Lösung wurden von Porra et al. (1989) bestimmt:

$$\text{Chl } a: \epsilon(663,6) = 76.79 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}; \text{ Chl } b: \epsilon(646,6) = 47.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Durch die Beziehung  $\sigma_0 = \epsilon \cdot \frac{\ln(10)}{N_A}$  ( $N_A$ , Avogadro-Konstante) ergeben sich die Grundzustands-Absorptionsquerschnitte bei den entsprechenden Wellenlängen:

$$\text{Chl } a: \sigma_0(663,6) = 2.94 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2; \text{ Chl } b: \sigma_0(646,6) = 1.8 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$$

Die Kenntnis dieser Werte erlaubt die Berechnung der Spektren für die Grundzustands-Absorptionsquerschnitte von Chl *a* und Chl *b* aus dem Absorptionsspektrum ( $OD_0(\lambda)$ ) in azetonischer Lösung. Diese sind in Abb. 22 als gestrichelte Linien eingezeichnet.

Der Chlorophyll-Triplet-Absorptionsquerschnitt,  $\sigma_T(\lambda)$ , läßt sich ebenfalls berechnen. Er ergibt sich aus  $\sigma_0(\lambda)$  sowie der relativen Änderung der optischen

Dichte  $\Delta OD(\lambda)/OD_0(\lambda)$ . Da 50 ns nach dem Pump-Impuls jegliche Chl-Singulett Besetzung relaxiert ist, ist der Absorptionskoeffizient durch folgenden Ausdruck gegeben:  $\alpha = \sigma_0 \cdot (N - n_T) + \sigma_T \cdot n_T$  ( $N$ : Gesamt-Chl ( $a/b$ )-Konzentration,  $n_T$ : Population von Chl ( $a/b$ )- Triplett-Zuständen). Wegen  $\alpha_0 = \sigma_0 \cdot N$ ,  $\Delta\alpha = \alpha - \alpha_0$  und  $\Delta\alpha/\alpha_0 = \Delta OD/OD_0$  ergibt sich:

$$\sigma_T(\lambda) = \sigma_0(\lambda) \cdot \left[ \frac{\Delta OD(\lambda)}{\frac{n_T}{N} \cdot OD_0(\lambda)} + 1 \right] \quad (\text{T3})$$

Die relative Triplett-Besetzung ( $\frac{n_T}{N}$ ) kann mit Gl. (T12) (siehe S. 76) berechnet werden. Bei der verwendeten Pump-Intensität ergeben sich die Werte 0.41 (Chl  $a$ ) und 0.57 (Chl  $b$ ). Die durchgezogenen Linien in Abb. 22 stellen die nach Gl. (T3) berechneten spektralen Verläufe von  $\sigma_T$  dar.

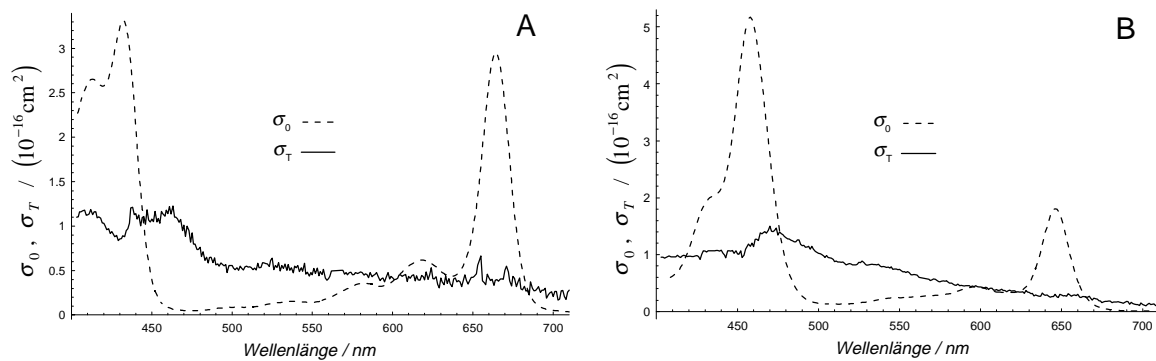


Abbildung 22

Darstellung der nach Gl. (T3) berechneten Absorptionsquerschnitte der Triplett-Zustände von Chl  $a$  (A) und Chl  $b$  (B) (durchgezogene Linien). Zum Vergleich sind die Grundzustands-Absorptionsquerschnitte eingezeichnet (gestrichelte Linien).

Sowohl für Chl  $a$  (Abb. 22A) als auch für Chl  $b$  (Abb. 22B) ist zu erkennen, daß das Absorptionsverhalten der entsprechenden Triplets bezüglich der Wellenlänge wie erwartet sehr unstrukturiert ist. Der Fehler von  $\sigma_T(\lambda)$  hängt sehr stark von einer Verstimmung der  $\lambda$ -Achse von  $\Delta OD$  bezüglich derer von  $OD_0$  ab. Schon eine sehr geringe Verstimmung  $\Delta\lambda$  führt zu scheinbar ausgeprägten Banden von  $\sigma_T(\lambda)$  wie sie von Shepanski et al. (1984) aus Meßdaten berechnet wurden.

### 3.2.3. Das T – S-Spektrum von solubilisiertem LHCII

Abb. 23 zeigt die durch den Pumpstrahl hervorgerufene Änderung der optischen Dichte gemessen nach 50 ns. Die Fluoreszenz-Lebensdauer des verwendeten LHCII beträgt 4.3 ns (Vasil'ev et al., 1997b). Deshalb enthält das  $\Delta OD$ -Spektrum nach 50 ns (wie im Fall von Chl  $a/b$  in Lösung) keine Beiträge, die auf Pump-Impuls-induzierte Singulett zurückzuführen sind. Die durchgezogene Linie in Abb. 23 kann darum als

T - S-Spektrum verstanden werden.

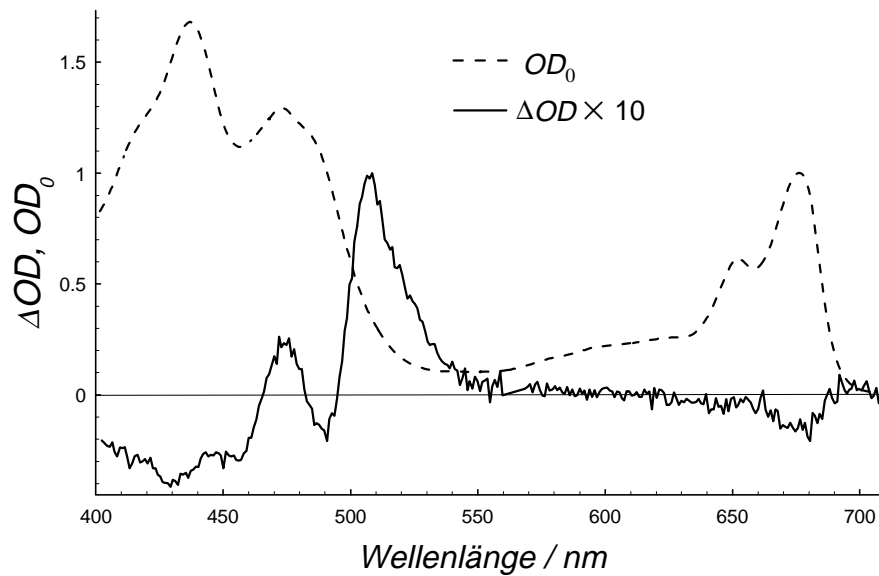


Abbildung 23

Pump-Impuls induzierte Änderung der optischen Dichte ( $\Delta OD$ ) gemessen nach 50 ns an solubilisiertem LHCII (durchgezogene Linie). Zum Vergleich ist das Absorptionsspektrum ( $OD_0$ ) des verwendeten LHCII dargestellt.

Pump-Intensität: ca.  $10^{17}$  Photonen  $cm^{-2}$  Impuls $^{-1}$  bei 645 nm

Die Form des in Abb. 23 dargestellten T – S-Spektrums von LHCII ist nahezu identisch mit den von Nechushtai et al. (1988) und Peterman et al. (1995) bestimmten Spektren. Im Vergleich mit Chlorophyll in Lösung (siehe Kap. 3.2.2. auf S. 63) weist es eine völlig andere spektrale Charakteristik auf. Das ausgeprägte Maximum bei ca. 507 nm ist auf die Absorption gebildeter Karotinoid-Triplets zurückzuführen. Bis auf das geringe Ausbleichen im  $Q_y$ -Bereich (um 675 nm) ist das Spektrum von LHCII typisch für ein T – S-Spektrum von Karotinoiden.

Deshalb kann der Wert von  $\Delta OD$  bei 507 nm als Maß für die Besetzung von Karotinoid-Triplett-Zuständen ( ${}^3Car$ ) angesehen werden. Dies ermöglicht es, den Einfluß experimenteller Parameter auf die  ${}^3Car$ -Besetzung zu untersuchen. So wird im folgenden Kapitel die Verzögerungszeit zwischen Pump- und Test-Impuls variiert, um Aussagen über die Lebensdauer der  ${}^3Car$ - Besetzung in dem verwendeten LHCII zu gewinnen.

### 3.2.4. Relaxation von Karotinoid-Triplets in solubilisiertem LHCII

Die Lebensdauer von Karotinoid-Triplets ist abhängig von der Sauerstoffkonzentration in der Probe. Um dies an dem verwendeten solubilisiertem LHCII zu untersuchen, wurden Messungen der Relaxationskinetik von  $\Delta OD$  bei 507 und 530 nm unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt.



Abb. 24 zeigt Kurven in Sauerstoff-freien und Luft-gesättigten Proben. In beiden Fällen ist die Relaxation unabhängig von der Test-Wellenlänge. Ein Wert von  $9 \mu\text{s}$  für den Abbau von  $^3\text{Car}$  in Sauerstoff-freier Probe ist in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen von Peterman et al. (1995) und Siefermann-Harms und Angerhofer (1995, 1998).

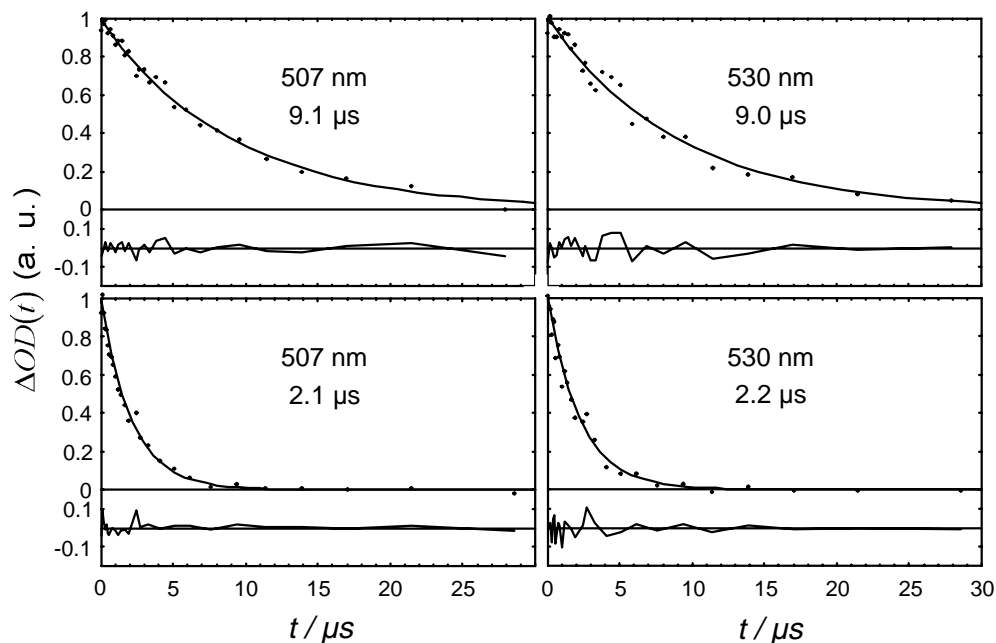


Abbildung 24

Pump-Impuls-induzierte Absorptionsänderungen bei 507 nm (links) und 530 nm (rechts) als Funktion der Verzögerungszeit zwischen Pump- und Test-Impuls in solubilisiertem LHCII unter Sauerstoff-freien (oben) und Luft-gesättigten Bedingungen (unten). Die durchgezogenen Linien zeigen mono-exponentielle Anpassungen mit entsprechender Lebensdauer.

Unterschiede existieren bezüglich der Werte, die unter Luft-gesättigten Bedingungen gemessen wurden. Dem mono-exponentiellen Abklingen mit ca.  $2 \mu\text{s}$  (Abb. 24 unten) steht das Ergebnis von Peterman et al. (1995) gegenüber, wo ein bi-exponentielles Verhalten mit  $\tau_1 = 2 \mu\text{s}$  und  $\tau_2 = 4 \mu\text{s}$  gefunden wurde, das von der Test-Wellenlänge abhängt ( $\tau_1$  dominiert bei 505 nm und  $\tau_2$  bei 528 nm). Eine noch langsamere Relaxation in Luft-gesättigter Probe wurde von Siefermann-Harms und Angerhofer (1995, 1998) gemessen. Werte von  $7 \mu\text{s}$  wurden erst durch die Zugabe von Fettsäure auf ca.  $4 \mu\text{s}$  reduziert <sup>/11</sup>.

Die genannten Differenzen in der Relaxationskinetik unter Luft-gesättigten Bedingungen sind höchstwahrscheinlich auf Unterschiede in Bezug auf die Zugänglichkeit von Sauerstoff zurückzuführen, die von der jeweiligen Proben-Isolation abhängen kann (Proben-Heterogenität).

<sup>/11</sup> Daraus wurde geschlußfolgert, daß die Proteinmatrix *in vivo* eine Sauerstoff-Barriere darstellt, welche den Kontakt von Karotinoiden mit Sauerstoff verhindert.

### 3.3. Der Einfluß der Pump-Intensität auf die Karotinoid-Triplett-Besetzung in solubilisiertem LHCII

#### 3.3.1. Die Relaxation von Karotinoid-Triplets bei verschiedenen Pump-Impuls-Intensitäten

Abb. 25 zeigt, daß die Pump-Impuls-Intensität  $I_p$  keinen Einfluß auf die Relaxation der Pump-Impuls-induzierten Änderung der optischen Dichte bei 507 nm und damit der Karotinoid-Triplets ausübt. Die Lebensdauer letzterer (in einer weder Luft-gesättigten noch Sauerstoff-freien Probe) bleibt unverändert etwa 4.3  $\mu$ s.

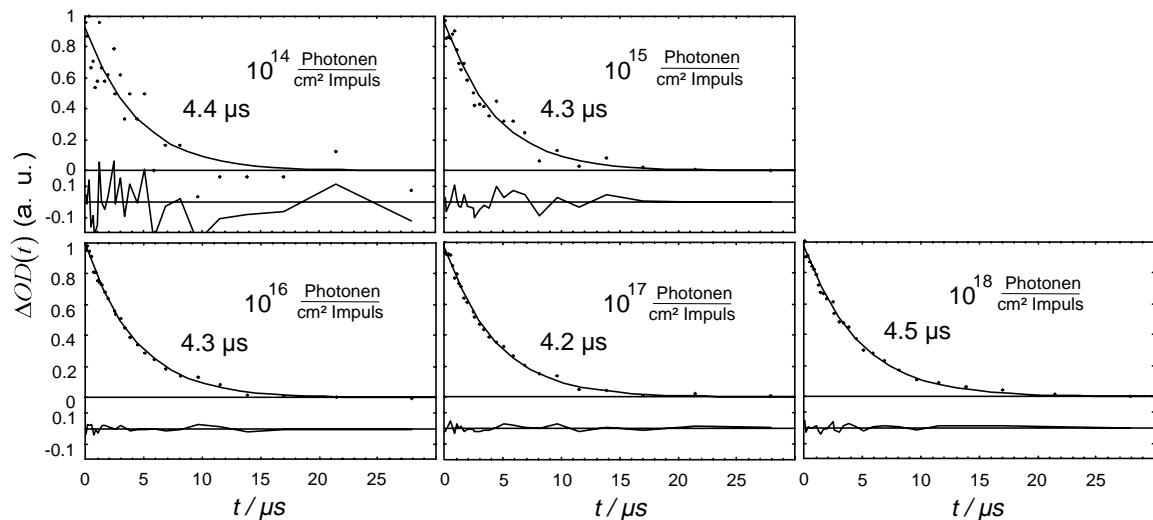


Abbildung 25

Normierte Relaxationskinetik von  $\Delta OD$  bei 507 nm bei verschiedenen Pump-Impuls-Intensitäten.

Dieses Ergebnis führt zu der Schlußfolgerung, daß es innerhalb der solubilierten LHCII Komplexe selbst bei extrem hohen Intensitäten keine destruktive Wechselwirkung zwischen Karotinoid-Triplets gibt. Anderenfalls müßte man bei Erhöhung von  $I_p$  ein nichtexponentielles Abklingverhalten der  $^3\text{Car}$ -Population beobachten.

Die absolute Besetzung von  $^3\text{Car}$  steigt jedoch mit zunehmender Pump-Intensität drastisch an. Diese Beobachtung soll im folgenden Kapitel ausführlich untersucht werden.

### 3.3.2. Die Karotinoid-Triplett-Besetzung als Funktion der Pump-Intensität

Bei diesen Messungen wurde die Änderung der optischen Dichte bei 507 nm und konstanter Verzögerung von 50 ns als Funktion der Pump-Intensität untersucht. Diese Zeit ist lang genug, um zu erreichen, daß die Triplett-Bildung in LHCII abgeschlossen ist und daß der Einfluß angeregter Chlorophyll-Singulets vernachlässigt werden kann. Andererseits sind 50 ns Verzögerungszeit kurz genug, um Relaxationseffekte der gebildeten Karotinoid-Triplets ausschließen zu können (siehe Kap. 3.2.4. auf S. 65).

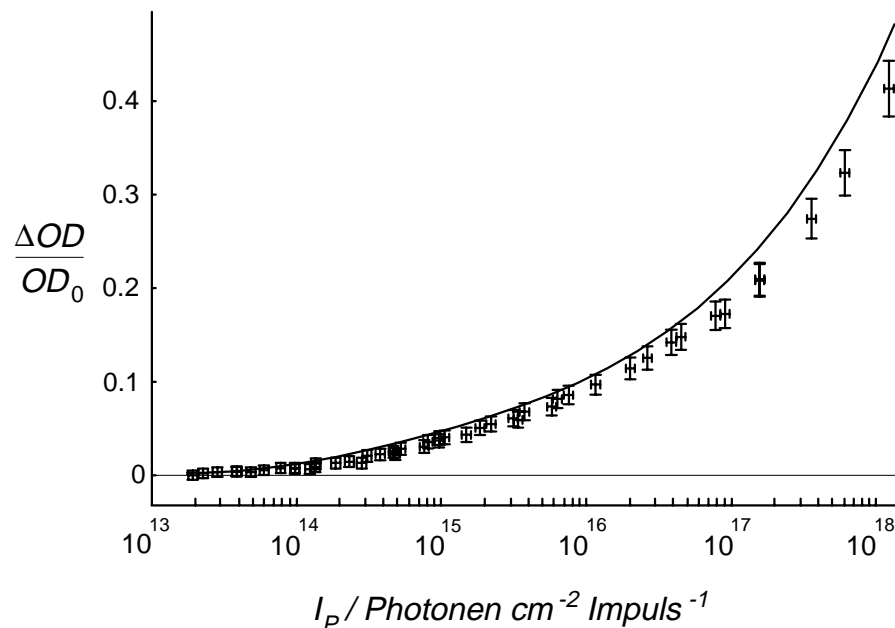


Abbildung 26

$\Delta OD/OD_0$  bei 507 nm und 50 ns Verzögerung zwischen Pump- und Testimpuls als Funktion der Pump-Intensität in solubilisiertem LHCII.

Die Fehlerkreuze stellen die gemessenen Daten dar. Bei der durchgezogenen Linie wurde der Effekt abnehmender Pump-Intensität innerhalb der Probe eliminiert (siehe Text).

Abb. 26 zeigt die experimentellen Daten der relativen Änderung der optischen Dichte,  $\Delta OD/OD_0$ , bei 507 nm als Funktion von  $I_p$  (Fehlerkreuze). Die dargestellten Daten wurden an einer 1 mm Proben-Küvette gemessen. Die Absorption der Probe bei der Pump-Impuls-Wellenlänge von 645 nm führt dazu, daß die Pump-Intensität beim Durchgang durch die Probe auf ca. 36 % absinkt. Deshalb beziehen sich die Fehlerkreuze in Abb. 26 und damit die Besetzung von  $^3\text{Car}$  auf eine mittlere Pump-Impuls-Intensität innerhalb der Probe. Um eine genauere Zuordnung von  $\Delta OD$  zu einer definierten Pump-Intensität zu bekommen, wurde dieser Mittelungs-Effekt eliminiert. Dies ist im Anhang A3 auf S. 105 beschrieben. Die durchgezogene Linie in Abb. 26 stellt das Ergebnis dieser Berechnung dar.

Sogar bei extrem hohen Pump-Intensitäten ist keine Sättigung der Karotinoid-Triplett-Besetzung zu beobachten. Es stellt sich die Frage, warum dies so ist und auf

welchem Wege Triplets in LHCII bei hohen Pump-Intensitäten gebildet werden. Dem ist das folgende Kapitel gewidmet.

### 3.3.2.1. Wege der Karotinoid-Triplett-Bildung in solubilisiertem LHCII bei hohen Pump-Intensitäten

Im folgenden soll von zwei Voraussetzungen ausgegangen werden:

- i) Bei der Pump-Impuls-Wellenlänge von 645 nm erfolgt die Bildung von Karotinoid-Triplett-Zuständen ausschließlich durch Triplett-Transfer aus Chlorophyll-Triplets, die wiederum aus angeregten Chlorophyll-Singulets hervorgehen.
- ii) Die Änderung der optischen Dichte bei 507 nm ist ein lineares Maß für die Besetzung von Karotinoid-Triplett-Zuständen in LHCII.

Die erste Voraussetzung ist deshalb erfüllt, weil Karotinoid-Grundzustände nicht zur Absorption bei 645 nm beitragen.

Die zweite Annahme wird dadurch bewiesen, daß die Relaxation von Karotinoid-Triplets nicht von der Pump-Impuls-Intensität abhängt (siehe Kap. 3.3.1. auf S. 67).

Deshalb kann die relative Besetzung von Karotinoid-Triplets,  $x_T^{Car}$ , aus der relativen Änderung der optischen Dichte  $\Delta OD/OD_0$  bei 507 nm bestimmt werden. Wie ausführlich in Anhang A4 auf S. 106 beschrieben, ergibt sich:

$$x_T^{Car}(t = 50 \text{ ns}, I_p) \approx \frac{\Delta OD(507 \text{ nm}, t = 50 \text{ ns}, I_p)}{OD_0(507 \text{ nm})} \quad (\text{T4})$$

Zur Berechnung von  $x_T^{Car}(t = 50 \text{ ns}, I_p)$  müssen in Gl. (T4) die hinsichtlich der inhomogenen  $I_p$ -Verteilung korrigierten Daten von Abb. 26 (durchgezogene Linie) verwendet werden.

Geht man davon aus, daß Karotinoid-Triplets ausschließlich aus Chlorophyll-Triplets gebildet werden, die aus einfach angeregten Chlorophyll-Singulets hervorgehen, was bei geringen Pump-Impuls-Intensitäten mit Sicherheit der Fall ist, so erhält man folgenden Ausdruck (siehe Anhang A9 auf S. 110):

$$x_T^{Car}(t = 50 \text{ ns}, I_p) \cong \frac{N^{Chl}}{N^{Car}} \cdot k_{ISC} \cdot \int_{-\infty}^{t=50 \text{ ns}} x_1^{Chl}(t', I_p) dt' \quad (\text{T5})$$

wobei  $x_1^{Chl}(t', I_p)$  die relative Besetzung einfach angeregter Chlorophyll-Singulets zum Zeitpunkt  $t'$  und bei der Pump-Intensität  $I_p$  darstellt.

Das in Gl. (T5) enthaltene Integral ist durch die folgende unabhängige Meßgröße gegeben: die zeitlich integrale Pump-Fluoreszenz  $F^{pump}(I_p)$ . Denn diese wird ausschließlich durch Relaxation einfach angeregter Chlorophyll-Singulets in den Grundzustand hervorgerufen (siehe Kap. 2.2.3.2. auf S. 35). Zum Zeitpunkt  $t = 50 \text{ ns}$

ist dieser Vorgang vollständig abgeschlossen, da die Lebensdauer der Population  $x_1^{Chl}$  in solubilisiertem LHCII etwa 4.3 ns beträgt (Vasil'ev et al., 1997b). Deshalb gilt:

$$F^{pump}(I_p) = k_F \cdot N^{Chl} \cdot \int_{-\infty}^{50 \text{ ns}} x_1^{Chl}(t', I_p) dt' \quad (\text{T6})$$

Die Gegenüberstellung der experimentellen Ergebnisse  $F^{pump}(I_p)$  (siehe Kap. 2.2.3. auf S. 34) und  $x_T^{Car}(t = 50 \text{ ns}, I_p)$  (siehe Gl. (T4)) erlaubt es demnach, zu prüfen, ob Gl. (T5) erfüllt ist.

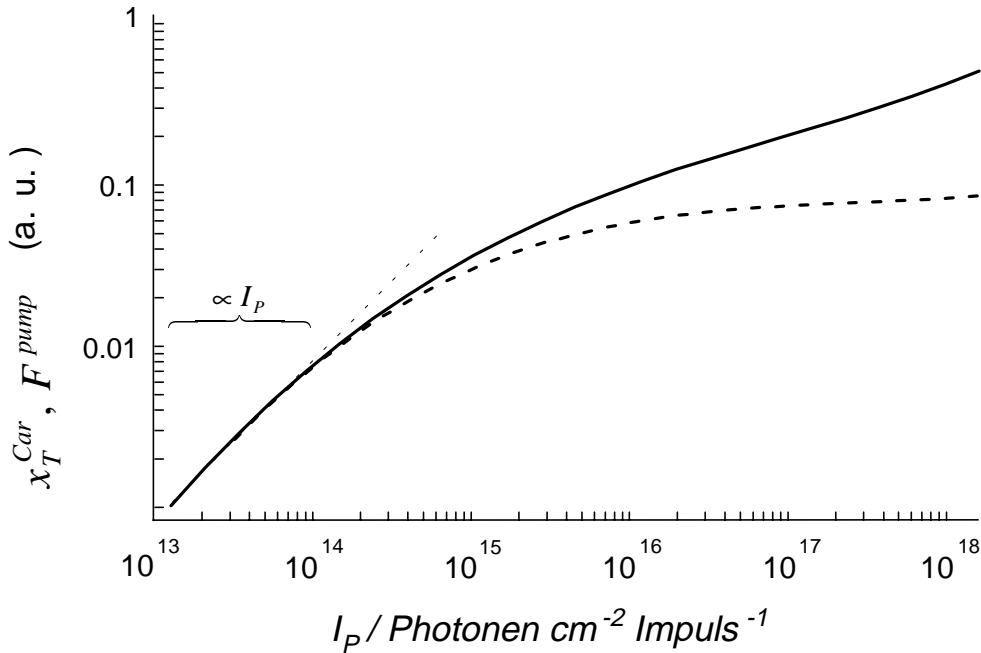


Abbildung 27

Doppelt logarithmische Darstellung der relativen Karotinoid-Triplett-Besetzung  $x_T^{Car}$  nach Gl. (T4) (durchgezogene Linie; entspricht durchgezogener Linie von Abb. 26) und der integralen Pump-Fluoreszenz  $F^{pump}$  (gestrichelte Linie, dargestellt ist eine kontinuierliche Funktion berechnet aus den Datenpunkten von Abb. 15 auf S. 44) als Funktion der Pump-Impuls-Intensität. Letztere wurden mit einem konstanten Faktor skaliert, um die Übereinstimmung bei geringen Pump-Intensitäten zu verdeutlichen.

Abb. 27 zeigt, daß bei geringen Pump-Intensitäten von  $I_p < 10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  eine gute Übereinstimmung der Abhängigkeiten von  $x_T^{Car}(t = 50 \text{ ns}, I_p)$  und  $F^{pump}(I_p)$ , gegeben ist. Für  $I_p < 10^{14} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  sind beide Größen proportional zur Pump-Intensität (optisch lineares Bereich).

Bei höheren Pump-Intensitäten wird eine Abweichung  $x_T^{Car}(t = 50 \text{ ns}, I_p)$  und  $F^{pump}(I_p)$  deutlich. Im Gegensatz zu dem sättigenden Verhalten der Pump-Fluoreszenz nimmt die Besetzung von Karotinoid-Tripletts kontinuierlich zu. Für  $I_p > 10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  ist demnach Gl. (T5) nicht erfüllt.

Es sind zwei Interpretationen für den zusätzlichen Weg der Karotinoid-Triplett-Bildung bei hohen Pump-Impuls-Intensitäten denkbar: i) Die paarweise Auslöschung

von angeregten Chlorophyll-Singulett (*singlet-singlet-annihilation*) könnte zu einem bestimmten Teil Chlorophyll-Tripletts hervorbringen, die schließlich zur Bildung von  $^3\text{Car}$  führen. ii) Ergebnisse der Messungen der intensitätsabhängigen Transmission von solubilisiertem LHCII weisen darauf hin, daß es bei hohen  $I_p$  zu einer nennenswerten Population von doppelt angeregten Chlorophyll-Singulett-Zuständen  $x_2^{Chl}$  kommt (siehe Kap. 2.2.6.2. auf S. 51). Im folgenden wird deshalb angenommen, daß ein Teil dieser Zustände in einen Chlorophyll-Triplett-Zustand relaxiert. Dieser Mechanismus wurde kürzlich an Zn-Phtalozyaninen beobachtet (Rückmann et al., 1997). Obwohl es sich dabei um ein unterschiedliches System handelt, könnte dies auch im LHCII eine Rolle spielen. Die zusätzlich erzeugten Chlorophyll-Tripletts tragen letztlich zur Erzeugung von Karotinoid-Tripletts bei. Die Population  $x_2^{Chl}$  liefert jedoch keinen Beitrag zur Fluoreszenz  $F^{pump}(I_p)$ .

Es ergibt sich folgendes Ratengleichungssystem:

$$\frac{d}{dt} x_T^{Chl} \cong k_{ISC1} \cdot x_1^{Chl} + k_{ISC2} \cdot x_2^{Chl} - k_{TT} \cdot x_T^{Chl} \quad (\text{T7a})$$

$$\frac{d}{dt} x_T^{Car} \cong \frac{N^{Chl}}{N^{Car}} \cdot k_{TT} \cdot x_T^{Chl} \quad (\text{T7b})$$

wobei die Relaxation von Tripletts in den Grundzustand weggelassen wurde ( $t \leq 50$  ns). Die relative Besetzung von Chlorophyll-Tripletts,  $x_T^{Chl}$ , ist selbst bei sehr hohen  $I_p$  nahezu Null. Wäre das nicht der Fall, dann würde  $\Delta OD/OD_0$  bei 675 nm nicht verschwindend klein bleiben (siehe Abb. 23 auf S. 65 und Abb. 37 auf S. 89). Deshalb gilt für Gl. (T7a) die quasi-stationäre Näherung, woraus folgt:

$$x_T^{Car}(I_p) = \frac{N^{Chl}}{N^{Car}} \cdot \left\{ k_{ISC1} \cdot \int_{-\infty}^{50 \text{ ns}} x_1^{Chl}(t') dt' + k_{ISC2} \cdot \int_{-\infty}^{50 \text{ ns}} x_2^{Chl}(t') dt' \right\} \quad (\text{T8})$$

Aus Gl. (T8) und Gl. (T6) ergibt sich:

$$D \cdot \int_{-\infty}^{50 \text{ ns}} x_2^{Chl}(t', I_p) dt' = x_T^{Car}(t = 50 \text{ ns}, I_p) - C \cdot F^{pump}(I_p) \quad (\text{T9})$$

wobei  $D$  eine willkürliche Konstante und  $C$  der Skalierungsfaktor zwischen  $x_T^{Car}(t = 50 \text{ ns}, I_p)$  und  $F^{pump}(I_p)$  ist, der in Abb. 27 gewählt wurde, um eine Übereinstimmung für geringe Pump-Impuls-Intensitäten zu bekommen (Verschiebung der  $F^{pump}(I_p)$ -Kurve entlang der logarithmischen Y-Achse von Abb. 27).

Die in Gl. (T9) enthaltenen Terme sind in Abb. 28 als Funktion der Pump-Intensität aufgetragen.

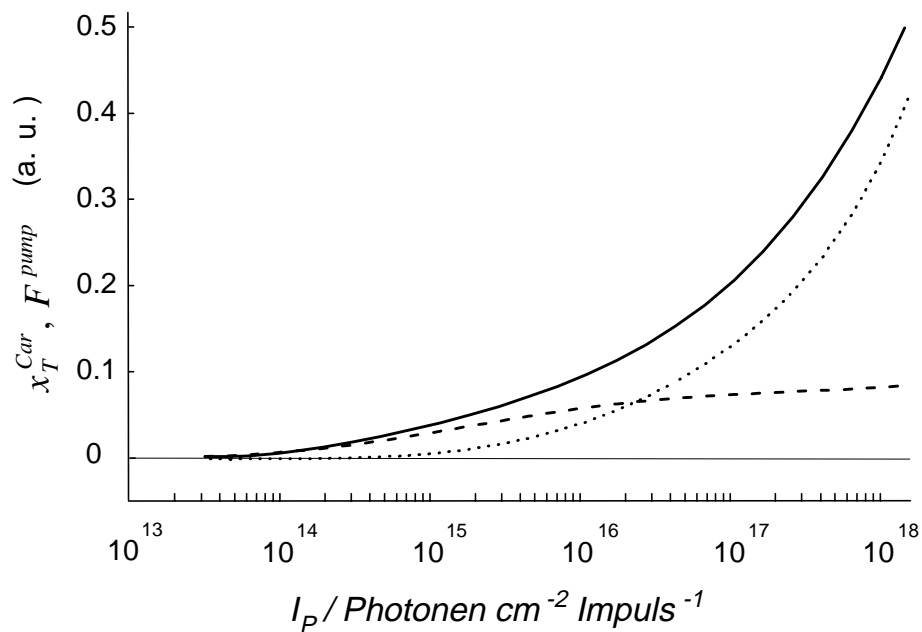


Abbildung 28

Einfach logarithmische Darstellung von  $x_T^{Car}(t = 50 \text{ ns}, I_p)$  (durchgezogene Linie, identisch mit durchgezogener Linie von Abb. 27), die skalierte Pump-Fluoreszenz (gestrichelte Linie, identisch mit gestrichelter Linie von Abb. 27) und die Differenz aus beiden (gepunktete Linie, siehe Gl. (T9)).

Abb. 28 zeigt deutlich, daß die integrale Besetzung der angenommenen nichtstrahlenden doppelt angeregter Chlorophyll-Singulett-Zustände kontinuierlich zunimmt (gepunktete Linie).

### **3.4. Untersuchungen zur ns-Kinetik der Karotinoid-Triplett-Bildung im LHCII**

---

Entsprechend den Ergebnissen der vorangegangenen Kapitel zeigt das 50 ns nach dem Pump-Impuls gemessene T - S-Spektrum von solubilisiertem LHCII, daß Karotinoid-Triplett Zustände erzeugt wurden (siehe Kap. 3.1. auf S. 59). Dabei kann man davon ausgehen, daß diese indirekt über Chl-Triplets entstehen. Da  $\Delta OD$  als Funktion der Verzögerungszeit eindeutig die Relaxation von  $^3\text{Car}$  reflektiert, kann man davon ausgehen, daß der Triplett-Transfer von  $^3\text{Chl}$  zu Car zu diesem Zeitpunkt vollständig abgeschlossen ist.

Mit dem in Abb. 20 (S. 61) dargestellten Meßaufbau ist es nicht möglich, die Generierung der  $^3\text{Car}$  Besetzung zeitlich aufzulösen, da die Fremd-Triggerung des Test-Lasers und die elektronisch erzeugte Verzögerung ein zeitliches *Jitter* von ca.  $\pm 20$  ns zwischen Pump- und Test-Impuls hervorruft.

Deshalb mußte ein Meßaufbau realisiert werden, bei dem der zeitliche Verlauf von Pump- und Test-Impuls sich lediglich durch eine wohl definierte zeitliche Verschiebung unterscheidet. Dieser Aufbau ist im folgenden Kapitel beschrieben.

#### **3.4.1. Meßaufbau mit optischer Verzögerung**

---

Abb. 29 zeigt die geometrische Anordnung des Meßaufbaus mit optischer Verzögerung. Dabei dient der  $\text{N}_2$ -Laser mit integriertem Farbstoff-Laser (Tab. 1 auf S. 19) sowohl als Pump- als auch Test-Laser. Kernstücke sind die Strahlteiler 1 und 2 sowie der Retroreflektor mit variabler Position entlang der optischen Achse. Die Schwierigkeit bestand darin, dafür zu sorgen, daß die Lage und Position des Teststrahles völlig unabhängig vom Ort des Retroreflektors ist. Voraussetzung dafür war zunächst die Qualität des Teststrahls selbst. Dessen Divergenz war sehr gering <sup>/12</sup>, außerdem war dafür Sorge zu tragen, daß der Teststrahl auf unendlich „fokussiert“ ist. Um dies zu erreichen, wurde ein Teleskop verwendet.

---

<sup>/12</sup> Die geringe Strahldivergenz wird durch die Verwendung des Lasers sichergestellt. Es wäre unmöglich, statt dessen mit Blitzlampen oder ähnlichem zu arbeiten.



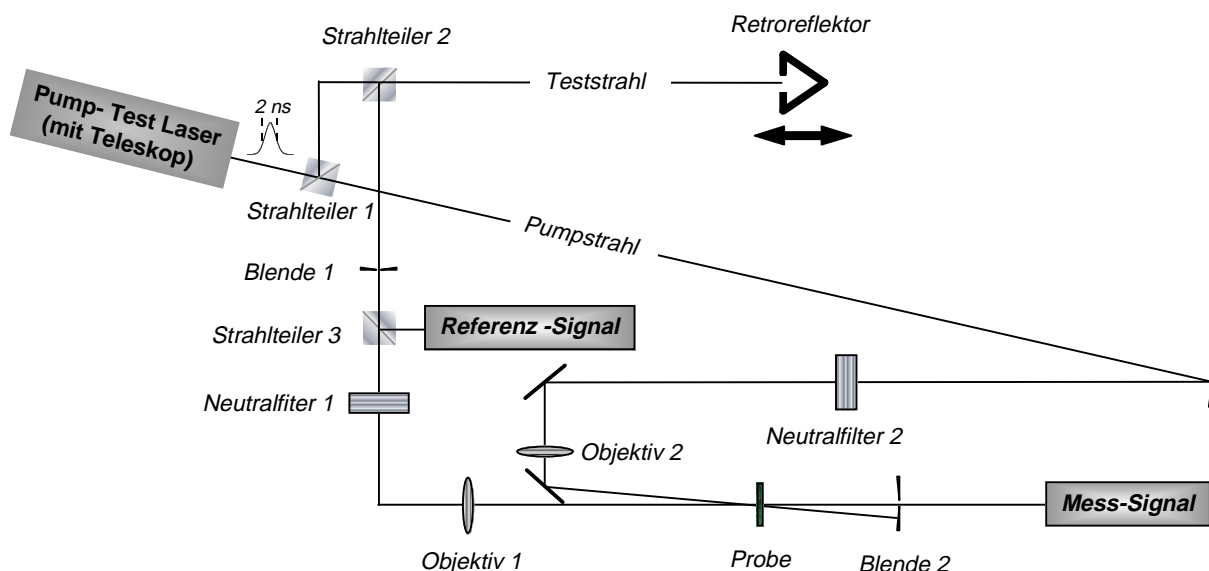


Abbildung 29

Meßaufbau für Pump-Test Messung der Transmission mit optischer Zeitverzögerung des Test-Impulses

Die Bewegungsrichtung des Retroreflektors wurde mit der des Teststrahles genau in Übereinstimmung gebracht. Auf diese Weise gelang es, das Bild des Teststrahls in der Probenebene auf einem ca. 10 m langen „Weg“ des Retroreflektors zu erreichen. Dies entspricht einer Verzögerungszeit von  $t = 30$  ns. Der Zeitpunkt  $t = 0$  ns wurde zunächst aus dem Vergleich der Lichtwege von Pump- und Teststrahl ermittelt.

Die prinzipielle Vorgehensweise bei der Pump-Test-Messung ist in Kap. 3.2.1. auf S. 61. beschrieben.

### 3.4.2. Messungen an Chl *b* in Lösung zur Bestimmung der Apparatfunktion

Um das zeitliche Verhalten des experimentellen Aufbaus (Abb. 29) zu untersuchen, war ein Modell-System nötig: Als solches wurde Chl *b* in 80% azetonischer Lösung gewählt, da es bei einer Wellenlänge von 460 nm ein starkes Ausbleichen des Grundzustandes aufweist (siehe Abb. 21B auf S. 63), das nur sehr wenig von der Anregungszustandsabsorption gebildeter (angeregter) Singulett- sowie Triplett- abgeschwächt wird (siehe quantitative Abschätzung auf S. 75).

Es wurden Messungen der Pump-Impuls-induzierten Absorptionsänderung bei 460 nm als Funktion der Verzögerungszeit zwischen Pump- und Test-Impuls durchgeführt.

Abb. 30 zeigt die experimentellen Daten für die Pump-Impuls-induzierte Absorptionsänderung  $\Delta OD(460 \text{ nm}, t)$  als Funktion der Verzögerungszeit zwischen Pump- und Test-Impuls.

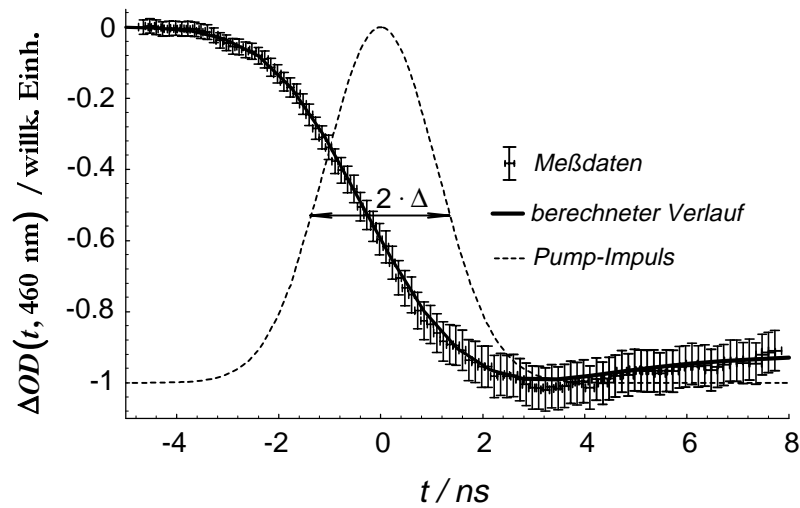


Abbildung 30

Pump-Impuls-induzierte Absorptionsänderungen bei 460 nm von Chl *b* in Lösung als Funktion der optischen Verzögerungszeit zwischen Pump- und Test-Impuls. Die durchgezogene Linie stellt eine berechnete Modellkurve für  $\Delta OD(t)$  bei Verwendung des (gestrichelt) dargestellten zeitlichen Verlaufes des Pump-Impulses dar (siehe Text).

Vernachlässigt man die Besetzung höherer Singulett-Zustände (geringe Pump-Intensität, schnelle Relaxation höherer Singulett), so ergibt sich der Absorptionskoeffizient aus:

$$\alpha = \underbrace{\sigma_0 \cdot (N - n_1 - n_T)}_{\text{Grundzustandsabsorption}} + \underbrace{\sigma_1 \cdot n_1}_{\text{Absorption angeregter Singulett-Zustände}} + \underbrace{\sigma_T \cdot n_T}_{\text{Triplet-Zustands-Absorption}} \quad (\text{T10})$$

wobei  $n_i$  für die Besetzungszahldichte (in  $\text{cm}^{-3}$ ) des ersten angeregten Singulett-Zustandes ( $i = 1$ ) und des Triplet-Zustandes ( $i = T$ ) von Chl *b* steht.  $\sigma_0$ ,  $\sigma_1$  und  $\sigma_T$  sind die Absorptionsquerschnitte des Grund-, ersten angeregten Singulett- und des Triplet-Zustandes. Die Pump-Impuls-induzierten Änderungen von  $\alpha$  sind durch  $\Delta\alpha = \alpha - \alpha_0$  gegeben, wobei  $\alpha_0$  für den linearen Absorptionskoeffizienten steht. Deshalb kann  $\Delta\alpha$  durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\Delta\alpha = n_1 \cdot (\sigma_1 - \sigma_0) + n_T \cdot (\sigma_T - \sigma_0) \quad (\text{T11})$$

Der Betrag von  $\sigma_T$  bei 460 nm ist nach Abb. 22 (S. 64) bekannt und damit etwa um einen Faktor fünf kleiner als  $\sigma_0$  bei der gleichen Wellenlänge.

Der Absorptionsquerschnitt  $\sigma_1$  kann aus Messungen bei  $t = 0$  abgeschätzt werden (nicht gezeigt): Da zu diesem Zeitpunkt die Relaxation in den Triplet-Zustand nur zu einem geringen Teil erfolgt ist, kann davon ausgegangen werden, daß  $n_1$  wesentlich größer als  $n_T$  ist und daß dadurch  $\Delta\alpha$  durch den Term  $n_1 \cdot (\sigma_1 - \sigma_0)$  dominiert wird.

Deshalb erhält man das Verhältnis  $\sigma_1/\sigma_0$  aus  $\frac{N}{n_1} \cdot \frac{\Delta\alpha}{\alpha_0} + 1$  wobei  $n_1$  entsprechend

Gl. (T12a, b) berechnet wird (siehe unten). Setzt man  $\frac{\Delta\alpha}{\alpha_0} = \frac{\Delta OD}{OD_0}$ , dann ergibt sich,

daß  $\sigma_1/\sigma_0$  ungefähr 0.1 ist (obere Grenze: 0.3). Basierend auf diesem Ergebnis sowie  $\sigma_T/\sigma_0 \approx 0.2$  (siehe oben) bei 460 nm, wurde  $\Delta\alpha(t)$  nach Gl. (T11) berechnet. Da die abgeschätzten Werte für  $\sigma_1$  und  $\sigma_T$  deutlich kleiner sind als  $\sigma_0$ , spielt die Anregungszustandsabsorption und Triplett-Absorption eine untergeordnete Rolle. Deshalb kann die gemessene zeitliche Abnahme der optischen Dichte bei 460 nm als fortschreitende Grundzustandsentleerung verstanden werden.

Die Bildung einfach angeregter Singulett- und Triplett- in Chl *b* wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\frac{d}{dt} n_1(t) = \sigma_0 \cdot i^{pump}(t) \cdot [N - n_1(t) - n_T(t)] - k \cdot n_1(t) \quad (\text{T12a})$$

$$\frac{d}{dt} n_T(t) = k_{ISC} \cdot n_1(t) - k_T \cdot n_T(t) \quad (\text{T12b})$$

wobei  $k$  die reziproke Lebensdauer von Chl *b* Singulett- darstellt, die in azetonischer Lösung etwa 3 ns beträgt (Pfarrherr et al. 1991). Zusammen mit einer Triplett-Ausbeute von 88% für Chl *b* in vitro (Bowers and Porter 1967) ergibt sich die Rate für intersystem crossing zu  $k_{ISC} = (3.4 \text{ ns})^{-1}$ .  $i^{pump}(t)$  ist der zeitliche Verlauf des Pump-Impulses entsprechend Gl. (E2) auf S. 20. Ein Einfluß des Test-Impulses auf die Zustandsbesetzungen kann aufgrund dessen geringer Intensität vernachlässigt werden (siehe Kap. 3.2.1. auf S. 61).

Um den zeitlichen Verlauf der gemessenen Änderung der optischen Dichte,  $\Delta OD^{Me\beta}$ , zu beschreiben, ist es notwendig, das Profil der ns-Impulse,  $\Gamma(t)$ , explizit zu berücksichtigen (siehe Anhang A2 auf S. 104) :

$$\Delta OD^{Me\beta}(t) = -\lg \left[ \int_{-\infty}^{+\infty} \exp[-\Delta\alpha(t') \cdot d] \cdot \Gamma(t-t') dt' \right] \quad (\text{T13})$$

Bei der Anpassung der Meßdaten wurde eine zusätzliche willkürliche zeitliche Verschiebung  $\delta$  bezüglich der geometrisch bestimmten Zeitachse zugelassen. Für den besten Fit (durchgezogene Linie von Abb. 30) ergab sich:  $\delta = -0.2 \text{ ns}$ . Diese geringe Abweichung entspricht einem Fehler von lediglich ca. 8 cm Lichtweg-differenz zwischen Pump- und Test-Impuls. Um die Anpass-Prozedur zu testen, wurde ebenfalls die Breite des Gauß-Impulses variiert. Für den besten Fit ergab sich  $\Delta = 1.1 \text{ ns}$ , was mit dem unabhängig ermittelten Wert übereinstimmt (siehe S. 20).

Die zeitliche Entwicklung der angeregten Singulett- und Triplett-Zustände bestimmt gemeinsam die beobachtete Entleerung von Chl *b* Grundzuständen. Dies ist in Anhang A6 auf S. 108 illustriert. Abb. 40 zeigt (siehe S. 108), daß die normierte Kinetik der Chl *b* - Triplett- Besetzung verzögert ist zur gemessenen Grundzustandsentleerung, da letztere zunächst (bei  $t \approx 0$ ) durch die gebildeten angeregten Singulett- verursacht wird.

Das in diesem Abschnitt bestimmte Verhalten von Chl *b* in azetonischer Lösung entspricht dem von dieser Modellsubstanz erwarteten zeitlichem Verhalten, das überwiegend durch Grundzustandsentleerung geprägt ist und damit in etwa einer zeitlichen Integration über den Pump-Impuls entspricht.

### 3.4.3. Messungen mit optischer Verzögerung an solubilisiertem LHCII, kinetische Beschreibung und Diskussion

Die Messungen wurden bei der Wellenlänge von 507 nm durchgeführt, wo das T-S-Spektrum der Karotinoide ein deutliches Maximum aufweist (siehe Abb. 23 auf S. 65). Basierend auf den obigen Messungen an Chl *b* in Lösung müssen die Daten um den Wert  $\delta = -0.2$  ns verschoben werden.

Um Sättigungseffekte zu minimieren, wurde die Pump-Intensität so gering wie möglich gehalten. Eine Intensität von  $10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  war jedoch nötig, um ein akzeptables Signal-Rauschverhältnis zu erhalten. Auf den (geringen) Einfluß nichtlinearer Effekte auf die Bildung von Karotinoid-Triplets wird weiter unten eingegangen.

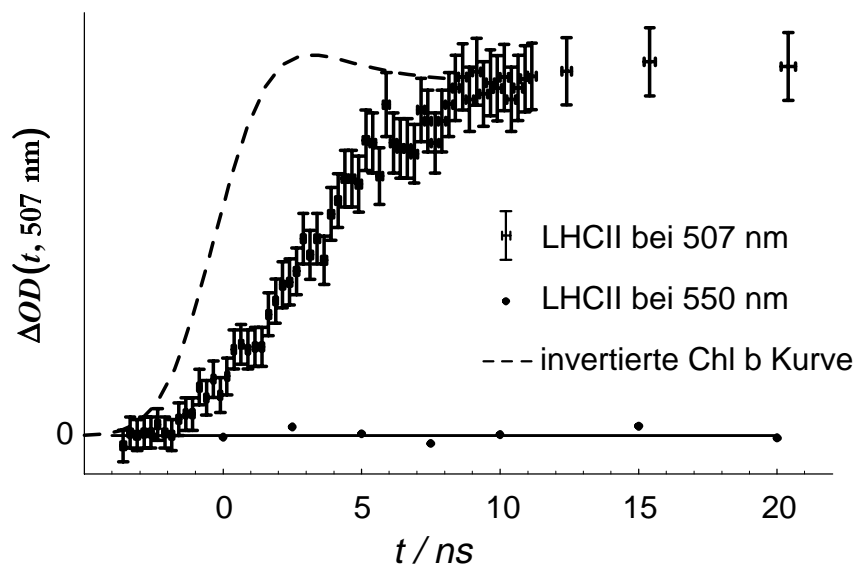


Abbildung 31

$\Delta OD(t)$  bei 507 nm als Funktion der Verzögerungszeit zwischen Pump- ( $10^{15} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ Impuls}^{-1}$ ) und Test-Impuls in solubilisiertem LHCII (Datenkreuze). Die gestrichelte Linie zeigt die an der Zeitachse gespiegelte Chl *b* Kurve (siehe Abb. 30). Die Punkte stellen Werte dar, die bei einer Wellenlänge von 550 nm und gleicher Dichte absorbiertener Photonen gemessen wurden.

Abb. 31 zeigt den zeitlichen Verlauf von  $\Delta OD$  bei 507 nm. Zum Vergleich ist das (an der Zeitachse gespiegelte) Verhalten von Chl *b* in Lösung eingezeichnet (vergleiche Abb. 30). Der zeitliche Aufbau von  $\Delta OD$  bei 507 nm in LHCII ist damit deutlich langsamer als die Apparatefunktion.

Um das gemessene zeitliche Verhalten von  $\Delta OD$  bei 507 nm theoretisch zu beschreiben, ist ein detailliertes Modell notwendig.

Zunächst sei nochmals darauf hingewiesen, daß Karotinoid-Triplets in LHCII, die für  $\Delta OD$  bei 507 nm verantwortlich sind, nicht direkt aus Karotinoid-Grundzuständen hervorgehen, sondern ausschließlich durch den Triplett-Transfer von Chlorophyll zu Karotinoiden gebildet werden. Grund dafür ist zum einen die sehr geringe *intersystem crossing* Rate von angeregten Karotinoid-Singulett (Frank und Cogdell, 1996; Koyama et al., 1996). Zum anderen bleibt die Besetzung der Karotinoid-Singulett selbst sehr gering, weil diese ihre Energie sehr schnell zu den Chlorophyllen transferieren. (Connelly et al., 1997, Peterman et al., 1997b).

Der wellenlängenabhängige Absorptionskoeffizient  $\alpha$  von solubilisiertem LHCII ist durch folgende Terme gegeben:

$$\alpha = \underbrace{\sigma_0^{Chl} \cdot (N^{Chl} - n_1^{Chl} - n_T^{Chl})}_{\text{Chl Grundzustandsabsorption}} + \underbrace{\sigma_1^{Chl} \cdot n_1^{Chl}}_{\text{Absorption angeregter Chl Singulett}} \quad (T14)$$

$$+ \underbrace{\sigma_T^{Chl} \cdot n_T^{Chl}}_{\text{Absorption gebildeter Chl Triplett}} + \underbrace{\sigma_0^{Car} \cdot (N^{Car} - n_T^{Car})}_{\text{Car Grundzustandsabsorption}} + \underbrace{\sigma_T^{Car} \cdot n_T^{Car}}_{\text{Car Triplett-absorption}}$$

wobei  $n_i$  die Besetzungszahldichten (in  $\text{cm}^{-3}$ ) der Singulett- ( $i = 1$ ) und Triplett- ( $i = T$ ) Zustände von Chlorophyll (Chl) beziehungsweise Karotinoiden (Car) bezeichnen.  $\sigma_0$ ,  $\sigma_1$  und  $\sigma_T$  sind die Absorptionsquerschnitte von Grund-, angeregten Singulett- und Triplett-Zuständen. Der lineare Absorptionskoeffizient von LHCII,  $\alpha_0$ , ergibt sich aus:

$$\alpha_0 = \sigma_0^{Chl} \cdot N^{Chl} + \sigma_0^{Car} \cdot N^{Car} \quad (T15)$$

Aus Gl. (T14) und Gl. (T15) erhält man die Pump-Impuls-induzierte Änderung des Absorptionskoeffizienten ( $\Delta\alpha = \alpha - \alpha_0$ ):

$$\Delta\alpha = \underbrace{n_1^{Chl} \cdot (\sigma_1^{Chl} - \sigma_0^{Chl})}_A + \underbrace{n_T^{Chl} \cdot (\sigma_T^{Chl} - \sigma_0^{Chl})}_B + \underbrace{n_T^{Car} \cdot (\sigma_T^{Car} - \sigma_0^{Car})}_C \quad (T16)$$

Term  $C$  in Gl. (T16) beschreibt den Beitrag der Karotinoid-Triplets, der offensichtlich für die Änderung der optischen Dichte bei 507 nm verantwortlich ist (siehe z.B. Kapitel 3.2.4. auf S. 65). Der Einfluß der Terme  $A$  und  $B$  muß jedoch abgeschätzt werden. Dazu wurden vergleichende Messungen von  $\Delta OD(t)$  bei 550 nm durchgeführt, wo der Beitrag von Term  $C$  nahezu null ist (siehe Abb. 23 auf S. 65). Die Beiträge der Terme  $A$  und  $B$  sollten sich jedoch bei 550 nm kaum von 507 nm unterscheiden, da sowohl der Absorptionsquerschnitt der Chlorophyll-Triplets,  $\sigma_T^{Chl}$ , (siehe Abb. 22) als auch angeregter Chlorophyll-Singulett,  $\sigma_1^{Chl}$ , (den Blanken et al., 1983) im Bereich 505 - 550 nm nur schwach variiert. Die Ergebnisse der Messungen bei 550 nm sind als Punkte in Abb. 31 eingezeichnet. Es sei darauf hingewiesen, daß

die Dichte absorbierter Photonen bei der Messung bei 550 nm etwa der bei 507 nm entsprach (etwas höhere Pump-Intensität, wegen geringerer Absorption). Innerhalb des Meßfehlers konnte keine Änderung der optischen Dichte bei 550 nm nachgewiesen werden. Folglich können die Beiträge der Terme  $A$  und  $B$  zur Absorptionsänderung bei 507 nm in Gl. (T16) vernachlässigt werden.

Die zeitliche Änderung der Absorption bei 507 nm spiegelt damit die Kinetik der Karotinoid-Triplett-Bildung wider.

Die bei 507 nm absorbierenden Karotinoid-Grundzustände besitzen ebenfalls keinen Einfluß auf die Kinetik der Karotinoid-Triplett-Bildung. Wegen des ultra-schnellen Singulett-Singulett-Transfers von Car nach Chl (Peterman et al. 1997b) liefern diese lediglich einen Beitrag zum linearen Absorptionskoeffizienten bei 507 nm (siehe Anhang A7).

Deshalb kann die Besetzung von Chlorophyll-Singulett durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{d}{dt} n_1^{chl} = i^{pump}(t) \cdot \alpha_0 - n_1^{chl} \cdot k \quad (\text{T17})$$

wobei  $k$  für die reziproke Lebensdauer von  $n_1$  steht.  $i^{pump}(t)$  ist das zeitliche Profil des Pump-Impulses (Gl. (E2) auf S. 20).

Der zeitliche Verlauf der Besetzung von Chlorophyll-Singulett wird nach Gl. (T17) durch zwei Faktoren bestimmt: i) den Wert von  $k$  und ii) die Intensität und Form des Pump-Impulses. Die Rate  $k$  hängt sehr stark vom Aggregationszustand der verwendeten Probe ab. Da es sich bei dem verwendeten LHCII um eine vollständig solubilisierete Probe handelt, können Aggregationseffekte ausgeschlossen werden. Die Singulett-Relaxationszeit beträgt damit  $k^{-1} = 4.3 \pm 0.2$  ns (Liu et al. 1993, Vasil'ev et al. 1997a, b).

Bezüglich des Einflusses der Intensität und der Form des Pump-Impulses auf den zeitlichen Verlauf von  $n_1^{chl}$  sei daran erinnert, daß für ein akzeptables Signal-Rauschverhältnis bei den Messungen von  $\Delta OD(t)$  eine Pump-Intensität von  $10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  verwendet wurde. Bei dieser Intensität ist die Fluoreszenzausbeute von solubilisieretem LHCII bereits um 50 % vermindert (siehe Kapitel 2.2.3. auf S. 34). Dies kann als ein Effekt der teilweisen Sättigung von LHCII Grundzuständen verstanden werden (siehe Kapitel 2.2.5. auf S. 39). Ein Einfluß der Pump-Intensität auf die Singulett-Lebensdauer ist jedoch nicht zu erwarten. Dies wurde durch Messungen von Liu et al. (1993) bestätigt und entspricht dem von kleinen Pigment-Protein-Komplexen erwartetem Verhalten (siehe S. 30 sowie Mauzerall, 1976, Gülen et al., 1986; Schödel et al. 1996).

Der Einfluß der Sättigung der Chlorophyll-Singulett bei verschiedenen Pump-Intensitäten ist in Anhang A8 auf S. 109 dargestellt. Der normierte zeitliche Verlauf

der Besetzung angeregter Chlorophyll-Singulettts bei der verwendeten Intensität von  $10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  weicht nur wenig von dem Verhalten bei sehr geringen Intensitäten (d. h. vom optisch linearen Fall) ab und kann deshalb durch Gl. (T17) von S. 79 beschrieben werden.

Bei der verwendeten Pump-Intensität von  $10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  verändert sich die optische Dichte bei 507 nm nur sehr wenig (ca. 3%) im Vergleich zur maximal erreichten  $\Delta OD$  (siehe Abb. 25 auf S. 67). Deshalb ist auch die maximale Karotinoid-Triplett-Besetzung,  $n_T^{Car}$ , deren Zeitverlauf in Abb. 31 dargestellt ist, weit von einer Sättigung entfernt. Folglich können die Triplett-Besetzungen im LHCII für  $I_p = 10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  durch folgende Differentialgleichungen beschrieben werden:

$$\frac{d}{dt} n_T^{Chl}(t) = k_{ISC} \cdot n_1^{Chl}(t) - k_T^{Chl} \cdot n_T^{Chl}(t) - k_{TT} \cdot n_T^{Chl}(t) \quad (\text{T18a})$$

$$\frac{d}{dt} n_T^{Car}(t) = k_{TT} \cdot n_T^{Chl}(t) - k_T^{Car} \cdot n_T^{Car}(t) \quad (\text{T18b})$$

wobei  $k_{ISC}$  die *intersystem crossing* - Rate von angeregten Chlorophyll-Singulettts (Besetzung  $n_1^{Chl}$ ) in den Chlorophyll-Triplett-Zustand (Besetzung  $n_T^{Chl}$ ) bedeutet. Die Raten  $k_T^{Chl/Car}$  sind für die Relaxation der entsprechende Triplett-Besetzungen verantwortlich. Der Einfluß letzterer ist auf der ns-Zeitskala von Abb. 31 vernachlässigbar klein, da die Relaxation über  $k_T^{Chl/Car}$  im  $\mu\text{s}$  bzw. im ms Zeitbereich abläuft.

Die Konstante  $k_{TT}$  bezeichnet die Rate für den Triplett-Transfer von  $^3\text{Chl}$  nach Car.

Gl. (T18a, b) liefert demnach die Karotinoid-Triplett-Besetzung, die zu folgender Änderung des Absorptionskoeffizienten bei 507 nm führt:  $\Delta\alpha(t) = n_T^{Car}(t) \cdot (\sigma_T^{Car} - \sigma_0^{Car})$  (siehe oben, insbesondere Gl. (T16) auf S. 78)

Um jedoch die Daten von  $\Delta OD^{Me\beta}(t)$  bei 507 nm (Abb. 31) zu modellieren, ist es notwendig, die zeitliche Überlappung mit dem Test-Impuls zu berücksichtigen. Dies geschieht analog zu Chl *b* in Lösung durch Anwendung von Gl. (T13) (siehe S. 76).

Abb. 32 zeigt die experimentellen Daten aus Abb. 31 gemeinsam mit Modellkurven. Letztere wurden nach Gl. (T13) sowie dem oben beschriebenen Modell berechnet. Der einzige Parameter, der den berechneten (normierten) Zeitverlauf von  $\Delta OD$  und damit die Karotinoid-Triplett-Besetzung beeinflusst, ist die Rate  $k_{TT}$  für den Triplett-Transfer von  $^3\text{Chl}$  nach Car. Deshalb sind Kurven bei verschiedenen Werten von  $k_{TT}$  dargestellt.

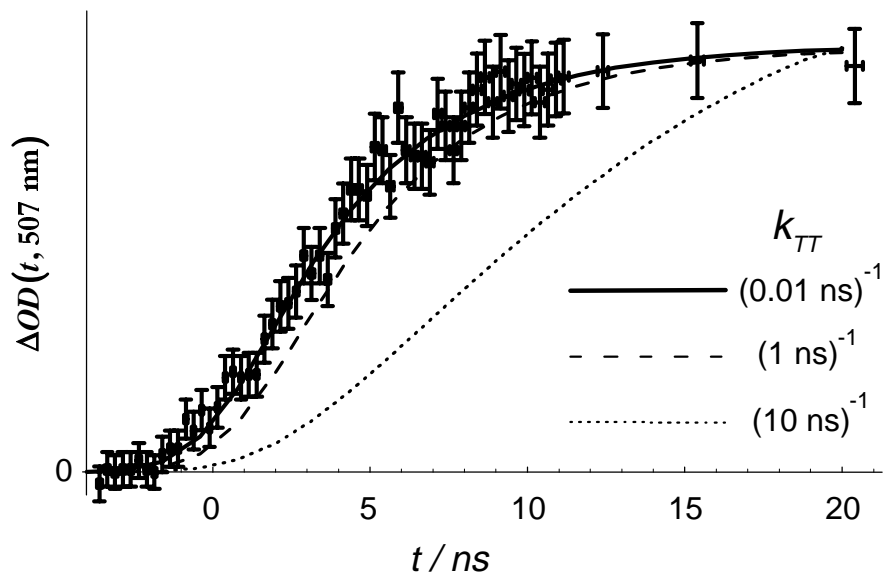


Abbildung 32

Anpassung der gemessenen Daten von  $\Delta OD(t)$  bei 507 nm (Fehlerkreuze) durch das beschriebene Modell bei verschiedenen Raten  $k_{TT}$  für den Triplet-Transfer in solubilisiertem LHCII. Der Fall  $k_{TT} = (0.01 \text{ ns})^{-1}$  stellt den Grenzfall  $k_{TT} \rightarrow \infty$  dar.

Wird der von Kramer und Mathis (1980) gefundene Parameter von  $k_{TT} = (10 \text{ ns})^{-1}$  benutzt, so ergibt sich keine Übereinstimmung mit den gemessenen Daten (gepunktete Kurve in Abb. 32). Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß eine Variation des Parameters  $k_{ISC}$  keinen Einfluß auf die dargestellten berechneten Kurven besitzt (siehe Anhang A9 auf S. 110).

Die durchgezogene Linie in Abb. 32 stellt eine sehr gute Anpassung an die experimentellen Daten dar. Der dort verwendete Wert von  $k_{TT} = (0.01 \text{ ns})^{-1}$  entspricht dem Grenzfall eines unendlich schnellen Triplet-Transfers ( $k_{TT} \rightarrow \infty$ ). Das heißt, eine weitere Vergrößerung von  $k_{TT}$  zeigt keine Wirkung mehr auf die berechnete Kurve. In diesem Fall wird die zeitliche Besetzung von Karotinoid-Triplets durch das Integral über angeregte Chlorophyll-Singulets beschrieben (siehe Anhang A9 auf S. 110).

Als untere Grenze kann im Rahmen der Meßgenauigkeit angegeben werden:

$$k_{TT} \geq (0.5 \text{ ns})^{-1}$$

Dieser Wert ist mehr als eine Größenordnung größer, als der noch vor kurzer Zeit akzeptierte Wert von Kramer und Mathis (siehe oben).



#### **3.4.4. Schlußfolgerungen für die Funktionalität des LHCII**

---

Die detaillierte Untersuchung von Pump-Impuls-induzierten Absorptionsänderungen bei 507 nm führt zu einer unteren Grenze für die Rate des Triplett-Transfers von  $^3\text{Chl}$  zu Car. Das Ergebnis  $k_{TT} \geq (0.5 \text{ ns})^{-1}$  zeigt, daß die Wechselwirkung zwischen Chlorophyllen und Karotinoiden in LHCII offensichtlich stärker ist, als bisher angenommen wurde. Diese Feststellung erklärt nicht nur den schnellen Singulett-Singulett-Energietransfer von Car zu Chl, sondern illustriert die Fähigkeit der Karotinoide, den LHCII sehr effektiv vor einer Zerstörung durch Singulett-Sauerstoff zu schützen.

### 3.5. Untersuchungen zum Einfluß gebildeter Triplets auf die Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII

Die Anwesenheit von Triplets (sowohl  $^3\text{Car}$  als auch  $^3\text{Chl}$ ) führt zur Löschung strahlend relaxierender angeregter Chlorophyll-Singulets (siehe S. 59 in Kap. 3.1.). Dieses auch Fluoreszenz-Quenching genannte Phänomen soll in den folgenden Kapiteln an solubilisiertem LHCII untersucht werden. Die Meßmethode besteht darin, einen schwachen Test-Impuls verzögert zum Pump-Impuls auf ein definiertes Probengebiet zu senden und das Verhalten der durch der „Test-Fluoreszenz“ zu untersuchen. Ziel ist es, einen Zusammenhang zwischen Triplet-Besetzungen und der Löschung der Test-Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII herzustellen.

#### 3.5.1. Meßaufbau für Pump-Test-Messungen der Fluoreszenz

Abb. 33 stellt die neu aufgebaute Anordnung zur Messung Pump-Impuls-induzierter Änderungen der Test-Fluoreszenz dar. Um den Zusammenhang mit parallel durchgeführten Messungen von  $\Delta OD$  zu verdeutlichen, sind zusätzlich die Komponenten des in Abb. 20 (siehe S. 61) dargestellten Aufbaus enthalten. Im folgenden sei lediglich auf Aspekte eingegangen, die im Zusammenhang mit den genannten Fluoreszenz-Messungen stehen. Für weiteres sei auf Kap. 3.2.1. (S. 61) verwiesen.

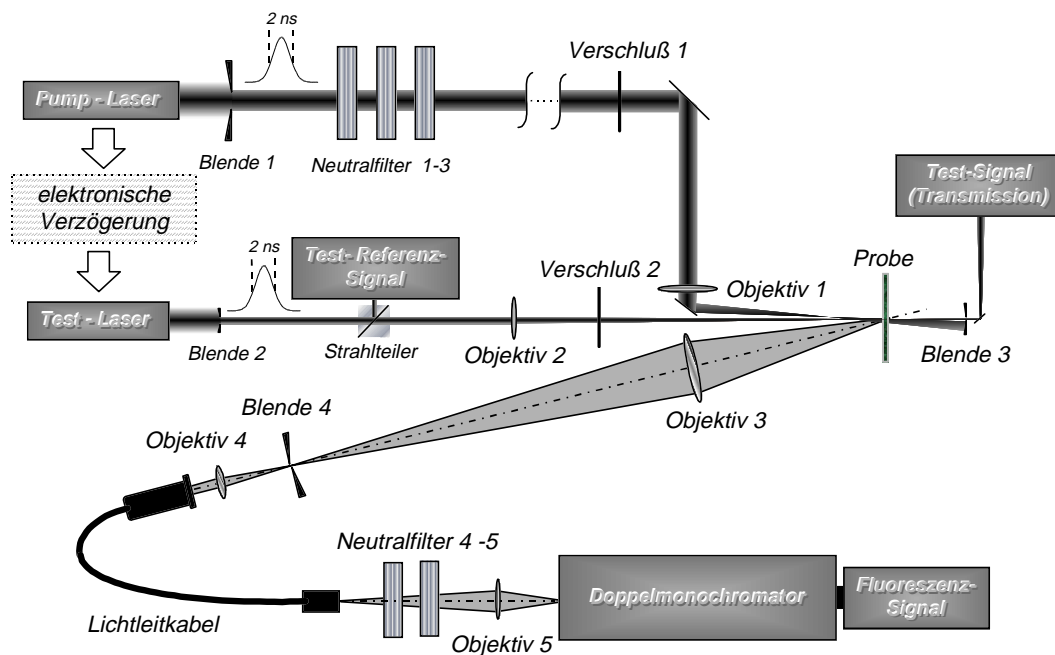


Abbildung 33

Schematische Darstellung des Meßaufbaus bei Pump - Test - Messungen der Fluoreszenz

Die durch den Pump-Impuls hervorgerufenen Änderung der Fluoreszenzquantenausbeute der Probe wurde durch die Messung der Fluoreszenz des Test-Impulses bestimmt. Die Test-Impuls-Intensität wurde auf etwa  $10^{13} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  eingestellt. Als Test-Impuls-Wellenlänge wurde 430 nm gewählt.

Die Messung der Test-Fluoreszenz erfolgte in einem Probengebiet, in dem die Pump-Intensität nur sehr gering variierte. Um dies zu erreichen, war es unerlässlich, die in Kap. 2.2.1. (siehe S. 31) beschriebene räumliche Selektion des zu untersuchenden fluoreszierenden Probenbereiches durchzuführen. Das Fluoreszenzlicht gelangte über ein Lichtleitkabel mit entsprechender Optik und einen Doppelmonochromator zum Detektor (für näheres siehe Kap. 2.2.2. auf S. 33).

Ein wichtiger zusätzlicher Vorteil der räumlichen Selektion der Fluoreszenz ist die Unterdrückung der Pump-Fluoreszenz bei hohen Intensitäten. Auf diese Weise wurde erreicht, daß die Pump-Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII ab ca.  $10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  nur noch unwesentlich ansteigt (siehe Abb. 15 auf S. 44). Ein Verzicht auf räumliche Selektivität bei der Fluoreszenzmessung hätte zur Folge, daß das zusammen mit der Test-Fluoreszenz den Detektor erreichende Signal der Pump-Fluoreszenz bei hohen Intensitäten sehr drastisch ansteigt (siehe Abb. 12 auf S. 36). Dies würde zu einer Übersteuerung des Fluoreszenz-Detektors führen und damit eine Messung der Test-Fluoreszenz unmöglich machen.

Die zeitliche Verzögerung zwischen Pump- und Test-Impuls war  $\geq 50$  ns. Da die Lebensdauer einfach angeregter Chlorophyll-Singulets in solubilisiertem LHCII etwa 4.3 ns beträgt (Vasi'lev et al., 1997b), ist die Pump-Fluoreszenz bei diesen Verzögerungszeiten vernachlässigbar gering. Trotzdem kann die Pump-Fluoreszenz für  $t \geq 50$  ns bei hohen Pump-Intensitäten das elektronische Signal am Detektor beeinflussen, da diese um Größenordnungen höher ist als die Test-Fluoreszenz. Dies kann jedoch dadurch korrigiert werden, daß das Signal bei ausgeschaltetem Test-Impuls berücksichtigt wird. Deshalb wurde die Pump-Impuls induzierte relative Änderung der Test-Fluoreszenz bestimmt aus:

$$\frac{F(I_p, t \geq 50 \text{ ns})}{F_0} = \frac{S(\text{pump } \uparrow \text{ probe } \uparrow) - S(\text{pump } \uparrow \text{ probe } \downarrow)}{S(\text{pump } \downarrow \text{ probe } \uparrow) - S(\text{pump } \downarrow \text{ probe } \downarrow)} \Big|_{I_p, t \geq 50 \text{ ns}} \quad (\text{T19})$$

Dabei kennzeichnet  $S$  das bezüglich des Test-Impulses synchronisierte Signal am Fluoreszenz-Signal-Detektor (Pump  $\uparrow / \downarrow$ : Verschluß 1 auf/zu; Test  $\uparrow / \downarrow$ : Verschluß 2 auf/zu; siehe Abb. 33).

Auf diese Weise konnten Einflüsse der Pump-Fluoreszenz auf die zu bestimmende Fluoreszenzausbeute des Test-Impulses beseitigt werden.

Um zu prüfen, ob Gl. (T19) den Einfluß des Signals  $S(\text{pump } \uparrow \text{ probe } \downarrow)$  wirksam beseitigt und daß Meßartefakte ausgeschlossen werden können, wurden folgende

Testexperimente durchgeführt:

Die Probe wurde durch eine streuende Oberfläche ersetzt, und es wurde die gleiche Wellenlänge am Pump-Laser, Test-Laser und am Monochromator eingestellt. Die elektronischen Signale am Fluoreszenz-Signal-Detektor wurden so eingestellt wie sie bei den Fluoreszenz-Messungen an LHCII auch bei sehr hohen Pump-Intensitäten vorgefunden wurden (siehe Kap. 3.5.2.). Es ergab sich, daß der entsprechend Gl. (T19) berechnete Ausdruck sowohl unabhängig von der Pump-Intensität als auch der gewählten Verzögerungszeit zwischen Pump- und Test-Impuls ist (Daten nicht gezeigt).

Die im weiteren gewonnenen experimentellen Ergebnisse sind demnach nicht durch elektronische Meßartefakte verfälscht.

### 3.5.2. **Ergebnisse der Messungen der Test-Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII als Funktion der Pump-Impuls-Intensität sowie der Verzögerungszeit**

Durch Messung der durch den verzögerten schwachen Test-Impuls hervorgerufenen Fluoreszenz (Test-Fluoreszenz) ist es möglich, die Wechselwirkung der Pump-Impuls-induzierten Triplets mit den später erzeugten angeregten Chlorophyll-Singulets zu analysieren (siehe S. 60).

Das Verhältnis der relativen Ausbeute der Test-Fluoreszenz  $F(t \geq 50 \text{ ns}, I_p)/F_0$  (siehe Gl. (T19) auf S. 84) wurde bei konstanter Verzögerungszeit von ca. 50 ns als Funktion der Pump-Impuls-Intensität bestimmt. Abb. 34 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen in einer doppelt logarithmischen Darstellung. Die Test-Fluoreszenz nimmt stark ab und erreicht bei hohen Intensitäten wenige Prozent des Ausgangswertes.

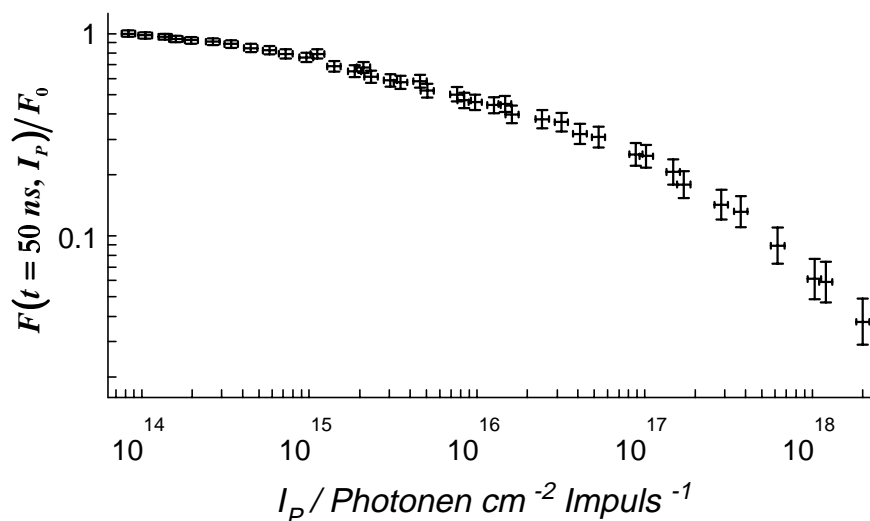


Abbildung 34

Doppelt logarithmische Darstellung des Verhältnisses  $F(t = 50 \text{ ns}, I_p)/F_0$ .

Es sei hierbei nochmals auf die Wichtigkeit der räumlich selektiven Messung der Fluoreszenz hingewiesen (siehe Kap. 3.5.1. auf S. 83), ohne die es unmöglich gewesen wäre, den gesamten dargestellten Bereich der Pump-Intensität abzudecken.

Abb. 35 zeigt das Zurückkehren von  $F(t \geq 50 \text{ ns}, I_p)/F_0$  mit fortschreitender Verzögerung zum Ausgangswert bei verschiedenen Pump-Intensitäten.

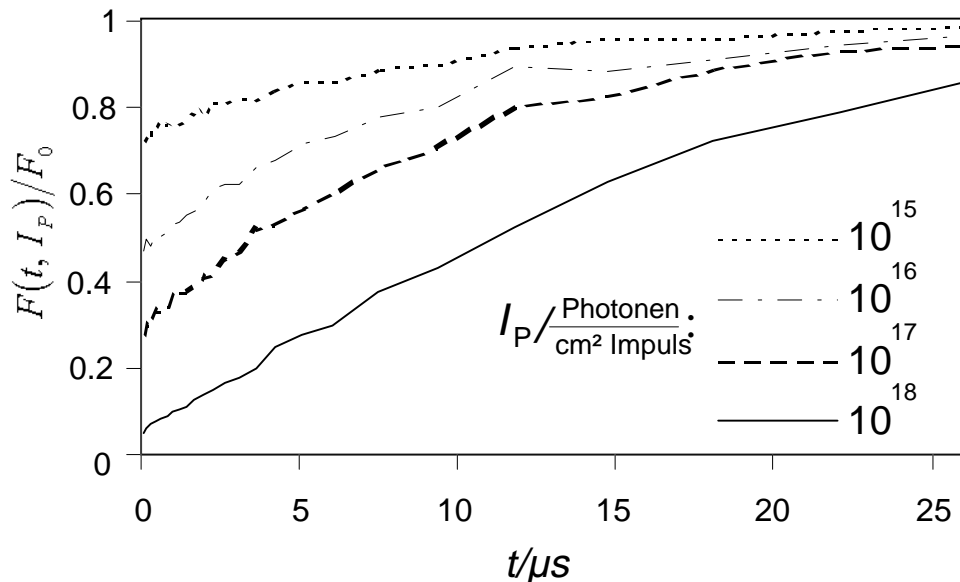


Abbildung 35

Das Verhältnis  $F(t, I_p)/F_0$  als Funktion der Verzögerungszeit ( $t \geq 50 \text{ ns}$ ) bei verschiedenen Pump-Intensitäten.

Im folgenden soll dieses zeitabhängige Verhalten detailliert untersucht werden.

### 3.5.3. Die Löschung der Test-Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII auf einer $\mu\text{s}$ Zeitskala

Da die Daten der Test-Fluoreszenz in Abb. 34 und 35 nicht durch Beiträge der Pump-Fluoreszenz verfälscht sind, können diese direkt zur Berechnung der Quench-Effizienz benutzt werden.

In Abwesenheit des Pump-Impulses ist die Fluoreszenz-Quantenausbeute des Test-Impulses,  $\Phi_F^0$ , gegeben durch  $\Phi_F^0 = k_F/k$ , wobei  $k_F$  die Ratenkonstante für die strahlende Emission und  $k$  die reziproke Lebensdauer des einfach angeregten Chlorophyll-Singulett-Zustandes darstellen.

Sorgt der Pump-Impuls für eine Besetzung von Quenchern, deren Lebensdauer wesentlich größer als die der angeregten Singulets ist, so reduziert sich die Fluoreszenz-Quantenausbeute zum Zeitpunkt des Test-Impulses auf den folgenden

Wert:  $\Phi_F = \frac{k_F}{\left\{ k + \sum_i k_q^i \cdot x^i \right\}}$ , wobei  $k_q^i$  die einer relativen Quencher-Population,

$x^i$ , zugeordnete Quenching-Rate bezeichnet. Dies führt auf die wohlbekannte Stern-Volmer Gleichung:

$$\frac{\Phi_F^0}{\Phi_F} = 1 + \sum_i \frac{k_q^i}{k} \cdot x^i \quad (\text{T20})$$

Die Summe  $\sum_i \frac{k_q^i}{k} \cdot x^i(t)$  in Gl. (T20) enthält die gewichteten Anteile aller löschenden Populationen und wird deshalb im weiteren als „totale Quencher-Konzentration“,  $Q_{tot}(t)$ , bezeichnet.

Die Fluoreszenz-Quantenausbeute in Gl. (T20) ist definiert als das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen:  $\Phi_F = F/I_{abs}$ . Bei der verwendeten Test-Impuls-Wellenlänge von 430 nm (siehe Kap. 3.5.1. auf S. 83) und einer Pump-Impuls Intensität von  $10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  ist die relative Änderung der optischen Dichte,  $\Delta OD/OD_0$ , etwa - 0.01 (siehe Abb. 23 auf S. 65). Im Vergleich dazu ist die relative Änderung der Test-Fluoreszenz,  $F(t = 50 \text{ ns}, I_p)/F_0$ , bei  $I_p = 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  sehr groß ( $\approx 0.3$ , siehe Abb. 34). Folglich bleibt die Anzahl der durch die Probe absorbierten Test-Impuls-Photonen ( $I_{abs}$ ) nahezu unbeeinflusst vom Pump-Impuls. Deshalb kann  $\Phi_F^0/\Phi_F$  in Gl. (T20) durch  $F_0/F(t \geq 50 \text{ ns}, I_p)$  ersetzt werden. Letzteres entspricht den reziproken Werten der Daten von Abb. 34 bzw. 35. Deshalb erhält man aus den experimentellen Daten der Test-Fluoreszenz einen unabhängigen Ausdruck für  $Q_{tot}(t)$ :

$$Q_{tot}(t) = \frac{F_0}{F(t \geq 50 \text{ ns}, I_p)} - 1 \quad (\text{T21})$$

Abb. 36 zeigt die normierten Zeitverläufe von  $Q_{tot}(t)$ , die mit Gl. (T21) aus den Daten von Abb. 35 berechnet wurden. Die Relaxation von  $Q_{tot}(t)$  kann bei geringen Pump-Impuls-Intensitäten von bis zu  $10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  sehr gut durch eine mono-exponentielle Anpassung mit  $\tau = 7.1 \mu\text{s}$  beschrieben werden. Diese berechnete Kinetik ist nahezu identisch mit der Kinetik von Karotinoid-Triplets, die an derselben Probe gemessen wurde ( $\Delta OD$  bei 507 nm, siehe oben rechts in Abb. 36). Es sei darauf hingewiesen, daß letztere nicht von der Pump-Intensität abhängt (siehe Kap. 3.3.1. auf S. 67). Daraus kann geschlußfolgert werden, daß bei vergleichsweise geringen Pump-Impuls-Intensitäten die Population  $Q_{tot}$  ausschließlich den Karotinoid-Triplets zugeordnet werden kann, d.h.:

$$Q_{tot}(t, I_p \leq 10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}) = \frac{k_q^{3Car}}{k} \cdot x_T^{Car}(t) \quad (\text{T22})$$

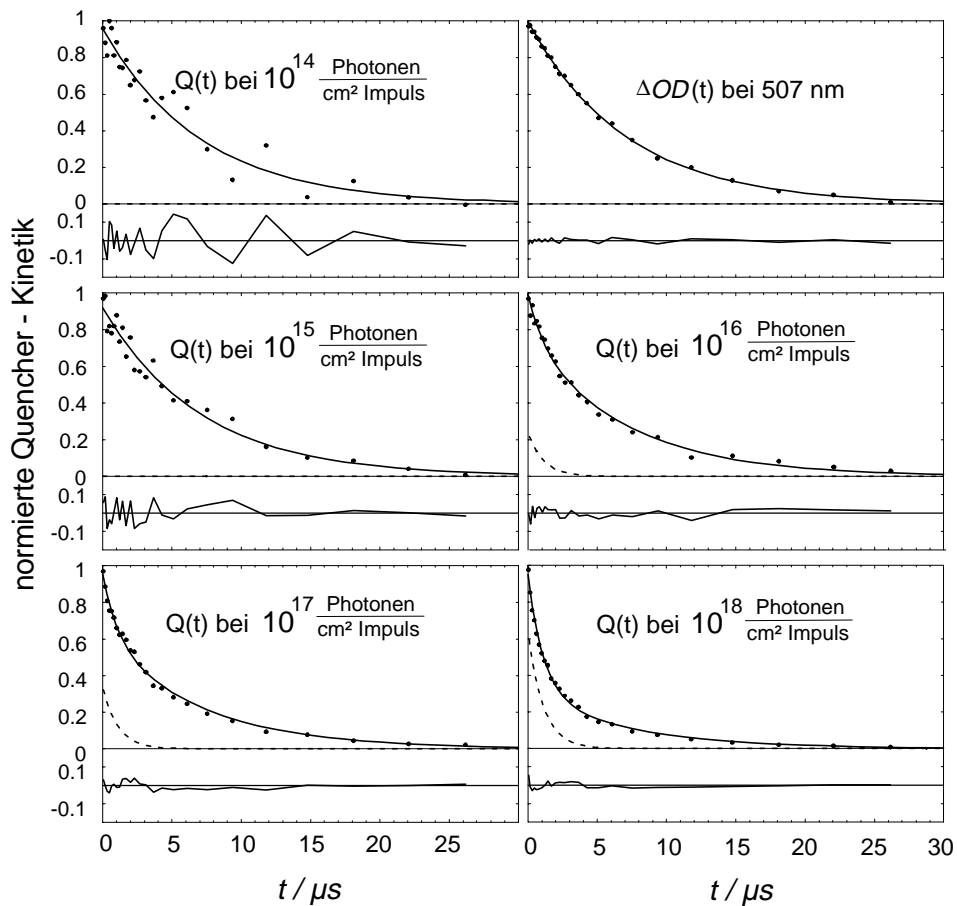


Abbildung 36

Normierte Darstellung des Zeitverlaufes der „totalen Quencher-Konzentration“ in solubilisiertem LHCII bei verschiedenen Pump-Impuls-Intensitäten. Die Datenpunkte wurden mit Gl. (T21) aus den experimentellen Daten von Abb. 35 (siehe S. 86) berechnet. Das Bild oben rechts zeigt die Kinetik der Karotinoid-Triplets, die an derselben Probe wie in Abb. 35 gemessen wurde. Die durchgezogenen Linien entsprechen einer Anpassung mit zwei exponentiell abfallenden Komponenten. Zu einer konstant bleibenden  $7.1 \mu\text{s}$ -Komponente entwickelt sich mit steigender Pump-Intensität eine  $1.1 \mu\text{s}$ -Komponente (gestrichelte Linie). Siehe Text für Einzelheiten.

Bei höheren Pump-Impuls-Intensitäten ( $\geq 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ ) tritt zusätzlich zu  $\tau_1 \cong 7.1 \mu\text{s}$  eine kürzere zeitliche Komponente mit  $\tau_2 \cong 1.1 \mu\text{s}$  in Erscheinung). Die Amplitude dieser Komponente nimmt mit steigender Pump-Impuls-Intensität zu (siehe gestrichelte Linien in Abb. 36). Die entsprechenden Amplituden lauten:

$$A^{1.1 \mu\text{s}} = 0.25, 0.35, 0.65 \text{ bei } I_p = 10^{16}, 10^{17}, 10^{18} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}.$$

Die Invarianz der Relaxation von Karotinoid-Triplets bezüglich  $I_p$  auf der einen und das Relaxationsverhalten von  $Q_{\text{tot}}(t)$  für verschiedene  $I_p$  auf der anderen Seite führen zu der Frage, worauf die schnellere  $1.1 \mu\text{s}$  Komponente von  $Q_{\text{tot}}(t)$  bei höheren  $I_p$  zurückzuführen ist. Da bei Verzögerungszeiten von  $\geq 50 \text{ ns}$  zwischen Pump- und Test-Impuls angeregte Chlorophyll-Singulets keine Rolle spielen (siehe oben), kann man davon ausgehen, daß bei hohen  $I_p$  eine zusätzliche Quenching-Komponente gebildet wird.

Zur Identifikation des zusätzlichen Quenchers, wurden die im folgenden beschriebenen Experimente bei 675 nm durchgeführt.

### 3.5.4. Vergleichende Messungen von $\Delta OD$ bei 507 nm und 675 nm

Das in Abb. 23 (S. 65) dargestellte Spektrum von  $\Delta OD$  von solubilisiertem LHCII, das 50 ns nach dem Pump-Impuls gemessen wurde, zeigt deutlich das Verhalten von Karotinoid-Triplets (siehe Kap. 3.2.4. aus S. 65). Das genannte  $\Delta OD$ -Spektrum weist jedoch auch ein leichtes Ausbleichen im Bereich des  $Q_y$ -Absorptionsmaximums bei etwa 675 nm auf. Dieses Verhalten wurde ebenfalls von Peterman et al. (1995) beobachtet und auf die Wechselwirkung von Karotinoid-Triplets mit Chlorophyll-Grundzuständen (siehe van der Vos et al., 1991) zurückgeführt. Bestätigung fand diese These durch die Beobachtung, daß die Relaxationskinetik von  $\Delta OD$  bei 675 nm identisch war mit dem Verhalten bei 507 nm (Peterman et al., 1995).

Sollte es jedoch zur Bildung von Chlorophyll-Triplets bei hohen Pump-Intensitäten kommen (siehe Kap. 3.5.3. auf S. 86), so führt dies zwingend zu einer Änderung der optischen Dichte bei 675 nm (Chlorophyll-Grundzustandsentleerung). Aus diesem Grund wurden Messungen von  $\Delta OD$  bei 675 nm durchgeführt.

Abb. 37 zeigt  $\Delta OD$  bei 675 nm bei 50 ns Verzögerung zwischen Pump- und Test-Impuls als Funktion der Pump-Impuls-Intensität.

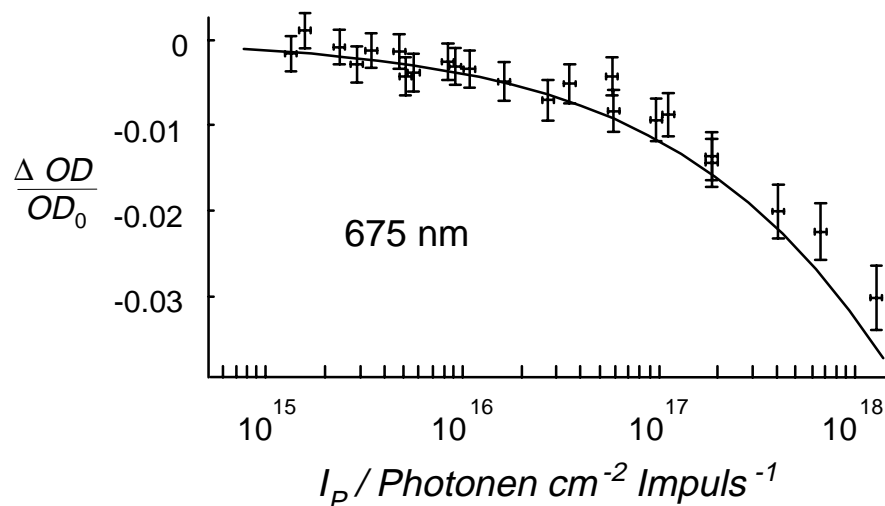


Abbildung 37

$\Delta OD/OD_0$  bei 675 nm und 50 ns Verzögerung zwischen Pump- und Test-Impuls als Funktion der Pump-Intensität in solubilisiertem LHCII.

Die Fehlerkreuze stellen die gemessenen Daten dar. Bei der durchgezogenen Linie wurde der Effekt abnehmender Pump-Intensität innerhalb der Probe eliminiert (siehe Text).

Die in Abb. 37 dargestellten Meßdaten (Kreuze) wurden analog zu  $\Delta OD$  bei 507 nm



(siehe Kap. 3.3.2.) hinsichtlich abnehmender Pump-Intensität innerhalb der Probe korrigiert. Das Ergebnis dessen ist als durchgezogene Linie eingezeichnet (siehe auch Anhang A3 auf S. 105).

Die relative Änderung der optischen Dichte bei 675 nm ist nach Abb. 37 wesentlich kleiner als bei 507 nm (vergleiche Abb. 26). Deshalb gestalteten sich die Messungen der Relaxationskinetik bei 675 nm schwierig. Diese wurden an derselben Probe wie bei den in Abb. 36 dargestellten Messungen zur Quenching-Kinetik der Test-Fluoreszenz durchgeführt.

Abb. 38 zeigt die mono-exponentielle Relaxation der Karotinoid-Triplets (oben, anhand der  $7\mu\text{s}$ -Kinetik von  $\Delta OD$  bei 507 nm) und die Kinetik von  $\Delta OD$  bei 675 nm (unten) in solubilisiertem LHCII. Letztere wurde bei einer Pump-Impuls-Intensität von  $6 \cdot 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  gemessen.

Die experimentellen Daten der in Abb. 38 dargestellten Kinetik von  $\Delta OD$  bei 675 nm lassen sich durch die Summe zweier exponentieller Abklingkomponenten beschreiben. Einer langsameren  $7.1\mu\text{s}$  Komponente, die der Relaxation von Karotinoid-Triplets zugeordnet werden kann (siehe Kap. 3.5.5.) steht eine zweite Komponente mit einer wesentlich kleineren Zeitkonstante von  $0.9\mu\text{s}$  gegenüber.

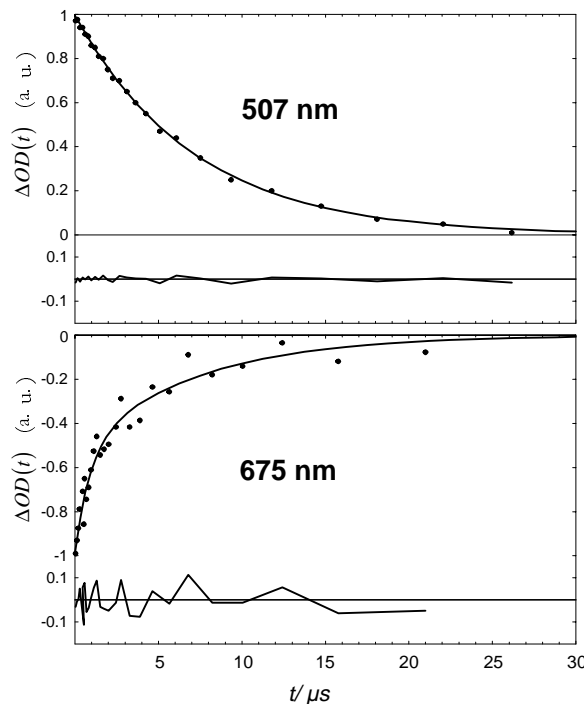


Abbildung 38

Normierte Kinetik der Pump-Impuls-induzierten Absorptionsänderungen,  $\Delta OD$ , gemessen bei der Pump-Intensität von  $6 \cdot 10^{17} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ Impuls}^{-1}$  und bei 507 nm bzw. 675 nm (Punkte). Die durchgezogenen Linien stellen folgende mono- bzw. bi-exponentielle Anpassungen an die experimentellen Daten dar:

507 nm:  $\tau = 7.1 \mu\text{s}$

675 nm:  $a_1 = -0.48$ ;  $\tau_1 = 0.9 \mu\text{s}$ ;  $a_2 = -0.52$ ;  $\tau_2 = 7.1 \mu\text{s}$ .

Aufgrund der kleinen Absolutwerte von  $\Delta OD$  bei 675 nm konnte keine geringere Pump-Impuls-Intensität verwendet werden. Deshalb war es nicht möglich, die Amplitude der gefundenen 0.9  $\mu$ s-Komponente systematisch bei verschiedenen Pump-Intensitäten zu untersuchen. Es ist lediglich bekannt, daß bei geringen Pump-Intensitäten keine kurze Komponente von  $\Delta OD$  bei 675 nm auftritt (Peterman et al., 1995).

Demnach sind zwei verschiedene Mechanismen denkbar, die zur Änderung der optischen Dichte bei 675 nm führen: i) die Wechselwirkung von Chlorophyll-Grundzuständen mit gebildeten Karotinoid-Tripletts (siehe van der Vos et al., 1991) und ii) eine Entleerung der Population von absorbierenden Chlorophyll-Grundzuständen bei hohen Pump-Intensitäten.

### 3.5.5. Identifikation der Fluoreszenz-löschenden Populationen

---

Bei geringen Pump-Impuls-Intensitäten stimmt die Kinetik der Fluoreszenz-Quencher mit der Karotinoid-Triplett-Relaxationskinetik überein (siehe Kap. 3.5.3. auf S. 86). Dies führte auf Gl. 22 (siehe S. 87) für die Beschreibung der „totalen Quencher-Konzentration“,  $Q_{tot}$ , für  $I_p \leq 10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ .

Vergleicht man den Wert der kurzen Zeitkonstanten von  $\Delta OD$  bei 675 nm (0.9  $\mu$ s) mit der aus den Test-Fluoreszenz-Messungen folgenden schnellen Quenching-Komponente von 1.1  $\mu$ s (siehe Abb. 36 auf S. 88), dann liegt die Vermutung nahe, daß beide Ergebnisse auf dasselbe Phänomen zurückzuführen sind: Die Bildung von Chlorophyll-Tripletts bei hohen Intensitäten. Denn zum einen äußert sich die Bildung von Chlorophyll-Tripletts in der Entleerung des Chlorophyll-Grundzustandes (siehe Kap. 3.2.2. auf S. 63), zum anderen ist bekannt, daß das Vorhandensein von Chlorophyll-Tripletts zu einer drastischen Verringerung der Fluoreszenzausbeute führt (siehe Breton und Geacintov, 1980).

Die Annahme, daß es 50 ns nach dem Pump-Impuls eine Wahrscheinlichkeit für die Existenz einer sehr geringen Population von Chlorophyll-Tripletts in solubilisiertem LHCII gibt, stellt keinen Widerspruch zu bisher gewonnenen Ergebnissen dar:

Die intensitätsabhängigen Untersuchungen von Kap. 3.3.2. (siehe S. 68) führen zu dem Ergebnis, daß die Population von Karotinoid-Tripletts mit steigender Pump-Impuls-Intensität kontinuierlich zunimmt. Selbst bei extrem hohen  $I_p$  kommt es zu keiner Sättigung der  $^3\text{Car}$  Besetzung. Wäre letzteres der Fall, hätte man eine drastische Zunahme einer Chlorophyll-Triplett-Population beobachten müssen, die sich dann in einer deutlichen Änderung der optischen Dichte bei 675 nm geäußert hätte. Dahingegen ist die gemessene relative Änderung von  $OD$  bei 675 nm und 50 ns Verzögerung extrem gering. Dieses Ergebnis ist also einerseits konsistent mit

dem erwähnten nicht-sättigenden Verhalten von  $^3\text{Car}$ , schließt aber andererseits nicht aus, daß eine geringe Population von Chlorophyll-Triplets aufgebaut werden kann.

Die Untersuchungen mit optischer Verzögerung (siehe Kap. 3.4.3. auf S. 77) führen zu dem Resultat, daß die Rate für den Triplett-Transfer von  $^3\text{Chl}$  zu  $\text{Car}$  in solubilisiertem LHCII sehr groß ist ( $k_{TT} \geq (0.5 \text{ ns})^{-1}$ ). Dieses Ergebnis folgte aus  $\Delta OD$ -Messungen bei 507 nm mit der relativ geringen Pump-Impuls-Intensität von  $10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ , bei der  $\Delta OD(675 \text{ nm}, 50 \text{ ns})$  nicht nachweisbar ist (siehe Abb. 37 auf S. 89) und wo die Karotinoid-Triplett-Besetzung etwa ein zehntel des bei maximaler Pump-Intensität bestimmten Wertes beträgt (siehe Abb. 26 auf S. 68). Bei hohen  $I_p$  ist mit einer geringen Wahrscheinlichkeit damit zu rechnen, daß der Triplett-Transfer von  $^3\text{Chl}$  zu  $\text{Car}$  dadurch behindert wird, daß Karotinoide bereits im Triplett-Zustand sind und deshalb die Energie der Chlorophyll-Triplets nicht aufnehmen können, sodaß ein bestimmter Anteil von Triplets zunächst bei  $^3\text{Chl}$  verbleibt bevor dieser zu  $\text{Car}$  transferiert wird. Daß dieser Anteil auch bei extrem hohen  $I_p$  so gering bleibt (wie die experimentellen Daten von  $\Delta OD(675 \text{ nm}, 50 \text{ ns})$  zeigen) ist ein erstaunliches Ergebnis und keineswegs ein Widerspruch zum schnellen Triplett-Transfer von  $^3\text{Chl}$  zu  $\text{Car}$ .

Die oben geäußerte Hypothese, daß Chlorophyll-Triplets für die schnelle Komponente in der Kinetik des Fluoreszenz-Quenching verantwortlich sind führt auf folgende Gleichung für  $Q_{tot}$  (siehe Kap. 3.5.3. auf S. 86):

$$Q_{tot}(t) = \frac{k_q^{3\text{Car}}}{k} \cdot \left[ x_T^{\text{Car}}(t) + \frac{k_q^{3\text{Chl}}}{k_q^{3\text{Car}}} \cdot x_T^{\text{Chl}}(t) \right] \quad (\text{T23})$$

wobei  $k_q^{3\text{Car}}$  und  $k_q^{3\text{Chl}}$  die Ratenkonstanten für das Quenching der Test-Fluoreszenz bezeichnen. Die relative Besetzung von Karotinoid-Triplets,  $x_T^{\text{Car}}$ , kann aus  $\Delta OD/OD_0$  bei 507 nm als Funktion der Pump-Impuls-Intensität berechnet werden.

Es gilt demnach näherungsweise:  $x_T^{\text{Car}}(I_p) \approx \frac{\Delta OD(507 \text{ nm}, I_p)}{OD_0(507 \text{ nm})}$  (siehe Kap. 3.3.2.1.

auf S. 69 sowie Angang A4 auf S. 106)

Die relative Besetzung von Chlorophyll-Triplets,  $x_T^{\text{Chl}}$ , kann nur für die Pump-Intensität  $6 \cdot 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  abgeschätzt werden, bei der die Relaxationskinetik von  $\Delta OD$  bei 675 nm bestimmt wurde (siehe Anhang A5 auf S. 107). Es ergibt sich:

$$x_T^{\text{Chl}}(50 \text{ ns}, I_p = 6 \cdot 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}) \approx 0.015 \pm 0.005.$$

### 3.5.6. Bestimmung der Ratenkonstanten für die Löschung der Fluoreszenz durch Triplets in solubilisiertem LHCII

#### 3.5.6.1. Karotinoid-Triplett-induziertes Fluoreszenz-Quenching bei geringen Pump-Intensitäten

Die Übereinstimmung der Karotinoid-Triplett-Relaxation mit der Kinetik von  $Q_{tot}(t)$  bei geringen Pump-Intensitäten führte zu der Hypothese, daß für  $I_p \leq 10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  die Population  $Q_{tot}$  ausschließlich den Karotinoid-Triplets zugeordnet werden kann (siehe S. 87).

Der Vergleich von Gl. (T21) von S. 87 mit Gl. (T22) von S. 87 liefert:

$$\frac{F(t \geq 50 \text{ ns}, I_p \leq 10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}})}{F_0} = \frac{1}{1 + \frac{k_q^{3Car}}{k} \cdot x_T^{Car}(t, I_p)} \quad (\text{T24})$$

Hierbei ist  $F(t \geq 50 \text{ ns}, I_p)/F_0$  die experimentell bestimmte Pump-Impuls-induzierte Abnahme der Test-Fluoreszenz (siehe Abb. 34 und 35 auf S. 85, 86). Die relative Karotinoid-Triplett-Besetzung,  $x_T^{Car}$ , geht ebenfalls aus experimentellen Daten hervor (siehe Kap. 3.3.2.1. auf S. 69 sowie Angang A4 auf S. 106). Die reziproke Lebensdauer  $k = \tau^{-1}$  ist  $(4.3 \text{ ns})^{-1}$  in solubilisiertem LHCII. Demzufolge ist die Quenching-Rate  $k_q^{3Car}$  die einzige unbekannte Größe in Gl. (T24). Letztere wurde variiert, um die Daten von  $F(t = 50 \text{ ns}, I_p)/F_0$  (siehe Abb. 34 auf S. 85) bestmöglich

durch  $\frac{1}{1 + \frac{k_q^{3Car}}{k} \cdot x_T^{Car}(t = 50 \text{ ns}, I_p)}$  anzupassen. Das Ergebnis dieser Prozedur lautet:

$k_q^{3Car}/k = 7 \pm 2$  und ist in Abb. 39 dargestellt.

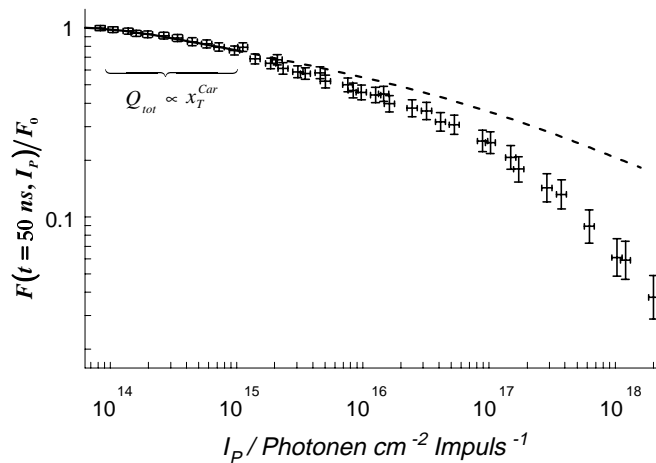


Abbildung 39

Experimentelle Daten für die Pump-Impuls-induzierte Abnahme der Test-Fluoreszenz (Kreuze) und Anpassung der Daten für  $I_p \leq 10^{15} \text{ Photon cm}^{-2} \text{ Impuls}^{-1}$  durch Gl. (T24) mit  $k_q^{3Car}/k = 7$ .

Die Anpassung im Bereich geringer Pump-Intensitäten ist sehr gut. Die Abweichung bei höheren Pump-Impuls-Intensitäten ist auf die Bildung einer zusätzlichen Quencher-Population zurückzuführen, die durch Gl. (T24) nicht berücksichtigt wird. Diese wurde in Kap. 3.5.5. (siehe S. 91) einer geringen Population von Chlorophyll-Triplets zugeordnet. Im folgenden Kapitel soll die Rate  $k_q^{3Chl}$  für das Quenching der Test-Fluoreszenz durch  $^3Chl$  bestimmt werden.

### 3.5.6.2. Chlorophyll-Triplett-induziertes Fluoreszenz-Quenching

Die kurzen Zeitkonstanten von  $\Delta OD$  bei 675 nm ( $0.9 \mu s$ ) und  $Q_{tot}(t)$  bei höheren Pump-Impuls-Intensitäten ( $\geq 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ ) stimmen nahezu überein. Daraus wurde geschlußfolgert, daß beide Ergebnisse auf die Bildung von Chlorophyll-Triplets zurückzuführen sind (siehe Kap. 3.5.5.). Diese konnte nicht als Funktion der Pump-Impuls-Intensität bestimmt werden, da  $\Delta OD$  bei 675 nm auch Beiträge von Karotinoid-Triplets beinhaltet ( $7 \mu s$ -Komponente in Abb. 38 auf S. 90) und eine Messung der Relaxationskinetik von  $\Delta OD$  bei 675 nm für  $I_p < 6 \cdot 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  nicht möglich war (siehe Kap. 3.5.4. auf S. 89). Deshalb soll die Berechnung des Fluoreszenz-Quenching durch Chlorophyll-Triplets in solubilisiertem LHCII nur aus den Daten bei der Pump-Intensität  $I_p = 6 \cdot 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ .

Die Einbeziehung von Chlorophyll-Triplets in das Quenching der Test-Fluoreszenz führt über Gl. (T21) von S. 87 und Gl. (T23) von S. 92 zu folgender Gleichung für das Verhältnis der Quenching-Raten von Chlorophyll-Triplets zu der Karotinoid-Triplets:

$$\frac{k_q^{3Chl}}{k_q^{3Car}} = \frac{\left( \frac{F_0}{F(t, I_p)} - 1 \right) \cdot \frac{k}{k_q^{3Car}} - x_T^{Car}}{x_T^{Chl}} \quad (T25)$$

$I_p = 6 \cdot 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}; \quad t = 50 \text{ ns}$

Alle auf der rechten Seite von Gl. (T25) stehenden Größen sind bekannt:  $x_T^{Car}$  folgt aus  $\Delta OD/OD_0$  bei 507 nm (siehe Kap. 3.3.2.1. auf S. 69). Für die relative Besetzung von Chlorophyll-Triplets ergab sich:  $x_T^{Chl}(t = 50 \text{ ns}, I_p = 6 \cdot 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}) \approx 0.015 \pm 0.005$  (siehe Kap. 3.5.5. auf S. 91). Das Verhältnis  $k_q^{3Car}/k = 7$  (siehe Kap. 3.5.6.1. auf S. 93) ergibt  $k/k_q^{3Car} = 0.15$ .  $F_0/F(t = 50 \text{ ns}, I_p)$  folgt aus den Daten von Abb. 34 (siehe S. 85). Aus Gl. (T25) kann also das Verhältnisses  $k_q^{3Chl}/k_q^{3Car}$  berechnet werden. Es ergibt sich der folgende Wert (zur Interpretation siehe Kap. 3.5.7.):  $k_q^{3Chl}/k_q^{3Car} = 100 \pm 40$

Der hier angegebene Fehler von  $\pm 40\%$  bezieht die Unsicherheit bei der Berechnung der Chlorophyll- und Karotinoid-Triplett-Besetzung mit ein.

### 3.5.7. **Schlußfolgerungen für die Funktionalität des LHCII**

Bei relativ geringen Pump-Impuls-Intensitäten von  $I_p \leq 10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  ist das Fluoreszenz-Quenching auf der  $\mu\text{s}$ -Zeitskala ausschließlich auf die Bildung von Karotinoid-Tripletts zurückzuführen. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Messungen an Chloroplasten (Breton et al., 1979) und impliziert, daß alle durch *intersystem crossing* aus angeregten Chlorophyll-Singulett gebildeten Chlorophyll-Tripletts sehr schnell und vollständig zur Bildung von Karotinoid-Tripletts führen. Dies ist konsistent mit dem Ergebnis von Peterman et al. (1995), daß der Triplett-Transfer in LHCII eine Ausbeute von nahezu 100 % besitzt und mit dem Ergebnis der Untersuchungen dieser Arbeit (siehe Kap. 3.4. auf S. 73), welches besagt, daß die Rate für den Triplett-Transfer in LHCII extrem groß ist, d.h.  $k_{TT} \geq (500 \text{ ps})^{-1}$ .

Die quantitative Analyse der Ergebnisse der Messungen der Test-Fluoreszenz-Löschung erlaubte die Abschätzung der Quenching-Rate  $k_q^{3Car}$ . Demnach reduziert sich die Lebensdauer von angeregten Chlorophyll-Singulett durch die Anwesenheit von Karotinoid-Tripletts deutlich ( $k_q^{3Car}/k = 7 \pm 2$ ). Karotinoid-Tripletts sorgen also nicht nur für die Vernichtung von Chlorophyll-Tripletts (und so für den Schutz vor Singulett-Sauerstoff), sondern tragen auch dazu bei, daß überschüssige angeregte Chlorophyll-Singulett strahlungslos vernichtet werden.

Bei hohen Pump-Impuls-Intensitäten tritt eine zusätzliche Quencher-Population in Erscheinung. Diese ist höchstwahrscheinlich eine sehr geringe Population von Chlorophyll-Tripletts,  $^3\text{Chl}$ , zurückzuführen, die ein starkes Fluoreszenz-Quenching aufweist. Die Lebensdauer dieser  $^3\text{Chl}$ -Population ist mit ca.  $1 \mu\text{s}$  mehr als zwei Größenordnungen kleiner als  $^3\text{Chl}$  in Lösung (siehe Chibisov, 1969, Mathis and Setif, 1981, Durrant et al., 1990) oder wie man es von Protein-gebundenen Chlorophyllen, die vom Triplett-Transfer ausgeschlossen sind, erwarten würde (siehe Breton et al., 1979). Die relative Besetzung von Chlorophyll-Tripletts bleibt jedoch auch bei maximal verwendeter Pump-Impuls-Intensität sehr gering. Da letztere jedoch hauptverantwortlich für das Quenching der Test-Fluoreszenz bei hohen Pump-Intensitäten sind, ergibt sich aus der quantitativen Analyse der experimentellen Daten eine um etwa zwei Größenordnungen höhere Rate für das Fluoreszenz-Quenching durch Chlorophyll-Tripletts verglichen mit dem Quenching durch Karotinoid-Tripletts:  $k_q^{3Chl}/k_q^{3Car} = 100 \pm 40$ . Dies entspricht der Idee von Breton et al. (1979) für Chloroplasten. Es wurde allerdings kein Wert für  $k_q^{3Chl}/k_q^{3Car}$  berechnet. Untersuchungen an Photosynthesebakterien (Monger und Parson, 1976)

ergaben einen Wert von etwa 4 für das Verhältnis  $k_q^{3Chl} / k_q^{3Car}$ . Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß es bei den hier zitierten Untersuchungen im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit nicht möglich war, das Quenching der Test-Fluoreszenz durch Triplets zu einem Zeitpunkt  $t$  zu untersuchen, wo  $Q_{tot}(t)$  noch nicht relaxiert ist (in dieser Arbeit:  $t = 50$  ns; Breton et al., 1979:  $t = 4$   $\mu$ s; Monger und Parson, 1976:  $t = 2$   $\mu$ s).

Abschließend sei bemerkt, daß die Ergebnisse der Untersuchungen zur Wechselwirkung von Singulets mit Triplets sehr hilfreich für die Bewertung von Messungen an Reaktionszentren des PSII sind. Die dort beobachteten transienten Änderungen der Fluoreszenzausbeute geben Aufschluß über die ablaufenden Redox-Reaktionen (siehe Reifarth et al., 1997; Christen et al., 1998). Dabei spielen sowohl die zu untersuchende Reduktion von P680\*\* als auch die Relaxation von Karotinoid-Triplets eine entscheidende Rolle.

## Zusammenfassung

---

Das Anliegen dieser Arbeit bestand darin, die Kinetik von elektronischen Singulett- und Triplett-Anregungen innerhalb des solubilisierten Lichtsammelkomplexes des Photosystem II (LHCII) zu untersuchen.

Die Untersuchungen gliedern sich in die folgenden drei Teilkomplexe:

Klärung der Frage, in welchem Maß die gegenseitige Wechselwirkung zwischen angeregten Singulett-Zuständen (Singulett) zu deren Vernichtung führt. Um dies zu analysieren, wurden Messungen zur nichtlinearen Fluoreszenz von LHCII in einem großen Bereich der Anregungsimpuls-Intensität durchgeführt (siehe unten). Dazu war es notwendig, eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt, die von der Probe ausgesandte Fluoreszenz räumlich zu selektieren.

Untersuchung der Kinetik der Karotinoid-Triplett-Bildung in LHCII. Dazu wurde ein Meßaufbau für Pump-Test-Messungen der nichtlinearen Transmission mit optischer Zeitverzögerung zwischen Pump- und Test-Impuls realisiert. Dabei galt es, ein besonderes Augenmerk auf die Vermeidung von Meß-Artefakten zu legen und so dafür zu sorgen, daß Effekte, die nicht auf einer absorptionsbedingten Transmissionsänderung der Probe beruhen, keinen Einfluß auf das Meßsignal besitzen.

Untersuchung der Wechselwirkung von Singulett mit langlebigen Triplett anhand der Fluoreszenz des verzögerten Test-Impulses. Hier war wiederum die räumlich selektive Messung der Fluoreszenz von größter Bedeutung.

Die Ergebnisse der genannten Messungen sowie deren theoretische Aufarbeitung sind im folgenden zusammengefaßt:

### **1. Multiple Singulett-Anregungen im LHCII**

---

Um die Wechselwirkung zwischen angeregten Singulett-Zuständen innerhalb solubilisierter LHCII-Komplexe zu untersuchen, wurden Messungen der Fluoreszenz als Funktion der Anregungsimpuls-Intensität durchgeführt. Auf die Realisierung eines homogenen Anregungsgebietes wurde höchstes Augenmerk gerichtet. Dies wurde durch die räumliche Selektion eines (kleinen) Teilbereichs innerhalb des angeregten Probengebiets realisiert, in dem die Anregungsintensität lediglich um  $\pm 20\%$  variiert. Dadurch war es erstmalig möglich, intensitätsabhängige Messungen in einem sehr weiten Bereich der Anregungsintensität durchzuführen.

Die Fluoreszenzspektren von LHCII sind nahezu unbeeinflusst von der Anregungsintensität. Im Gegensatz dazu nimmt die normierte Fluoreszenzausbeute  $\Phi^{norm}(I_p)$



mit zunehmender Intensität drastisch ab. Meßergebnisse der normierten Fluoreszenzausbeute von solubilisiertem LHCII, die bei unterschiedlicher räumlicher Selektivität gemessen wurden, zeigen deutlich, daß die unter vollständiger räumlicher Selektierung gemessene Kurven (bei hohen Intensitäten) um Größenordnungen von den anderen abweicht. Ein derart drastischer Abfall der Fluoreszenzausbeute um ca. 4 Größenordnungen war vorher nie beobachtet worden. Dies entspricht einem sättigenden Verhalten der Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII (nur unwesentliche Zunahme für  $I_p > 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ ).

Messungen an Chl *a* in 80 % azetonischer Lösung wurden durchgeführt, um die Ergebnisse mit denen von solubilisiertem LHCII zu vergleichen. Die Kurvenform von  $\Phi^{norm}(I_p)$  stimmt in beiden Fällen nahezu überein. Zwischen beiden Verläufen existiert lediglich eine Verschiebung von ca. 1 - 1.5 Größenordnungen bezüglich der Anregungsintensität. Die Ergebnisse von Chl *a* in Lösung lassen sich in einem einfachen Ratengleichungssystem sehr gut durch eine drastische Entleerung der Grundzustandspopulation beschreiben.

Die Beschreibung der experimentellen Daten der intensitätsabhängigen Fluoreszenz von LHCII mußte von einer gegebenen Anzahl von Pigmenten,  $\mathfrak{N}$ , innerhalb der räumlichen begrenzten solubilierten Komplexe und deren destruktiv wechselwirkenden angeregten Zuständen ausgehen. Um dem gerecht zu werden, wurde das von Gülen et al. (1986) entwickelte Pauli-Master-Gleichungsmodell an die experimentellen Gegebenheiten angepaßt. Das daraus resultierende Modell ist numerisch für beliebige Impulsformen anwendbar. Damit war es möglich, die intensitätsabhängige Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII durch ein erweitertes auf Pauli-Master-Gleichungen basierendem Modell zu beschreiben.

Bei der Anpassung der intensitätsabhängigen Fluoreszenz von LHCII zeigte sich, daß die Form der berechneten Kurven fast ausschließlich durch den Parameter  $\gamma^*$  bestimmt wird, der die Wechselwirkung zwischen angeregten Singulett festlegt. Der sättigende Verlauf der Meßdaten wird nur für extrem große Werte von  $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$  erreicht. In diesem Fall besitzt die Zahl  $\mathfrak{N}$  der im Komplex enthaltenen Grundzustände keinen direkten Einfluß auf die berechnete Fluoreszenz.  $\mathfrak{N}$  hat lediglich im Produkt mit  $\sigma_{01}$  eine Bedeutung und bestimmt so die Position der berechneten Kurven bezüglich der Intensitätsachse. Die Anpassung der experimentellen Daten von solubilisiertem LHCII liefert somit einen Gesamtabsorptionsquerschnitt:  $\sigma_{01} \cdot \mathfrak{N} = (2.3 \pm 0.6) \cdot 10^{-15} \text{cm}^2$ . Zusammen mit dem aus der Kurvenform bestimmten Parameter  $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$  ist es damit möglich, den Verlauf der intensitätsabhängigen Fluoreszenz durch ein auf gegenseitiger Wechselwirkung zwischen angeregten Singulett- Zuständen basierendem Modell sehr gut zu beschreiben.

Das Ergebnis der extrem großen Annihilationsrate  $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$  bedeutet

anschaulich, daß  $i > 1$  elektronische Anregungszustände in einem Komplex mit  $\aleph$  Gesamtzuständen quasi-instantan vernichtet werden.

Andererseits wird gezeigt, daß ein Komplex mit  $k_{21} > (1 \text{ ps})^{-1}$  und  $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$  unter Wirkung eines ns-Impulses durch ein „Cluster“ mit  $\aleph = 1$  ersetzt werden kann, um die Meßdaten anzupassen. Absorbiert ein bereits angeregtes Cluster ein weiteres Photon, kommt es zur Besetzung des doppelt angeregten Zustandes, der sehr schnell relaxiert. Dieser Relaxationsprozeß beschreibt die effiziente Vernichtung von Mehrfachanregungen in solubilisierten LHCII Komplexen im Rahmen des „Cluster-Modells“.

Unter der Bedingung  $\langle i \cdot (i-1) \rangle \approx \langle i^2 \rangle$  läßt sich das Pauli-Master-Gleichungssystem für beliebige  $\aleph$  in ein Ratengleichungssystem umschreiben. In diesem Fall treten quadratische Glieder in Verbindung mit  $\gamma^*$  auf. Die Pauli-Master-Gleichungs-Analyse der Ergebnisse zur intensitätsabhängigen Fluoreszenz von solubilisiertem LHCII im Rahmen dieser Arbeit führt allerdings zu dem Schluß, daß die Wechselwirkung zwischen (einfach) angeregten Zuständen so schnell zu deren Vernichtung führt ( $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$ ), daß die mittlere Anzahl einfach angeregter Zustände im Komplex,  $\langle i \rangle$ , selbst bei extrem hohen Intensitäten sehr gering bleibt ( $\langle i \rangle < 2$ ). Die Bedingung  $\langle i \cdot (i-1) \rangle \approx \langle i^2 \rangle$  ist damit für solubilisiereten LHCII keineswegs erfüllt.

Die aus der Anpassung der intensitätsabhängigen Daten der LHCII-Fluoreszenz gewonnen Aussagen werden durch die Ergebnisse anderer Messungen gestützt. Nimmt man zum Beispiel einen kurzen (ps - bzw. sub-ps -) Impuls und  $\gamma^* > (1 \text{ ps})^{-1}$  an, so ergeben die Berechnungen auf der Grundlage von Pauli - Master Gleichungen die von Nordlund und Knox (1981) gefundene Unabhängigkeit der Fluoreszenz-abklingkinetik von der Intensität des Anregungsimpulses.

Aus den Untersuchungen lassen sich Rückschlüsse über den Transfer der Anregungsenergie innerhalb des LHCII-Komplexes ziehen. Dieser muß extrem schnell sein, um die quasi-instantane Vernichtung von Anregungszuständen zu ermöglichen. Es muß also gelten:  $k^{EET} > (1 \text{ ps})^{-1}$ , wobei  $k^{EET}$  die Rate für den Transfer der Anregungsenergie innerhalb des solubilisiereten LHCII-Komplexes symbolisiert. Aussagen über den Charakter des Energietransfers sind dabei allerdings nicht möglich.

## **2. Triplett-Zustände im LHCII**

Zur Charakterisierung von Triplett-Zuständen wurde ein Meßaufbau realisiert, der aus zwei selbständigen Lasersystemen besteht. Eine elektronische Zeitverzögerung erlaubte die Einstellung einer definierten Zeit zwischen Pump- und Test-Impuls.

Um Aussagen über Triplett-Absorptionsquerschnitte von Chl *a* und Chl *b* zu

gewinnen, wurden die entsprechenden  $\Delta OD$ -Spektren mit 50 ns Verzögerung gemessen. Die sich ergebenden T-S-Spektren von Chl *a* und Chl *b* in azetonischer Lösung spiegeln offensichtlich das spektrale Verhalten der Grundzustands-Absorption ( $OD_0$ ) wider. Sowohl für Chl *a* als auch für Chl *b* ist zu erkennen, daß das Absorptionsverhalten der entsprechenden Triplets bezüglich der Wellenlänge wie erwartet sehr unstrukturiert ist.

Die Form des T-S-Spektrums von solubilisiertem LHCII weist eine völlig andere spektrale Charakteristik auf. Das ausgeprägte Maximum bei ca. 507 nm ist auf die Absorption gebildeter Karotinoid-Triplets zurückzuführen. Bis auf das geringe Ausbleichen im  $Q_y$ -Bereich (um 675 nm) ist das Spektrum von LHCII typisch für ein T-S-Spektrum von Karotinoiden. Der Wert von  $\Delta OD$  bei 507 nm kann als Maß für die Besetzung von Karotinoid-Triplett-Zuständen ( ${}^3\text{Car}$ ) angesehen werden. Dies ermöglichte es, den Einfluß experimenteller Parameter auf die  ${}^3\text{Car}$ -Besetzung zu untersuchen.

Die Pump-Impuls-Intensität  $I_p$  übt keinen Einfluß auf den Relaxationsverlauf der Pump-Impuls-induzierten Karotinoid-Triplets,  ${}^3\text{Car}$ , aus. Dieses Ergebnis führt zu der Schlußfolgerung, daß es innerhalb der solubilierten LHCII Komplexe selbst bei extrem hohen Intensitäten keine destruktive Wechselwirkung zwischen Karotinoid-Triplets gibt. Die absolute Besetzung von  ${}^3\text{Car}$  steigt jedoch mit zunehmender Pump-Intensität drastisch an. Sogar bei extrem hohen Pump-Intensitäten ist keine Sättigung der Karotinoid-Triplett-Besetzung zu beobachten. Im Gegensatz zu dem sättigenden Verhalten der Pump-Fluoreszenz nimmt die Besetzung von Karotinoid-Triplets kontinuierlich zu. Es sind zwei Mechanismen denkbar, die zu einer vermehrten Bildung von  ${}^3\text{Car}$  bei hohen Intensitäten führen könnten: i) Möglicherweise gehen aus der paarweisen Auslöschung von angeregten Chlorophyll-Singulets (*singlet-singlet-annihilation*) Chlorophyll-Triplets hervor, die schließlich zur Bildung von  ${}^3\text{Car}$  führen. ii) Doppelt angeregte Chlorophyll-Singulets könnten zu einem gewissen Teil in einen Chlorophyll-Triplett-Zustand relaxieren und letztlich ebenfalls zur Besetzung von Karotinoid-Triplett-Zuständen beitragen.

Um die Bildung der  ${}^3\text{Car}$  Besetzung zeitlich aufzulösen, wurde ein Meßaufbau mit optischer Verzögerung zwischen Pump- und Test-Impuls realisiert. Als Modellsubstanz wurde Chl *b* in 80% azetonischer Lösung gewählt. Es wurden Messungen der Pump-Impuls-induzierten Absorptionsänderung bei 460 nm als Funktion der Verzögerungszeit zwischen Pump- und Test-Impuls durchgeführt. Die zeitliche Entwicklung der angeregten Singulett- und Triplett-Zustände bestimmt gemeinsam die beobachtete Entleerung von Chl *b* Grundzuständen und entspricht damit im wesentlichen einer zeitlichen Integration über den Pump-Impuls. In solubilisiertem LHCII spiegelt die zeitliche Änderung der Absorption bei 507 nm die Kinetik der Karotinoid-Triplett-Bildung wider. Bei der Modellierung der Daten wurde die Rate

$k_{TT}$  für den Triplett-Transfer von  $^3\text{Chl}$  nach Car variiert. Die beste Anpassung ergibt den Grenzfall  $k_{TT} \rightarrow \infty$ . Als untere Grenze kann im Rahmen der Meßgenauigkeit ein Wert von  $k_{TT} \geq (0.5 \text{ ns})^{-1}$  angegeben werden. Dieser Wert ist mehr als eine Größenordnung größer, als der noch vor kurzer Zeit akzeptierte Wert von Kramer und Mathis (1980). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Wechselwirkung zwischen Chlorophyllen und Karotinoiden in LHCII wesentlich stärker ist, als bisher angenommen wurde.

### 3. Singulett-Triplett-Wechselwirkung

Um die Wechselwirkung der gebildeten Triplets (sowohl  $^3\text{Car}$  als auch  $^3\text{Chl}$ ) mit angeregten Singulets in solubilisiertem LHCII zu untersuchen, wurde die Fluoreszenz des zeitlich verzögerten Test-Impulses gemessen. Die Anwesenheit der Pump-Impuls-induzierten Triplets führt zu einer Fluoreszenz-Löschung. Dabei wurde ein neuer Weg beschritten, um die Fluoreszenz-Löschung im Zusammenhang mit zeitabhängigen Absorptionsänderungen zu analysieren. Anstelle eines zeitlich und spektral breiten Blitzlampen-Test-Impulses wurde ein zeitlich definierter und spektral schmaler ns-Laser-Impuls verwendet. Die Messung der Test-Fluoreszenz erfolgte in einem Probengebiet, in dem die Pump-Intensität nur sehr gering variierte. Um dies zu erreichen, wurde wiederum eine räumliche Selektion des zu untersuchenden fluoreszierenden Probenbereiches (siehe oben) durchgeführt. Das Verhältnis der relativen Ausbeute der normierten Test-Fluoreszenz,  $F(I_p)/F_0$ , wurde bei konstanter Verzögerungszeit von ca. 50 ns als Funktion der Pump-Impuls-Intensität bestimmt. Die Test-Fluoreszenz nimmt drastisch ab und erreicht bei hohen Intensitäten wenige Prozent des Ausgangswertes. Das Zurückkehren von  $F(I_p, t \geq 50 \text{ ns})$  zum Ausgangswert  $F_0$  wurde als Funktion der Verzögerungszeit bei verschiedenen Pump-Intensitäten gemessen. Da diese Daten nicht durch Beiträge der Pump-Fluoreszenz verfälscht sind, konnten sie mit Hilfe der Stern-Volmer Gleichung direkt zur Berechnung der quencheden Populationen benutzt werden. Die Relaxation der „totalen Quencher-Konzentration“  $Q_{tot}(t)$  kann für Pump-Impuls-Intensitäten von bis zu  $10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  sehr gut durch eine mono-exponentielle Anpassung beschrieben werden, die nahezu identisch ist mit der Relaxationskinetik von Karotinoid-Triplets ( $\tau_1 \cong 7.1 \mu\text{s}$ ). Daraus kann geschlußfolgert werden, daß  $Q_{tot}$  bei vergleichsweise geringen Pump-Impuls-Intensitäten ausschließlich den Karotinoid-Triplets zugeordnet werden kann. Dies erlaubt die Berechnung der entsprechenden Quenching-Rate,  $k_q^{3\text{Car}}$ , durch die Anpassung der experimentellen Daten von  $F(I_p, t = 50 \text{ ns})/F_0$  im Bereich geringer Pump-Intensitäten. Eine sehr gute Anpassung ergibt sich für  $k_q^{3\text{Car}}/k = 7 \pm 2$ , wobei  $k$  die reziproke Lebensdauer (einfach) angeregter Singulett-Zustände in

Abwesenheit von Triplets ist.

Bei hohen Pump-Impuls-Intensitäten ( $I_p \geq 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ ) wurde in  $Q_{tot}(t)$  eine zusätzliche und wesentlich kürzere zeitliche Komponente ( $\tau_2 \cong 1.1 \mu\text{s}$ ) beobachtet, deren Amplitude mit steigender  $I_p$  deutlich zunimmt. Zur Identifikation dieses zusätzlichen Quenchers, wurden  $\Delta OD$ -Experimente bei 675 nm durchgeführt. Die Kinetik von  $\Delta OD$  bei 675 nm bei  $I_p = 6 \cdot 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  läßt sich durch die Summe zweier exponentieller Abklingkomponenten beschreiben: Es dominiert eine Komponente mit ca.  $0.9 \mu\text{s}$  gegenüber einer mit ca.  $7.1 \mu\text{s}$ .

Der Vergleich der Werte der kurzen Zeitkonstanten von  $\Delta OD$  bei 675 nm ( $0.9 \mu\text{s}$ ) und  $Q_{tot}(t)$  ( $1.1 \mu\text{s}$ ) legt nahe, daß beide Ergebnisse auf die Bildung von Chlorophyll-Triplets bei hohen Intensitäten zurückzuführen sind. Ausgehend von dieser Hypothese läßt sich die Konstante  $k_q^{3Chl}$  für das Quenching der Fluoreszenz durch Chlorophyll-Triplets in LHCII berechnen. Es ergibt sich ein sehr großer Wert von  $k_q^{3Chl} / k_q^{3Car} = 100 \pm 40$ .

Als Schlußfolgerung der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Aussagen ergibt sich eine Erweiterung des Spektrums der Erkenntnisse zur Struktur-Funktions-Beziehung im Lichtsammelkomplex des Photosystem II höherer Pflanzen (LHCII). Dies betrifft zum einen die Konsequenzen aus den Untersuchungen zur nichtlinearen Fluoreszenz, die ergeben, daß die absorbierte Lichtenergie extrem schnell innerhalb der LHCII Komplexe transferiert wird. Zum anderen verdeutlichen die Ergebnisse der Untersuchungen zum Triplett-Transfer und zur Fluoreszenz-Löschung wie wirksam Karotinoide beim Schutz vor dem toxischen Singulett-Sauerstoff agieren. Einige wichtige biologisch relevante Fragen konnten so physikalisch verstanden werden.

## Anhang

### A1 Berechnung eines effektiven (molekularen) Absorptionsquerschnittes von Chl *a* in LHCII bei 645 nm

Im folgenden sei von dem Bild ausgegangen, daß das Verhalten des LHCII durch einen sehr schnellen und 100 % effektiven (inkohärenten) Transfer der Anregungsenergie von Chl *b* nach Chl *a* geprägt ist. Damit erzeugen im Chl *b* Bereich absorbierte Photonen letztlich angeregte Chl *a* (Singulett-) Zustände. Dieses Bild wird anschaulich durch die Tatsache, daß die Fluoreszenz des LHCII ausschließlich im Spektralbereich der Chl *a* - Fluoreszenz emittiert wird und das selbst bei sehr hohen Anregungs-Impuls-Intensitäten keine Chl *b* - Fluoreszenz zu beobachten ist. Chl *b* trägt so zur Erzeugung fluoreszierender Chl *a*-Singulett- und damit zur Entleerung von Chl *a*-Grundzuständen bei. Dabei kann man davon ausgehen, daß bei Raumtemperatur alle Chl *a*-Moleküle zur Fluoreszenz beitragen.

Entsprechend diesen Voraussetzungen ist die Definition eines effektiven (molekularen) Absorptionsquerschnittes von Chl *a* in LHCII möglich:

$$\sigma_{\text{eff}}^{\text{Chl } a} = \frac{\alpha}{N^{\text{Chl } a}} \quad (\text{A1})$$

Hierbei ist  $\alpha$  der experimentell bestimmbare Absorptionskoeffizient (es gilt:  $\alpha \cdot d = OD \cdot \ln(10)$ ;  $d$ : Dicke,  $OD$ : optische Dichte der Probe).  $N^{\text{Chl } a}$  ist die (makroskopische) Konzentration von Chl *a* (in  $\text{cm}^{-3}$ ). Diese ergibt sich aus der Chl - Gesamtkonzentration ( $C_{\text{Chl}} = 0.2 \text{ mg/ml}$ ), dem Chl *a/b* Verhältnis (1.35; siehe Kap. 1.2.2. auf S. 17) sowie der molaren Masse,  $M_{\text{Chl } a}$ , von Chl *a* ( $M_{\text{Chl } a} = 893.5 \text{ g/mol}$ ) und der Avogadroschen Zahl ( $N_A \cong 6.02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ):

$$N^{\text{Chl } a} = \frac{N_A \cdot c_{\text{Chl}} / (1 + \frac{1}{1.35})}{M_{\text{Chl } a}} = 7.7 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-3}.$$

Bei 645 nm beträgt die optische Dichte des verwendeten solubilisierten LHCII 0.44 (bei  $d = 0.1 \text{ cm}$ ). Gl. (A1) ergibt somit:  $\sigma_{\text{eff}}^{\text{Chl } a} (645 \text{ nm}) = 1.32 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$ .

## A2 Berücksichtigung des zeitlichen Anregungsverlaufes bei der Berechnung von $\Delta OD$

Bei den folgenden Berechnungen wird der durch die optische Weglänge hervorgerufene Zeitunterschied innerhalb der Probe vernachlässigt. Dies ist durch die Tatsache gerechtfertigt, daß die bei den Messungen verwendete Impulsdauer von ca. 2 ns wesentlich größer ist, als die Zeit für den Durchgang des Lichtes durch die Probe (ca. 3 ps bei 1 mm Meßküvette).

### a) keine Verzögerung zwischen Pump- und Test-Impuls

In diesem Fall (bzw. bei Einstrahlexperimenten) ergibt zeitlich integrale Intensität am Meßdetektor:

$$I_T^{Me\beta} = \int i_T(t') dt' = \int T(t') \cdot i_0(t') dt' = \int \exp[-\alpha(t') \cdot d] \cdot i_0(t') dt' \quad (A2)$$

Dabei ist  $i_T(t')$  die zeitabhängige transmittierte Intensität,  $i_0(t')$  die ungeschwächte Intensität vor der Probe,  $T(t')$  die zeitabhängige Transmission und  $d$  die Dicke der Probe. Der zeitabhängige Absorptionskoeffizient  $\alpha(t')$  kann als Summe  $\alpha(t') = \alpha_0 + \Delta\alpha(t')$  geschrieben werden. Damit ergibt sich für die Transmission:

$$\frac{I_T^{Me\beta}}{I_0} = T^{Me\beta} = \underbrace{\exp[-\alpha_0 \cdot d]}_{T_0} \cdot \int \exp[-\Delta\alpha(t') \cdot d] \cdot \Gamma(t') dt'$$

wobei  $\Gamma(t)$  den auf 1 normierten zeitliche Verlauf des Anregungsimpulses darstellt

$$(\Gamma(t) = \frac{1}{\Delta \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{t^2}{2\Delta^2}} \text{ mit } \Delta = 1.1 \text{ ns; siehe Gl. (E2) (S. 20) ).}$$

Daraus erhält man die integrale Änderung der optischen Dichte:

$$\Delta OD^{Me\beta} = -\lg \left[ \frac{T^{Me\beta}}{T_0} \right] = -\lg \left[ \int \exp[-\Delta\alpha(t') \cdot d] \cdot \Gamma(t') dt' \right] \quad (A3)$$

wobei  $\frac{T^{Me\beta}}{T_0}$  die direkt aus der Messung gewonnene intensitätsabhängige relative Transmission ist.

### b) Verzögerung zwischen Pump- und Test-Impuls

In diesem Fall ist der Test-Impuls um die Zeit  $t$  bezüglich des Pump-Impulses verzögert und es gilt:  $\Gamma^{test}(t') = \Gamma^{pump}(t' - t)$ . Analog zum obigen Fall (siehe Gl. (A2))

$$\text{erhält man: } \frac{I_T^{test}(t)}{I_0^{test}} = \int T(t') \cdot \Gamma(t' - t) dt',$$

wobei die zeitabhängige Transmission gegeben ist durch:  $T(t') = \exp[-\alpha(t') \cdot d]$ .

Es ergibt sich:

$$\Delta OD^{Me\beta}(t) = -\lg\left[\int \exp[-\Delta\alpha(t') \cdot d] \cdot \Gamma(t-t') dt'\right] \quad (\text{A4})$$

### **A3 Berücksichtigung der Abnahme der Pump-Intensität innerhalb der Probe bei Messungen von $\Delta OD$ als Funktion von $I_p$**

Die Änderung der optischen Dichte des untersuchten solubilisierten LHCII hängt von der Pump-Impuls-Intensität  $I_p$  ab. Letztere wird jedoch beim Durchgang durch die Probe geschwächt und erreicht letztlich den durch die Proben-Transmission  $T$  gegebenen Bruchteil des ungeschwächten Wertes (hier:  $T \cong 0.36$  bei  $\lambda_p = 645$  nm).

Die den Meßdaten entsprechende mittlere Änderung der optischen Dichte ist durch folgenden Ausdruck gegeben:

$$\overline{\Delta OD} = \frac{1}{(1-T) \cdot I_p} \cdot \int_{T \cdot I_p}^{I_p} \Delta OD(I'_p) \cdot dI'_p \quad (\text{A5})$$

wobei  $I'_p$  die abnehmende Pump-Intensität entlang des optischen Weges innerhalb der Probe darstellt. Der Ausdruck für die im Integral von Gl. (A5) stehende ungemittelte Änderung der optischen Dichte als Funktion der Pump-Intensität läßt sich über die Ableitung von Gl. (A5) gewinnen:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dI_p} \overline{\Delta OD}(I_p) &= \frac{1}{1-T} \cdot \frac{d}{dI_p} \left[ \frac{1}{I_p} \cdot \int_{T \cdot I_p}^{I_p} \Delta OD(I'_p) \cdot dI'_p \right] \\ &= \frac{1}{1-T} \cdot \left\{ -\frac{1}{I_p^2} \cdot \int_{T \cdot I_p}^{I_p} \Delta OD(I'_p) \cdot dI'_p + \frac{1}{I_p} \cdot \frac{d}{dI_p} \left[ \int_{T \cdot I_p}^{I_p} \Delta OD(I'_p) \cdot dI'_p \right] \right\} \\ &= \frac{1}{I_p} \cdot \left\{ -\overline{\Delta OD}(I_p) + \frac{1}{1-T} \cdot [\Delta OD(I_p) - T \cdot \Delta OD(T \cdot I_p)] \right\} \end{aligned}$$

Daraus erhält man:

$$\Delta OD(I_p) = T \cdot \Delta OD(T \cdot I_p) + (1-T) \cdot \left[ I_p \cdot \frac{d}{dI_p} \overline{\Delta OD}(I_p) + \overline{\Delta OD}(I_p) \right] \quad (\text{A6})$$

Gl. (A6) ermöglicht die schrittweise Berechnung von  $\Delta OD(I_p)$  aus den experimentellen Daten  $\overline{\Delta OD}(I_p)$ . In einem ersten Schritt wurde eine kontinuierliche Funktion von  $\overline{\Delta OD}(I_p)$  aus den Datenpunkten erzeugt. Für die nachfolgende Berechnung von  $\Delta OD(I_p)$  aus  $\Delta OD(0.36 \cdot I_p)$  wurde ein Startwert angesetzt. Dieser läßt sich im Bereich geringer Pump-Intensitäten leicht aus  $\overline{\Delta OD}(I_p)$  und  $\overline{\Delta OD}(0.36 \cdot I_p)$  abschätzen.



#### A4 Abschätzung der relativen Karotinoid-Triplett-Besetzung in solubilisiertem LHClI aus $\Delta OD$ bei 507 nm

Bei der Verzögerungszeit von 50 ns sind alle durch den Pump-Impuls erzeugten angeregten Chlorophyll-Singulets abgebaut. Deshalb kann jede Änderung des Absorptionskoeffizienten  $\alpha$  bei 507 nm auf die Besetzung von Triplett-Zuständen zurückgeführt werden. Die Tatsache, daß die Kinetik des Abklingens von  $\Delta OD$  bei 507 nm nicht von der Pump-Intensität abhängt, führt zu der Schlußfolgerung, daß dabei lediglich Karotinoid-Triplets eine Rolle spielen.

Auf dieser Annahme basierend ergibt sich der Absorptionskoeffizient  $\alpha$  bei 507 nm:  $\alpha = \sigma_0^{Car} \cdot (N^{Car} - n_T^{Car}) + \sigma_T^{Car} \cdot n_T^{Car} + \sigma_0^{Chl} \cdot N^{Chl}$ , wobei  $\sigma_0^{Car}$  und  $\sigma_T^{Car}$  die Absorptionsquerschnitte des Grund- und Triplett-Zustandes der Karotinoide sind.  $n_T^{Car}$  ist die Konzentration von Karotinoid-Triplets,  $N^{Car}$  und  $N^{Chl}$  sind die Gesamtkonzentrationen von Karotinoiden und Chlorophyllen und  $\sigma_0^{Chl}$  ist der Absorptionsquerschnitt des Chlorophyll-Grundzustands, der im Produkt  $\sigma_0^{Chl} \cdot N^{Chl}$  einen konstanten Beitrag zu  $\alpha$  bei 507 nm liefert.

Der lineare Absorptionskoeffizient ist gegeben durch:  $\alpha_0 = \sigma_0^{Car} \cdot N^{Car} + \sigma_0^{Chl} \cdot N^{Chl}$ .

Deshalb ergibt sich mit  $\Delta\alpha = \alpha - \alpha_0$ : 
$$\frac{\Delta\alpha}{\alpha_0} = \frac{n_T^{Car} \cdot (\sigma_T^{Car} - \sigma_0^{Car})}{N^{Car} \cdot \sigma_0^{Car} + \sigma_0^{Chl} \cdot N^{Chl}}$$

Nach Siefermann – Harms (1985) ist das Verhältnis  $\frac{\sigma_0^{Chl} \cdot N^{Chl}}{\sigma_0^{Car} \cdot N^{Car}}$  ungefähr  $\frac{1}{3}$  bei 507 nm. Damit ergibt sich::

$$\frac{\Delta OD}{OD_0} = \frac{\Delta\alpha}{\alpha_0} \approx \frac{3}{4} \cdot x_T^{Car} \cdot \left( \frac{\sigma_T^{Car}}{\sigma_0^{Car}} - 1 \right) \quad (A7)$$

wobei  $x_T^{Car}$  die relative Besetzung von Karotinoid-Triplets  $n_T^{Car}/N^{Car}$  darstellt. Aus Abb. 26 (S. 68) folgt, daß es unmöglich ist, die Besetzung von Karotinoid-Triplets zu sättigen. Das heißt, selbst bei extrem hohen Pump-Intensitäten gilt:  $x_T^{Car} < 1$ .

Deshalb liefert Gl. (A7) folgende Ungleichung: 
$$x_T^{Car} = \frac{\Delta OD}{OD_0} \cdot \frac{1}{\frac{3}{4} \cdot \left( \frac{\sigma_T^{Car}}{\sigma_0^{Car}} - 1 \right)} < 1.$$

Bei  $I_p = 10^{18} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  ergibt sich aus den experimentellen Daten:  $\Delta OD/OD_0 \approx 0.4$ . Daraus folgt:  $\sigma_T^{Car}/\sigma_0^{Car} > 0.5$ . Nimmt man eine relative Karotinoid Population von 0.5 an (bei  $I_p = 10^{18} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ ) so ergibt sich für das Verhältnis der Absorptionsquerschnitte:  $\sigma_T^{Car}/\sigma_0^{Car} \approx 3$ . Eine Verringerung von  $\sigma_T^{Car}/\sigma_0^{Car}$  auf den Wert 2.33 ( $\cong \frac{4}{3} + 1$ ) hat nur eine geringfügige Auswirkung auf  $x_T^{Car}$  ( $0.5 \rightarrow 0.4$  bei

$I_p = 10^{18} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$ ). Man erhält in diesem Fall aus Gl. (A7) die einfache Beziehung:

$$x_T^{Car}(I_p) \approx \frac{\Delta OD(507 \text{ nm}, I_p)}{OD_0(507 \text{ nm})} \quad (\text{A8})$$

für die relative Besetzung von Karotinoid-Tripletts als Funktion der Pump-Impuls-Intensität.

#### **A5 Abschätzung der relativen Chlorophyll-Triplett-Besetzung in solubilisiertem LHCII aus $\Delta OD$ bei 675 nm**

Im Gegensatz zum blauen/grünen Spektralbereich zeigen Karotinoide keine Absorption im roten Bereich der  $Q_y$ -Bande und deshalb bei 675 nm (siehe Siefermann – Harms, 1985). In diesem Fall ist der Absorptionskoeffizient,  $\alpha$ , gegeben durch:  $\alpha = \sigma_0^{Chl} \cdot (N^{Chl} - n_T^{Chl}) + \sigma_T^{Chl} \cdot n_T^{Chl}$ , wobei  $\sigma_0^{Chl}$  und  $\sigma_T^{Chl}$  die Chlorophyll-Absorptionsquerschnitte des Grund- und Triplett-Zustandes darstellen.  $N^{Chl} - n_T^{Chl}$  ist die makroskopische Konzentration verbleibender Chlorophyll-Grundzustände, wobei  $n_T^{Chl}$  für die Population von Chlorophyll-Tripletts steht. Die relative Änderung der optischen Dichte bei 675 nm durch die Besetzung von Chlorophyll-Tripletts ergibt sich analog zu obiger Betrachtung für Karotinoid-Tripletts (siehe Anhang A4):

$$\frac{\Delta OD}{OD_0} = x_T^{Chl} \cdot \left( \frac{\sigma_T^{Chl}}{\sigma_0^{Chl}} - 1 \right) \Bigg|_{675 \text{ nm}} \quad (\text{A9})$$

Bei der Pump-Impuls-Intensität von  $I_p = 6 \cdot 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  ist die Amplitude der schnellen  $\Delta OD$ -Komponente, die auf die Bildung von  $^3\text{Chl}$  zurückgeführt wurde, etwa 0.5 (siehe Abb. 38 auf S. 90). Demzufolge sind bei der genannten Pump-Impuls-Intensität Chlorophyll-Tripletts etwa für die Hälfte der mit 50 ns Verzögerung gemessenen relativen Änderung der optischen Dichte bei 675 nm verantwortlich (vergleiche Abb. 37 auf S. 89):  $\Delta OD/OD_0 \approx -0.01$ .

Für das Verhältnis  $\sigma_T^{Chl}/\sigma_0^{Chl}$  soll näherungsweise der Wert für Chl *a* in azetonischer Lösung im  $Q_y$  Absorptionsmaximum verwendet werden: Das ergibt (siehe Abb. 22A auf S. 64):  $\sigma_T^{Chl}/\sigma_0^{Chl} = 0.15$ . Setzt man diesen Wert und  $\Delta OD/OD_0 \approx -0.01$  in Gl. (A9) ein, so ergibt sich für die relative Besetzung von Chlorophyll-Tripletts in solubilisiertem LHCII:

$$x_T^{Chl} \left( 50 \text{ ns}, I_p = 6 \cdot 10^{17} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}} \right) \approx 0.015 \pm 0.005.$$

## A6 Die zeitliche Entwicklung von Singulett- und Triplett- Zuständen von Chl *b* in Lösung

Abb. 40 zeigt die zeitliche Besetzung von Singulett- und Triplett-Zuständen von Chl *b* in Lösung. Diese wurden mit Gl. (T12) und den Parametern von Abb. 30 berechnet (S.75). Die gestrichelte Linie zeigt die gespiegelte Anpassung an die Meßdaten von  $\Delta OD$  bei 460 nm (siehe Abb. 30 auf S. 75). Diese ist qualitativ in guter Übereinstimmung mit der Kurve, die die Summe aus Singulett- und Triplett-Besetzungen darstellt. Grund dafür ist die Tatsache, daß die abgeschätzten Absorptionsquerschnitte  $\sigma_1$  und  $\sigma_T$  bei 460 nm (siehe S.75) wesentlich kleiner sind als  $\sigma_0$ . Deshalb gilt näherungsweise:  $\Delta\alpha \approx -\sigma_0 \cdot (n_1 + n_T)$  (siehe Gl. (T11)).

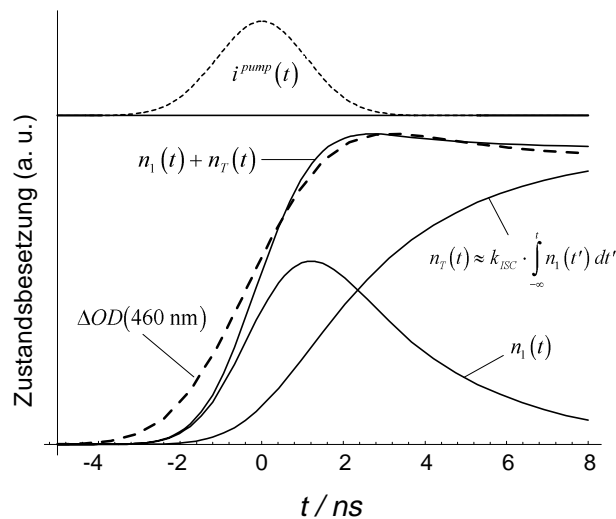


Abbildung 40

Die zeitliche Entwicklung der Besetzung von Singulett-Zuständen,  $n_1(t)$ , und Triplett-Zuständen,  $n_T(t)$ , von Chl *b* in Lösung (durchgezogene Linien). Die gestrichelte Linie stellt die Anpassung an die Meßkurve von  $\Delta OD$  bei 460 nm dar. Die gepunktete Linie zeigt den zeitlichen Verlauf des Pump-Impulses (für weiteres siehe Text).

Der Hauptunterschied zwischen der berechneten Kurve  $n_1 + n_T$  und der gemessenen  $\Delta OD$  bei 460 nm wird dadurch hervorgerufen, daß der Test-Impuls zu einer zeitlichen Mittelung führt und damit ein leichtes Abflachen der gemessenen Kurve verursacht (dieser Effekt wird bei der Anpassung in Abb. 30 auf S. 75 durch Verwendung von Gl. (T13) berücksichtigt).

Bemerkung:

Die Besetzung von Chl *b* Triplets kann näherungsweise beschrieben werden durch:

$$n_T(t) = k_{ISC} \cdot \int_{-\infty}^t n_1(t') dt' \quad (\text{A10})$$

Dies folgt direkt aus Gl. (T12) (siehe S. 76), wenn man  $k_T = 0$  setzt. Letzteres ist möglich, da die Relaxation von Chl *b* Triplets auf einer ms- Zeitskala abläuft.

### A7 Der Einfluß der Karotinoid-Grundzustandsabsorption im LHCII bei 507 nm

Betrachtet man den Grenzfall geringer Pump-Intensitäten, so ergeben sich die folgenden Ratengleichungen für die Besetzungszahldichten der Singulets von Car ( $n_1^{Car}$ ) und Chl ( $n_1^{Chl}$ ):

$$\frac{d}{dt} n_1^{Chl} = i^{pump}(t) \cdot \sigma_0^{Chl} \cdot N^{Chl} - n_1^{Chl} \cdot k^{Chl} + k_{ss} \cdot n_1^{Car} \quad (A11a)$$

$$\frac{d}{dt} n_1^{Car} = i^{pump}(t) \cdot \sigma_0^{Car} \cdot N^{Car} - n_1^{Car} \cdot k^{Car} - k_{ss} \cdot n_1^{Car} \quad (A11b)$$

wobei  $k_{ss}$  für die Rate des (ultra-schnellen) Singulett-Singulett-Transfer steht, der die Energie der gebildeten (angeregten) Karotinoid-Singulets mit nahezu 100% iger Effizienz zu den Chlorophyllen weiterleitet (Peterman et al., 1997b).  $k^{Chl}$  ist die Rate für die Relaxation von Chlorophyll-Singulets. Die Rate  $k^{Car}$ , die die Relaxation von Karotinoid-Singulets beschreibt, kann wegen des ultra-schnellen Singulett-Singulett-Transfers vernachlässigt werden. Letzterer führt darüber hinaus dazu, daß  $n_1^{Car}$  im gesamten Zeitbereich nahezu Null bleibt. Deshalb ergibt die zeitliche Ableitung von  $n_1^{Car}$  und damit Gl. (A11a) ebenfalls Null. Gl. (A11a) lautet dann:

$$\frac{d}{dt} n_1^{Chl} = i^{pump}(t) \cdot \left[ \underbrace{\sigma_0^{Chl} \cdot N^{Chl} + \sigma_0^{Car} \cdot N^{Car}}_{\text{linearer Absorptionkoeffizient } \alpha_0} \right] - n_1^{Chl} \cdot k^{Chl}.$$

### A8 Einfluß der Pump-Impuls Intensität auf den Zeitverlauf der (angeregten) Chlorophyll-Singulett-Zustände

Die Sättigung der Fluoreszenz in solubilisierten LHCII Komplexen läßt sich quantitativ am einfachsten durch ein Ratengleichungsmodell beschreiben, das von einem Gesamtabsorptionsquerschnitt,  $\sigma_0^{Komplex}$ , ausgeht (siehe Kapitel 2.2.5.2. auf S. 46). Im Zusammenhang mit dieser Beschreibungsweise wird die Absorption von mehr als einem Photon pro Komplex als Anregungszustandsabsorption (des Komplexes) angesehen. Folglich wird die Abnahme der Fluoreszenzausbeute durch eine Entleerung von (Komplex-) Grundzuständen hervorgerufen. Da die gebildeten höheren Anregungszustände des Komplexes sehr schnell relaxieren lautet die kinetische Gleichung für die Besetzung von (einfach angeregten) Singulett-Zuständen:

$$\frac{d}{dt} n_1^{Komplex} = i^{pump}(t) \cdot \sigma_0^{Komplex} \cdot (N^{Komplex} - n_1^{Komplex}) - n_1^{Komplex} \cdot k \quad (A12)$$

$n_1^{Komplex} / N^{Komplex}$  bestimmt den Anteil von Komplexen, die bereits angeregt wurden.  $k$  ist die reziproke Lebensdauer von einfach angeregten Singulett-Zuständen ( $(4.3 \text{ ns})^{-1}$ ).  $\sigma_0^{komplex}$  ist in der Größenordnung von ca.  $10^{-15} \text{ cm}^2$  bei 507 nm

(vergleichbare Absorption bei 507 und 645 nm, siehe auch Kapitel 2.2.5.2.).

Abb. 41 zeigt den Einfluß der Pump-Impuls-Intensität auf den nach Gl. (A12) berechneten zeitlichen Verlauf der Besetzung von  $n_1^{Komplex}$ .

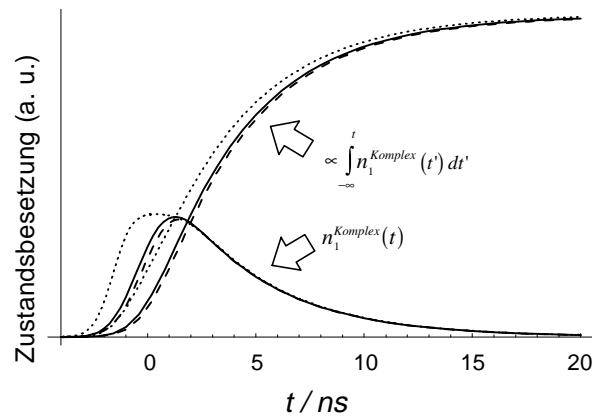


Abbildung 41

Einfluß der Pump-Impuls-Intensität auf den zeitlichen Verlauf der Besetzung von Chlorophyll-Singulets sowie des Integrales in solubilisierem LHCII entsprechend Gl. (A12).

Die gestrichelte Linie stellt die Grenze bei niedrigen Pump-Intensitäten dar.

Die durchgezogene Linie entspricht der Intensität, bei der die Messungen von  $\Delta OD$  bei 507 nm durchgeführt wurden ( $10^{15}$  Photonen  $\text{cm}^{-2}$  Impuls $^{-1}$ ).

Die gepunktete Kurve zeigt den Einfluß hoher Pump-Intensitäten ( $10^{16}$  Photonen  $\text{cm}^{-2}$  Impuls $^{-1}$ ).

Der Aufbau der Karotinoid-Triplett-Besetzung kann mit dem Integral über die angeregten Chlorophyll-Singulets identifiziert werden (siehe Anhang A9 auf S. 110). Deshalb sind in Abb. 41 zu den berechneten Besetzungen  $n_1^{Komplex}(t)$  auch die entsprechenden Integrale für die verschiedenen Intensitäten eingezeichnet.

Offensichtlich existiert bei  $10^{15} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  lediglich eine geringe Abweichung vom Verhalten bei geringen Intensitäten. Erst bei  $10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  sind die Abweichungen deutlich. Messungen von  $\Delta OD$ , die bei einer Pump-Intensität von  $10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ Impuls}}$  durchgeführt wurden, weisen tatsächlich den in Abb. 41 dargestellten berechneten Verlauf auf (Daten nicht gezeigt).

## A9 Illustration der zeitlichen Entwicklung von Triplett-Zuständen in solubilisierem LHCII

Abb. 42 zeigt sowohl die zeitliche Entwicklung von Karotinoid-Tripletts (durchgezogene Linien) als auch von Chlorophyll-Tripletts (gestrichelte Linien) die sich aus Gl. (T18) bei verschiedenen Ratenkonstanten,  $k_{TT}$ , für den Triplett-Transfer ergeben. Offensichtlich besteht im Fall  $k_{TT} \rightarrow \infty$  (Kurve "I" bei  $k_{TT} = (0.01 \text{ ns})^{-1}$ ) gute Übereinstimmung zwischen der berechneten Besetzung von Karotinoid-Tripletts und  $\Delta OD$  bei 507 nm (gepunktete Kurve). Die verbleibende Abweichung zwischen beiden Kurven ist auf die Tatsache zurückzuführen, daß der Test-Impuls eine zeitliche Breite besitzt. Dieser Effekt wurde bei der Anpassung der Daten in

Abb. 32 auf S. 81 durch Gl. (T13) berücksichtigt.

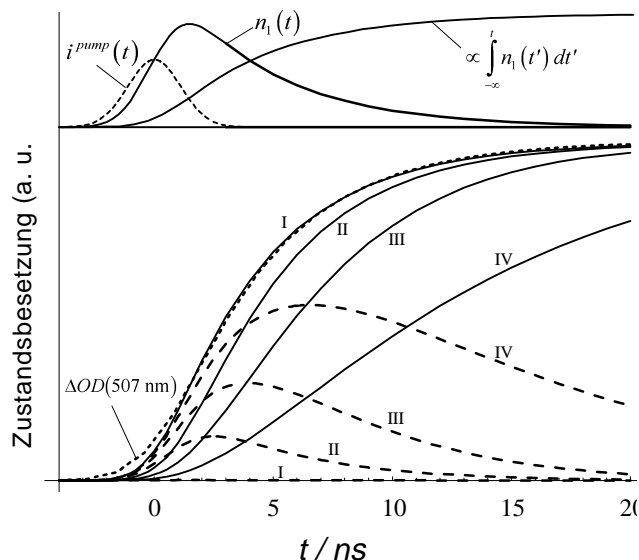


Abbildung 42

Zeitliche Entwicklung von Karotinoid-Triplets (durchgezogene Linien) und Chlorophyll-Triplets (gestrichelte Linien) in solubilisiertem LHCII bei verschiedenen Raten  $k_{TT}$ :

I:  $(0.01 \text{ ns})^{-1}$ , II:  $(1 \text{ ns})^{-1}$ , III:  $(3 \text{ ns})^{-1}$ , IV:  $(10 \text{ ns})^{-1}$ .

Die gepunktete Linie entspricht den gemessenen Daten von  $\Delta OD(t)$  bei 507 nm.

Die oberen Kurven stellen den Zeitverlauf der Anregungsimpulse sowie der entsprechenden Chlorophyll-Singulett-Besetzung dar.

Kurve "I" ist mit dem Integral  $\int_{-\infty}^t n_1(t') dt'$  in Übereinstimmung. Das bedeutet, daß

die Karotinoid-Triplett-Besetzung komplementär zum Abklingen der Chlorophyll-Singulett-Besetzung abläuft. Dies soll im folgenden illustriert werden:

Die Relaxationsterme über  $k_T^{Chl/Car}$  können in Gl. (T18) vernachlässigt werden (siehe S. 80), dann ergibt sich:

$$\frac{d}{dt} n_T^{Chl} = k_{ISC} \cdot n_1 - k_{TT} \cdot n_T^{Chl} \quad (\text{A13a})$$

$$\frac{d}{dt} n_T^{Car} = k_{TT} \cdot n_T^{Chl} \quad (\text{A13b})$$

Im Falle  $k_{TT} \rightarrow \infty$  bleibt die Chlorophyll-Triplett Besetzung,  $n_T^{Chl}(t)$ , aufgrund des schnellen Triplett-Transfers im gesamten Zeitbereich nahezu null (siehe Abb. 42). Deshalb verschwindet die zeitliche Ableitung von  $n_T^{Chl}(t)$  und Gl. (A13a) kann Null gesetzt werden.

Man erhält:  $n_T^{chl}(t) \cong \frac{k_{ISC}}{k_{TT}} \cdot n_1(t)$  und damit die Lösung von Gl. (A13):

$$n_T^{Car}(t) \cong k_{ISC} \cdot \int_{-\infty}^t n_1(t') dt' \quad (A14)$$

Es sei bemerkt, daß dieser für Karotinoid-Triplets erhaltene Ausdruck (Gl. (A14)) identisch ist mit dem der Triplet-Besetzung von Chl *b* in Lösung (siehe Gl. (A10) auf S. 108). Abb. 43 illustriert den Fall  $k_{TT} \rightarrow \infty$  unter Annahme eines 100 ps Pump-Impulses.

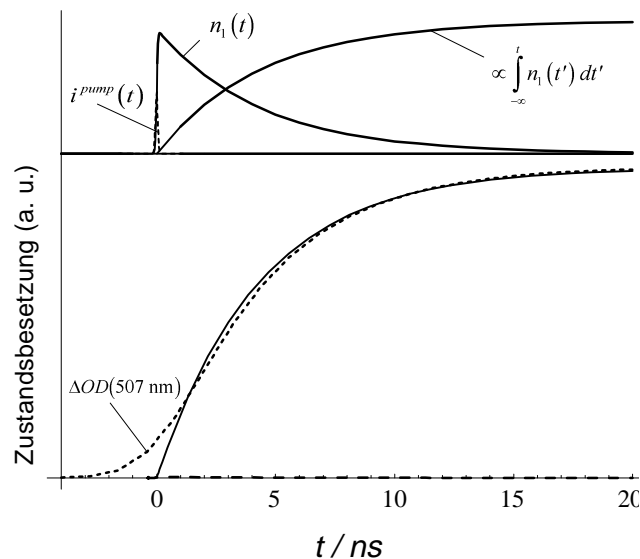


Abbildung 43

Zeitliche Entwicklung von Karotinoid-Triplets (durchgezogene Linien) für  $k_{TT} \rightarrow \infty$

( $k_{TT} = (0.01 \text{ ns})^{-1}$ ). Die gepunktete Linie entspricht den gemessenen Daten von  $\Delta OD(t)$  bei 507 nm. Die oberen Kurven stellen den Zeitverlauf des angenommenen  $\delta$ -Pump-Impulses sowie der entsprechenden Chlorophyll-Singulett-Besetzung dar.

Dem Verlauf der berechneten Karotinoid-Triplett-Besetzung (durchgezogene Linie) ist die gemessene Kurve für  $\Delta OD$  bei 507 nm (gepunktete Kurve) gegenübergestellt.

Wieder ist das Integral  $\int_{-\infty}^t n_1(t') dt'$  bestimmend für  $n_T^{Car}(t)$  (siehe oben) und unter-

scheidet sich daher nur gering vom Fall  $k_{TT} \rightarrow \infty$  in Abb. 42. Deshalb ist die zeitliche Auflösung bei Experimenten zum Triplet-Transfer in LHCII nur unwesentlich durch die verwendeten ns-Impulse (ca. 2 ns) reduziert. Experimente mit kürzeren Impulsen müßten auf der gleichen Zeitskala, wie die hier vorgestellten durchgeführt werden (bis 20 ns Verzögerung). Deshalb ist die Qualität der experimentellen Daten hauptsächlich durch die Güte der optischen Verzögerungsstrecke bestimmt.

## Literatur

---

- Bassi, R., P. Dainese. 1990. The role of light harvesting complex II and of the minor chlorophyll a/b proteins in the organization of the photosystem II antenna system. *Curr. Res. in Photosynth.* 2:209-216.
- Bassi, R., D. Sandona and R. Croce. 1997. Novel aspects of chlorophyll a/b binding proteins. *Physiol. Plant.* 100:769-779.
- Beddard, G. S., G. Porter, C. J. Tredwell, and J. Barber 1975. Fluorescence lifetimes in the photosynthetic unit. *Nature* 258:166-168.
- Berthold, D.A., G. T. Babcock and C. F. Yocum. 1981. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett.* 134:231-234.
- Bittner, T., K.-D. Irrgang, G. Renger and M. R. Wasilewski. 1994. Ultrafast excitation energy transfer and exciton-exciton annihilation processes in isolated light harvesting complexes of photosystem II (LHC II) from spinach. *J. Phys. Chem.* 98:11821-11826.
- Bowers, P. G., and G. Porter. 1967. Quantum yields of triplet formation in solutions of chlorophyll. *Proc. R. Soc. London.* A296:435-441.
- Breton, J., N. E. Geacintov, C.E. Swenberg. 1979. Quenching of fluorescence by triplet excited states in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 548:616-635.
- Breton, J. and N. E. Geacintov. 1980. Picosecond fluorescence kinetics and fast energy transfer processes in photosynthetic membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 594:1-32.
- Campillo, A. J., V.-H. Kollman, and S. L. Shapiro. 1976a. Intensity dependence of the fluorescence lifetime in vivo chlorophyll excited by a picosecond light pulse. *Science* 193:227-229.
- Campillo, A. J., S. L. Shapiro, V.-H. Kollman, K. R. Winn, and R. C. Hyer. 1976b. Picosecond excitation annihilation in photosynthetic systems. *Biophys. J.* 16:93-97.
- Chibisov, A.K. 1969. A flash photolysis study of intermediates in photochemical reactions of chlorophyll. *Photochem. Photobiol.* 10:331-347.
- Christen, G., F. Reifarth, G. Renger. 1998. On the origin of the '35- $\mu$ s kinetics' of P680<sup>+</sup> reduction in photosystem II with an intact water oxidizing complex. *FEBS Lett.* 429:49-52.
- Clayton, R. K. and W. R. Sistrom (eds.). 1983. *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum Press. New York.
- Connelly, J.P., M. Müller, M. Hucke, G. Gatzert, C.W. Mullineaux, A.V. Ruban, P. Horton and A.R. Holzwarth. 1997a. Ultrafast spectroscopy of trimeric Light-Harvesting Complex II from higher plants. *J. Phys. Chem. B.* 101:1902-1909.
- Connelly, P.P., M. G. Müller, R. Bassi, R. Croce, and A. R. Holzwarth. 1997b. Femtosecond transient absorption study of Carotenoid to chlorophyll energy transfer in the light-harvesting complex II of Photosystem II. *Biochemistry* 36:281-287.



- Demming-Adams, B., W. W. III Adams, B. A. Logan, A. S. Verhoevan. 1995. Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress. *Aust. J. Plant. Physiol.* 22:249-260.
- den Blanken, H. J., A. J. Hoff, A. P. J. M Jongenelis. and B. A. Diner 1983. High Resolution triplet-minus-singlet absorbance difference spectrum of Photosystem II particles. *FEBS Lett.* 157:21-27.
- Du, M., X. Xie, L. Mets and G. R. Fleming. 1994. Direct observation of ultrafast energy-transfer processes in light harvesting complex II. *J. Phys. Chem.* 98:4736-4741.
- Durrant, J. R., L. B. Giorgi, J. Barber, D. R. Klug and G. Porter. 1990. Characterization of triplet states in isolated photosystem II reaction centres : oxygen quenching as a mechanism of photodamage. *Biochim. Biophys. Acta* 1017:167-175.
- Emerson, R. and W. Arnold. 1932. *J. Gen. Physiol.* 16:191:205.
- Gantt, E. 1986. Phycobilisomes. In: *Encyclopedia of plant physiology, New Series.* Vol. 19 (Staehein, L. A. and C. J. Arntzen, eds.), pp.260-268, Springer, Berlin.
- Gaffron, H. and K. Wohl, 1936. *Naturwissenschaften* 24:81:90.
- Geacintov, N. E., C. E. Swenberg, A. J. Campillo, R. C. Hyer, S. L. Shapiro, and K. R. Winn. 1978. A picosecond pulse train study of exciton dynamics in photosynthetic membranes. *Biophys. J.* 24:347-359.
- Gülen, D., B. P. Wittmershaus and R. S. Knox. 1986. Theory of picosecond-laser-induced fluorescence from highly excited complexes with small numbers of chromophores. *Biophys. J.* 49:469-477.
- Foot, C. S. 1976. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: Consequences in biological systems. In: *Free Radicals in Biology* (W. A. Pryor, ed.), Vol. II, pp. 85-133. Academic Press, New York. ISBN 0-12-5601-6.
- Förster, Th. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. d. Physik* 6:55-75
- Frank, H. A., and R. Cogdell. 1996. Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63:257-264.
- Heinze, I., E. Pfündel, M. Hühn, H. Dau. 1997. Assembly of light harvesting complexes II (LHCII) in the absence of lutein. A study on the alpha-Carotenoid-free mutant C-2A'-34 of the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1320:188-194.
- Hemelrijk, P. W., S. L. Kwa, R. van Grondelle, J. P. Dekker. 1992. Spectroscopic properties of LHC-II, the main light-harvesting chlorophyll a/b protein complex from chloroplast membranes. *Biochim Biophys Acta* 1098:159-166.
- Hillmann, F. 1995. Experimentelle und theoretische Untersuchungen zur nichtlinearen Absorption von Bestandteilen des Photosyntheseapparates. Diplomarbeit. Eingereicht am Institut für Physik der Humboldt-Universität zu Berlin.
- Holzwarth, A. R. 1989. Applications of ultrafast laser spectroscopy for the study of biological systems. *Q. Rev. Biophys.* 22:239-295.
- Horton, P., A. V. Ruban, and R. G. Walters. 1996. Regulation of light harvesting in green plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:665-684.

- Irrgang, K.-D., E. J. Boekema, J. Vater and G. Renger. 1988. Structural determination of the photosystem II core complex from spinach. *Eur. J. Biochem.* 178:209-217.
- Irrgang, K.-D. 1999. Architecture of the thylakoid membrane. In: *Concepts in Photobiology and Photomorphogenesis*. G. S. Singhal, G. Renger, S. K. Sopory, K.-D. Irrgang and Govindjee (Eds). Narosa Publishing House. 1999. New Delhi, India.
- Kehrberg, G., J. Voigt, T. Schrötter, and G. Renger. 1995. Exciton equilibration in the light-harvesting complex of Photosystem II of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1231:147-156.
- Kolubajev, T., N. E. Geacintov, G. Paillotin, and J. Breton. 1985. Domain sizes in chloroplasts and chlorophyll-protein complexes probed by fluorescence yield quenching induced by singlet-triplet exciton annihilation. *Biochim. Biophys. Acta* 808:66-76.
- Koyama, Y., M. Kuki, P. O. Andersson, and T. Gillbro 1996. Singlet excited states and the light harvesting function of Carotenoids in bacterial photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63:243-256.
- Kramer, H. and P. Mathis. 1980. Quantum yield and rate of formation of the Carotenoid triplet state in photosynthetic structures. *Biochim. Biophys. Acta* 593:319-329.
- Kühlbrandt, W., D. N. Wang, and Y. Fujiyoshi. 1994. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367:614-621.
- Kwa, S. L. S., F. G. Groeneveld, J. P. Dekker, R. van Grondelle, H. van Amerongen, S. Lin, W. S. Struve. 1992. Steady-state and time-resolved polarized light spectroscopy of the green plant light-harvesting complex II. *Biochim. Biophys. Acta* 1101:143-146.
- Liu, B., A. Napiwotzki, H.-J. Eckert, H. J. Eichler, and G. Renger. 1993. Studies on the recombination kinetics of the radical pair P680+Pheo- in isolated PS II core complexes from spinach. *Biochim. Biophys. Acta* 1142:129-138.
- Lokstein, H., H. Härtel, P. Hoffmann, P. Woitke and G. Renger. 1994. The role of light-harvesting complex II in excess excitation energy dissipation: an in-vivo fluorescence study on the origin of high-energy quenching. *J. Photochem. Photobiol.* 26:175-184.
- Lokstein, H., D. Leupold, B. Voigt, F. Nowak, J. Ehlert, P. Hoffmann and G. Garab. 1995. Nonlinear Polarization Spectroscopy in the frequency domain of light-harvesting complex II: absorption band structure and exciton dynamics. *Biophys. J.* 69:1536-1543.
- Mathis, P. and G. Paillotin. 1981. Primary processes of photosynthesis. In: *The biochemistry of plants* (M.D. Hatch and N.K. Boorman eds.) pp. 97-161, Academic Press, New York.
- Mathis, P. and P. Setif. 1981. *Isr. J. Chem.* 21:316-320.
- Mauzerall, D. 1976a. Multiple excitations in photosynthetic systems. *Biophys. J.* 16:87-91.
- Mauzerall, D. 1976b. Fluorescence and multiple excitation in photosynthetic systems. *J. Phys. Chem.* 80:2306-2309.

- Mauzerall, D. 1978. Multiple excitations and the yield of chlorophyll a fluorescence in photosynthetic systems. *Photochem. Photobiol.* 28:991-998.
- Monger, T. G. and W. Parson. 1977. Singlet-triplet fusion in *Rhodospseudomonas sphaeroides* chromatophores. A probe of the organization of the photosynthetic apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 460:393-407.
- Mukamel, S. 1995. Principles of nonlinear optical spectroscopy. Oxford University press: New York 1995.
- Mukamel, S. and V. Rupasov. 1995. Energy transfer, spectral diffusion, and fluorescence of molecular aggregates: Brownian Oscillator Analysis. *Chem. Phys. Lett.* 242:17-26.
- Nechushtai, R., J. P. Thornber, L. K. Patterson, R. W. Fessenden, and H. Levanon. 1988. Photosensitization of triplet Carotenoid in photosynthetic light harvesting complex of photosystem II. *J. Phys. Chem.* 92:1165-1168
- Nordlund, T. M. and W. H. Knox. 1981. Lifetime of fluorescence from light harvesting chlorophyll a/b proteins excitation intensity dependence. *Biophys. J.* 38:193-201.
- Nussberger, S., J. P. Dekker, W. Kühlbrandt, B. M. van Bolhuis, R. van Grondelle and H. van Amerongen. 1994. Spectroscopic characterization of three different monomeric forms of the main chlorophyll a/b binding from chloroplast membranes. *Biochemistry* 33:14775-14783.
- Paillotin, G., C. E. Swenberg, J. Breton and N. E. Geacintov. 1979. Analysis of picosecond laser-induced fluorescence phenomena in photosynthetic membranes utilizing a master equation approach. *Biophys. J.* 25:513-534.
- Paillotin, G., N. E. Geacintov, and J. Breton. 1983a. Effect of spatial non-uniformity of illumination in non-linear intensity dependent photophysical experiments. Application to some fluorescence yield measurements in photosynthetic systems. *Photochem. Photobiol.* 37:475-478.
- Paillotin, G., N. E. Geacintov, and J. Breton. 1983b. A master equation theory of fluorescence induction, photochemical yield, and singlet-triplet exciton quenching in photosynthetic systems. *Biophys. J.* 44:65-77.
- Paschenko, V. Z., S. P. Protasov, A. B. Rubin, K. N. Timofeev, L. M. Zamazova, and L. B. Rubin. 1975. Probing the kinetics of photosystem I and photosystem II fluorescence in pea chloroplasts on a picosecond pulse fluorimeter. *Biochim. Biophys. Acta* 408:143-153.
- Peterman, E. J. G., F. M. Dukker, R. van Grondelle and H. van Amerongen. 1995. Chlorophyll a and Carotenoid states in light harvesting complex II of higher plants. *Biophys. J.* 69:2670-2678.
- Peterman, E. J. G., C. C. Gradinaru, F. Calkoen, J. C. Borst, R. van Grondelle. 1997a. Xanthophylls in light harvesting complex II of higher plants: Light harvesting and triplet quenching. *Biochemistry* 36:12208-12215.
- Peterman, E.J.G., R. Monshouwer, I.H.M. van Stokkum, R. van Grondelle, H. van Amerongen. 1997b. Ultrafast singlet excitation transfer from Carotenoids to chlorophylls via different pathways in light-harvesting complex II of higher plants. *Chem. Phys. Letters* 264:279-284.

- Pfarrherr, A., K. Teuchner, D. Leupold and P. Hoffmann. 1991. Chlorophyll b in solution: fluorescence lifetimes, absorption and emission spectra as criteria of purity. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 9:35-41.
- Porra, R. J., W. A. Thompson, and P. E. Kriedemann. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chl a and b extracted with for different solvents: Verification of the concentration of chl standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975:384-394.
- Reifarth, F., G. Christen and G. Renger. 1997. Fluometric equipment for monitoring P680<sup>+</sup> reduction in PS II preparations and green leaves. *Phot. Res.* 51:231-242.
- Renger, G. 1992. Energy transfer and trapping in photosystem II. In: *Topics in Photosynthesis Vol.11: 45-99* (J. Barber ed.), Elsevier Amsterdam.
- Renger, G. 1999a. Photosysteme und Reaktionszentren. In: *Lehrbuch über Photosynthese* (H. Häder ed.). Thieme Verlag, in press.
- Renger, G. 1999b. Basic principles of photophysics and photochemistry. In: *Concepts in Photobiology and Photomorphogenesis*. G. S. Singhal, G Renger, S. K. Sopory, K.-D. Irrgang and Govindjee (Eds). Narosa Publishing House. 1999. New Delhi, India.
- Renger, T. and V. May. 1997. Theory of multiple exciton effects in the photosynthetic antenna complex LHCII. *J. Phys. Chem. B* 101:7232-7242.
- Renger, T. 1998. Theory of dissipative ultrafast exciton motion in photosynthetic antennae. Dissertation. Humboldt – Universität zu Berlin.
- Rubin, L. B., V. Z. Paschenko. 1986. Electron excitation energy distribution in the photosynthetic pigment apparatus of green plants. *Lasers in the Life Sciences* 1:171-192.
- Rückmann, I., A. Zeug, R. Herter and B. Röder. 1997. On the Influence of Higher Excited States on the ISC Quantum Yield of Octa-alkoxy-substituted Zn-Phthalocyanine Molecules Studied by Nonlinear Absorption. *Photochem. Photobiol.* 66:576-584.
- Schödel, R. 1993. Untersuchungen zur Intensitäts- und Wellenlängenabhängigkeit der nichtlinearen Fluoreszenz von Bestandteilen des Photosyntheseapparates. Diplomarbeit. . Humboldt - Universität zu Berlin, Institut für Physik.
- Schödel, R., J. Voigt, G. Kehrberg. 1994. Non-linear fluorescence yield of photosystem 2 subunits of higher plants. *Photosynthetica* 30:613-622.
- Schödel, R., F. Hillmann, T. Schrötter, K.-D. Irrgang, J. Voigt and G. Renger 1996. Kinetics of excited states of pigment clusters in solubilized light-harvesting complex II: Photon density-dependent fluorescence yield and transmittance. *Biophys. J.* 71:3370-3380
- Schödel, R., K.-D. Irrgang, J. Voigt and G. Renger. 1998. Rate of Carotenoid triplet formation in solubilized Light-Harvesting Complex II (LHCII) from spinach. *Biophys. J.* 75:3143-3153.
- Schödel, R., K.-D. Irrgang, J. Voigt and G. Renger. 1999. Quenching of chlorophyll fluorescence by triplets in solubilized Light-Harvesting Complex II (LHCII). *Biophys. J.* 76:2238-2248.
- Scholes, G. D., R. D. Harcourt and K. P. Ghiggino. 1994. *J. Chem. Phys.* 101:10521.

- Scholes, G. D., R. D. Harcourt and G. R. Fleming. 1997. Electronic interactions in photosynthetic light-harvesting complexes. The role of Carotenoids. *J. Phys. Chem. B.* 101:7302-7312.
- Siefermann-Harms, D. 1987. The light harvesting protective functions of Carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plantarum* 69:561-568.
- Schrötter, T., J. Voigt, G. Kehrberg. 1994. Equilibration of excitation energy in light-harvesting complex of photosystem 2 analysed by pump-probe experiments. *Photosynthetica* 30:603-612.
- Schrötter, T. Untersuchungen des Exzitonentransfers und der Exzitonverteilung in Pigment - Protein - Komplexen des Photosystem II mittels der nichtlinearen Laserspektroskopie. 1992. Diplomarbeit. Humboldt - Universität zu Berlin, Institut für Physik.
- Schubert, A., B. Voigt, D. Leupold, W. Beenken, J. Ehlert, P. Hoffmann, H. Lokstein. 1997. Direct observation of spectral substructure in the Qy-absorption band of light harvesting complex II by nonlinear polarization spectroscopy in the frequency domain at low temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 1321:195-199.
- Seibert, M. and R. R. Alfons. 1974. Probing photosynthesis on a picosecond time scale. *Biophys. J.* 14:269-283.
- Shepanski, J.F., D. J. Williams, and Y. Kalinsky. 1984. The triplet exciton of chlorophyll a and carotenoid in solution and in photosynthetic antenna proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 766:116-125.
- Siefermann-Harms, D. 1985. Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochim. Biophys. Acta* 811:325-355.
- Siefermann-Harms, D. 1987. The light harvesting protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* 69:561-568.
- Siefermann-Harms, D. and A. Angerhofer. 1995. An O<sub>2</sub>-barrier in the light-harvesting complex LHCII protects chlorophylls and Carotenoids from photooxidation. In: Mathis, P. (ed.) *Photosynthesis: From light to biosphere*, Vol IV, pp. 71-74. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Siefermann-Harms, D. and A. Angerhofer. 1998. Evidence for an O<sub>2</sub>-barrier in the light-harvesting chlorophyll-a/b-protein complex LHCII. *Photosynth. Res.* 55:83-94.
- Stiel, H., D. Leupold, K. Teuchner, F. Nowak, B. Ücker, H. Scheer, R. J. Cogdell. 1997. One- and two exciton bands in the LH2 antenna of *Rhodospseudomonas acidophila*. *Chem. Phys. Lett.* 276:62-69.
- Swenberg, C. E., N. E. Geacintov, and M. Pope. 1976. Bimolecular quenching of excitons and fluorescence in the photosynthetic unit. *Biophys. J.* 16:1447-1452.
- Thorner, J.P., D.T. Morishige, S. Anandan, and G.F. Peter. 1991. Chlorophyll Carotenoid proteins of higher plant thylakoids. In: H. Scheer (ed) *Chlorophylls*, pp. 549-1585. CRC Press. Boca Raton.
- Valkunas, L., G. Trinkunas, V. Liuolia, and R. van Grondelle. 1995. Nonlinear annihilation of excitations in Photosynthetic systems. *Biophys. J.* 69:1117-1129.

- van der Vos, R., D. Carbonera and A. J. Hoff 1991. Microwave and optical spectroscopy of Carotenoid triplets in light-harvesting complex LHCII of spinach by absorbance-detected magnetic resonance. *Appl. Magn. Res.* 2:179-202.
- van Grondelle, R., J. P. Dekker, T. Gillbro, and V. Sundstrom. 1994. Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1187:1-65.
- Vasil'ev, S., K.-D. Irrgang, T. Schrötter, A. Bergmann, H.-J. Eichler and G. Renger 1997a. Quenching of chlorophyll a fluorescence in the aggregates of LHCII: steady state fluorescence and picosecond relaxation kinetics. *Biochemistry* 36:7503-7512.
- Vasil'ev, S., T. Schrötter, A. Bergmann, K.-D. Irrgang, H.-J. Eichler, G. Renger. 1997b. Cryoprotectant-induced quenching of chlorophyll a fluorescence from LHCII in vitro: time-resolved fluorescence and steady state spectroscopic studies. *Photosynthetica* 33:553-561.
- Voigt, J., K. Maciy, T. Schrötter. 1994. Dynamic behaviour of excitons in light harvesting LHC2 complexes. *Photosynthetica* 30:567-574.
- Voigt, J., T. Renger, R. Schödel, T. Schrötter, J. Pieper, and H. Redlin. 1996. Excitonic effects in the light harvesting complex of higher plants. *Phys. Stat. Sol.(b)* 194:333.
- Völker, M. , T. A. Ono, Y. Inoue, and G. Renger. 1985. Effect of trypsin on PS II particles. Correlation between Hill-activity, Mn-abundance and peptide pattern. *Biochim. Biophys. Acta* 806:25-34.
- Wellburn, A. R. and H. Lichtenthaler. 1984. Formula and program to determine total Carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. In: *Advances in Photosynthesis Research* (Sybesma, C. ed) Vol. II, pp, 9-12, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ. The Hague/Bosten/Lancaster. The Netherlands.

## **Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit**

---

### **Bereits erschienene Arbeiten:**

---

Schödel, R., J. Voigt, G. Kehrberg. 1994. *Non-linear fluorescence yield of photosystem 2 subunits of higher plants*. Photosynthetica 30:613-622.

Schödel, R., K.-D. Irrgang, J. Voigt and G. Renger. 1995. *Normalized fluorescence yield as a function of laser pulse intensity in the light harvesting complex of photosystem II of higher plants and chlorophyll a in solution*. Proc. IX. Intern. Symposium, Ultrafast Processes in Spectroscopy, Trieste 1995.

Voigt, J., T. Renger, R. Schödel, T. Schrötter, J. Pieper, and H. Redlin. 1996. *Excitonic effects in the light harvesting complex of higher plants*. Phys. Stat. Sol.(b) 194:333.

Schödel, R., F. Hillmann, T. Schrötter, K.-D. Irrgang, J. Voigt and G. Renger. 1996. *Kinetics of excited states of pigment clusters in solubilized light-harvesting complex II: Photon density-dependent fluorescence yield and transmittance*. Biophys. J. 71:3370-3380.

Schödel, R., K.-D. Irrgang, J. Voigt and G. Renger. 1998. *Rate of Carotenoid triplet formation in solubilized Light harvesting complex II (LHCII) from spinach*. Biophys. J. 75:3143-3153.

Schödel, R., K.-D. Irrgang, J. Voigt and G. Renger. 1999. *Quenching of chlorophyll fluorescence by triplets in solubilized Light-Harvesting Complex II (LHCII)*. Biophys. J. 76:2238-2248.

### **In Vorbereitung:**

---

Schödel, R., K.-D. Irrgang, J. Voigt and G. Renger. 1999. *Singlet and Triplet Quenching Processes in solubilized LHCII - Theoretical description by Master Equations*.

## **! Danksagung !**

Ich danke Prof. Dr. Joachim Voigt für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut für Physik in der Arbeitsgruppe Molekulare Biophysik und Spektroskopie anfertigen zu können. Für die Betreuung, gemeinsame Diskussionen, aber auch für die mir gegebenen Freiräume sowie die Hilfe bei der Realisierung von eigenen Ideen, möchte ich Ihnen, Prof. Dr. Joachim Voigt, besonders herzlich danken.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Prof. Dr. Gernot Renger vom Max-Volmer Institut der Technischen Universität Berlin. Die Zusammenarbeit mit Ihnen war (und ist) von unschätzbarem Wert. Die vielen interessanten, für mich oft sehr lehrreichen und zum Teil auch kontroversen Diskussionen im Zusammenhang mit gemeinsamen Publikationen waren besonders ergiebig. Oft erhielt ich dadurch neue Denkanstöße, die ich gern in die Tat umsetzte, um das Machbare auszuschöpfen.

Ebenso möchte ich Dr. Klaus Irrgang vom Max-Volmer Institut der TU besonders herzlich danken. Zum einen betrifft dies die Sorgfalt bei der Bereitstellung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben. Zum anderen bedanke ich mich für die fruchtbare Kooperation im Zusammenhang mit gemeinsamen Publikationen und die Bereitschaft, mir die biochemischen Aspekte in Bezug auf den LHCII nahezubringen.

Die Arbeit an den hier vorgestellten Untersuchungen hat mir insgesamt viel Freude bereitet. Dazu hat nicht zuletzt die gute Atmosphäre und Kooperation innerhalb der Arbeitsgruppe beigetragen, bei der ich mich hiermit herzlich bedanken möchte.

Für die Erstellung von elektronischen Komponenten möchte ich Klaus Palis sowie Frank Hillmann herzlich danken. Mein Dank geht auch an unsere Sekretärin Frau Regine Reichmann sowie an die Zentralwerkstatt für die konstruktive Zusammenarbeit.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit währende finanzielle Unterstützung im Rahmen des Sonderforschungsbereiches Sfb 312.





## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht im Internet veröffentlicht.



## **Erklärung**

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 17. April 1999

