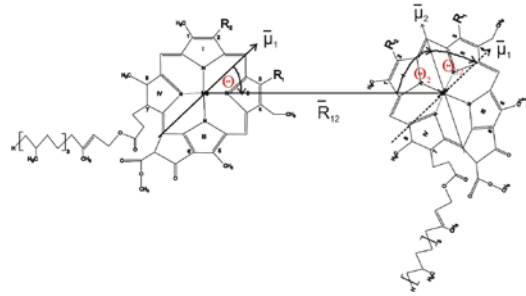




Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Institut für Physik

Praktikum Master Physik

Stand: 10/2020



M16: Anregungsenergie- und Elektronentransferprozesse in gekoppelten Molekülen

1. Aufgaben

1. Nehmen Sie das Absorptionsspektrometer, das Fluoreszenz-Spektrometer und den PML 16-C für zeitaufgelöste Einzelphotonendetektion (SPC) in Betrieb
 1. Wählen Sie die Messparameter geeignet
 2. Bilden Sie die Laserpulse mit Hilfe eines Streumediums ab und Kalibrieren Sie die Zeit- und Wellenlängenskalierung
 3. Messen Sie die Absorptions- und Fluoreszenzspektren von allen Proben (Phycobiliprotein (PBP)-Komplexe, Chlorophyllextrakt und lebende Algen)
2. Bestimmung der Dynamik von Laserpulsen und Anregungszuständen in Pigment-Protein-Komplexen mittels SPC
 1. Messen Sie die Instrumentenantwortfunktion (IRF)
 2. Extrahieren Sie aus einer selbst mitgebrachten photosynthetischen Probe (z.B. Blatt) mittels Ethanol Chlorophyll

3. Vermessen Sie eine Lösung von isolierten Phycobiliproteinkomplexen (PBP) sowie eine Suspension von ganzen Zellen von *Chlorella*.
 4. Bestimmen Sie die Halbwertsbreite (FWHM) der aufgenommenen Signale sowie das multiexponentielle Abklingverhalten der biologischen Proben durch einen Fit.
 5. Erstellen Sie zerfallsassoziierte Spektren (Decay Associated Spectra, DAS) für die biologischen Proben (Eigene Probe, PBP und *Chlorella*)
-
3. Rekonstruktion der Transfermatrix für Anregungsenergie- und Elektronentransferprozesse in *photosynthetischen organismen*
 1. Berechnen Sie mit Hilfe von Mathematica® eine Transfermatrix, die ihre gemessenen DAS für alle Proben qualitativ erklärt. Simulieren Sie die erwarteten zeitaufgelösten Spektren, die sich aus der vorgeschlagenen Transfermatrix ergeben.
 2. Berechnen Sie mit Hilfe der Theorie des Förster-Resonanz-Anregungsenergietransfers den Abstand zwischen Antennenkomplexen und Reaktionszentrum.
 3. Skizzieren Sie ein Schema der bedeutendsten Anregungsenergie- und Elektronentransferprozesse mit zugehörigen Zeitkonstanten für alle Proben (*Chlorella*, eigene Probe, PBP Komplexe, extrahiertes Chlorophyll)

Übergeordnete Aufgabenstellung:

Die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie ist eine geeignete Methode zur Untersuchung von Energie- und Elektronentransferprozessen. Dabei können durch die Farbverschiebung zwischen absorbierenden und emittierenden Molekülen die Wechselwirkung von Molekülen direkt sichtbar gemacht werden. Anwendung findet die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie zum Beispiel bei der Untersuchung von

molekularen Wechselwirkungen über die Theorie des Förster-resonanz-Energietransfers. Die Fluoreszenzmikroskopie bildet die Grundlage der Superresolution- Mikroskopie, für die Prof. Stefan Hell aus Göttingen 2014 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde.

Mittels der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie von Algen, die Lichtsammelsysteme aus Phycobiliproteinen oder Chlorophyllen enthalten und einer Spektroskopie der reinen Phycobiliprotein bzw. Chlorophyll-Lösungen sollen Anregungsenergietransferprozesse zwischen Phycobiliproteinen und Chlorophyll oder zwischen verschiedenartigen Chlorophyll-Molekülen beobachtet werden. Dazu sind zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren aufzunehmen und auszuwerten.

Die Messdaten sind dazu durch eine multiexponentielle Zerfallsfunktion zu approximieren. Die Zeitkonstanten sind durch Aufstellung eines geeigneten Ratengleichungssystems für die verschiedenen beteiligten Moleküle und Ihre Wechselwirkung zu berechnen. Aus diesem Ratengleichungssystem soll auch das multiexponentielle Abklingverhalten der Fluoreszenz simuliert werden. Die Messdaten sind in Form Decayassoziierter Spektren (DAS) darzustellen.

Die Genauigkeit der Messergebnisse ist durch eine geeignete Fehlerabschätzung zu bewerten.

Durch die Konstruktion eines geeigneten Modells gekoppelter linearer Differentialgleichungen 1. Ordnung kann die beobachtete Fluoreszenz nach einem Fit der Messdaten theoretisch simuliert werden. Die Ratenkonstanten für den Anregungsenergietransfer zum Chlorophyll, für die primäre Ladungstrennung am Chlorophyll und für die Rekombinationswahrscheinlichkeit sind durch Anpassung des Modells und der daraus simulierten zeitaufgelösten Fluoreszenz an die Messdaten zu bestimmen. Die Details dazu werden während des Versuchs besprochen.

2. Kontrollfragen

Wie funktioniert die Methode der Einzelphotonen-Spektroskopie (SPC)?

Was ist ein Pile up Effekt und wie vermeidet man ihn?

Warum müssen bei SPC wirklich einzelne Photonen gezählt werden?

Wie beeinflusst die zeitliche Breite der Laserpulse das Auflösungsvermögen der Apparatur?

Wie verhält sich mittlere Leistung, Pulsspitzenleistung, Pulsenergie und zeitlicher Abstand der Laserpulse bei den verwendeten Anregungslasern?

Wie funktioniert ein Diodenlaser?

Wie viele Zerfallskomponenten erwartet man für ein System aus n gekoppelten Zuständen?

Welche Dimension hat die Transfermatrix?

Mit welchen Methoden können Sie die Dimension der Transfermatrix reduzieren?

Welche Symmetrieeigenschaften der Transfermatrix kennen Sie?

Wie verhält sich das Signal-Rausch-Verhältnis bei SPC?

Welcher Zusatzannahmen muss man treffen, um aus der Transfermatrix zeitaufgelöste Spektren simulieren zu können?

Welcher Anteil des gesamten Messsignals steckt in einer einzelnen zeitlichen Komponente der DAS?

Welcher Zusammenhang besteht zwischen Abstand, Orientierung und Energietransfer beteiligter Pigmente beim Energietransfer nach der Theorie von Förster?

Leiten sie die Förster Formel unter vereinfachten Annahmen semiklassisch her.

3. Grundlagen

Die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie ist eine verbreitete Methode zur Analyse der Kopplung (Wechselwirkung) fluoreszierender Moleküle, beispielsweise bei Anregungsenergietransferprozessen zwischen Molekülen. Ziel ist die Anwendung und das grundlegende Verständnis der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung von Anregungsenergietransferprozessen in den Lichtsammelsystemen von photosynthetischen Organismen.

3.1. Einleitung

Nach Anregung einer Farbstoffprobe (z.B. Oxazine, Porphyrin, Chlorophyll) klingt die Fluoreszenz einer Lösung bei großer Verdünnung mit einer Zeitkonstanten von einigen 100 ps bis einigen ns monoexponentiell ab (z.B. 5 ns bei Chlorophyll). Werden der Probe Fluoreszenzquencher als Akzeptormoleküle mit hoher Konzentration zugesetzt, so kann es zum Anregungsenergietransfer von den ursprünglich vorhandenen Donormolekülen zu den Akzeptoren kommen. Die Effizienz dieses Transfers hängt stark von der Konzentration der beiden beteiligten Farbstoffe ab. Dies ist durch ein schnelles zeitliches Abklingen der Donorfluoreszenz und einen zeitlichen Anstieg der Akzeptorfluoreszenz nachweisbar bei Messungen mit hoher Zeitauflösung. Dazu werden die Donorpigmente durch kurze Laserpulse angeregt und mit einer zeitlichen Auflösung von einigen ps wird die Dynamik des nach Anregung auftretenden Fluoreszenzlichtes gemessen. Die Effizienz des Anregungsenergietransfers ist stark von den optischen Eigenschaften der beteiligten Pigmente, der Orientierung der Dipolmomente von Anregungszuständen, vom Abstand der beteiligten Pigmente und von den optischen Eigenschaften des Lösungsmittels abhängig.

Methodisch verbindet der Versuch zeitaufgelöste Lebensdauerermessung und die damit zusammenhängende elektronische Messtechnik mit den

Verfahren der optischen Spektroskopie und der grundlegenden Theorie des Anregungsenergietransfers zwischen Molekülen nach Förster.

Das Lösen von Systemen linearer Differentialgleichungen 1. Ordnung und der anschließende Vergleich mit der Theorie des Förster-Resonanz-Anregungsenergie-Transfers können in einem überschaubaren Rahmen das grundlegende Verständnis für die gemessenen zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren vermitteln. Angesichts der bis heute unvollständigen Form dieser Theorie auf der molekularen Ebene komplexer Makromoleküle sind in diesem Versuch keine festen Grenzen für eine theoretische Analyse gesetzt. Hier können Sie frei entscheiden, wie tief Sie in die Theorie einsteigen möchten.

3.2 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie:

Zur Untersuchung der Wechselwirkung von Licht und Materie wird die Absorption und Emission bestimmter Moleküle oder Atome gemessen. Aus den gewonnenen Spektren können Rückschlüsse über eine unbekannte Probe gezogen werden, beispielsweise über die innere Struktur und Zusammensetzung. Die Spektroskopie liefert Informationen über die elektronische Struktur der beteiligten Moleküle und Atome. Durch zeitaufgelöste Spektroskopie können auch dynamische Prozesse untersucht werden.

Die Fluoreszenzspektroskopie organischer Moleküle arbeitet hauptsächlich im sichtbaren Spektralbereich. Mit dieser Methode werden die Fluoreszenzeigenschaften von Fluorophoren ausgenutzt. Dabei unterscheidet man zwischen natürlichen und synthetischen Fluorophoren. Chlorophyll ist ein natürlich vorkommendes Fluorophor und befindet sich in höheren Pflanzen und zahlreichen Bakterien. Das Chlorophyllmolekül ist das Hauptpigment der Photosynthese. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie, insbesondere der zeitaufgelösten

Einzelphotonenfluoreszenzspektroskopie (SPC), können die primären Prozesse der Photosynthese analysiert werden.

Absorption und Emission

Durch Absorption elektromagnetischer Strahlung werden innerhalb von 10^{-15} s Moleküle in einen energetisch höheren Zustand gebracht. Die Absorption eines Photons kann zur Emission eines Fluoreszenzphotons führen, welches mit einer größeren Wellenlänge, also einer kleineren Energie abgestrahlt wird. Daher ist die Fluoreszenz im Gegensatz zur Absorption in den roten Wellenlängenbereich verschoben (Stokes shift). Bei Übergängen zwischen zwei Zuständen eines molekularen Systems wird bei Absorption oder Emission meist nur ein Lichtquant ausgetauscht. Das bedeutet, es können nur diejenigen Photonen übertragen werden, deren gesamte Energie nach der Bohrschen Frequenzbedingung genau der Energiedifferenz ΔE zwischen dem Grundzustand S_0 und dem angeregten Zustand entspricht:

$$\Delta E = h \cdot \nu$$

Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum und ν die Frequenz, die sich aus folgender elementarer Gleichung ergibt:

$$c = \lambda \cdot \nu$$

c ist die Lichtgeschwindigkeit und λ die Wellenlänge.

Demnach ist Fluoreszenz die spontane Emission von Licht aus einem optisch angeregten Niveau in einen energetisch tieferen Zustand. Beim Übergang entspricht die Wellenlänge λ der Energiedifferenz $\Delta E'$, gemäß:

$$\lambda = \frac{h \cdot c}{\Delta E'}$$

Die Dynamik der Fluoreszenz nach einem Anregungsblitz gehorcht dem exponentiellen Gesetz:

$$I(t) = I_0 \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right)$$

I_0 ist die Fluoreszenzintensität instantan nach dem Anregungsblitz und τ entspricht der Lebensdauer des angeregten Zustands.

Elektronenübergang eines Moleküls

Die meisten organischen Moleküle haben eine gerade Anzahl von Elektronen, deren Spins paarweise antiparallel ausgerichtet sind. Da Fluoreszenzübergänge spinerlaubt sein und der Auswahlregel $\Delta S = 0$ gehorchen müssen, sind Übergänge zwischen zwei Zuständen hinreichend wahrscheinlich. Nach Absorption kommt es im allgemeinen zu keiner Spinänderung. Die Spins sind antiparallel.

Ferner können Moleküle mit gerader Anzahl von Elektronen neben Singulettzuständen (S_1, S_2, \dots) auch Triplettzustände (T_1, T_2, \dots) haben. Bei einem Singulettzustand ist der Gesamtspin S null und die Multiplizität eins. Ein Triplettzustand dagegen hat einen Gesamtspin von eins und eine Multiplizität von drei. Die Multiplizität M ergibt sich aus [Mayer-Kuckuk, 1994]:

$$M = 2S + 1$$

Neben der Fluoreszenz (F) kann es allerdings auch zu strahlungslosen Prozessen kommen, beispielsweise Internal Conversion (IC). Darunter versteht man eine Schwingungsrelaxation (Wärmeentwicklung). Intersystem Crossing (ISC) ist eine weitere Möglichkeit für eine Relaxation. Dies ist ein strahlungsloser Übergang vom angeregten Singulettzustand in einen Triplettzustand. In diesem Fall (ISC) kommt es zu einer Spinumkehr und die Spins richten sich parallel aus. Strahlungslose Prozesse können durch sogenannte Quencher zusätzlich gefördert werden. Die unterschiedlichen Möglichkeiten der Relaxation können durch ein Jablonski Diagramm veranschaulicht werden (Fig. 1).

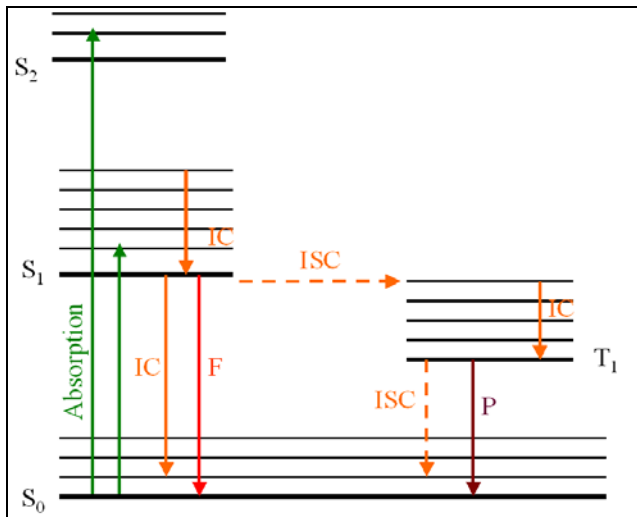


Fig. 1 vereinfachtes Jablonski Diagramm mit möglichen intramolekularen Elektronenübergängen

Die Phosphoreszenz (P) entsteht bei einem Übergang von einem energiereichen Triplettzustand in den Singulettzustand. Da hier eine erneute Spinumkehr nötig ist, ist die Lebensdauer der Triplettzustände viel größer als die der Singulettzustände. Die Phosphoreszenz klingt dadurch wesentlich langsamer ab, was das lange Nachleuchten phosphoreszierender Stoffe erklärt.

In welchen Schwingungszustand nun das einzelne Fluorophor relaxiert, beschreibt das Franck Condon Prinzip. Wird ein Elektron eines Moleküls angeregt, so ändert sich dadurch seine Potentialkurve. Das bedeutet, ein Übergang zweier Zustände wird durch einen Sprung zwischen zwei Potentialkurven dargestellt. Dabei erfolgt der Sprung fast senkrecht und am wahrscheinlichsten zwischen den Scheitelpunkten beider beteiligter Schwingungen, da dort quantenmechanisch betrachtet, die Maxima der Wellenfunktion liegen [Gerthsen, 1999].

Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein angeregter Zustand fluoresziert, wird Quantenausbeute genannt. Daher kann die Quantenausbeute höchstens 1 sein. Nach dem Jablonski Diagramm kann der angeregte Zustand über mehrere Kanäle zerfallen. Somit enthält die Ratengleichung für die

zeitliche Änderung des Erwartungswerts der Besetzung des angeregten Zustands $\langle S_1 \rangle$ mehrere Ratenkonstanten (k):

$$\frac{d\langle S_1 \rangle}{dt} = -(k_F + k_{IC} + k_{ISC}) \cdot \langle S_1 \rangle$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute Θ_F ist das Verhältnis der Fluoreszenzrate zur Summe der Raten aller möglichen Relaxationsprozesse.

$$\Theta_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \quad \text{mit} \quad k_F = \frac{1}{\tau_0}$$

τ_0 entspricht der natürlichen Lebensdauer beziehungsweise der Strahlungslebensdauer des Fluorophors. Diese natürliche Lebensdauer ist bei Chl a ca. 15 ns. Für die mittlere Fluoreszenzlebensdauer gilt dann:

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}}$$

und für die Fluoreszenzquantenausbeute:

$$\Theta_F = \frac{\tau}{\tau_0}$$

Sind die Farbstoffmoleküle isoliert, so klingt die Fluoreszenz, die proportional zu $\langle S_1 \rangle$ ist, nach einer e-Funktion ab:

$$\begin{aligned} \frac{d\langle S_1 \rangle}{dt} &= -(k_F + k_{IC} + k_{ISC}) \cdot \langle S_1 \rangle \\ \Rightarrow \langle S_1 \rangle(t) &= \langle S_1 \rangle(0) e^{-(k_F + k_{IC} + k_{ISC})t} \end{aligned}$$

Es ist zu beachten, dass der Fluoreszenzzerfall auch multiexponentiell abklingen kann. Sind fluoreszierende Zustände gekoppelt, z.B. in der Photosynthese, so muss das resultierende gekoppelte System durch ein System aus gekoppelten linearen Differentialgleichungen mit konstanten Koeffizienten beschrieben werden:

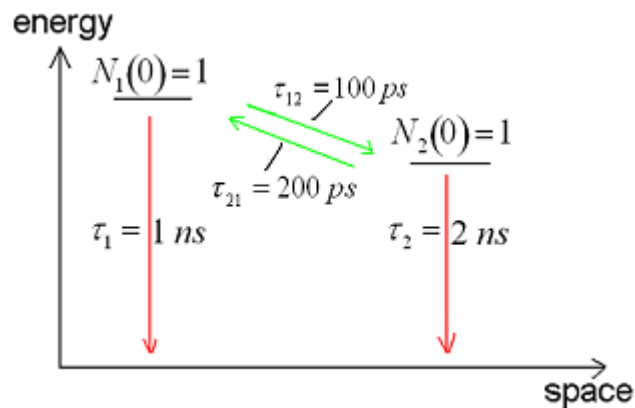


Fig. 2 Kopplungsschema zwischen 2 Zuständen N_1 und N_2 mit möglichem Vorwärts- und Rückwärts-Transfer

Dieses lineare Differentialgleichungssystem 1. Ordnung kann mit Hilfe der Transfermatrix T kompakt dargestellt werden. Man nennt ein solches System auch Ratengleichungssystem:

$$\dot{\mathbf{N}}(\mathbf{t}) = \begin{pmatrix} -k_{11} - k_{12} & k_{21} \\ k_{12} & -k_{22} - k_{21} \end{pmatrix} \mathbf{N}(\mathbf{t}) := \mathbf{TN}(\mathbf{t})$$

Dabei beschreiben die Parameter k_{11} , k_{12} , k_{21} und k_{22} „Übergangsraten“ für die entsprechend in der Abbildung bezeichneten Prozesse.

Die Lösung dieses Systems ist multiexponentiell. Die Fluoreszenz verändert sich zeitlich gemäß einer Summe diskreter Exponentialfunktionen mit den Amplituden A_i und den Lebensdauern τ_i :

$$F(t) = \sum_i A_i \exp(-t/\tau_i)$$

Dabei hat $F(t)$ unterschiedliche Wellenlängen für unterschiedliche Emitter. In dem gezeigten Beispiel würde man getrennt die Fluoreszenz von N_1 und N_2 beobachten können. In beiden Spektralbereichen ist gemäß der Lösung des obigen Differentialgleichungssystems eine biexponentielle Zerfallskinetik zu erwarten:

$$F_1(t) \sim \sum_{i=1}^2 U_{1i} e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

$$F_2(t) \sim \sum_{i=1}^2 U_{2i} e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

Diese mathematische Form für die beobachtete Fluoreszenz ist zunächst für ein beispielhaftes System aus 2 gekoppelten 2-Niveau Systemen wie in der Abbildung 2 gezeigt zu beweisen. Dabei kann angenommen werden, dass die Fluoreszenz proportional zur Menge vorhandener Moleküle der entsprechenden Species ist:

$$F_i(t) \sim N_i(t)$$

Die Fragen, die sich hierbei zum Beispiel ergeben: Wie hängen die Vorfaktoren U_{11} , U_{12} , U_{21} , U_{22} mit dem Ratengleichungssystem zusammen?

Warum gibt es in beiden Spektralbereichen $F_1(t)$ und $F_2(t)$ die gleichen Fluoreszenzzeiten τ_1 und τ_2 ?

Welche Rolle spielt eine Randbedingung in diesem System, was bedeutet diese Randbedingung (zum Beispiel die anfängliche „Anregung“ der Moleküle, oben bei $N_1(0) = N_2(0) = 1$)?

3.3 Fluoreszenzspektroskopie mit "Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC)"

Die Methode der Zeitkorrelierten-Einzelphotonenzählung (Time-Correlated Single Photon Counting; TCSPC) beruht auf der Zählung einzelner Photonen. Dabei wird mit kurzen Laserpulsen und hohen Wiederholungsfrequenzen $>1\text{MHz}$ die Probe angeregt und das erste eintreffende Fluoreszenzphoton detektiert. Damit aus diesem Verfahren überhaupt auf den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz geschlossen werden kann, muss sichergestellt werden, dass pro Anregungspuls nach

Möglichkeit nur ein einziges Fluoreszenzphoton auf den Detektor fällt. Da gleichzeitig immer nur ein ankommendes Photon gemessen werden kann, bedarf es nur geringer Laserintensität. Alle weiteren Photonen, die während eines Pulses den Detektor erreichen, werden ignoriert. Treten mehrere Photonen innerhalb eines Anregungszyklus am Detektor auf, kann es zum "Pile-up"-Effekt kommen, welcher die Fluoreszenzkinetik künstlich verkürzt.

Das erste ankommende Photon startet den Time-to-Amplitude-Converter (TAC), dieser wird durch den nächsten ankommenden Anregungspuls wieder gestoppt. Der TAC gibt einen Spannungspuls aus, der proportional zur Zeitverzögerung zwischen Photonenankunft und Laserpuls ist. Dieses Signal wird dann von einem Multi-Channel-Analyser (MCA) in den jeweiligen Zeitkanal einsortiert und in einem Histogramm aufsummiert. Dieser Messvorgang wird so oft wiederholt, bis das Signal-Rausch-Verhältnis hinreichend gut ist. Wie nachfolgend zu sehen ist, entspricht die gemessene Häufigkeitsverteilung der auftretenden Zeitabschnitte zwischen Anregung und Detektion dem zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzkinetik. Da es sich hier um einen statistischen Prozess handelt und eine diskrete Wahrscheinlichkeitsverteilung vorliegt, gehorcht das erste ankommende Fluoreszenzphoton der Poissonverteilung. Ferner kann zusätzlich zur Zeitmessung auch eine Wellenlängenmessung vorgenommen werden. Das bedeutet, die Probensubstanz kann zeitlich und spektral analysiert werden.

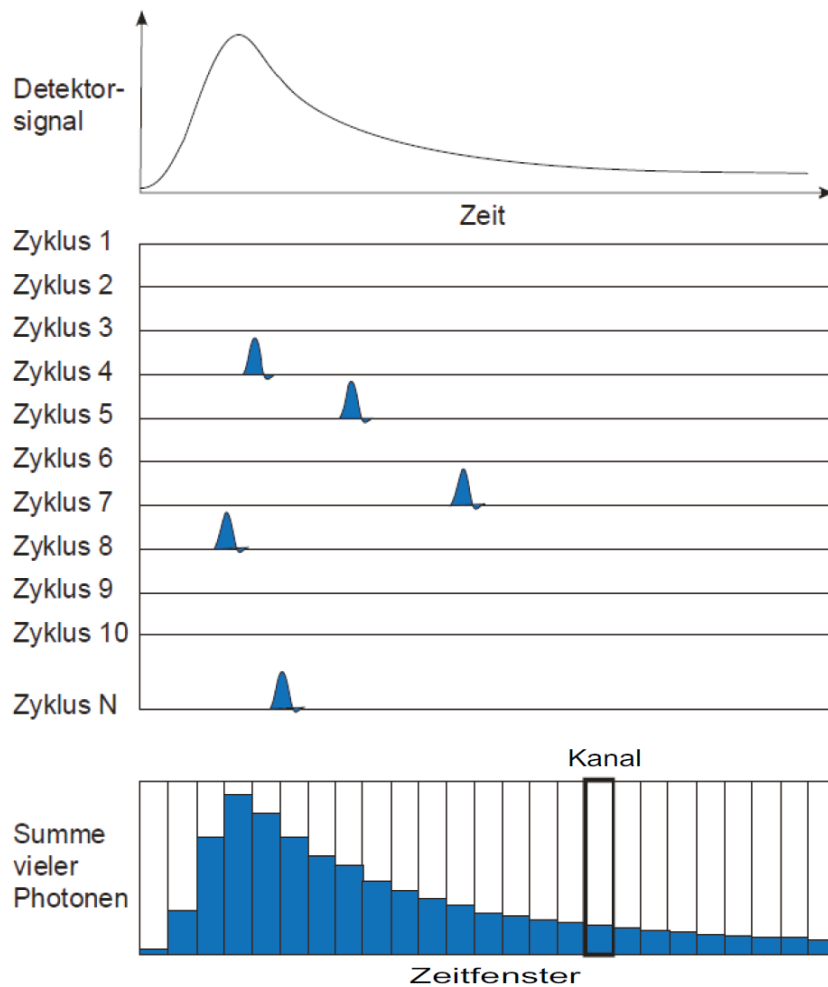


Fig. 3 Rekonstruktion eines Fluoreszenzzerfalls mit Hilfe von SPC

4. Versuchsaufbau:

Herzstück der Messapparatur ist ein 16-Kanal Photomultiplier (PML-16C). Der PML-16C ist ein Hamamatsu R5900 16 Kanal-Multi-Anoden Photomultiplier. Dieser kann für Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) verwendet werden. Der Photomultiplier besitzt 16 Anoden und arbeitet so simultan in 16 Kanälen. Es können Zählraten bis zu $1 \cdot 10^6$ Photonen pro Sekunde erreicht werden. Jedoch sind Zählraten von bis zu

$1 \cdot 10^6$ pro Sekunde bei biologischen Proben kaum möglich und auch nicht unbedingt erwünscht, da dann aufgrund hoher Anregungsintensitäten möglicherweise die jeweilige Probe zerstört wird. Dennoch kann mit Zählraten von etwa $2 \cdot 10^5$ pro Sekunde gemessen werden, was zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen binnen Sekunden ermöglicht. Ein weiterer Vorteil des PML-16C mit der zugehörigen Auswertelektronik, die in einen Computer eingebaut ist, ist der kompakte Aufbau.

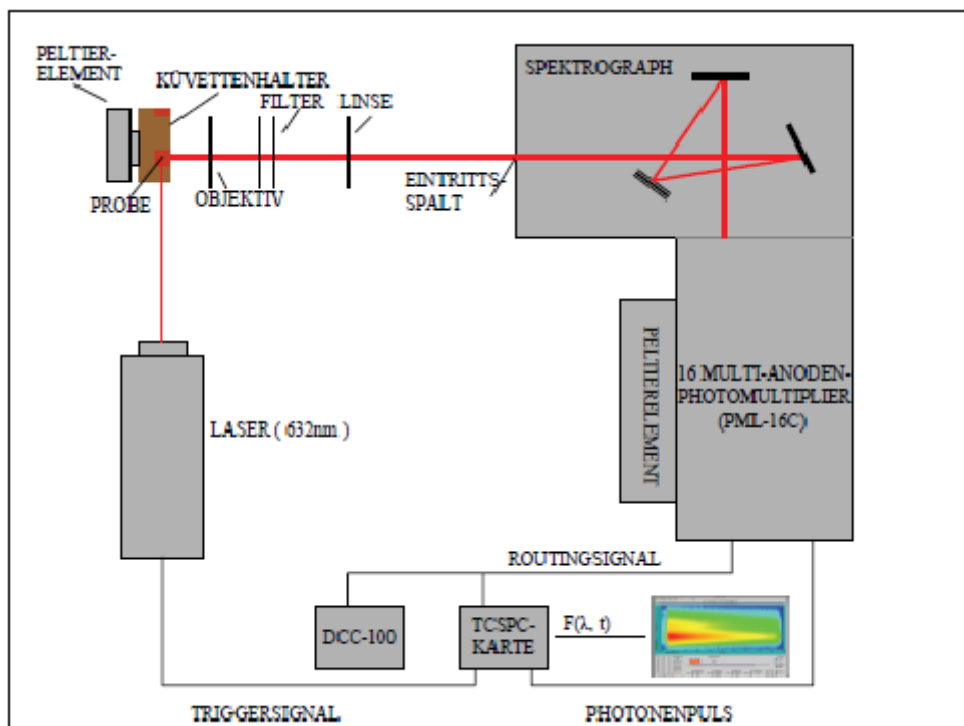


Fig. 4 Schematischer Aufbau des zeitaufgelösten Messplatzes am PML-16C

Keinesfalls dürfen Zählraten über $1 \cdot 10^6$ eingestellt werden. Dies würde den PML-16C beschädigen. In den Anregungslaser darf nie direkt hineingesehen werden. Armbanduhren und Ringe sowie andere spiegelnde Gegenstände an Fingern, Händen oder Handgelenk sind abzulegen.

4.1 Anregung

Die zu untersuchende biologische Probe befindet sich in einer Küvette und wird mit einem gepulsten Diodenlaser zur Fluoreszenz angeregt.

Laser zeigen eine starke Monochromasie des Lichtes, so dass spezielle Energieniveaus der Probe angeregt werden können. Des Weiteren wird ein Laser mit einer hohen Repetitionsrate, also einer hohen Pulsfolge verwendet, um die Messdauer verkürzen zu können.

Als Anregungslaser stehen verschiedene Diodenlaser mit Wellenlängen von 405, 470 und 632 nm und 20 MHz Repetitionsrate zur Verfügung. Es ist eine möglichst geeignete Wellenlänge zur Beobachtung des Energietransfers zwischen Phycobiliproteinen und Chlorophyll oder zwischen verschiedenartigen Chlorophyllmolekülen auszuwählen.

4.2 Küvette mit Küvettenhalter

Die Glasküvette wird in eine Messingfassung (Küvettenhalter) hineingestellt und kann zusätzlich über ein Peltierelement auf bis zu -2°C während den Messungen gekühlt werden.

Durch seitliche Fenster im Küvettenhalter kann die Probe angeregt werden. Streulicht und Reflexe, die sich in der Instrumental Response Function (IRF) bemerkbar machen, können vermindert werden, indem die Fenster des Küvettenhalters geschwärzt und die Küvette selbst mit schwarzen Klebeband abgeklebt wird. Zusätzlich wird der Bereich zwischen Linse und Detektoreintrittsspalt mittels eines Papprohres vor störendem Streulicht geschützt.

Ein richtige Konzentration der Probe ist von entscheidender Bedeutung. Eine zu hohe Konzentration der Probe kann zu Reabsorptionseffekten führen und eine zu stark verdünnte Probe macht sich in einer zu niedrigen Zählrate bemerkbar. Des Weiteren sollte die Probe am äußersten Rand der Küvette angeregt werden, um Reabsorptionseffekte zu vermeiden [Th. Foerster, 1951].

4.3 Abbildung des Fluoreszenzlichtes

Das von der Probe ausgesandte Fluoreszenzlicht erfüllt aufgrund der statistischen Orientierung der Pigmente den ganzen Raumwinkel, so dass im 90° Winkel zur Anregung durch den Laser ein Mikroskopobjektiv eingebracht wird, welches das Fluoreszenzlicht sammelt. Transmittiertes oder reflektiertes Anregungslicht erreicht auf Grund der 90 ° Geometrie nur geringfügig den Detektor. Eine weitere Linse hat die Aufgabe, das gesammelte Licht der Probe auf den 1 mm großen Eintrittsbereich einer Glasfaser, die zum Eintrittsspalt des Detektors führt zu fokussieren. Der angeregte Bereich in der Küvette, sowie die Faserendfläche müssen dabei jeweils im Fokus der ersten, bzw. der zweiten Linse stehen. Die Küvette ist dabei fest positioniert und das Linsensystem kann in alle drei Raumrichtungen bewegt werden. Zwischen die Linsen können außerdem noch Farbfilter zur Streulichtunterdrückung und Graufilter zur Intensitätsabschwächung verwendet werden.

4.4 Der Spektrograph

Nach Passieren der Fluoreszenzphotonen durch den Eintrittsspalt gelangen diese im Spektrographen auf einen Parabolspiegel und von diesem parallel auf das Gitter. Hier wird das Licht gebeugt. Anschließend werden die Photonen auf die Photokathode fokussiert und die ausgelösten Elektronen werden im Photomultiplier verstärkt.

Ein konventioneller Photomultiplier ist eine evakuierte Röhre, in der sich die Photokathode und eine Anode befindet, sowie dazwischen liegende Dynoden. Dabei wird über eine anliegende Spannung ein elektrisches Feld aufgebaut, welches ein an der Kathode herausgeschlagenes Elektron auf die erste Dynode beschleunigt, dort weitere Elektronen herausschlägt bis schließlich ein Elektronenstrom zur Anode gelangt. Es kann ein Verstärkungsfaktor bis zu 10^6 erreicht werden.

Der Elektronenpuls wird an der letzten Dynode abgegriffen. Die an der Anode ankommenden Pulse werden an die Verarbeitungselektronik weitergeleitet.

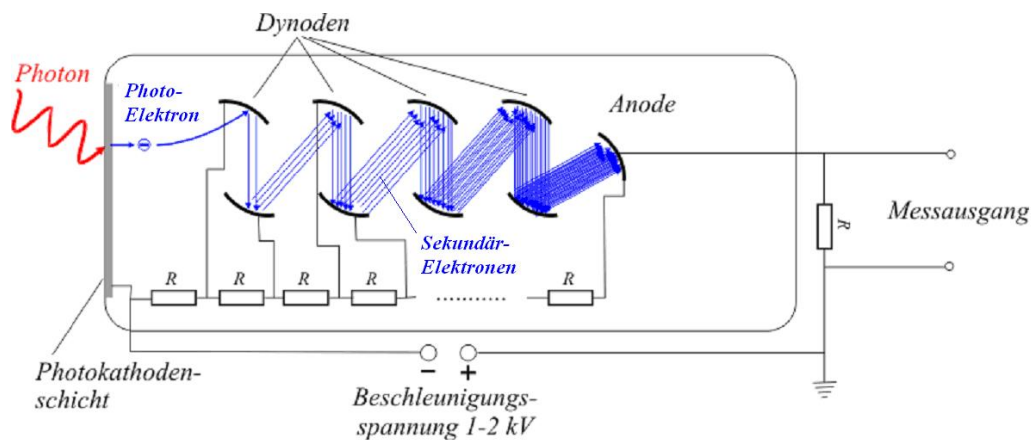


Fig. 5 Grundprinzip eines Elektronenvervielfachers Quelle: JKrieger, https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Photomultiplier_schema_en.png

Jeder Photomultiplier hat eine gewisse Dunkelzählrate, die hauptsächlich in der Elektronik durch thermisches Rauschen entsteht.

4.5 Funktionsweise des TCSPC-Modul

Die klassische Methode des TCSPC basiert auf der Detektion einzelner Photonen aus einem periodischen Lichtsignal (repetierende Anregung) und der Messung der Zeit zwischen Anregung und Ankunft des ersten Fluoreszenzphotons.

Ein auf die Dynode auftreffendes Photon löst ein Elektron aus. Dieses Elektron wird verstärkt. Die Elektronenwolke wird detektiert und dient als Zeit-Start-Signal. Das Zeit-Stop-Signal wird vom Laser als Trigger geliefert.

Die verstärkten Pulse werden in dem TCSPC-Modul über Constant Fraction Diskriminatoren (CFD), Time to Amplituden Converter (TAC), bis hin zum Vielkanalanalysator für die Zeitmessung weitergeleitet.

Sobald ein Puls den Constant Fraction Diskriminator (CFD) des TCSPC-Moduls erreicht, wird außerdem ein Zeit-Start-Signal am Time to Amplituden Converter (TAC) gestartet. Die Spannung am TAC steigt, bis über ein Referenzsignal das Stop-Signal kommt. Der Referenzpuls kommt direkt vom Laser-Trigger. Im Modul wird er SYNC genannt.

5. Messungen

5.1 Instrument Antwortfunktion (IRF)

Die Instrument-Antwortfunktion ist für jede Messapparatur eine charakteristische Funktion und wird für jede Messung aufgenommen. Sie beschreibt die effektive Auflösung der Apparatur und spiegelt die Breite des verwendeten Anregungspulses sowie Streuungen elektrischer Signale durch die verwendete Elektronik bzw. Lichtstreuungen in der Apparatur durch vorhandene Optiken wider. Mit ihr ist es möglich durch einen mathematischen Entfaltungsprozess zwischen IRF und Fluoreszenz, das Auflösungsvermögen zu erhöhen.

5.2 Phycobiliproteine, Chlorophylle und ganze Zellen von Algen und photosynthetischen Bakterien

Cyanobakterien werden auch Blaualgen genannt. Ihnen fehlt der Zellkern (Prokaryonten). In der nachstehenden Abbildung ist zu sehen, dass der Antennenkomplex von Cyanobakterien und Algen anders aufgebaut ist als der höherer Pflanzen. Zusätzlich unterscheiden sich die Antennen auch

innerhalb einzelner Pflanzen- und Bakteriengattungen. Die Zusammensetzung einer Antenne kann je nach Lichtverhältnissen ganz unterschiedlich sein. Als Lichtsammelkomplex dient den Cyanobakterien eine membranexterne Antenne, die aus Phycobilisomen (PBS), das sind spezielle Aggregate der Phycobiliproteine, besteht und direkt über ein Linkerprotein mit dem Reaktionszentrum (RZ) verbunden ist [Häder, 1999]. Im Gegensatz dazu besteht der LHC II höherer Pflanzen aus Chl a und Chl b. Die Blaualge *Acaryochloris marina* (*A.marina*) beispielsweise nimmt unter den Cyanobakterien eine besondere Stellung ein. Es besitzt als einziges Cyanobakterium Chl d als Hauptpigment und nur in geringen Mengen Chl a und Phycobiliproteine (PBP). Die PBP bestehen aus Phycocyanin (PC) und Allophycocyanin (APC), die jedoch nicht wie bei typischen Cyanobakterien in Form von Phycobilisomen aggregieren, sondern als membranexterne Stabantenne angeordnet sind. Ferner besitzt *A. marina* auch einen membraninternen Chl d-Lichtsammelkomplex. Das Pigment Chl d absorbiert Licht hauptsächlich im Wellenlängenbereich zwischen 650 nm und 730 nm. Licht unterhalb 650 nm kann die Phycobiliproteine (PBP) anregen [Schmitt, 2005]. Damit ist ein Wellenlängenbereich von 600 nm bis 730 nm ausgenutzt. PC fluoresziert im 650 nm Bereich und APC im Bereich von 660 nm bis 680 nm.

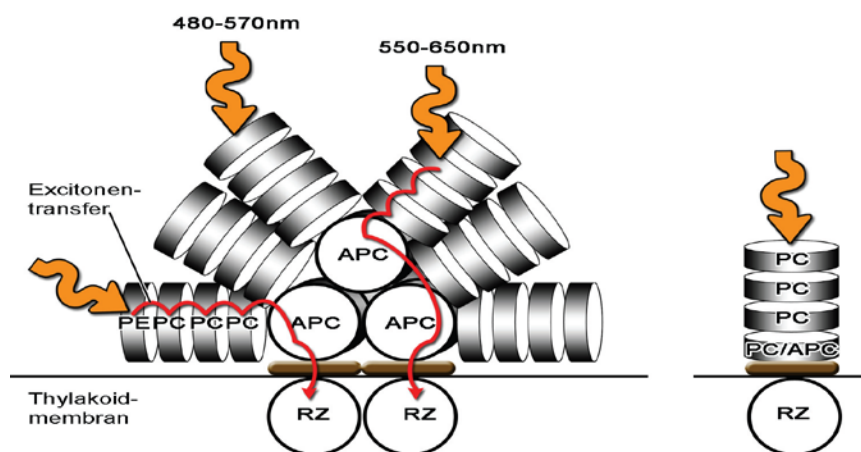


Fig. 6 Antennensysteme aus Phycobiliprotein von Cyanobakterien wie *H.hongdechloris* (links) oder *A.marina* (rechts)

Im Versuch kann ein Cyanobakterium mit einer spezifischen Komposition zur Verfügung gestellt werden. Diese wird vor Beginn der Experimente genau erläutert.

Eine Absorptionsspektroskopie erlaubt die Identifikation der Phycobiliproteine und des Chlorophylls:

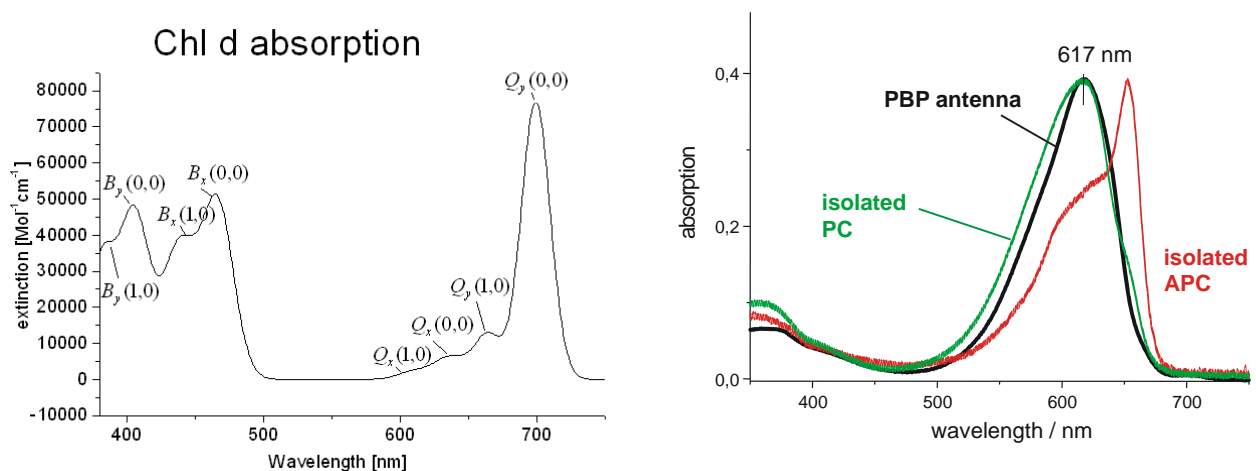


Fig. 7 Absorptionsspektrum von Chl d (links) und verschiedenen Phycobiliproteinen (rechts)

6. Auswertung:

Die erhaltenen Daten sollen mit dem Programm „Glo“ in Hinsicht auf ihre Lebensdauer und die zugehörigen Amplituden gefittet werden. Ziel ist also die Bestimmung von

$$F_1(t) \sim \sum_{i=1}^2 U_{1i} e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

$$F_2(t) \sim \sum_{i=1}^2 U_{2i} e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

Für die Phycobiliproteinfluoreszenz $F_1(t)$ und die Chlorophyllfluoreszenz $F_2(t)$. Es zeigt sich dabei, dass eine perfekte Anpassung der Chlorophyllfluoreszenz eine kompliziertere Funktion erfordert als

$$F_2(t) \sim \sum_{i=1}^2 U_{2i} e^{-\frac{t}{\tau_i}} .$$

Dies ist darauf zurückzuführen, dass in einer lebenden Pflanze oder einem lebenden Cyanobakterium die Anregungsenergie nach Übergang auf das Chlorophyllmolekül nicht dort gebunden bleibt sondern eine Ladungstrennung stattfindet und sich chemische Folgereaktionen anschließen. Der Photosyntheseapparat besteht eben nicht aus 2 gekoppelten 2-Niveau Systemen. Im Sinne des Versuchsziels kann jedoch die skizzierte Vereinfachung durchgeführt werden.

Im Anschluss soll mit Origin aus den erhaltenen Fitdaten ein „Decay associated“ Spektrum (DAS) erstellt werden. In einem DAS werden die Anfangsamplitude der Fluoreszenzkomponenten als Funktion der Wellenlänge aufgetragen. Weiterhin ist eine Fehleranalyse zu machen. Im Hinblick auf die Genauigkeit der gemessenen Lebensdauern.

6.1 Erstellung der Decay Associated Spectra (DAS):

Dieses lineare Differentialgleichungssystem 1. Ordnung kann mit Hilfe der Transfermatrix kompakt dargestellt werden:

$$\dot{\mathbf{N}}(\mathbf{t}) = \begin{pmatrix} -k_{11} - k_{12} & k_{21} \\ k_{12} & -k_{22} - k_{21} \end{pmatrix} \mathbf{N}(\mathbf{t}) := \mathbf{TN}(\mathbf{t})$$

Aus der Transfermatrix T kann man den erwarteten Fluoreszenzverlauf für die Emissionsmaxima der beteiligten Chromophore durch Lösen des Eigenwertproblems von T bestimmen. Die Eigenwerte $\gamma_j = \frac{1}{\tau_j}$ entsprechen verschiedenen Abklingraten, sogenannten „Komponenten“ der Fluoreszenz. Das Abklingverhalten wird multiexponentiell, selbst wenn in den einzelnen Spektralbereichen nur von einem Pigment emittierte Fluoreszenz gemessen wird, die Spektren sich also nicht überlappen.

Die Eigenvektoren von T bilden als Spalten die Matrix U, wobei U_{ij} der anfänglichen Amplitude der Komponente j des Chromophors i proportional ist, wenn die vom Absorptionsverhalten der einzelnen Chromophore festgelegte Randbedingung

$$N_i(0) = \sum_{j=1}^n U_{ij} \text{ berücksichtigt wird.}$$

Die Besetzung angeregter Zustände ist damit eindeutig bestimmt zu:

$$N_i(t) = \sum_{j=1}^n U_{ij} e^{\gamma_j t}$$

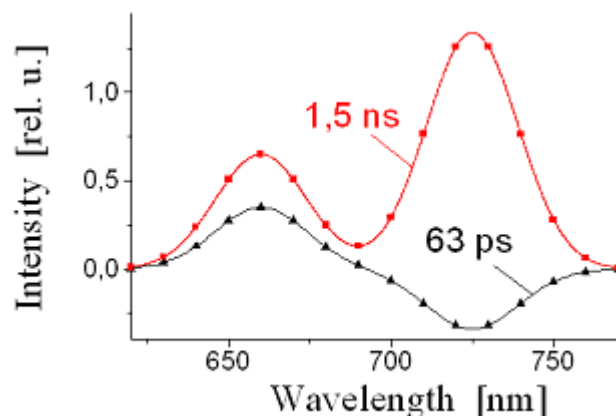


Fig. 8 DAS für zwei gekoppelte 2-Niveau-Systeme wie in Fig. 2 gezeigt.

Nun kann man die Einträge der Eigenvektormatrix U mit einer spektralen, beispielsweise gaußförmigen, Formfunktion für das „Profil“ der Fluoreszenzemission multiplizieren und über den Wellenlängen der Emissionsbanden auftragen. Dies führt auf eine Simulation der beobachteten Decay associated spectra (DAS), wenn bei der Simulation alle beteiligten Chromophore und ihre Kopplungen korrekt wiedergegeben wurden und die Emission in den einzelnen Banden mit dem Inversen der natürlichen Lebensdauer gewichtet wird.

Die DAS sind folglich die graphische Darstellungen der anfänglichen Amplituden der verschiedenen Zerfallskomponenten als Funktion der Wellenlänge und lassen sich bei einem gegebenen Kopplungsschema durch Lösung des linearen Differentialgleichungssystems 1. Ordnung berechnen (simulieren).

Ein experimentelles DAS wird direkt aus den Messdaten durch eine multiexponentielle Anpassung der Fluoreszenzdynamik gewonnen.

Das gezeigte DAS hier (Fig. 8) zeigt das Resultat der Analyse des gekoppelten 2 X 2-Niveau-Systems mit den Eigenwerten

$$\gamma_1 = -(63\text{ps})^{-1}, \gamma_2 = -(1,5\text{ns})^{-1} \text{ und der Eigenvektormatrix } U = \begin{pmatrix} 0,35 & 0,65 \\ -0,34 & 1,34 \end{pmatrix},$$

wobei als Randbedingung $N_1(0) = N_2(0) = 1$ verwendet wurde, was einer gleich starken Absorption beider Chromophore im Bereich der Anregungswellenlänge entspricht. Dieses Schema ist exakt in Fig. 2 abgebildet.

Eine Fluoreszenzkomponente mit negativer Amplitude, wie im Bereich 725 nm zu sehen wird als Anstiegskinetik oder „Rise-term“ bezeichnet und ist ein besonders deutlicher Hinweis auf einen Energietransfer.

Im Rahmen dieses Versuchs kann das eine 2 – Niveau System mit den Phycobiliproteinen (PC und APC im „Gleichgewicht“) oder sogenannten Antennen-Chlorophyll-Molekülen identifiziert werden, während das andere

2-Niveau-System aus den gekoppelten Chlorophyllmolekülen im Reaktionszentrum (und dem „primären Donor für Ladungstrennung P) besteht:

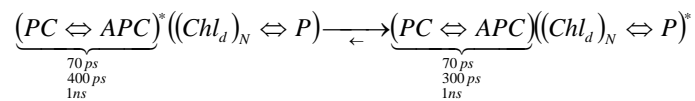


Fig. 9 Transfer des Anregungszustandes vom System PC/APC (Fluoreszenz bei 650-660 nm) zum Antennenchlorophyll und primären Donor P (Fluoreszenz 720-730 nm) aufgrund der Kopplung zwischen den Molekülen

6.2 Lösung der linearen Differentialgleichungssysteme

Ein lineares Differentialgleichungssystem (DGS) 1. Ordnung kann mit Hilfe der Transfermatrix T_{ik} für die zu besetzenden durchnummerierten Zustände N_i kompakt dargestellt werden:

$$\dot{\vec{N}} = \vec{T} \vec{N} \quad \frac{dN_i}{dt} = \sum_k T_{ik} N_k(t)$$

Aus der Transfermatrix T_{ik} kann man den erwarteten Fluoreszenzverlauf für die Emissionsmaxima der beteiligten Pigmente durch Lösen des Eigenwertproblems von T_{ik} bestimmen. Die Eigenwerte entsprechen verschiedenen Abklingraten, sogenannten „Komponenten“ der Fluoreszenz. Das Abklingverhalten wird multiexponentiell, da T_{ik} auch Außerdiagonalelemente besitzt, also alle Pigmente gekoppelt sind. Die Lösung des linearen DGS lautet allgemein:

$$N_i(t) = \sum_{j=1}^n U_{ij} e^{\gamma_j t}$$

Mit der sogenannten Hauptachsentransformation:

$$\mathbf{T} = \mathbf{U} \mathbf{\Gamma} \mathbf{U}^{-1}$$

Die Eigenvektoren von T bilden als Spalten die Matrix U , wobei U_{ij} der anfänglichen Fluoreszenz der Komponente j des Pigments i entspricht, wenn die durch die Anregung gegebene Randbedingung für eine spezielle Lösung des DGS ausgewertet wird. Die Matrix Γ ist die Diagonalisierung von T mit den Eigenwerten von T auf der Diagonalen

Betrachtet man nun ein etwas komplexeres System:

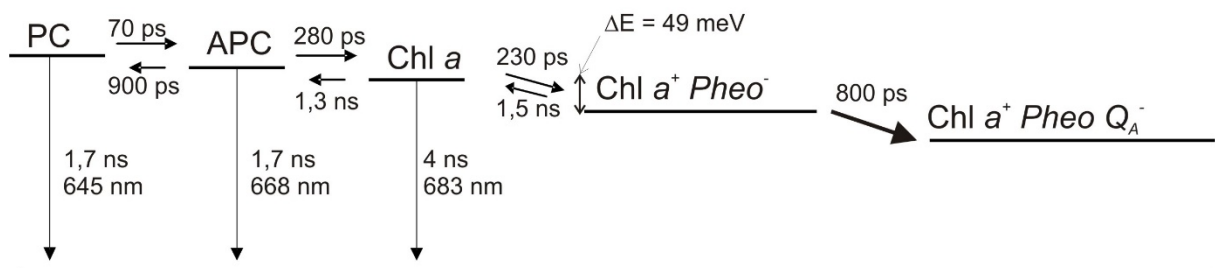


Fig. 10: Energietransfer zwischen PC, APC und RZ (Chl) mit Ladungstrennung in typischen Cyanobakterien

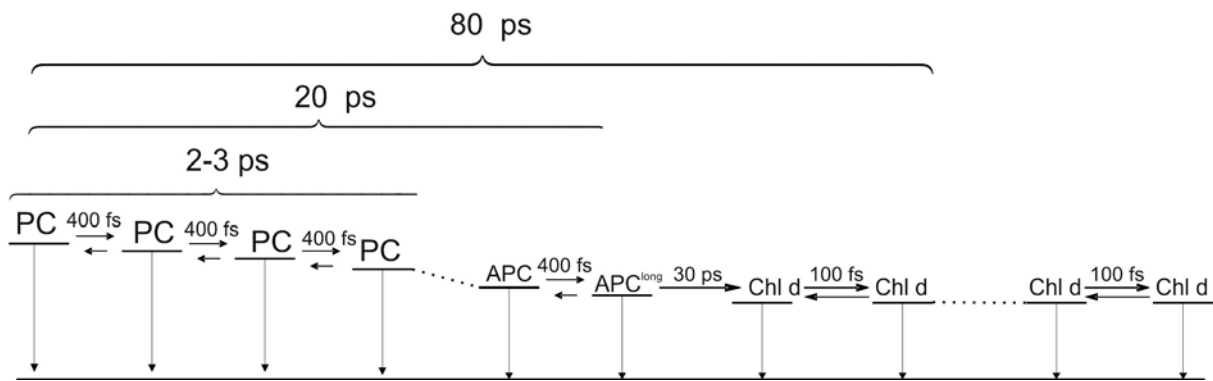


Fig. 11: Schnelle Energietransferschritte zwischen PC, APC und Chl *d* in *A.marina*

Mit dem dargestellten Formalismus können die DAS für beliebig komplexe Systeme wie zum Beispiel in Fig. 10 und Fig. 11 gezeigt, simuliert werden. Die Aufgabe besteht darin, aus den Messdaten, die den Eigenwerten und Eigenvektoren der Transfermatrix entsprechen, diese Matrix T selbst zu rekonstruieren, indem ein Kopplungsschema wie in Fig. 2, Fig. 10 oder Fig. 11 gezeigt konstruiert wird, dessen Simulation auf die gemessenen DAS führt.

Leider sind die Messdaten durch das Auflösungsvermögen der Apparatur und die Fluoreszenzeigenschaften der beteiligten Zustände begrenzt. Dementsprechend ist eine eindeutige Bestimmung der Transfermatrix im Allgemeinen nicht möglich. Es ist aber zu mindest möglich, einen Vorschlag zu erstellen, der die gemessenen Daten erklären kann.

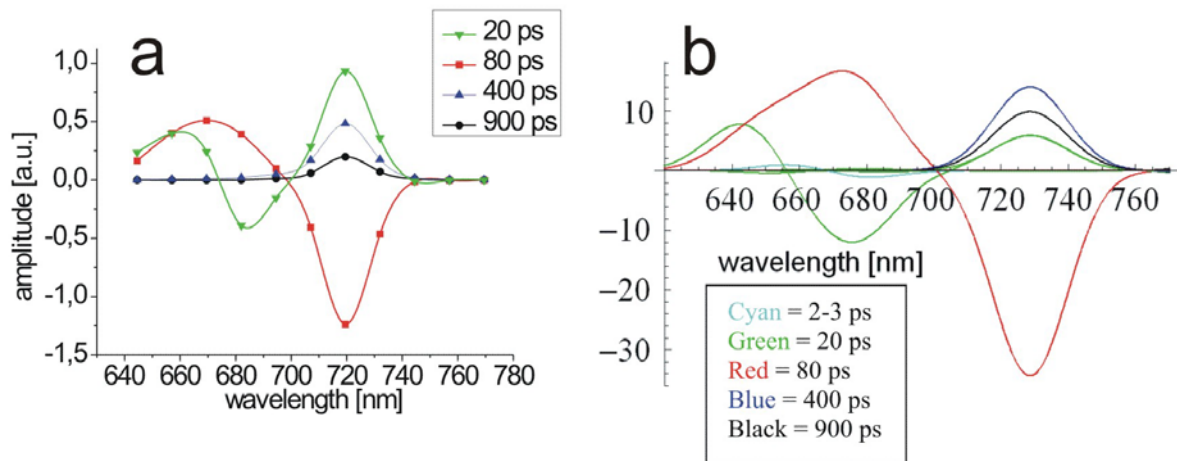


Fig. 12 a: An lebenden Zellen der Blaualge *A. marina* gemessenes DAS (nach globalem Fit der zeitaufgelösten Fluoreszenzdaten). b: Simulation der DAS aus dem in Abb. 11 gezeigten Kopplungsschema und folgender Ladungstrennung wie in Abb. 10 gezeigt.

Über Zusatzannahmen, wie beispielsweise über den Zusammenhang von Vorwärts- und (thermisch aktivierten) Rückwärts –Transferraten oder über die aufgrund der Struktur der PBP oder Chlorophyll-Komplexe mögliche Symmetrie der Transfermatrix, kann die Transfermatrix zumindest teilweise bestimmt werden. Sind Pigmente, die die Zustände N_i repräsentieren, zu weit voneinander entfernt, um untereinander Anregungsenergie (Exzitonen) zu übertragen, so verschwinden die Einträge der Transfermatrix beispielsweise, was die Berechnung sehr stark vereinfacht. Schrittweise kann das simulierte DAS an die Messdaten angepasst werden.

6.3 Förster-Resonanz-Anregungsenergie-Transfer

Die Theorie des Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET) liefert Informationen über die geometrische Anordnung der Farbstoffmoleküle.

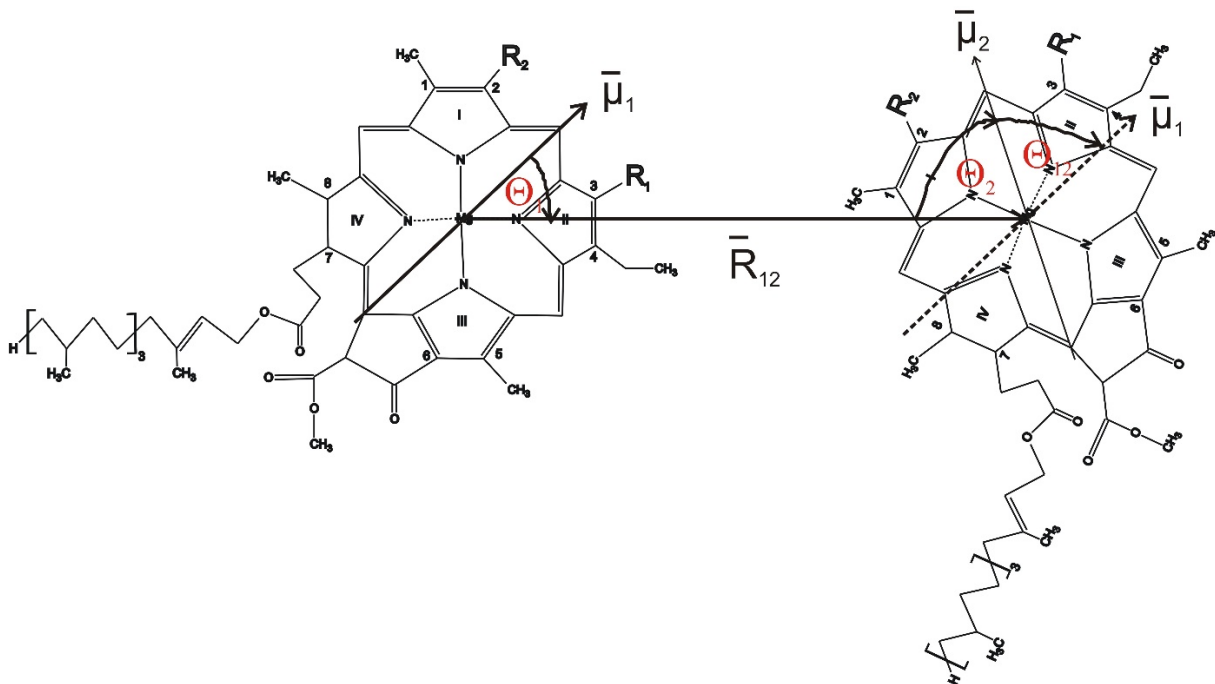


Fig. 13 Schema für den Winkel Θ_1 zwischen dem Übergangsdipolmoment $\bar{\mu}_1$ und dem Vektor \bar{R}_{12} , der die Schwerpunkte der beteiligten Übergangsdipolmomente verbindet. Entsprechend bezeichnet Θ_2 den Winkel zwischen $\bar{\mu}_2$ und \bar{R}_{12} . Θ_{12} bezeichnet den Winkel zwischen den beiden beteiligten Übergangsdipolmomenten $\bar{\mu}_1$ und $\bar{\mu}_2$.

Die Wahrscheinlichkeit pro Zeit, also die Rate des Energietransfers k_{FRET} berechnet sich aus dem allgemeinen Ansatz eines Übergangsmatrixelements der Anregung (e) eines Moleküls 1 auf ein Molekül 2, das anfangs im Grundzustand (g) vorliegt:

$$V_{12} = \langle \Phi_1^g \Phi_2^e | V_{Coulomb} | \Phi_1^e \Phi_2^g \rangle$$

Nach Fermi's Goldener Regel in erster Ordnung Störungstheorie aus dem Übergangsmatrixelement V_{12}

und der effektiven Zustandsdichte $\rho_{eff}(E)$ für den Anfangs- und Endzustand:

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} |V_{12}|^2 \rho_{eff}(E)$$

Mit einer Coulomb-Kopplung von zwei Dipolmomenten:

$$V_{12} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \left(\frac{\bar{\mu}_1\bar{\mu}_2}{(R_{12})^3} - 3 \frac{(\bar{\mu}_1\bar{R}_{12})(\bar{\mu}_2\bar{R}_{12})}{(R_{12})^5} \right)$$

folgt mit den in Abb. 13 bezeichneten Winkeln:

$$V_{12} = \frac{|\mu_1||\mu_2|}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r(R_{12})^3} (\cos\Theta_{12} - 3\cos\Theta_1\cos\Theta_2)$$

Führt man zur Abkürzung den Orientierungsfaktor $\kappa := (\cos\Theta_{12} - 3\cos\Theta_1\cos\Theta_2)$

ein, so folgt für die Försterrate:

$$k_{FRET}(R_{12}) = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{|\mu_1|^2|\mu_2|^2\kappa^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 n^4 (R_{12})^6} \rho_{eff}(E)$$

und aufgrund der Proportionalität von $|\mu_1|^2|\mu_2|^2\rho_{eff}(E)$

zum normierten Überlappintegral von Donatorfluoreszenz und

$$\text{Akzeptorextinktion } J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda)\epsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\bar{\tau}_D \cdot \int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda}$$

dann die bekannte Förster-Formel:

$$k_{FRET}(r) = A \frac{\kappa^2}{(R_{12})^6 \tau_0 n^4} \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda)\epsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda}$$

A ist eine Konstante mit dem Zahlenwert $A = 8.8 \cdot 10^{-28} \text{ mol}$ (warum hat A die Einheit [mol]?). Es gilt auch $A = \frac{9 \cdot \ln(10)}{128 \cdot \pi^5 \cdot N_A}$ wobei N_A die Avogadro-Zahl [1/mol] ist.

Ist umgekehrt die Übergangswahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit k_{FRET} (Förster-Rate) für den Transfer bekannt, so kann man mit der Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors τ_0 , dem Orientierungsfaktor κ , den man bei fehlender Information über die Struktur mit Zahlenwerten um „ $\kappa = 1$ “ nähern kann und einer Information über den Brechungsindex n des Mediums zwischen Donor und Akzeptor (Für Protein kann $n = 1,4$ angenommen werden) der Abstand zwischen Donor und Akzeptor berechnet werden.

6.4 Abstandsbestimmung über Förster Resonanz Anregungsenergie transfer (Beispiel)

Die elektrodynamischen Eigenschaften der beteiligten Moleküle lassen sich

als sogenannter Försterradius $R_0 = \left(A \Phi_F \frac{\kappa^2}{n^4} J(\lambda) \right)^{\frac{1}{6}}$ für ein spezifisches

Donor-Akzeptor Paar zusammenfassen. Dabei bezeichnet $\Phi_F = \frac{\tau_D}{\tau_0}$ die

Fluoreszenzquanteneffizienz des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, die dem Quotienten zwischen Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors τ_D und Lebensdauer (intrinsischer) τ_0 für strahlende Relaxation entspricht. κ^2 den Orientierungsfaktor der molekularen Dipole, n den mittleren Brechungsindex der Mikroumgebung als makroskopische Größe und $J(\lambda)$ das spektrale Überlappintegral zwischen der normierten Donormission und der Akzeptorextinktion. A ist eine Konstante $A = 8.8 \cdot 10^{-25} \text{ cm}^3 \text{ M}$.

Entscheidend ist es also, den Försterradius des Systems Donor-Akzeptor zu bestimmen. Im Folgenden wird dies für das Beispiel Tryptophan als Donor und Biliverdin als Akzeptor vorgerechnet.

Die natürliche Fluoreszenzquantenausbeute des Tryptophans beträgt etwa $\Phi_F \approx 0.13$.

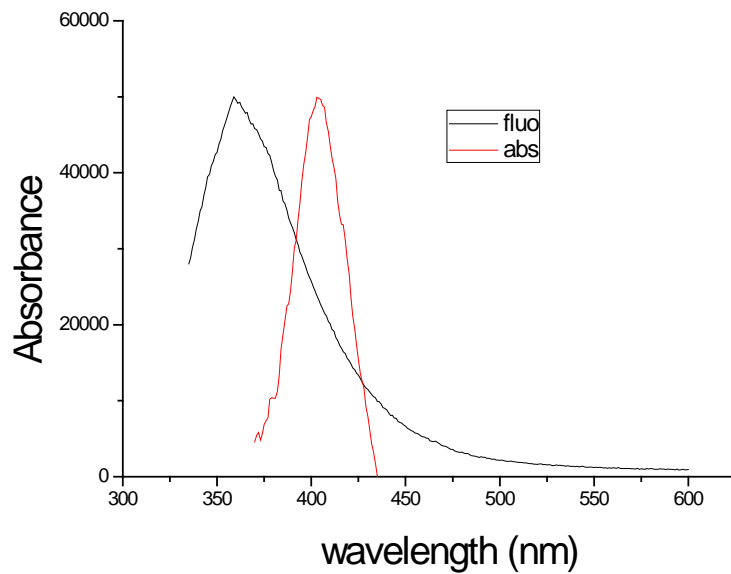
Der Brechungsindex läßt sich experimentell an angereicherten Lösungen der Proteine bestimmen. Nach [Lakowicz,99, S. 368] wird für Proteinen ein Brechungsindex von ca. 1,4 in wässriger Lösung angegeben. Schwieriger ist die Bestimmung des Orientierungsfaktors. Mit geeigneten Messverfahren, wie der Beobachtung von Fluoreszenz Anisotropie läßt sich dieser gut eingrenzen. [Lakowicz,99, S. 375 ff.] Auch andere optische Verfahren, wie die Messung des linearen Dichroismus, also der Absorptionsdifferenz bei verschiedenen Polarisationsrichtungen des eingestrahlten Lichtes, sind geeignet, um den Orientierungsfaktor zu bestimmen.

Benachbarte Moleküle in den Antennensystemen von photosynthetischen organismen finden sich oft, deren Orientierungsfaktor bei $\kappa^2 = 1$ oder sogar etwas darüber liegt. Entlang einer Vorzugsrichtung optimal orientierter Moleküle findet dann der Anregungsenergie transfer statt. Es ist nicht anzunehmen, dass alle Orientierungen ungünstiger als $\kappa^2 \approx 1$ sind. Hier ist eine Annahme nötig, da der Försterradius bei fehlender Eingrenzung von κ keine untere Schranke besitzt. Für κ^2 sollte man aber sicherheitshalber einen Fehler von etwa 50 % mit einkalkulieren.

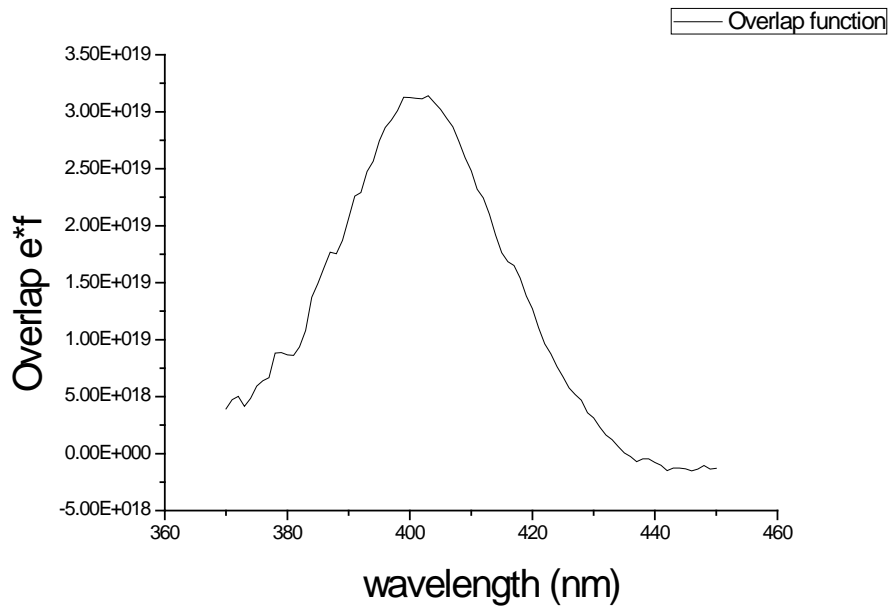
Die Spektren für das Überlappintegral werden dagegen aus den Messdaten bestimmt. Doch gibt es auch hier Unsicherheiten. Als Extinktion des Akzeptors kann für Biliverdin ein Wert von $50.000 \left(\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right)^{-1} \text{cm}^{-1}$ im Maximum der Soretbande angenommen werden. Auch hier könnte ein Fehler von 50 % resultieren. Für Chlorophyll ist die Extinktion wohl etwas

größer bei etwa $80.000 \left(\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right)^{-1} \text{cm}^{-1}$ im Maximum der Q_y -Bande bei etwa 680 nm.

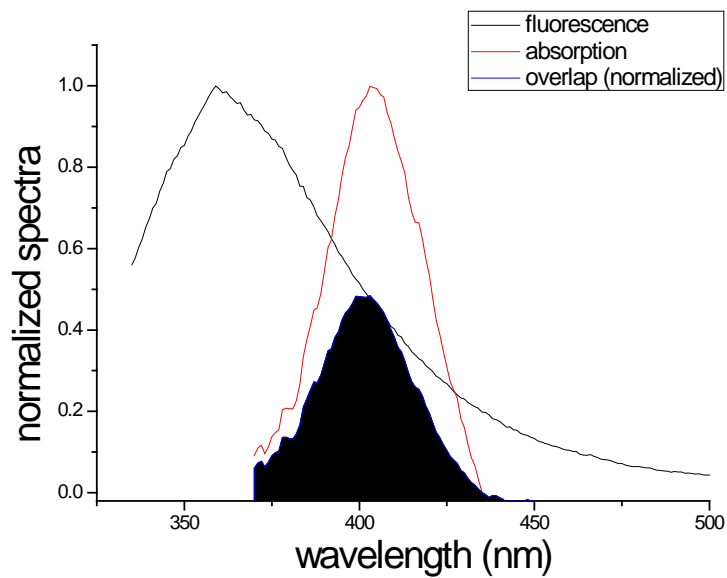
Hier finden sich zunächst beide Spektren (Fluoreszenz des Tryptophans (fluo) und Absorption des Biliverdins (abs), beide gemessen).



Die Überlapp / Produkt Funktion kann daraus mittels Origin berechnet werden und sieht dann folgendermaßen aus:



Das Überlappintegral entspricht dann der schwarz eingezeichneten Fläche:



Für das normierte Überlappintegral folgt mittels Origin

$$J = 2.8 \cdot 10^{14} \frac{\text{nm}^4}{\text{Mol} \cdot \text{cm}} = 2.8 \cdot 10^{-14} \frac{\text{cm}^3}{\text{Mol}}$$

Setzt man dann die Werte $\kappa^2 = 1 \pm 50\%$, $n = 1,4 \pm 10\%$ und $\Phi_D = 0.13 \pm 30\%$ ein, so ergibt sich

$$R_0 = 3.1 \text{ nm} \pm 0.5 \text{ nm},$$

als Förster-Radius. Mit der bekannten Transferrate $k_{FRET}(R_{12}) = \frac{(R_0)^6}{(R_{12})^6} \tau_D$

kann daraus und aus der Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors τ_D dann der im System vorliegende Abstand R_{12} zwischen Donor und Akzeptor berechnet werden.

Frage: Welcher Anteil an Anregungsenergie wird übertragen wenn $R_{12} = R_0$? Bzw. was gilt dann für die Wahrscheinlichkeit des Förster-Transfers vom Donor zum Akzeptor im Vergleich zur Wahrscheinlichkeit einer strahlenden Relaxation des Donormoleküls mit der Lebensdauer τ_D ?

7. Fehlerrechnung

Es soll der Fehler für den Abstand zwischen Donor und Akzeptor nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzungsformel bestimmt werden. Dieser ist prozentual gleich dem Fehler an den Förster-Radius. Für das Beispiel Tryptophan-Biliverdin aus Kapitel 6.4 folgt:

$$\frac{\Delta R_0}{R_0} = \sqrt{\left(\frac{1}{6} \frac{\Delta \kappa^2}{\kappa^2}\right)^2 + \left(\frac{2}{3} \frac{\Delta n}{n}\right)^2 + \left(\frac{1}{6} \frac{\Delta J}{J}\right)^2 + \left(\frac{1}{6} \frac{\Delta \Phi_D}{\Phi_D}\right)^2} \approx 15\%$$

8,3% 6,7% 8,3% 5%

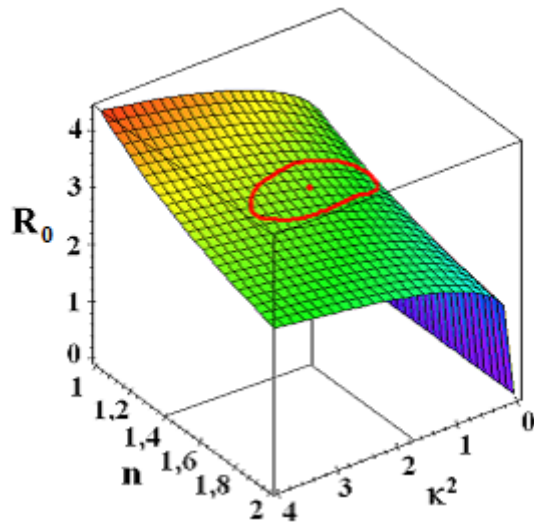
Man sieht also, dass durch die Abstandsabhängigkeit der

Dipol-Dipol Kopplung mit $\frac{1}{(R_0)^6}$

die Lösung sehr stabil gegen die Unwägbarkeiten ist, welche in die Berechnung eingehen.

Die Unsicherheiten im Spektrum, in dem Orientierungsfaktor κ^2 und

auch in der Dielektrizität, welche als makroskopische Größe ohnehin nicht fehlerfrei zur Klassifizierung einer Mikroumgebung herangezogen werden kann, stören den berechneten Abstand der Fluorophore nur schwach, Die Abbildung zeigt den Verlauf des ermittelten Försterradius über den Größen n und κ^2 . Der rot eingekreiste Bereich charakterisiert den Abstand (R_0) innerhalb der angenommenen Grenzen von n und κ^2 . In diesem Sinne wird die Theorie von Förster häufig herangezogen, um Energietransferprozesse zwischen biologischen Molekülen in einer Proteinmatrix zu beschreiben.



Literaturverzeichnis:

- Joseph R. Lakowicz., „Principles of Fluorescence spectroscopy“, New York, 1999
- Theodor Foerster „Fluoreszenz Organischer Verbindungen“, Göttingen, 1951
- Helmut Vogel, Christian Gerthsen, Gerthsen Physik, 1999
- Theo Mayer-Kuckuk, Atomphysik 1994

- Demtröder, Laserspektroskopie, 2006
- Schmitt F.-J. (2011), *Picobiophotonics for the investigation of pigment-pigment and pigment-protein interaction in photosynthetic complexes*. PhD Thesis. TU Berlin
<http://opus4.kobv.de/opus4-tuberlin/frontdoor/index/index/docId/3012>
- F.-J. Schmitt, E. Maksimov, C. Junghans, J. Weißenborn, P. Hätti, S. I. Allakhverdiev and T. Friedrich „Structural organization and dynamic processes in protein complexes determined by multiparameter imaging.” Signpost Open Access J. *NanoPhotoBioSciences*. 1, 1-45 (2013)

https://www.researchgate.net/publication/337194650_Structural_Organization_and_Dynamic_Processes_in_Protein_Complexes_Determined_by_Multiparameter_Imaging

- F.-J. Schmitt, Z. Y. Campbell, M. V. Bui, A. Hüls, T. Tomo, M. Chen, E. G. Maksimov, S. I. Allakhverdiev, T. Friedrich, Photosynthesis supported by a chlorophyll f-dependent, entropy-driven uphill energy transfer in *Halomicronema hongdechloris* cells adapted to far-red light, *Photosynth Res* (2018), doi.org/10.1007/s11120-018-0556-2

https://www.researchgate.net/publication/326568517_Photosynthesis_is_supported_by_a_chlorophyll_f-dependent_entropy-driven_uphill_energy_transfer_in_Halomicronema_hongdechloris_cells_adapted_to_far-red_light

