Elektronentransferprozesse in den Photosystemen I & II

vorgelegt von Diplom-Chemiker Matthias Schenderlein aus Berlin

von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Berlin zur Erlangung des akademischen Grades

> Doktor der Naturwissenschaften – Dr. rer. nat. – genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:Prof. Dr. Thomas FriedrichBerichter:Prof. Dr. Peter HildebrandtBerichter:Prof. Dr. Thomas Renger

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 26. Februar 2010

Berlin 2010 D 83 Tsuki mireba Chiji ni mono koso Kanashi kere Waga mi hitotsu no Aki ni wa aranedo

-

As I view the moon, Many things come into my mind, And my thoughts are sad; Yet it's not for me alone, That the autumn time has come.

(Oe no Chisato, Ogura Hyakunin Isshu)

Für Katja.

Abstract

Die membrangebundenen Pigment-Proteinkomplexe Photosystem I und II katalysieren in Pflanzen, Algen und Cyanobakterien die oxygene Photosynthese. Bei der Umwandlung der Sonnenenergie in chemisch nutzbare Energie sind eine Vielzahl von Elektronentransferschritten beteiligt, deren spektroskopische Untersuchung Gegenstand dieser Arbeit ist. Untersucht wurden das Photosystem II aus den Organismen *Thermosynechococcus elongatus* und Spinat und das Photosystem I aus dem Cyanobakterium *Acaryochloris marina* mit Hilfe der UV/Vis/NIR-Absorptionsspektroskopie, der ESR-, der Raman- und der transienten Absorptionsdifferenzspektroskopie, gestützt durch quantenmechanische Berechnungen auf dem DFT-Level für das β -Carotin, welches ein wichtiges Pigment in den Photosystemen ist.

Im PS II wurden die Elektronentransferschritte der sekundären Prozesse charakterisiert, die zum Schutz des Systems vor oxidativer Schädigung nach der lichtinduzierten Ladungstrennung durch den primären Donator P_{680}^+ ablaufen. Dabei zeigte sich, dass sich durch Belichtung bei kryogenen Temperaturen ($T < 180 \,\mathrm{K}$) in Abhängigkeit des Oxidationszustandes des Kofaktors Cytochrom b_{559} in fast allen Zentren ein ladungsgetrennter, stabiler Zustand einstellt. Mit Cyt b_{559}^{ox} bilden sich ausschließlich die Zustände Car⁺Q_A⁻ bzw. Chl⁺_ZQ_A⁻. Mit Cyt b_{559}^{red} wird in $\approx 70 \,\%$ der Zentren die Cytochromoxidation beobachtet und zu einem kleinen Teil ebenfalls Carotin- und Chlorophylloxidation. Ein Rest von Zentren verbleibt, die keinen langlebigen Zustand bilden. Während der Zustand Car⁺Q_A⁻ im PS II aus *T. elongatus* unter Belichtung stabil ist, zerfällt er im PS II aus Spinat unter Bildung von Chl⁺_ZQ_A⁻.

Neben diesen Kofaktoren treten im PS II die zwei redoxaktiven Tyrosine Tyr_Z und Tyr_D auf, von denen Tyr_Z eine sehr wichtige Rolle in den primären Elektronentransferschritten spielt, die zur Wasserspaltung führen. Untersucht wurde die Temperaturabhängigkeit der Oxidation der Tyrosine durch P_{680}^+ . Es zeigte sich, dass bei tiefen Temperaturen der Elektronentransfer vom Tyr_Z nicht mehr auftritt, obwohl die bestimmte Aktivierungsenergie nicht dagegen spricht. Dies könnte auf ein Einfrieren für die Oxidation wichtiger Reorganisationsprozesse deuten. Dagegen trat die lichtinduzierte Tyr_D-Oxidation aktivierungslos bis zu Temperaturen von 5 K im größten Teil der Zentren auf, wenn der pH in der PS II-Probe über 8.5 lag.

Die Charakterisierung des Carotins in den Photosystemen wurde durch einen kombinierten Ansatz aus Ramanspektroskopie und DFT-Rechnungen noch erweitert. Die Ramanspektren vom PS II, die dominiert werden von dem Spektrum des β -Carotins, zeigten eine Verschiebung der Bande um 1525 cm⁻¹ mit verschiedenen Anregungswellenlängen des Lasers, was auf eine selektive Anregung von Carotinen in dem Photosystem hindeuten könnte. Ramanspektren vom β -Carotin in Lösung zeigten jedoch den gleichen Effekt, was in Kombination mit den DFT-Rechnungen auf eine unterschiedliche Resonanzverstärkung von zwei dicht benachbarten Moden unter der 1525 cm⁻¹-Bande hinweist.

Für die spektroskopische Charakterisierung des PS I aus A. marina wurden die transiente Absorptionsdifferenzspektroskopie und Redoxtitrationen angewandt. Obwohl A. marina nicht Chl a, sondern Chl d als Hauptpigment bindet, zeigten die Messungen, dass das PS I aus A. marina dem PS I aus Chl a-bindenden Organismen sehr ähnelt. Sowohl die spektroskopischen als auch die kinetischen Daten legen nahe, dass auf der Elektronenakzeptorseite die Eisen-Schwefelcluster und der sekundäre Elektronakzeptor A₁ identisch sind. Auch das neu bestimmte Redoxpotential des primären Donators P₇₄₀ von (450 ± 10) mV ist dem vom P₇₀₀ aus Chl a-bindenden Organismen sehr ähnlich. Über den ebenfalls neu bestimmten Wert des Extinktionsdifferenzkoeffizienten für die Oxidation des primären Donators von (45 ± 4) mM⁻¹cm⁻¹ bei 740 nm wurde das P₇₄₀ zu Chl d Verhältnis in Thylakoidmembranen bestimmt - auf ein P₇₄₀ kommen ungefähr 200 Chl d-Moleküle.

Abstract

In plants, algae and cyanobacteria oxygenic photosynthesis is catalysed by the membraneembedded pigment-protein complexes photosystem I and II. The conversion of sunenergy to chemical usable energy involves a multitude of electron transfer steps, which will be studied spectroscopically in this work. Photosystem II from the organisms *Thermosynechococcus elongatus* and spinach as well as photosystem I from the cyanobacterium *Acaryochloris marina* were examined by means of UV/Vis/NIR-absorption spectroscopy, EPR-, Ramanand transient absorbance difference spectroscopy. Spectroscopic data were supported by quantum mechanical calculations at DFT level for β -carotene, as an important pigment in both photosystems.

In PS II electron transfer steps of secondary processes were studied, which serve as a protection mechanism against oxidative damage by the primary donor P_{680}^+ after lightinduced charge separation. Depending on the oxidation state of Cytochrom b_{559} a stable, charge separated state is formed upon illumination in almost all centres at cryogenic temperatures (T < 180 K). If Cyt b_{559} is initially oxidised exclusively Car⁺Q_A⁻ and Chl⁺_ZQ_A⁻ are accumulated. If Cyt b_{559} is initially reduced cytochrome oxidation in about 70% of the centres and to a smaller extent also carotene and chlorophyll oxidation occurs. A fraction of centres lacks the ability to create long-lived states. Whereas Car⁺Q_A⁻ is stable under illumination in PS II of *T. elongatus* it decays in PS II of spinach by forming Chl⁺_ZQ_A⁻.

PS II also includes two redox active tyrosine Tyr_Z and Tyr_D . Tyr_Z plays a major role in primary electron transfer steps, which ultimately lead to water oxidation. The temperature dependence of tyrosine oxidation by P_{680}^+ has been studied. Electron transfer from Tyr_Z seems to be frozen out at low temperatures. This cannot be understood based on activation energy but perhaps in the hindrance of crucial reorganisation processes in the course of oxidation. In contrast activationless Tyr_D oxidation occured in the main part of centres at temperatures as low as 5 K, if the pH of the PS II sample was above 8.5.

The study of β -carotene as a major pigment in both photosystems was extended by a combined approach of Raman spectroscopy and DFT calculations. Raman spectra of PS II are dominated by contributions of β -carotene signals. Upon changing the excitation wavelength a band at 1525 cm^{-1} seems to shift its position, which could be due to selective enhancement of carotenes within the photosystem. However Raman spectra of β -carotene in solution exhibit the same behaviour. In combination with DFT-results this behaviour was assigned to different resonance enhancements of two closely spaced modes underneath the band at $1525 \,\mathrm{cm}^{-1}$.

PS I from A. marina has been studied using transient absorbance difference spectroscopy and redox titrations. Despite the difference in pigment composition, as A. marina exhibits Chl d and not as usual Chl a as main pigment, PS I from A. marina resembles closely PS I from Chl a-binding organisms. Spectroscopic and kinetic data strongly suggest that the iron-sulphur-clusters as well as the secondary acceptor A₁ are virtually identical. The midpoint potential of the primary donor P₇₄₀ has been reassessed. A value of (450 ± 10) mV was found, which is very similar to that found for P₇₀₀ in Chl a-dominated organisms. In addition the extinction difference coefficient for the oxidation of the primary donor has been determined and a value of (45 ± 4) mM⁻¹cm⁻¹ at 740 nm was obtained. Based on this value the ratio of P₇₄₀ to chlorophyll d was calculated to be 1 : \approx 200 in thylakoid membranes.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

- SCHENDERLEIN, M.; ÇETIN, M.; BARBER, J.; TELFER, A.; SCHLODDER, E.: Spectroscopic studies of the chlorophyll d containing photosystem I from the cyanobacterium, Acaryochloris marina. In: Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1777 (2008), S. 1400–1408
- 2. SCHENDERLEIN, M. ; ÇETIN, ; SCHLODDER, E. ; BENSON, S. ; SHARMA, P.K. ; BARBER, J. ; TELFER, A.: Reassessment of the redox potential of P740: The primary electron donor in photosystem I of the chlorophyll *d* containing cyanobacterium, *Acaryochloris marina*. In: *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis Research 2007* Springer Verlag, 2008, S. 219–222
- SCHENDERLEIN, M. ; MROGINSKI, M.A. ; ÇETIN, M. ; SCHLODDER, E.: Low quantum yield electron transfer pathways in PS II. In: *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis Research 2007* Springer Verlag, 2008, S. 191–195
- 4. TSCHIRNER, N. ; BROSE, K. ; SCHENDERLEIN, M. ; ZOUNI, A. ; SCHLODDER, E. ; MROGINSKI, M.A. ; HILDEBRANDT, P. ; THOMSEN, C.: The anomaly of the ν_1 -resonance Raman band of β -carotene in solution and in photosystem I and II. In: *Phys. Status Solidi B* 246 (2009), S. 2790–2793
- 5. TSCHIRNER, N. ; SCHENDERLEIN, M. ; BROSE, K. ; SCHLODDER, E. ; MROGINSKI, M.A. ; HILDEBRANDT, P. ; THOMSEN, C.: Raman excitation profiles of β -carotene novel insights into the nature of the ν_1 -band. In: *Phys. Status Solidi B* 245 (2008), S. 2225–2228
- 6. TSCHIRNER, N. ; SCHENDERLEIN, M. ; BROSE, K. ; SCHLODDER, E. ; MROGINSKI, M.A. ; THOMSEN, C. ; HILDEBRANDT, P.: Resonance Raman spectra of β-carotene in solution and in photosystems revisited: an experimental and theoretical study. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009), S. 11471–11478

Inhaltsverzeichnis

A	Abstract 3						
1 Einleitung							
2	Material und Methoden						
	2.1	Anzue	cht, Solubilisierung und Reinigung der Photosysteme	19			
	2.2	UV/V	⁷ is-Spektroskopie	20			
	2.3	Blitzli	icht-Spektralphotometrie	25			
	2.4	ESR-S	Spektroskopie	29			
	2.5	Rama	n-Spektroskopie	33			
	2.6	QM-F	lechnungen	39			
3	Ergebnisse						
	3.1 Sekundäre Do		däre Donatoren im PS II	45			
		3.1.1	Spektroskopische Methoden zur Charakterisierung der sekundären				
			Donatoren	47			
		3.1.2	Bildung und Zerfall der ladungsgetrennten Zustände	55			
		3.1.3	Tieftemperaturmessungen an pflanzlichem PS II	63			
	3.2	inoxidation	68				
		3.2.1	Temperaturabhängigkeit der Tyrz-Oxidaion $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	69			
		3.2.2	$\mathrm{Tyr}_{Z}\text{-}\mathrm{Oxidation}$ bei tiefen Temperaturen?	70			
		3.2.3	Temperatur- und pH-Abhängigkeit der $\mathrm{Tyr}_{\mathrm{D}}\text{-}\mathrm{Oxidation}$ in PS II $$.	74			
	3.3	Rama	nspektroskopie und QM-Rechnungen am Carotin	81			
		3.3.1	DFT-Rechnungen am neutralen Carotin	81			
		3.3.2	DFT-Rechnungen am Carotinkationradikal	85			
		3.3.3	Ramananregungsprofil von Carotin in Lösung	87			
		3.3.4	Ramanan regungs profil von Carotin in der Proteinumge bung von PS ${\rm I}$				
			und PS II	92			
	3.4	Spekt	roskopische Charakterisierung des PS I aus <i>A. marina</i>	95			

	3.4.1	Absorptionsdifferenzspektroskopie bei Raumtemperatur	96		
	3.4.2	Bestimmung des Mittelpunktpotentials von P_{740}	101		
	3.4.3	Absorptions differenzspektroskopie bei tiefen Temperaturen $\ . \ . \ .$	104		
4	Zusammer	nfassung	109		
Aı	Anhang				
A	Abkürzun	gsverzeichnis und verwendete Pufferlösungen	113		
в	Appendix	zu Kap. 3.1	117		
С	Appendix	zu Kap. 3.3	121		
D	Appendix	zu Kap. 3.4	131		
Al	Abbildungsverzeichnis				
\mathbf{Li}	Literaturverzeichnis				
Da	Danksagung				

Kapitel 1

Einleitung

Die Voraussetzungen für unsere Existenz sind über Jahrmillionen durch den Vorgang der Photosynthese entstanden. Durch diesen Prozess bildete sich eine sauerstoffreiche Atmosphäre, womit die Grundlage für die schützende Ozonschicht in der Stratosphäre gelegt wurde. Diese Ereignisse ermöglichten erst die Entstehung des höheren Lebens in seiner heutigen Form auf der Erde. Zusätzlich brachten die Produkte der Photosynthese im Laufe von über 2 Milliarden Jahren die fossilen Brennstoffe Kohle, Erdöl und Erdgas hervor, die heutzutage die primären Energieträger der menschlichen Gesellschaft sind. Die immer weiter wachsende Bevölkerung und der drastische Ausbau der Industrialisierung in den letzten Jahrhunderten haben zu einem stetig anwachsenden Energieverbrauch geführt, der in einem raschen Abbau dieser nur begrenzt vorkommenden, wertvollen Ressourcen mündet [82]. Die Energiegewinnung aus den kohlenstoffreichen Brennstoffen löste ein Anwachsen des Kohlenstoffdioxidgehalts in der Atmosphäre aus. Ein Gas, welches eine wichtige Rolle als Treibhausgas in dem globalen Klimawandel spielt [81]. Um die Emission von CO_2 zu verringern und weil es von den fossilen Brennstoffen nur einen endlichen Vorrat auf der Welt gibt, ist es für die Zukunft unausweichlich, dass der Energieverbrauch durch alternative Quellen gedeckt werden muss.

Eine offensichtliche Möglichkeit ist die Nutzung des Sonnenlichtes, dessen auf die Erdoberfläche eingestrahlte Energie den Bedarf der Menschheit um ein Vielfaches übertrifft [109]. Die Umwandlung der Energie in einen brauchbaren Treibstoff, der den globalen Energiebedarf decken kann, muss von billigen, in Überschuss vorhandenden Materialien ausgehen. Eine idealer Rohstoff, der diese Voraussetzungen erfüllt, ist Wasser, welches sich in Wasserstoff und Sauerstoff spalten lässt. Die Verbrennung von Wasserstoff erzeugt wiederum nur Wasser, was Wasserstoff zu einem idealen Brennstoff macht. Wie so oft könnte die Natur den Weg weisen, um die effiziente, lichtgetriebene Wasserspaltung in einem großen Maßstab zu verwirklichen. In der oxygenen Photosynthese von Cyanobakterien, Algen und Pflanzen wird der Prozess der Wasserspaltung in Sauerstoff und Protonen durch den Pigment-Proteinkomplex Photosystem II katalysiert [202]. Viele Grünalgen und Cyanobakterien enthalten zudem das Enzym Hydrogenase, welches die freigesetzten Protonen in molekularen Wasserstoff umwandeln kann [112, 195]. Eine profunde Kenntnis der dabei auftretenden Prozesse könnte es ermöglichen, künstliche Systeme zu erschaffen, die in der Lage sind, Wasserspaltung und Wasserstoffproduktion im großen Maßstab zu verwirklichen und im Gegensatz zu den isolierten Enzymen nicht unter stark begrenzten Lebensdauern leiden.

Diese Arbeit soll ihren Teil dazu beitragen, das Wissen über grundlegende Prozesse der Photosynthese zu vertiefen. Im Besonderen geht es dabei um Elektronentransferprozesse in den beiden für die Umwandlung der Sonnenenergie in chemisch nutzbare Energie hauptveranwortlichen Pigment-Proteinkomplexen Photosystem I und II (PS I und PS II). Die Photosysteme sind in die Thylakoidmembranen von Cyanobakterien, Algen und Pflanzen eingebettet, wo sie die oxygene Photosynthese katalysieren (siehe Abb. 1.1). Durch diesen Prozess sind die photosynthetischen Organismen in der Lage, die Energie des Sonnenlichts zu nutzen, um energiereiche Verbindungen zu erzeugen, mit deren Hilfe sie die Synthese des organischen Materials durchführen. Die allgemeine Summengleichung dafür ist:

$$6 \operatorname{H}_2 \operatorname{O} + 6 \operatorname{CO}_2 \xrightarrow{h\nu} \operatorname{C}_6 \operatorname{H}_{12} \operatorname{O}_6 + 6 \operatorname{O}_2 \tag{1.1}$$

Die grundlegenden Schritte beginnen bei der Anregung des Photosystem II durch Licht, was schlussendlich zur Wasserspaltung führt.

$$2 \operatorname{H}_2 O \xrightarrow{h\nu} 4 \operatorname{H}^+ + 4 \operatorname{e}^- + O_2 \tag{1.2}$$

Eine detaillierte Betrachtung der einzelnen dabei auftretenden Schritte erfolgt später. Die Protonen verbleiben im Lumen, also im inneren Raum der Thylakoide. Jeweils zwei der Elektronen bilden mit zwei Protonen aus dem Stroma aus einem schwach ans PS II gebundenem Plastochinon (PQ) ein Hydrochinol (PQH₂), welches zum Cyt b_6f -Komplex diffundiert. Dort wird es wieder zum Plastochinon reoxidiert. Die Elektronen werden durch ein Plastocyaninmolekül (PC) bzw. ein Cytochrom c_6 in einigen Cyanobakterien weiter zum PS I transportiert. Das Photosystem I wird ebenfalls durch Licht angeregt und auch hier wird ein Elektron über die Membran zur stromalen Seite transportiert. Dort gelangt es zum Ferredoxin (Fd), welches es zur Ferredoxin:NADP⁺-Reduktase (FNR) bringt. An dieser Einheit wird dann aus NADP⁺ das Reduktionsagens NADPH erzeugt. Es besteht auch die Möglichkeit, dass das Elektron durch das Ferredoxin zurück zum Cyt b_6f -Komplex transferiert wird, um dann wieder über das Plastocyanin zum PS I gebracht zu werden. Bei diesem zyklischen Elektronentransport werden weitere Protonen aus dem Stroma ins Lumen translokiert. Da auch schon an anderen Stellen Protonen ins Lumen abgegeben wurden, stellt sich ein elektrochemischer Potentialgradient der Protonen über die Mem-



Abbildung 1.1 Schema der Elektronentransferkette in der Thylakoidmembran. PS II-Struktur aus [59], Cyt $b_6 f$ -Komplexstruktur aus [8], PS I-Struktur aus [91], FNR-Struktur aus [168], ATP-Synthase zusammengesetzt aus den Strukturen [54, 142, 199, 34], PQ: Plastochinonpool, PC: Plastocyanin, Fd: Ferredoxin.

bran ein¹. Diesen nutzt die ATP-Synthase aus. Die Protonen wandern durch sie hindurch zum Stroma und treiben die Synthase dabei wie einen Motor an. Darüber wird schließlich aus Adenosindiphosphat (ADP) und einem Phosphatrest (P_i) Adenosintriphosphat (ATP) gebildet. Die Spaltung von ATP in ADP und P_i liefert dann für die weiteren Syntheseschritte, die in den lichtunabhängigen Reaktionen ablaufen, die nötige Energie.

Auf die lichtinduzierten Reaktionen in den beiden Photosystemkomplexen soll im folgenden näher eingegangen werden ([37, 148] geben einen detaillierten Überblick), da sie die Grundlage der Untersuchungen dieser Arbeit sind. Abb. 1.2 zeigt das Reaktionszentrum des PS II mit den wichtigsten Kofaktoren, die hauptsächlich über die D1- und D2-Untereinheiten des PS II gebunden werden. Trifft nun Licht auf das PS II werden die Antennenchlorophylle und -carotine angeregt.

Die Anregungsenergie gelangt dann über einen Exzitonentransfer in das Reaktionszentrum zu dem aus mehreren Molekülen gebildeten P_{680} , welches seine Bezeichnung der im Zuge der Ladungstrennung auftretenden Ausbleichungsbande in der Absorption um 680 nm verdankt [39, 40]. Gegenstand der Diskussion ist dabei noch, welche Pigmente unter dem Begriff P_{680} zusammengefasst werden. Der ursprünglichen Ansicht nach handelt es sich beim P_{680} um ein Dimer, was sich aus den beiden Chl *a* Molekülen P_{D1} und P_{D2} zusammensetzt [16, 14, 41, 106, 135, 193, 93]. Andere Arbeiten gehen von einem Multimer-Modell aus, bei dem das Dimer-Modell um die beiden Chlorophylle Chl_{D1} und Chl_{D2} und die Pheophytine Pheo_{D1} und Pheo_{D2} erweitert wird [42, 108, 139, 143, 145, 149]. Aus dem

¹Engl. proton motive force.



Abbildung 1.2 Anordnung der Kofaktoren im Reaktionszentrum von PS II aus [59].

angeregten Zustand P_{680}^* , der hauptsächlich auf Chl_{D1} lokalisiert ist [38, 145], kommt es im Femto- bis Pikosekundenbereich zu einer Ladungstrennung, bei der der Zustand P_{680}^+ Pheo⁻ gebildet wird [57, 79, 144]. Das Kation ist zum größeren Teil auf P_{D1} und zu einem kleineren Teil auch auf P_{D2} lokalisiert [134, 151, 182]. Das Elektron wird in ungefähr 200 ps weiter zu dem festgebundenen Plastochinon Q_A übertragen [9, 22, 79, 124, 175]. Die finale Station auf der Elektronenakzeptorseite ist nach 100 µs das locker gebundene Q_B [153].

Das oxidierte P₆₈₀ hat mit rund 1.2 V ein extrem hohes Redoxpotential [83, 141], was in der Natur dazu führt, dass die D1-Untereinheit im Stundentakt ausgetauscht und das Reaktionszentrum neu assembliert werden muss [119, 177]. P₆₈₀ erhält in der primären Reaktionskette sein Elektron über das redoxaktive Tyrosin Tyr_Z von dem benachbarten Mangan-Calciumcluster². Damit befindet sich auf dem Mn₄Ca-Cluster ein Oxidationsäquivalent und die negative Ladung auf dem Chinon Q_B. Bei erneuter Anregung des Reaktionszentrums durch ein Photon laufen die gleichen Reaktionen erneut ab, so dass sich nun zwei Elektronen auf Q_B befinden. Mit zwei Protonen aus dem Stroma bildet sich aus dem Chinon-Anion ein Hydrochinon, welches dann die Bindungstasche in Richtung des Cyt b_6f -Komplexes verlässt und durch ein neues Chinonmolekül ersetzt wird. Dabei handelt es sich möglicherweise um das ebenfalls in der Röntgenstruktur identifizierte Q_C.

²OEC, engl. oxygen evolving complex oder auch WOC, engl. water oxidizing complex.



Abbildung 1.3 Schema des Kokzyklus mit dem das Durchlaufen der einzelnen S-Zustände des Mangan-Calciumclusters nach Lichtanregung mit den jeweiligen Halbwertszeiten beschrieben wird, bis zu dem Übergang vom S_3 - in den S_0 -Zustand, bei dem Sauerstoff freigesetzt wird.

Auf der Elektronendonorseite befinden sich nun gleichzeitig zwei Oxidationsäquivalente auf dem OEC. Durch zwei weitere Photonen sind schlussendlich vier Elektronen übertragen worden und am OEC haben sich dementsprechend vier Oxidationsäquivalente angesammelt. Dieses sukzessive Erhöhen der Oxidationsäquivalente des OEC wird durch den Kokzyklus beschrieben [103] (siehe Abb. 1.3). Dabei geht mit jedem Photon der Zyklus eine Stufe weiter - von S_0 nach S_1 , dann S_2 und schließlich S_3 . Mit der nächsten Anregung geht es über den S₄-Übergangszustand wieder in den S₀-Zustand. Bei diesem Schritt wird der Elektronenmangel durch die Spaltung eines Wassermoleküls unter Sauerstoffentwicklung in Protonen und eben Elektronen ausgeglichen. Die Sauerstoffausbeute nach Blitzlichtanregung zeigt dementsprechend eine charakteristische Oszillation mit einer Periode von 4 und einer maximalen Ausbeute nach dem 3., 7., 11., ... Blitz. Das erste Maximum bereits nach dem 3. Blitz deutet darauf hin, dass in dunkeladaptierten Proben hauptsächlich der S₁-Zustand vorliegt [89, 103]. Das ursprüngliche Schema des Kokzyklus (Abb. 1.3) wird in aktuellen Arbeiten noch erweitert. Dabei wird einerseits neben dem Mangan-Calciumcluster auch das redoxaktive Tyrosin Tyr_Z mit berücksichtigt und andererseits eventuell auftretende weitere Zwischenzustände mit einbezogen [65, 77, 183].

Neben den in der primären Reaktionskette involvierten Molekülen befinden sich noch eine Reihe weiterer Kofaktoren im Reaktionszentrum des PS II. Dabei handelt es sich um weitere Chlorophylle ($Chl_{Z,D1}$ und $Chl_{Z,D2}$), ein Pheophytin ($Pheo_{D2}$), ein Cytochrom



Abbildung 1.4 Anordnung der Kofaktoren im Reaktionszentrum von PS I aus [91].

 $(Cyt b_{559})$, ein weiteres redoxaktives Tyrosin (Tyr_D) und einige Carotine $(Car_{D1}, Car_{D2} und Car_{15})$. Die Rolle dieser Kofaktoren ist bei weitem noch nicht so gut verstanden. Diskutiert wurde zum Beispiel, dass der Oxidationszustand von Tyr_D eine Rolle bei der Verteilung des geladenen Zustandes von P₆₈₀ auf P_{D1} und P_{D2} spielt, so dass mit oxidiertem Tyr_D die positive Ladung verstärkt auf P_{D1} liegt [37, 44, 154]. Eine mögliche Funktion der Chlorophylle, der Carotine und des Cyt b_{559} besteht im Schutz des Reaktionszentrums vor photoinduzierten Schäden, insbesondere in Situationen, in denen P⁺₆₈₀ akkumuliert wird. Die dabei auftretenden Prozesse lassen sich aber unter physiologischen Bedingungen nur schwer untersuchen, da sie sehr stark von den primären Reaktionen überlagert werden. Es bietet sich daher an, Bedingungen zu wählen, bei denen die primäre Reaktionskette blockiert ist. Dies geschieht zum Beispiel bei Untersuchungen des Photosystem II bei kryogenen Temperaturen (T < 180 K). Bei diesen Temperaturen lassen sich dann gut die sekundären Reaktionen und die involvierten Kofaktoren studieren. Im Kapitel 3.1 "Sekundäre Donatoren im PS II" wird darauf näher eingegangen.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden die Elektronentransferreaktionen im Photosystem I untersucht ([127] gibt einen detaillierten Überblick). Diese laufen im Prinzip analog zu den Primärreaktionen im PS II ab, das heißt, die Lichtanregung löst einen Elek-



Chlorophyll a

Chlorophyll d

Abbildung 1.5 Strukturformeln für Chlorophyll a, das in den meisten photosynthetischen Organismen das Hauptpigment darstellt und Chlorophyll d, welches in dem Cyanobakterium *Acaryochloris marina* das Hauptpigment ist. Der Unterschied zwischen den Chlorophyllen ist der Austausch der Vinylgruppe in Chl a an der C-3 Position des Ring A durch eine Formylgruppe in Chl d (rot eingekreist).

tronentransfer quer über die Membran zur stromalen Seite hin aus. Der Aufbau der Reaktionszentren unterscheidet sich jedoch in einigen Punkten (s. Abb. 1.2 und 1.4). So sind im PS I die terminalen Elektronenakzeptoren kein Chinon, sondern drei Eisen-Schwefelcluster (F_X , F_A und F_B) [18], die Chinone selber ändern sich nur wenig von Plasto- zu den Phyllochinonen $Q_{k,A}$ und $Q_{k,B}$, anstelle der Pheophytine stehen die beiden Chlorophylle (eC_{A3} und eC_{B3}) und die sekundären Kofaktoren fehlen völlig.

Der Elektronentransfer startet von dem angeregten Zustand eines Chlorophylldimers das P_{700} , welches sich aus den beiden Chlorophyllmolekülen eC_{A1} und eC_{B1} zusammensetzt. Innerhalb von rund 1.5 ps wird das Elektron auf den primären Akzeptor A₀ übertragen [191, 64], welcher entweder durch eins oder beide Chlorophylle eC_{A3} bzw. eC_{B3} gebildet wird [91]. Der Transfer zum sekundären Akzeptor A₁, ein Phyllochinon, erfolgt in ungefähr 30 ps [69, 158]. Der Elektronentransfer zum F_X zeigt eine zweiphasige Kinetik mit Halbwertszeiten von 20 ns und 250 ns, welche als Beleg dafür gewertet wurden, dass das Elektron sowohl vom $Q_{k,A}$ als auch vom $Q_{k,B}$ aus übertragen wird [19, 58]. Der weitere Weg und die Reihenfolge, in welcher F_A und F_B involviert sind, ist noch nicht abschließend geklärt [55]. Auf der lumenalen Seite erhält das P_{700}^+ ein Elektron von dem kleinen Elektronenüberträgerprotein Plastocyanin oder Cytochrom c_6 in Cyanobakterien. Das in dieser Arbeit untersuchte PS I stammt aus dem Organismus Acaryochloris marina. Dieses Cyanobakterium unterscheidet sich stark von den anderen photosynthetischen Organismen, da es als Hauptpigment nicht Chl a, sondern Chl d aufweist [126]. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Molekülen liegt in der Änderung der Vinylgruppe in Chl a zu einer Formylgruppe in Chl d (siehe Abb. 1.5).

Diese Modifikation führt zu einer recht drastischen Anderung in dem Absorptionsverhalten des Chl *d*. So verschiebt sich zum Beispiel die Lage des Maximums der Q_y -Bande von 664 nm (Chl *a* in Aceton) um 25 nm nach 689 nm (Chl *d* ebenfalls in Aceton). In der Proteinmatrix des Photosystems fällt dieser Effekt sogar noch stärker aus. Der primäre Donor zeigt eine Ausbleichung in der Absorption nach der Ladungstrennung bei 740 nm, was ein Rotverschiebung um 40 nm im Vergleich zum primären Donor P₇₀₀ in Chl *a*-bindenden Organismen ausmacht [80]. Nach der Lage der Ausbleichung wird er daher P₇₄₀ genannt.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Anzucht, Solubilisierung und Reinigung der Photosysteme

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben von Photosystem I und II wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. PS I und II aus dem Organismus *T. elongatus* wurden in der Gruppe von Prof. Dr. Athina Zouni, TU Berlin präpariert. PS I und II aus *A. marina* stammten aus der Zusammenarbeit mit Dr. Alison Telfer, Imperial College London und mit Dr. Hann-Jörg Eckert, TU Berlin. Photosystem II Proben aus Spinat (*S. oleracea*) wurden von Prof. Dr. Klaus-Dieter Irrgang, Beuth Hochschule für Technik Berlin bereitgestellt.

T. elongatus - PS II

Die Anzucht des Cyanobakteriums *T. elongatus* erfolgte in einem PBR25 Photobioreaktor unter kontinuierlicher Belichtung durch 2 bis 12 Leuchtstoffröhren und unter einem Kohlenstoffdioxid-Fluss. Die angezogenen Zellen wurden gesammelt und aufgeschlossen. Die Thylakoidmembranen wurden solubilisiert und nach Isolierung und Aufreinigung mit dem Detergens β -DM (*n*-Dodecyl- β -D-Maltosid) und FPLC¹ wurden die PS II Kernkomplexe² erhalten. Eine detaillierte Beschreibung befindet sich in [98]. Es wurden sehr aktive dimere PS II Komplexe einer sehr hohen Qualität erhalten, an deren Kristallen die bis dato am besten aufgelöste Röntgenstrukturanalyse durchgeführt wurde [59]. Bis zu ihrer Verwendung in den Experimenten wurden die PS II Proben in einem Puffer (100 mM PIPES-NaOH, pH 7, 5 mM CaCl₂ und 0.03 % (m/m) β -DM) mit einer Chlorophyllkonzentration von 4 mM bei 77 K gelagert.

¹FPLC, engl. fast protein liquid chromatography.

²PS IIcc, engl. core complexes.

T. elongatus - PS I

Die Anzucht der Zellen erfolgte analog zur Präparationsvorschrift von PS II. Die Thylakoidmembranen wurden ebenfalls mit β -DM solubilisiert und die PS I Trimere wurden durch HPLC³ abgetrennt und aufgereinigt. Die genaue Beschreibung befindet sich in [52]. Auch Kristalle aus den hierbei erhaltenen trimeren PS I-Komplexen weisen eine sehr hohe Qualität auf, die es ermöglichte, die Röntgenstruktur bis zu einer Auflösung von 2.5Å zu bestimmen [91]. Die Proben wurden bei 77 K in einem Puffer (20 mM MES, pH 6.8 und 0.02% (m/m) β -DM) bei einer Chlorophyllkonzentration von 4 mM aufbewahrt.

A. marina - PS II & PS I

Die Zellen des Cyanobakteriums Acaryochloris marina wurden unter schwacher Belichtung in künstlichem Seewasser angezogen [29, 163]. Die Präparation der Thylakoidmembranen ist in [30] beschrieben. Die in 1 % β -DM solubilisierten Membranen wurden über eine Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation fraktioniert, wobei drei Hauptbanden und mehrere schwächere, schwerere Banden erhalten wurden. Die oberste Fraktion (als F1 bezeichnet) enthält dabei die Pcb Proteine und Carotin, die zweite (F2) weist sowohl PS II als auch PS I auf, wahrscheinlich in monomerer Form und die dritte (F3) enthält zum größten Teil trimeres PS I und im geringeren Maße dimeres PS II. Die schwereren Banden sind mit Superkomplexen von zwei PS II Dimeren und Pcb Proteinen angereichert. Für Experimente mit PS I wurde die gesammelte und aufkonzentrierte F3 Fraktion benutzt, während für Versuche mit PS II die konzentrierten schwereren Fraktionen genommen wurden. Die Proben wurden bei -80° C gelagert.

S. oleracea - PS II

Die Experimente wurden an PS IIcc Proben durchgeführt, deren Präparation in [60] beschrieben ist. Die PS II Komplexe wurden aus den Thylakoidmembranen durch eine Behandlung mit β -DM extrahiert und über eine Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von den anderen Proteinkomplexen abgetrennt.

2.2 UV/Vis-Spektroskopie

In der UV/Vis/NIR-Spektroskopie wird das Absorptionsverhalten von Molekülen im ultravioletten, im sichtbaren und im nahen Infrarot-Bereich des Lichts untersucht. Sie ist damit die vielleicht in ihrer Anwendung am einfachsten nachvollziehbare spektroskopische Methode, die ihre unmittelbare Entsprechung in der Natur im Schvorgang bei Mensch und

³HPLC, engl. high performance liquid chromatography.

Tier hat. Dabei werden die Dinge gerade in den Farben aus dem Wellenlängenbereich wahrgenommen, in dem der Stoff nicht absorbiert. So erscheinen zum Beispiel die Blätter der Pflanzen grün, da das Blattgrün bzw. die Chlorophyllmoleküle grünes Licht nicht absorbieren. Sie weisen vielmehr im blauen und im roten Spektralbereich Absorptionsbanden auf, die Soretbande um 430 nm und die Q_y -Bande um 664 nm. Die genaue Lage der Banden hängt von der Umgebung ab, in der sich die Chlorophyllmoleküle befinden.



Abbildung 2.1 Absorptionsspektrum vom Chlorophyll *a* gelöst in einem Aceton/Wasser-Gemisch.

So liegt zum Beispiel das Q_y -Absorptionsmaximum vom Chlorophyll *a* im Photosystem I und II aus dem Cyanobakterium *T. elongatus* bei 680 nm bzw. 674 nm [121]. Abb. 2.1 zeigt das Absorptionsspektrum von Chlorophyll *a* gelöst in einem Gemisch aus 80 % Aceton und 20 % Wasser. Die Größe der Absorption $A(\lambda)$ hängt bei stark verdünnten Lösungen nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz linear von der Konzentration der Moleküle *c*, ihrer Schichtdicke *d* und dem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$ ab:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \tag{2.1}$$

Im Spektrometer wird die Absorption als Funktion der Wellenlänge λ als Abschwächung des Messlichtstrahls gemessen. Es gilt:

$$A(\lambda) = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{100\%}{T}$$
(2.2)

mit der Intensität des Strahls vor der Probe I_0 und der durch die Probe abgeschwächten Messlichtintensität I. Eine Absorption von eins bedeutet zum Beispiel nach Gl. 2.2, dass



Abbildung 2.2 Schematischer Aufbau des Cary 1E UV/Vis Spektrometers von Varian, Inc.

nur noch 10 % des Lichts die Probe verlassen bzw. die Probe eine Transmission T von 10 % aufweist.

In Abb. 2.2 wird schematisch der Aufbau des verwendeten UV/Vis Spektrometers (Cary 1E von Varian, Inc.) dargestellt. Das Gerät wird im Zwei-Strahl-Modus betrieben, dabei wird der von der Messlichtquelle emittierte Strahl durch einen Strahlteiler in einen Referenzstrahl und den eigentlichen Messlichtstrahl aufgespalten. Die Absorption ergibt sich dann aus dem Verhältnis der Intensitäten der beiden Strahlen analog zum Ein-Strahl-Spektrometer und Gl. 2.2. Die Wellenlänge des Strahls wird über einen Czerny-Turner-Gittermonochromator eingestellt, die spektrale Bandbreite über variable Spalte. Schließlich ergibt sich ein messbarer Wellenlängenbereich von 190 nm bis 900 nm. Für Messungen noch weiter im nahem Infrarot (NIR) wurde das Cary 50 (Varian, Inc.) Spektrometer benutzt. Es erweitert den Messbereich auf 1100 nm.

Wird Licht in diesem Wellenlängenbereich vom UV bis NIR von Molekülen absorbiert, können durch die Energie der Photonen die Elektronen angeregt werden. Dabei geht ein Elektron von einem Orbital in ein energetisch höher gelegenes Orbital über. Das energetisch niedriger gelegene Orbital ist bei Raumtemperatur für die meisten Moleküle der elektronische Grundzustand, da die Energiedifferenz $\Delta E = E_1 - E_0$ zwischen elektronischem Grundzustand E_0 und dem ersten angeregten Zustand E_1 meist zu groß ist, als dass der angeregte Zustand durch die Energie der Umgebung kT merklich besetzt wird. Der Zusammenhang des Verhältnisses der Besetzungszahlen N wird durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben:

$$\frac{N_1}{N_0} = e^{-\frac{E_1 - E_0}{kT}}$$
(2.3)

Beim Ubergang in den elektronisch angeregten Zustand werden häufig auch Schwingungsund Rotationszustände mit angeregt, so dass sich die gesamte Energieänderung des Systems aus einem elektronischen, einem vibronischen und einem rotatorischen Anteil zusammensetzt:

$$\Delta E_{qes} = \Delta E_{el} + \Delta E_{vib} + \Delta E_{rot} \tag{2.4}$$

Im UV/Vis-Spektrum der Moleküle in Lösung können die Rotationsstrukturen normalerweise nicht aufgelöst werden und man sieht nur das (verbreiterte) elektronische Spektrum mit einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Auflösung der Schwingungsstruktur. In hochaufgelösten Gasphasenspektren lassen sich hingegen auch die von Schwingungs- und Rotationsübergängen verursachten Banden beobachten. Die Schwingungsstruktur hängt davon ab, wie groß die Verschiebung der Potentialkurve des angeregten Zustands gegenüber der des Grundzustands ist. Sind sie stark gegeneinander verschoben, weist das Spektrum eine starke Schwingungsstruktur (Progression) auf. Welche Schwingungsübergänge nun mit welcher Intensität auftauchen, geht aus dem Franck-Condon-Prinzip hervor. Man geht im Rahmen der Born-Oppenheimer-Näherung davon aus, dass die Kerne während der Zeit des elektronischen Übergangs ihre Lage nicht verändern. Am Ende der Elektronenverschiebung wirkt auf die Kerne aber ein neues Kraftfeld, welches sie veranlasst zu schwingen. Ihre ursprüngliche Lage ist dabei ein Umkehrpunkt der Schwingung um die Gleichgewichtslage im angeregten Zustand. Da die Kerne sich während des elektronischen Überganges nicht bewegen, entspricht der Übergang der senkrechten blauen Linie in Abb. 2.3, man bezeichnet ihn auch als vertikalen Übergang.

In der quantenmechanischen Vorstellung werden die Wellenfunktionen des Systems vor (Ψ_A) und nach (Ψ_E) dem Übergang betrachtet. Diese liefern in dem Integral

$$\boldsymbol{\mu}_{\mathrm{EA}} = -\mathrm{e} \int \Psi_{\mathrm{E}}^* \boldsymbol{r} \Psi_{\mathrm{A}} \,\mathrm{d}\tau \tag{2.5}$$



Abbildung 2.3 Darstellung des Franck-Condon-Prinzips. Gezeigt sind die wahrscheinlichsten Übergange zwischen den vibronischen Zuständen - mit den größten Franck-Condon-Faktoren - bei den elektronischen Übergangen $S_0 \rightarrow S_1$ und $S_1 \rightarrow S_0$.

einen Ausdruck für das Übergangsdipolmoment $\boldsymbol{\mu}_{\text{EA}}$, dessen Quadrat $|\boldsymbol{\mu}_{\text{EA}}|^2$ proportional zur Intensität des Übergangs ist. Die Gesamtwellenfunktionen des Anfangs- und des Endzustandes lassen sich in guter Näherung als Produkte der jeweiligen elektronischen (Ψ_{el} bzw. $\Psi_{el'}$ für den angeregten Zustand) und der Schwingungswellenfunktionen (Ψ_{vib} bzw. $\Psi_{vib'}$) darstellen. Es ergibt sich dann:

$$\boldsymbol{\mu}_{\text{EA}} = -e \int \Psi_{el'}^*(\boldsymbol{r}) \Psi_{vib'}^*(\boldsymbol{R}) \, \boldsymbol{r} \, \Psi_{el}(\boldsymbol{r}) \Psi_{vib}(\boldsymbol{R}) \, \mathrm{d}\tau_{e} \, \mathrm{d}\tau_{N}$$

$$= -e \int \Psi_{el'}^*(\boldsymbol{r}) \, \boldsymbol{r} \, \Psi_{el}(\boldsymbol{r}) \, \mathrm{d}\tau_{e} \int \Psi_{vib'}^*(\boldsymbol{R}) \Psi_{vib}(\boldsymbol{R}) \, \mathrm{d}\tau_{N}$$
(2.6)

mit den Koordinaten der Elektronen r und der Kerne R. Der erste Faktor in Gl. 2.6 gibt Aufschluss über die Größe der Umverteilung der Elektronendichte während des Übergangs, während der zweite Faktor ein Maß der Ähnlichkeit der Kernanordnungen im elektronischen Grund- und angeregten Zustand ist. Er wird auch als Überlappungsintegral $S_{vib',vib}$ bezeichnet:

$$S_{vib',vib} = \int \Psi_{vib'}^*(\boldsymbol{R}) \Psi_{vib}(\boldsymbol{R}) \,\mathrm{d}\tau_{\mathrm{N}}$$
(2.7)

Analog zum Übergangsdipolmoment ist die Intensität des Übergangs auch proportional zum Quadrat des Überlappungsintegrals $S^2_{vib',vib}$, dem sogenannten Franck-Condon-Faktor. Je gößer die Überlappung der Schwingungswellenfunktionen des elektronischen Grund- und angeregten Zustands ist (siehe auch Abb. 2.3), um so größer ist die Absorptionsintensität des kombinierten elektronischen und vibronischen Übergangs.

2.3 Blitzlicht-Spektralphotometrie

Im Gegensatz zur der Absorptionsspektroskopie, zum Beispiel im UV/Vis-Bereich, handelt es sich bei der Blitzlicht-Spektralphotometrie um eine Absorptions*differenz*spektroskopie. Bleiben die grundlegenden Prinzipien also gleich, werden nun die Änderungen der Absorption einer Probe betrachtet, ausgelöst durch eine externe Störung des Systems. Dabei kann es sich entweder um einen kurzen, intensiven Lichtblitz einer Blitzlampe oder um einen Laserpuls handeln. Der Lichtpuls bewirkt in der Probe photochemische Reaktionen, in deren Folge sich das Absorptionsverhalten der involvierten Pigmente direkt und über z.B. elektrochrome Effekte auch indirekt ändern kann. Die auftretenden Absorptionsänderungen werden zeitaufgelöst und in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Messlichtes gemessen. Aus dem Zeitverlauf lassen sich Informationen über die Kinetik der blitzinduzierten Prozesse ableiten und über die dazugehörigen Absorptionsdifferenzspektren Aussagen über die beteiligten Pigmente machen.

Abb. 2.4 zeigt den schematischen Aufbau des Blitzlicht-Spektralphotometers, bei dem als Anregungslichtquelle eine Blitzlampe mit einer Gasentladungsröhre verwendet wird. Zur Bestimmung des Absorptionsdifferenzspektrums werden die blitzinduzierten Absorptionsänderungen über die Zeit in Abhängigkeit der Wellenlänge des Messlichtes gemessen. Das zur Erzeugung des dafür notwendigen monochromatischen Messlichtstrahles dienende Messlichtsystem besteht aus einer Gleichstrom-Glühlampe und einem Gittermonochromator. Die Messlichtleistung I(t) des aus der Probe austretenden Lichtes wird durch einen Photomultiplier gemessen. Das Licht wird unter Ausnutzung des photoelektrischen Effekts an der Photokathode in einen Photostrom i(t) umgewandelt, der durch Sekundärelektronenemission vervielfacht wird und dann am Arbeitswiderstand zu einem Spannungsabfall U(t) führt, der proportional zur Messlichtleistung ist und als Signal vom Transientenrekorder (Tektronix TDS 320) aufgezeichnet wird. Aus der Änderung der Messlichtleistung



Abbildung 2.4 Schematischer Aufbau des Blitzlichtspektrometers mit einer Blitzlampe als Anregungslichtquelle. Für die bessere Übersichtlichkeit sind optische Elemente, wie Linsen und Spiegel nicht dargestellt.

und somit auch aus der Änderung der Spannung lässt sich dann die Absorptionsänderung der Probe $\Delta A(t)$ zum Zeitpunkt t nach dem Blitz berechnen:

$$\begin{split} \Delta A(t) &= A(t) - A_0 = \log \frac{I_{ein}}{I(t)} - \log \frac{I_{ein}}{I_0} = -\log \frac{I(t)}{I_0} = -\log \frac{I_0 + \Delta I(t)}{I_0} \\ &= -\frac{1}{\ln 10} \ln \left(1 + \frac{\Delta I(t)}{I_0} \right) \end{split}$$

Für $\frac{\Delta I(t)}{I_0} \ll 1$ gilt in guter Näherung $\ln(1+x) \cong x$ mit $x \ll 1$ und es folgt:

$$\Delta A(t) \simeq -\frac{1}{\ln 10} \frac{\Delta I(t)}{I_0} = -\frac{1}{\ln 10} \frac{\Delta U(t)}{U_0}$$
(2.8)

Dabei ist A_0 die Absorption der Probe vor dem Blitz und A(t) die Absorption der Probe zur Zeit t nach dem Blitz. Die durch die Probe abgeschwächte Messlichtleistung vor dem Blitz bzw. zum Zeitpunkt t nach dem Blitz wird durch I_0 bzw. I(t) gegeben. I_{ein} ist die Messlichtleistung vor der Probe und U_0 die Spannung am Arbeitswiderstand des Photomultipliers. Die vom Transientenrekorder aufgenommene Spannung U(t) wird schließlich zur Auswertung des Signals auf einen Computer übertragen.

Da die hier verwendeten Blitzlampen eine Halbwertsbreite der Blitzentladung von ca. 10 µs aufweisen, lassen sich mit diesem Aufbau auch nur Prozesse untersuchen, deren $t_{1/2} \gg 10$ µs ist. Für Messungen bis in den ns-Bereich wurde der in Abb. 2.5 dargestellte Aufbau benutzt. Die Blitzlampe wird dabei durch einen Laser (Frequenz-verdoppelter Nd:YAG Laser YG411 von Quantel) ersetzt, der nicht-sättigende Laserblitze bei 532 nm mit einer Pulsdauer von 3 ns zur Verfügung stellt. Als Messlichtquelle dient eine cw Laserdiode (HITACHI HL 8318G), die Licht der Wellenlänge 836 nm emittiert - eine Wellenlänge, bei der sich sehr gut die durch die Bildung eines Chlorophyll-Radikalkations (z.B. P_{680}^+) hervorgerufenen Absorptionsänderungen beobachten lassen.



Abbildung 2.5 Schematischer Aufbau des Blitzlichtspektrometers mit einem gepulsten Laser als Anregungslichtquelle. Ein kleiner Teil des Laserpulslichts wird durch ein Glasplättchen auf eine zweite Photodiode gelenkt, die mit einem "CFD"-Diskriminator (CFD, engl. *constant fraction discriminator*) verbunden ist. Dieser dient zur Bestimmung des Zeitnullpunktes der Reaktion. Optische Elemente, wie Linsen und Spiegel, sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Neben der Dauer des Anregungsblitzes spielt auch die elektrische Bandbreite des Detektionssystems Δf eine wichtige Rolle für die Zeitauflösung der Apparatur. Diese wird durch eine untere und eine obere Grenzfrequenz f_{ug} bzw. f_{og} definiert, zwischen denen der zeitliche Verlauf des Signals unverfälscht wiedergegeben wird. Für die Halbwertszeit des Prozesses muss $t_{1/2} \gg 1/f_{og}$ gelten, da sonst das System zu träge ist, um den zeitlichen Änderungen des Signals schnell genug zu folgen. Aus diesem Grund wurde für Messungen im ns-Bereich mit dem Aufbau aus Abb. 2.5 ein Detektionssystem verwendet, das eine elektrische Bandbreite von 500 Hz - 200 MHz aufweist. Es besteht aus einer Photodiode (FND-100 von EG&G), einem Verstärker (IV86 vom Hahn-Meitner-Institut) und dem Transientenrekorder (Tektronix TDS 540B). Im μ s- bis ms-Bereich wurde der Verstärker HVA-10M-60-F von Femto benutzt. Zur Auswertung der Signale wurden diese wiederum auf einen Computer übertragen.

Einige dieser Signal-Zeit-Verläufe sind exemplarisch in Abb. 2.6 zusammengestellt. Der Anfang der Verläufe bis zur Blitzentladung bzw. Laserpuls ist für alle gleich und repräsentiert A_0 bzw. I_0 . Die durch den Blitz ausgelösten Photoreaktionen können dann zu Absorptionsänderungen führen, wobei bei den hier gezeigten Beispielen die Entstehung der Photoprodukte nicht zeitlich aufgelöst ist und nur als instantane Änderung der Absorption beobachtet wird. Im Fall der Ausbleichung weist das Photoprodukt eine geringere Absorption bei der Messwellenlänge auf, was zu einer negativen Absorptionsänderung führt. Hat das Produkt einen größeren Extinktionskoeffizienten ε_P als das Edukt (ε_E), ist die Differenz der Extinktionskoeffizienten $\Delta \varepsilon = \varepsilon_P - \varepsilon_E$ positiv und es kommt zu einer Absorptionszunahme ($\Delta A(t) > 0$). Es gilt das Lambert-Beersche-Gesetz:

$$\Delta A(t) = \Delta \varepsilon \cdot \Delta c_P(t) \cdot d \tag{2.9}$$

mit der Änderung der Konzentration des Produkts $\Delta c_P(t) = -\Delta c_E(t)$ und der Länge des Lichtweges durch die Probe *d*. Nach der Anregung erfolgt die Rückreaktion des Photoprodukts zum Edukt und A(t) nähert sich mit der Zeit wieder A_0 an. Geschieht dies gemäß einem Zeitgesetz 1. Ordnung, dann gilt $\Delta c(t) = \Delta c(t = 0) \cdot \exp(-kt)$ bzw. $\Delta A(t) = \Delta A(t=0) \cdot \exp(-kt)$ mit $k = \ln 2/t_{1/2}$. Um die Halbwertszeit und die maximale Absorptionsänderung des Prozesses zu bestimmen, lässt sich der Zeitverlauf des Signals daher mit einer monoexponentiellen Zerfallsfunktion anpassen. Dazu werden die beiden Parameter rechnerisch so lange iterativ angepasst, bis die mittlere Fehlerquadratsumme minimal wird und die Anpasskurve (Fit) die Messkurve am besten wiedergibt. Die aus dem Fit erhaltenen Werte von $\Delta A(t=0)$ als Funktion der Wellenlänge des Messlichts ergeben dann das Absorptionsdifferenzspektrum der Reaktion.

Unter Umständen kann es vorkommen, dass nicht nur ein Prozess beobachtet wird. Gerade in komplexen Systemen wie den Photosystemen finden mitunter viele Reaktionen gleichzeitig im Beobachtungszeitfenster statt. Wenn sich die Halbwertszeiten der einzelnen Reaktionen stark genug voneinander unterscheiden, lassen sich die Prozesse kinetisch trennen. Der Signal-Zeitverlauf lässt sich dann als Überlagerung mehrerer Exponentialfunktionen fitten, mit je einer Halbwertszeit für jede einzelne Teilreaktion.

Neben der Photochemie können auch noch photophysikalische Prozesse stattfinden, die - so sie nicht selbst Gegenstand der Messung sind - den Signalverlauf der Reaktion



Abbildung 2.6 Exemplarische Zusammenstellung einiger typischer Zeitverläufe blitzinduzierter Absorptionsänderungen.

verfälschen können. Der am häufigsten auftretende Prozess ist dabei die Fluoreszenz. Um ihren Einfluss auf die Signale zu vermindern, wird der Detektor vergleichsweise weit von der Probe aufgestellt. Da bei der Fluoreszenz die Emission der Strahlung von den Molekülen aus dem elektronisch angeregten Zustand in alle Raumrichtungen erfolgt, schwächt sich die Fluoreszenz mit dem Quadrat des Abstandes von der Quelle ab. Ihr Einfluss wird also umso kleiner je größer der Abstand zwischen dem Detektor und der Probe ist.

2.4 ESR-Spektroskopie

In der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie wird die Absorption elektromagnetischer Strahlung betrachtet, die in Resonanz mit dem Übergang zwischen den Energieniveaus des Elektronenspins liegt. Der Spin S, eine Art Eigendrehimpuls des Elektrons, ist mit einem magnetischen Moment $\mu_{\rm S}$ verknüpft:

$$\mu_{\rm S} = -g_{\rm e} \,\mu_{\rm B} \,S \quad \text{mit} \quad \mu_{\rm B} = \frac{e\hbar}{2m_{\rm e}} = 9.274 \cdot 10^{-24} \,\,\mathrm{J}\,\mathrm{T}^{-1}$$
(2.10)

wobei $\mu_{\rm B}$ das Bohrsche Magneton und $g_{\rm e}$ der g-Faktor des Elektrons ist, der für das freie Elektron einen Wert von 2.0023193 hat. Die g-Faktoren organischer Radikale liegen gemeinhin sehr dicht an diesem Wert, wohingegen Komplexe von d-Metallen Werte von 0 bis 4 aufweisen können. Hier deutet sich die große Einschränkung der ESR an - sie ist



Abbildung 2.7 Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus der Elektronenspins in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke.

nur auf Moleküle anwendbar, die ungepaarte Elektronen enthalten, wie eben zum Beispiel Radikale, d-Metall-Komplexe oder auch Triplettzustände.

Befinden sich die ungepaarten Elektronen in einem Magnetfeld, gibt es für sie nur die Möglichkeit sich entweder parallel oder antiparallel zur Feldrichtung auszurichten. Diese Eigenschaft wird durch die magnetische Quantenzahl $m_{\rm S}$ beschrieben, die für Elektronen mit ihrem Spin S = 1/2 Werte von $\pm 1/2$ annimmt. Allgemein gilt für $m_{\rm S}$ mit einem beliebigen halb- oder ganzzahligen Spin: $m_{\rm S} = -S, -S + 1, \ldots, S - 1, S$. Die normalerweise entarteten Energieniveaus der Elektronenspins (siehe Abb. 2.7) werden durch das Magnetfeld angehoben (für $m_{\rm S} = +1/2$) bzw. abgesenkt (für $m_{\rm S} = -1/2$), wobei die Energiedifferenz zwischen den Niveaus proportional zur Magnetfeldstärke B ist:

$$\Delta E = g_{\rm e} \,\mu_{\rm B} \,B = h\nu \tag{2.11}$$

Die benötigte Energie zur Erfüllung der Resonanzbedingung des Ubergangs entspricht Strahlung des Mikrowellenbereiches. Die Mikrowellen werden in dem für die ESR-Experimente verwendeten X-Band Spekrometer (ESP 300E von Bruker) innerhalb einer Mikrowellenbrücke mit einem Klystron erzeugt und über einen Hohlraumleiter in einen Hohlraumresonator eingespeist, in dem sich die Probe befindet. Der Resonator ist in seinen Dimensionen (bezeichnet als TE_{102} -Mode) so gewählt, dass er leer eine Resonanzfrequenz



Abbildung 2.8 Darstellung des Prinzips der Feldmodulation bei der Aufnahme eines ESR-Spektrums. Durch Modulation des magnetischen Feldes oszilliert die Amplitude des Signals mit der Modulationsfrequenz. Die Amplitude wird phasenempfindlich detektiert - das erhaltene Spektrum entspricht dann der ersten Ableitung des ESR-Absorptionsspektrums.

von ungefähr 9.8 GHz und mit Probe in einer Quarzkapillare (von Rototec Spintec, 4 mm äußerer Durchmesser aus CFQ-Quarz⁴) eine von ca. 9.6 GHz aufweist. Das Mikrowellenfeld in der Probe wird im Resonator durch Mehrfachreflektion und das Erzeugen einer stehenden Welle verstärkt. Die Verbindung des Resonators mit dem Hohlraumleiter erfolgt so, dass keine Mikrowelle zurück reflektiert wird.

Da durch den Resonator die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung festgelegt ist, wird das ESR-Spektrum nicht als Funktion der Wellenlänge aufgenommen. Stattdessen wird die Feldstärke des magnetischen Feldes variiert. Ist die Aufspaltung der Energieniveaus durch das Magnetfeld gerade so groß, dass die Resonanzbedingung erfüllt ist, absorbiert die Probe und es kommt zu einer Reflektion von Mikrowellenstrahlung aus dem Resonator. Diese wird mittels einer Diode in der Mikrowellenbrücke detektiert. Dabei wird allerdings nicht die durch die Absorption verursachte Änderung der Mikrowellenleistung gemessen.

⁴CFQ, engl. *clear fused quartz*.



Abbildung 2.9 Beispiele für Hyperfeinwechselwirkungen zwischen Elektron und Kern(-en) und die resultierenden schematischen ESR-Spektren. Die linke Abbildung zeigt die Wechselwirkung eines Elektrons mit einem Kern mit I = 1. Von links nach rechts ist die Aufspaltung der Elektronenspinniveaus, die wesentlich kleinere Aufspaltung der 3 Kernspinniveaus und der Effekt der Wechselwirkung der Niveaus zu sehen. Die rechte Abbildung zeigt ein Beispiel mit zwei magnetisch äquivalenten Kernen mit I = 1/2. Deren Hyperfeinkopplung führt ebenfalls zu einer Aufspaltung in drei Linien, nur das Intensitätsverhältnis ist dabei mit 1:2:1 unterschiedlich.

Denn diese ist zu klein, um direkt als Spannungsänderung in der Diode nachgewiesen werden zu können. Vielmehr wird eine sinusförmige Modulation des Magnetfeldes angewendet, die in der Absorption zu einer Amplitudenmodulation des Signals führt. Die Amplitude dieser Signalmodulation wird phasenempfindlich als ESR-Signal aufgenommen. Die erhaltenen Spektren entsprechen dann der ersten Ableitung der Absorptionskurve (siehe Abb. 2.8). Da durch dieses Verfahren das ESR-Signal eine feste Frequenz besitzt - entsprechend der Modulationsfrequenz des magnetischen Feldes - lässt sich das Signal durch einen schmalbandigen Verstärker elektronisch vergrößern und das Rauschen durch Unterdrückung anderer Frequenzkomponenten verringern. Das führt zu einer deutlichen Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses, was die Aufnahme der ESR-Spektren ermöglicht.

In den erhaltenen Spektren liefert neben dem bereits erwähnten g-Faktor die Hyperfeinaufspaltung a des Signals die wichtigsten Informationen über die Probenmoleküle. Diese tritt auf, wenn das magnetische Moment des Elektrons mit den magnetischen Momenten der Kerne des Moleküls wechselwirkt, sobald für die Kernspins $I \neq 0$ gilt. In wieviele Linien die ESR-Resonanz aufgespalten wird, hängt nach 2I + 1 von der Kernspinquantenzahl ab. Befinden sich magnetisch äquivalente Kerne im Molekül, fallen einige der aufgespaltenen Linien zusammen und ihre Intensität wächst dadurch. Für die induzierten Übergänge zwischen den Spinenergieniveaus gelten die Auswahlregeln $\Delta m_{\rm S} = 1$ und $\Delta m_{\rm I} = 0$ (bzw. $\Delta M_{\rm I} = 0$ mit $M_{\rm I} = \sum m_{\rm I}$). Abb. 2.9 zeigt als Beispiele die Wechselwirkung eines Elektrons mit einem Kern mit I = 1 und zwei äquivalenten Kernen mit I = 1/2 und die resultierenden Linien im Spektrum.

2.5 Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie unterscheidet sich wesentlich von den bisher vorgestellten spektroskopischen Methoden. Die Grundlage bildet hierbei nicht die Absorption elektromagnetischer Strahlung durch ein Molekül, sondern vielmehr der Prozess der Streuung der Photonen an dem Molekül. Der Großteil der Photonen wird dabei elastisch gestreut, das heißt, die Wellenlänge der einfallenden Strahlung ist gleich der des gestreuten Lichts. Dieser Prozess wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet. Zusätzlich wird ein kleiner Teil der Photonen auch inelastisch gestreut - der Raman-Effekt - im Zuge dessen sich die Frequenz des gestreuten Lichts um einen kleinen Betrag ändert, der exakt der Frequenz ν_k einer Normalmode des Moleküls entspricht. Wird die Frequenz der einfallenden Strahlung ν_0 um den Betrag ν_k vemindert, spricht man von Stokes-Streuung, während man eine Frequenzerhöhung $\nu_0 + \nu_k$ als Anti-Stokes-Streuung bezeichnet (siehe Abb. 2.10).

Der untere Teil der Abbildung zeigt das korrespondierende, schematische Ramanspektrum, aufgetragen als Intensität der Banden gegen die Energie in Wellenzahlen $\tilde{\nu} = \nu/c$. In der Mitte liegt die Rayleigh-Bande bei ν_0 mit einer um mehreren Größenordnungen höheren Intensität als die Raman-Banden. Da bei Raumtemperatur fast ausschließlich der Schwingungsgrundzustand besetzt ist, ist die Stokes-Bande bei höheren Wellenzahlen wesentlich intensiver als die Anti-Stokes-Bande bei niedrigeren Wellenzahlen. Die Intensität ganz allgemein der Raman-Streuung hängt von der Polarisierbarkeit $\tilde{\alpha}(\nu)$ ab. Eine tensorielle Größe, die die Elektronenverteilung als Folge der Bewegung der Kerne, die mit der Frequenz ν_k einer Normalmode Q_k schwingen, beschreibt und sich mit der Zeit ändert:

$$\tilde{\alpha}(\nu) = \tilde{\alpha}_0(\nu_0) + \left(\frac{\partial \tilde{\alpha}}{\partial Q_k}\right)_0 \cos(2\pi\nu_k t)$$
(2.12)

Die veränderte Elektronenverteilung nach der Wechselwirkung des Moleküls mit dem elek-



Abbildung 2.10 Energiediagramm und schematisches Ramanspektrum für den Fall der Rayleigh- und der Raman-Streuung aus einem angeregten Schwingungszustand (Anti-Stokes) bzw. dem vibronischen Grundzustand (Stokes).

trischen Feld $\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$ der elektromagnetischen Strahlung hat ein induziertes Dipolmoment $\vec{\mu}_{ind}$ zur Folge:

$$\vec{\mu}_{ind} = \tilde{\alpha}(\nu) \cdot \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \tag{2.13}$$

Kombiniert man Gl. 2.12 mit Gl. 2.13, erhält man schließlich einen Ausdruck für das induzierte Dipolmoment, in dem Terme für die Rayleigh- (ν_0) , die Anti-Stokes- $(\nu_0 + \nu_k)$ und die Stokes-Streuung $(\nu_0 - \nu_k)$ auftauchen:

$$\vec{\mu}_{ind} = \vec{E}_0 \left[\tilde{\alpha}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial \tilde{\alpha}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k \cos\left[2\pi(\nu_0 + \nu_k) t \right] + \left(\frac{\partial \tilde{\alpha}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k \cos\left[2\pi(\nu_0 - \nu_k) t \right] \right]$$
(2.14)

Ob ein Molekül ein "guter Raman-Streuer" ist, hängt von seinem Streuquerschnitt $\sigma_{n\to m}$ ab. Die Intensität der gestreuten Strahlung $I_{n\to m}$ ergibt sich aus dem Produkt der Intensität der einfallenden Strahlung I_0 und dem Streuquerschnitt:

$$I_{n \to m} = \sigma_{n \to m} I_0 \tag{2.15}$$

Der Streuquerschnitt ist mit der Polarisierbarkeit wie folgt verknüpft:

$$\sigma_{n \to m} \propto (\nu_0 \pm \nu_k)^4 \cdot \sum_{\rho, \sigma} |\alpha_{\rho, \sigma}|^2$$
(2.16)

dabei stellen $\rho, \sigma = x, y, z$ die Polarisation des einfallenden (σ) und des gestreuten Lichts (ρ) in molekül-bezogenen Koordinaten dar. Wie man in Gl. 2.16 sieht, hängt der Streuquerschnitt und damit die Raman-Intensität mit ν^4 sehr stark von der Frequenz der elektromagnetischen Strahlung ab. Daher sind Ramansignale, die zum Beispiel mit roter oder infraroter Anregung aufgenommen werden, wesentlich schwächer als z.B. bei einer Anregung im blauen Spektralbereich.

Eine genaue Beschreibung der Polarisierbarkeit und damit der Raman-Intensitäten erfordert eine quantenmechanische Betrachtung [138] mit der Störungstheorie zweiter Ordnung. Auf Grundlage der Kramers-Heisenberg-Dirac'schen Dispersionstheorie ergibt sich für den Streutensor der folgende Ausdruck:

$$[\alpha_{nm}]_{\rho\sigma} = \frac{1}{h} \sum_{R,r} \left(\frac{\langle nG | M_{\rho} | Rr \rangle \langle rR | M_{\sigma} | Gm \rangle}{\nu_{Rr} - \nu_k - \nu_0 + i\Gamma_R} + \frac{\langle rR | M_{\sigma} | Gm \rangle \langle nG | M_{\rho} | Rr \rangle}{\nu_{Rr} - \nu_k + \nu_0 + i\Gamma_R} \right)$$
(2.17)

mit den elektronischen Übergangsdipolmomenten M_{σ} und M_{ρ} , dem elektronischen Grundzustand G, n bzw. m als energetisch niedrigerer bzw. höherer Schwingungszustand zwischen denen der Übergang stattfindet, R bzw. r als Indices für alle anderen elektronischen bzw. vibronischen Zustände und Γ_R einer Dämpfungskonstante, die mit der Lebensdauer des vibronischen Zustands Rr verbunden ist. In Gleichung 2.17 werden alle Übergänge $nG \to Rr$ und $Rr \to Gm$ in Form der Summe der einzelnen Integrale mit einbezogen, was bedeutet, dass bei der Berechnung der Ramanintensität eines einzelnen Übergangs alle vibronischen Zustände berücksichtigt werden müssen.

Resonanz-Raman-Effekt

Nähert sich nun die Anregungsfrequenz ν_0 einem elektronischen Übergang des Moleküls, spricht man vom Resonanz-Raman-Effekt und Gl. 2.17 vereinfacht sich zu:

$$[\alpha_{nm}]_{\rho\sigma} \cong \frac{1}{h} \sum_{r} \left(\frac{\langle nG | M_{\rho} | Rr \rangle \langle rR | M_{\sigma} | Gm \rangle}{\nu_{Rr} - \nu_{k} - \nu_{0} + i\Gamma_{R}} \right)$$
(2.18)

Die Ramanintensität hängt nun mehr oder weniger nur noch von den Übergangswahrscheinlichkeiten in die Schwingungszustände des elektronisch angeregten Zustands ab, der mit der Anregung in Resonanz liegt [5, 198]. Die Wellenfunktionen der Integrale in Gl. 2.18 können nach der Born-Oppenheimer-Näherung in ihren elektronischen und ihren Kernterm geteilt werden, so dass sich die Integrale wie folgt schreiben lassen:

$$\langle nG | M_{\rho} | Rr \rangle = \langle nr \rangle \langle G | M_{\rho} | R \rangle = \langle nr \rangle M_{GR,\rho}$$
(2.19)

bzw.

$$\langle rR | M_{\sigma} | Gm \rangle = \langle rm \rangle \langle R | M_{\sigma} | G \rangle = \langle rm \rangle M_{GR,\sigma}$$
(2.20)

Die Integrale $\langle nr \rangle$ und $\langle rm \rangle$ stellen die schon weiter oben im Kapitel der UV/Vis-Spektroskopie beschriebenen Franck-Condon-Faktoren dar und es ergibt sich für den Streutensor:

$$[\alpha_{nm}]_{\rho\sigma} \cong \frac{1}{h} \sum_{r} \left(\frac{\langle nr \rangle \langle rm \rangle M_{GR,\rho} M_{GR,\sigma}}{\nu_{Rr} - \nu_k - \nu_0 + i\Gamma_R} \right)$$
(2.21)

Die Komponenten der elektronischen Übergangsdipolmomente $M_{GR,\rho}$ und $M_{GR,\sigma}$, die zu den Übergängen zwischen dem Grundzustand G und dem angeregten Zustand R gehören, können in Taylor-Reihen bezüglich der Normalmoden-Koordinaten entwickelt werden:

$$M_{GR,\rho}\left(Q_k\right) = M_{GR,\rho}\left(Q_k^{(0)}\right) + \sum_k \left(\frac{\partial M_{GR,\rho}}{\partial Q_k}\right)_0 Q_k + \dots$$
(2.22)

und

$$M_{GR,\sigma}\left(Q_{k}\right) = M_{GR,\sigma}\left(Q_{k}^{\left(0\right)}\right) + \sum_{k} \left(\frac{\partial M_{GR,\sigma}}{\partial Q_{k}}\right)_{0} Q_{k} + \dots$$

$$(2.23)$$

Unter Vernachlässigung der Terme höherer Ordnung lässt sich nun der Streutensor als


Abbildung 2.11 Potentialkurven für den elektronischen Grund- und angeregten Zustand mit $\Delta s = 0$ (linke Seite) und $\Delta s \neq 0$ (rechte Seite). Für $\Delta s \neq 0$ gewinnt der Übergang $G_n \to m$ über Kopplung an den Zustand Rr an Resonanz-Raman-Intensität.

Summe von zwei Termen schreiben - dem sogenannten A- und B-Term:

$$[\alpha_{nm}]_{\rho\sigma} \cong A_{\rho\sigma} + B_{\rho\sigma} \tag{2.24}$$

Dabei ist:

$$A_{\rho\sigma} \cong \frac{1}{h} \sum_{r} \left(\frac{\langle nr \rangle \langle rm \rangle M_{GR,\rho}^{0} M_{GR,\sigma}^{0}}{\nu_{Rr} - \nu_{k} - \nu_{0} + i\Gamma_{R}} \right)$$
(2.25)

und

$$B_{\rho\sigma} \cong \frac{1}{h} \sum_{r} \left(\frac{\langle n | Q_k | r \rangle \langle rm \rangle \left(\frac{\partial M_{GR,\rho}}{\partial Q_k} \right)_0 M_{GR,\sigma}^0}{\nu_{Rr} - \nu_k - \nu_0 + i\Gamma_R} + \frac{\langle nr \rangle \langle r | Q_k | m \rangle \left(\frac{\partial M_{GR,\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0 M_{GR,\rho}^0}{\nu_{Rr} - \nu_k - \nu_0 + i\Gamma_R} \right)$$
(2.26)

Die beiden Terme werden auch als Franck-Condon- (A) bzw. Herzberg-Teller-Verstärkung (B) bezeichnet und stehen für unterschiedliche Mechanismen der Resonanz-Raman-Verstärkung. Die A-Term-Verstärkung hängt sehr stark von der Geometrie des angeregten Zustands R ab. Weist dessen Potentialkurve eine große Verschiebung Δs gegenüber der des Grundzustands auf (siehe Abb. 2.11), unterscheiden sich die Kernanordnungen in beiden Zuständen also stark voneinander, dann ist das Produkt der Franck-Condon-Faktoren ungleich 0 und die Resonanz-Raman-Intensität steigt. Es besteht folgender, vereinfachter Zusammenhang:

$$A \propto \frac{\left|M_{GR}^{0}\right|^{2} \cdot \nu_{k} \cdot \Delta s}{\left(\nu_{Rr} - \nu_{0} + i\Gamma_{R}\right)\left(\nu_{Rr} - \nu_{0} + \nu_{k} + i\Gamma_{R}\right)}$$
(2.27)

Für den Mechanismus der *B*-Term-Verstärkung ist die Größe der Ableitung des elektronischen Dipolmoments nach den Normalmoden-Koordinaten von entscheidender Bedeutung. Diese ist groß für Moden, die in der Lage sind, an einen anderen elektronischen Übergang neben dem eigentlichen in Resonanz liegenden Übergang zu koppeln.

Experimenteller Aufbau

Für die Aufnahme der Spektren wurden eine Reihe von Spektrometern benutzt, die eine große Breite an Anregungswellenlängen liefern. Messungen im nahen Infrarot wurden an einem FT-Raman-Spektrometer (Bruker RFS-100/S) mit einem Nd:YAG-Laser (Coherent) durchgeführt, der bis zu einer Leistung von 1.5 W bei 1064 nm emittiert. Das gestreute Licht wird in einer 180° Anordnung von einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Germanium-Detektor gemessen. Spektren bei 413 nm (Krypton-Ionen Laser Innova 300C von Coherent) und 514 nm (Argon-Ionen Laser Innova 70C von Coherent) Anregung wurden mit einem konfokalen Mikroskopaufbau am LabRam 800 HR-Spektrometer (Jobin Yvon) aufgenommen. In Zusammenarbeit mit Norman Tschirner und Katharina Brose aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Thomsen, TU Berlin, wurden für die Erstellung des Raman-Anregungsprofils des Farbstoffes β -Carotin Messungen über einen weiten Bereich des sichtbaren Spektrums durchgeführt. Um diesen großen spektralen Bereich abdecken zu können, wurden mehrere Laser benutzt: Argon- und Krypton-Ionen-Laser von Coherent (12 Linien zwischen 458 und 647 nm), ein Rhodamin 6G-Farbstofflaser (Radiant Dyes, 590 bis 615 nm) und ein HeCd-Laser (Omnichrome, 442 nm). Zur Detektion des gestreuten Lichts wurde ein Dilor XY 800 Dreifach-Monochromator Spektrometer mit Stickstoff gekühlter CCD-Kamera⁵ benutzt.

⁵CCD, engl. charge coupled device.

2.6 QM-Rechnungen

Spektren von biologischen Systemen sind häufig komplex und schwer zu interpretieren. Eine Möglichkeit, Aussagen über die involvierten Moleküle und ablaufende Prozesse zu treffen, besteht in dem Vergleich der experimentellen Daten mit quantenmechanischen Rechnungen theoretischer (vereinfachter) Modelle. So lassen sich zum Beispiel die Spektren von einzelnen Pigmenten, die sich experimentell nicht nachweisen lassen, berechnen und so ihr Anteil am Spektrum des kompletten Systems zuordnen. Im Rahmen dieser Arbeit waren das die Raman- bzw. Resonanz-Raman-Spektren von β -Carotin als ein essentielles Pigment der Photosysteme I und II.

Die Berechnungen wurden mit Hilfe der Programme Gaussian03 und TURBOMOLE [51, 1] durchgeführt. Besonders wichtig für die Güte der berechneten Spektren ist dabei, dass die Struktur für den Grundzustand des Moleküls soweit optimert wird, dass das globale Minimum der Potentialhyperfläche erreicht wird. Als Ausgangspunkt für die Geometrieoptimierung des Grundzustands von β -Carotin wurde die Struktur des Carotins aus der Röntgenkristallstruktur des PS II genommen [111]. Die Optimierung erfolgte auf Grundlage der Dichtefunktionaltheorie basierend auf dem Hohenberg-Kohn-Theorem [78], nach dem das Energiefunktional $E(\rho)$ des Grundzustands eine Funktion der Elektronendichte $\rho(r)$ und der Positionen der Atomkerne ist. Die Elektronendichte lässt sich mittels des Kohn-Sham-Ansatzes [102] in guter Näherung als Linearkombination von Einelektronenwellenfunktionen der Molekülorbitale $\varphi_i(r)$ beschreiben:

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^{N_{e}} |\varphi_{i}(r)|^{2}$$
(2.28)

Diese lassen sich wiederum aus der Linearkombination von Atomorbitalfunktionen χ_{μ} bilden:

$$\varphi_i(r) = \sum_{\mu,i} c_{\mu,i} \chi_{\mu,i}(r) \tag{2.29}$$

Am ehesten lassen sich die Atomorbitale als Slater-Typ-Orbitale (STO) darstellen. Diese führen aber bei den Rechnungen zu komplizierten Integralen, weswegen sie durch Linearkombinationen von n Gaussfunktionen $\rho_{\mu,n}(r)$ (GTO) angenähert werden [70]:

$$\chi_{\mu}(r) = \sum_{\mu,n} \varrho_{\mu,n}(r) \tag{2.30}$$

Die Art und Weise, wie die Molekülorbitale nun dargestellt werden, geht aus dem verwendeten Basissatz hervor. In dieser Arbeit wurde dafür der 6-31G*-Basissatz benutzt [62]. Die Notation bedeutet, dass die inneren Atomorbitale durch 6 Gaussfunktionen (G) und die Valenzschalen durch jeweils 3 bzw. 1 Gaussfunktion für den inneren bzw. äußeren Part (Doppel- ζ -Basissatz) repräsentiert werden. Der Stern steht dafür, dass zusätzlich noch Basisfunktionen mit höherer Drehimpulsquantenzahl (Polarisationsfunktionen) hinzugefügt werden, in diesem Fall 6 *d*-Gaussfunktionen.

Aus den optimierten Orbitalen $\varphi_i(r)$ lässt sich dann nach Gl. 2.28 die Grundzustandselektronendichte zur Berechnung des Energiefunktionals erhalten. Dabei fehlt aber die noch nicht berücksichtigte Korrelationsenergie zwischen den Elektronen. Zur Berechnung dieses Austausch-Korrelation-Funktionals werden sogenannte Hybridfunktionale benutzt, bei denen empirische Hartree-Fock-Austauschfunktionale mit *ab initio* DFT-Austausch-Korrelationsfunktionalen kombiniert werden. Für die Rechnungen im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür das B3LYP-Hybridfunktional [173] verwendet.

Für die optimierte Struktur lassen sich nun die Schwingungsfrequenzen des Moleküls berechnen. Dies geschieht im Rahmen der Normalmodenanalyse. Dafür ist die Kenntnis des Kraftfeldes erforderlich, das sich aus der Funktion der potentiellen Energie des Moleküls in der Umgebung eines lokalen Minimums auf der Potentialhyperfläche bestimmen lässt. Für kleine Auslenkungen der Atome *i* und *j* um ihre Gleichgewichtspositionen mit $V_0 = 0$ ergibt sich in der harmonischen Näherung der folgende Ausdruck für das Potential:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i,j}^{3N} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right) q_i q_j \tag{2.31}$$

Dabei sind q_i und q_j die massegewichteten, kartesischen Koordinaten. Die Ableitung der potentiellen Energie nach ihnen wird als Kraftkonstante $f_{i,j}$ bezeichnet:

$$f_{i,j} = \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j}\right) \tag{2.32}$$

Die Matrix aller Kraftkonstanten ist die Hesse-Matrix \mathbf{F} . Damit und mit dem Vektor \mathbf{q} für die Atomkoordinaten lassen sich die potentielle und kinetische Energie als

$$V = \frac{1}{2} \mathbf{q}^{\mathrm{T}} \mathbf{F} \mathbf{q} \quad \text{und} \quad T = \frac{1}{2} \dot{\mathbf{q}}^{\mathrm{T}} \mathbf{F} \dot{\mathbf{q}}$$
(2.33)

schreiben. Die Hesse-Matrix kann über die Matrix \mathbf{L} in die Diagonalmatrix $\boldsymbol{\Lambda}$ transformiert werden, wobei ebenfalls die kartesischen Koordinaten in Normalkoordinaten überführt werden:

$$\mathbf{\Lambda} = \begin{pmatrix} \lambda_1 & \dots & 0\\ \vdots & \ddots & \vdots\\ 0 & \dots & \lambda_{3N} \end{pmatrix} = \mathbf{L}^{\mathrm{T}} \mathbf{F} \mathbf{L}$$
(2.34)

und

$$Q_k = \sum_{i}^{3N} L_{k,i}^{-1} q_i \qquad \text{bzw.} \qquad \mathbf{Q} = \mathbf{L}^{-1} \mathbf{q}$$
(2.35)

Die Ausdrücke für die potentielle und die kinetische Energie aus Gl. 2.33 inklusive der Transformation aus Gl. 2.35 werden in die Lagrange-Gleichung

$$\frac{\mathrm{d}}{\mathrm{dt}} \left(\frac{\partial T}{\partial \dot{Q}_k} \right) + \left(\frac{\partial V}{\partial Q_k} \right) = 0 \tag{2.36}$$

eingesetzt und man erhält 3N unabhängige Differentialgleichungen

$$\ddot{\mathbf{Q}} + \mathbf{\Lambda}\mathbf{Q} = 0 \tag{2.37}$$

als deren Lösungsansatz der Ausdruck eines harmonischen Oszillators

$$Q_k = A_k \cos(2\pi\nu_k t + \varepsilon_k) \qquad mit \qquad \nu_k = \frac{\sqrt{\lambda_k}}{2\pi}$$
(2.38)

gewählt wird, mit A_k der Amplitude und ε_k der Phase der Schwingung. Die Lösung der Determinante von Gl. 2.37

$$|\mathbf{\Lambda} - \lambda_k \mathbf{1}| = 0 \tag{2.39}$$

ergibt für alle 3N - 6 Normalmoden Q_k einen Wert für die Schwingungsfrequenz, mit der jedes Atom in dieser Mode schwingt. Da bei der Berechnung dieser Frequenzen durch die harmonische Näherung und intrinsischer Fehler des *ab initio* Ansatzes systematische Abweichungen auftreten, wurde eine Skalierungsprozedur durchgeführt, um diese Effekte zu berücksichtigen. Dabei werden die Kraftkonstanten mit Skalierungsfaktoren σ_i multipliziert (siehe Tabelle 2.1), die für bestimmte Schwingungsarten optimiert wurden [114, 130]. Dadurch lässt sich die Genauigkeit der Frequenzberechnung auf ±11 Wellenzahlen erhöhen. Die Raman-Intensitäten wurden numerisch aus den Ableitungen der Polarisierbarkeiten

Art der Schwingung	Skalierungsfaktor σ_i
Streckschwingung C-C, C=C Streckschwingung C-H	$0.92418 \\ 0.91529$
Bindungswinkeldeformation C-C-C Bindungswinkeldeformation H-C-H Bindungswinkeldeformation C-C-H	0.99601 0.91684 0.94978
out of plane	0.98695
Torsion Einfachbindung Torsion konjugierte Bindung	0.96677 0.94824

Tabelle 2.1	Verwendete	Skalierungsfaktoren	für o	das	Skalieren	der	Kraftkonstanten	der	jeweiligen	inter-
nen Koordinat	en									

nach den jeweiligen Normalmoden mittels eines Algorithmus zur Differenziation vierter Ordnung bestimmt, wodurch die Fehler der numerischen Berechnung effektiv minimiert werden [114].

Die Berechnung von Resonanz-Raman-Spektren stellt eine noch größere Herausforderung als die ohnehin schon anspruchsvolle Berechnung der Raman-Spektren dar, da nun unter anderem ebenfalls die Kenntnis der Struktur des Moleküls im elektronisch angeregten Zustand erforderlich ist [129]. Die Eigenschaften des Systems im angeregten Zustand wurden mit Hilfe der zeitabhängigen Dichtefunktionaltheorie⁶ ermittelt. Um die Resonanz-Raman-Intensitäten zu berechnen, wurde der Ansatz von Rush und Peticolas benutzt [137, 152]. Der dafür benötigte Polarisierbarkeitstensor wird nach der Kramers-Kronig-Transformtheorie aus einem experimentellen UV/Vis-Absorptionsspektrum erhalten [76]. Es ergibt sich folgender Ausdruck für die Intensität I_k einer Normalmode k als Funktion der Anregungswellenlänge ω_L :

$$I_k(\omega_L) = \frac{\Delta s^2 K M_{GR}^4}{2} \left| \Phi(\omega_L) - \Phi(\omega_L - \Omega_k) \right|^2$$
(2.40)

Dabei ist M_{GR} das elektronische Übergangsdipolmoment zwischen Grund- und angeregtem Zustand und $\Phi(\omega_L)$ ein Ausdruck, in dem sich das transformierte Absorptionsspektrum widerspiegelt. K ist ein frequenzabhängiger Faktor:

$$K = \omega_L \left(\omega_L - \Omega_k\right)^3 \left(\frac{\sqrt{\Omega_k}}{5.8065}\right)^2 \tag{2.41}$$

⁶TDDFT, engl. time dependent density functional theory.

und Δs der Unterschied zwischen den Gleichgewichtsgeometrien in den beiden elektronischen Zuständen, der sich aus der Differenz aller internen Koordinaten ΔR_j nach der Transformation in Normalkoordinaten über die Matrix \mathbf{L}_{kj}^{-1} ergibt:

$$\Delta s = \sum_{j}^{3N-6} \mathbf{L}_{kj}^{-1} \Delta R_j \tag{2.42}$$

Die derart berechneten Intensitäten für den Fall der Resonanzverstärkung unterliegen einigen Einschränkungen. So wird angenommen, dass harmonische Potentialkurven vorliegen, sich die Schwingungsfrequenzen der Normalmoden beim Übergang nicht ändern und Duschinsky-Rotation [27] keine Rolle spielt. Als Verstärkungsmechanismus wird zudem nur die Franck-Condon-Streuung berücksichtigt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Sekundäre Donatoren im PS II

Unter Bedingungen, wie zum Beispiel kryogenen Temperaturen ($T < 180 \,\mathrm{K}$), können die in der Einleitung Kap. 1 kurz beschriebenen normalen Elektronentransferreaktionen im PS II nicht mehr vollständig stattfinden, da der Elektronentransfer vom Q_A^- zum Q_B und zwischen OEC und P_{680}^+ blockiert ist [49, 90, 116, 118, 176]. Bei Belichtung des Systems kommt es dann neben der Ladungsrekombination zwischen P_{680}^+ und Q_A^- mit geringer Quantenausbeute zu einer Oxidation alternativer Elektronendonatoren. Dabei handelt es sich um eins oder mehrere der Carotine (Car_{D1} , Car_{D2} bzw. Car_{15}) [132, 159], der Chlorophylle $(Chl_{Z,D1} \text{ und } Chl_{Z,D2})$ [196] und das Cytochrom Cyt b_{559} [31, 99]. Diese sekundären Donatoren sind eine Besonderheit des PS II, die die anderen photosynthetischen Reaktionszentren nicht aufweisen. Dieser Befund steht möglicherweise im Zusammenhang mit dem extrem hohen Redoxpotential des P_{680}^+ , welches schnell zur oxidativen Schädigung des Systems führen kann. So können unter Stressbedingungen, wie zu intensiver Lichteinstrahlung, die sekundären Donatoren das PS II-Reaktionszentrum schützen, indem zum Beispiel in einem zyklischen Elektronentransfer vom Q_B über das Cyt b_{559} zum P_{680}^+ [25, 26, 174] schnell wieder der Grundzustand hergestellt wird. Zusätzlich kann ein Überschuss an Anregungsenergie auch durch Chlorophyllkationradikale (wie z.B. Chl_{Z}^{+}) gequencht werden, die bei den sekundären Reaktionen entstehen können [166]. Das $\operatorname{Car}_{D2}^+$ fungiert wahrscheinlich als Intermediat in dem zyklischen Elektronentransfer zwischen $\operatorname{Cyt} b_{559}$ und P_{680}^+ , da der Abstand zwischen dem Cytochrom und P_{680} mit knapp 37Å zu groß für einen schnellen Elektronentransfer ist.

Abb. 3.1 zeigt einige der Abstände zwischen den Kofaktoren im PS II unter anderem auch zwischen Cyt b_{559} , Chl_{Z,D2}, Car_{D2} und Car₁₅. Es zeigt sich, dass das Carotin Car_{D2} eine ideale Lage für einen molekularen Verbindungsdraht zwischen Cyt b_{559} und P₆₈₀ besitzt.



Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Anordnung der Kofaktoren im PS II. Die Abstände zwischen den Kofaktoren sind die *edge-to-edge*-Abstände, angegeben in Å, bestimmt für die Röntgenkristallstruktur aus [59].

Das spricht für die Oxidation dieses Carotins als ersten Schritt in dem sekundären Elektronentransfer. Für den weiteren Weg existieren zwei vorgeschlagene Modelle. Zum einen das lineare Modell, bei dem Carotin erst Chl_z oxidiert, welches dann Cyt b_{559} oxidiert. Zum anderen das verzweigte Modell, bei dem ausgehend vom Carotin entweder Chl_z oder Cyt b_{559} das Elektron abgeben [46, 61, 180, 189, 190, 194, 197]. Welcher Zustand letzlich gebildet wird, hängt auch vom anfänglichen Oxidationszustand des Cyt b_{559} ab. Liegt Cyt b_{559} oxidiert vor, wie es zum Beispiel durch Zugabe von rotem Blutlaugensalz¹ erreicht wird, bilden sich unter Belichtung bei tiefen Temperaturen die langlebigen Zustände $Q_A^-P_{680}$ Chl_z⁺ und $Q_A^-P_{680}$ Car⁺. Wird durch Zugabe von Natriumascorbat und Phenazinmethosulfat (PMS) das Cytochrom zum größten Teil reduziert, induziert die Tieftemperaturbelichtung die Bildung des sehr stabilen Zustandes $Q_A^-P_{680}$ Cyt b_{559}^+ .

Die Bildung der verschiedenen Zustände lässt sich über eine Folge von Elektronentransferreaktionen beschreiben, bis die positive Ladung auf dem Donor mit dem niedrigsten Redoxpotential stabilisiert ist [189]. Im Falle der Ascorbat/PMS-Behandlung wäre das das reduzierte Cyt b_{559} . Eine Erklärung für die Zustandsverteilung bei anfänglich oxidiertem Cytochrom auf Car⁺ bzw. Chl⁺ ist, dass beim Wechseln zu kryogenen Temperaturen in

¹Kaliumhexacyanoferrat(III)/Kaliumferricyanid.



Abbildung 3.2 Absorptionsspektrum Photosystem II aus *T. elongatus* bei Raumtemperatur und pH 6.5. Die Bereiche, in denen die jeweiligen Pigmente charakteristische Absorptionsänderungen zeigen, sind hervorgehoben.

der Probe verschiedene Konformationssubzustände des Proteins eingefroren werden. Dies könnte zu einer Verteilung der Redoxpotentiale von Car⁺ und Chl⁺ führen. Liegen die Potentiale dicht beieinander, führt das zu einer heterogen Verteilung der positiven Ladung, je nachdem ob in einem Konformer eine Carotin- oder eine Chlorophyllspezies das niedrigste Redoxpotential aufweist.

3.1.1 Spektroskopische Methoden zur Charakterisierung der sekundären Donatoren

UV/Vis/NIR-Spektroskopie

Zur Untersuchung der sekundären Elektronentransferpfade und der Reaktionskinetiken bieten sich verschiedene Methoden an. Eine davon ist die UV/Vis/NIR-Spektroskopie, da die meisten Kofaktoren eine Absorption im sichtbaren Teil des elektromagnetischen Spektrums aufweisen. Abb. 3.2 zeigt das Absorptionsspektrum von Photosystem II bei Raumtemperatur solubilisiert in einer wässrigen Messlösung (5 mM MES, pH 6.5, 20 mM CaCl₂, 20 mM



Abbildung 3.3 Absorptionsspektren vom Photosystem II aus *T. elongatus* bei 77 K und pH 6.5 mit 60 %Vol Glycerol. Die rote Kurve zeigt das Spektrum der dunkeladaptierten Probe, die blaue Kurve das Spektrum nach Belichtung.

KCl, $0.02 \% (m/m) \beta$ -DM). Die Bereiche, in denen die jeweiligen Pigmente ihre charakteristische Absorption zeigen, sind hervorgehoben. Sie können als Markerbereiche dienen, sollte sich durch Änderungen in der Umgebung oder direkt an den betreffenden Molekülen das Absorptionsverhalten verändern. Nicht gezeigt sind die Bereiche im NIR, in denen deutliche Absorptionszunahmen durch die Chlorophyll- und die Carotinoxidation auftreten.

Die meisten Experimente wurden bei kryogenen Temperaturen durchgeführt. Um zu verhindern, dass durch das Gefrieren und die Eiskristallbildung die Probe undurchsichtig wird, wurde der Messlösung 60 % (v/v) Glycerol als Glasbildner zugegeben. Für die anschließenden Messungen wurde die Probe in einer PMMA-Küvette (optische Dicke d = 1 cm) entweder in einem Kryostat mit einem flüssigem Stickstoffbad (Oxford DN1704) oder einem Durchflusskryostat mit flüssigem Helium (Oxford CF1204) platziert. Die Tieftemperaturspektren zeigen aufgrund einer geringeren Linienverbreiterung mehr Struktur als die korrespondierenden Raumtemperaturspektren. In Abb. 3.3 ist das Spektrum von dunkeladaptierten PS II zu sehen, aufgenommen bei 77 K (rote Kurve). Der Anteil der Absorption der Carotine (Absorptionsmaxima bei 497 und 465 nm und eine Schulter bei



Abbildung 3.4 Absorptionsdifferenzspektren vom Photosystem II aus *T. elongatus* bei 77 K und pH 6.5 mit 60 %Vol Glycerol. Die rote Kurve zeigt die Differenz des Absorptionsspektrums nach Belichtung minus dem Dunkelspektrum mit anfänglich oxidiertem Cyt b_{559} , die blaue Kurve die Differenz mit anfänglich reduziertem Cyt b_{559} .

 $\approx 509 \,\mathrm{nm}$) hebt sich wesentlich deutlicher von der Soretbande der Chlorophylle ab. Da die Banden schmaler sind, die Oszillatorstärke² sich aber nicht ändert, erhöht sich mit sinkender Temperatur die Absorption der Probe bei gleichbleibender Konzentration. Für den Übergang von Raumtemperatur zu 77 K steigt die Absorption um einen Faktor von ungefähr 1.22 im Maximum der Q_v-Bande.

Belichtet man nun die Probe bei tiefen Temperaturen, ändert sich das Spektrum recht wenig (Abb. 3.3, blaue Kurve) - eine Folge, dass nur ein Bruchteil der Pigmente des Photosystems Änderungen unterworfen ist. Eine genauere Untersuchung des Differenzspektrums³ offenbart die Unterschiede in den schon in Abb. 3.2 vorgestellten Markerbereichen. Die Struktur des Differenzspektrums ist abhängig von der Vorbehandlung der Probe (Zugabe von Ferricyanid oder Ascorbat/PMS). Die rote Kurve in Abb. 3.4 zeigt das Differenzspektrum mit Oxidationsmittel. Das auf der Akzeptorseite entstandene Q_A^- ändert mit seiner Ladung die Energie des Q_x -Übergangs vom benachbarten Pheo_{D1} (Stark-Effekt). Dadurch

²Die Oszillatorstärke entspricht der Fläche der Absorption unter einer Bande.

³Von dem Spektrum der belichteten Probe wird das Spektrum der dunkeladaptierten Probe abgezogen.

verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Pheophytins leicht - man spricht von einem elektrochromen Effekt. Bei einer Blauverschiebung resultiert in der Differenz daraus die charakteristische Bandenform mit dem Maximum bei 540 nm, dem Minimum bei 546 nm und dem Nulldurchgang bei 543 nm. Die Bildung eines Chlorophyllkationradikals auf der Donorseite wird durch die Ausbleichung bei $433 \,\mathrm{nm}$ und die Differenzen im Q_v -Bereich nahegelegt. Die Struktur im Q_{y} -Bereich ist mit Minima bei 660, 671, 676 und 688 nm und einem Maximum bei 684 nm ziemlich komplex, was neben einer starken Ausbleichung auch auf elektrochrome Effekte deutet. Die Carotinoxidation lässt sich an der Absorptionsabnahme zwischen 450 nm und 520 nm und einer Absorptionszunahme im nahen Infrarot bei 1002 nm erkennen. Das Differenzspektrum mit Reduktionsmittel (blaue Kurve) zeigt ein deutlich anderes Muster. Die Ausbleichung bei 433 nm und die Absorptionszunahme im NIR als Marker für die Chlorophyll- bzw. Carotinoxidation fehlen fast völlig. Dafür treten für die Cytochromoxidation typische Banden mit Minima bei 428 nm und 557 nm auf. Im Q_v-Bereich tritt ebenfalls ein komplexes Bandenmuster auf, nur dass in diesem Fall die Flächen der Absorptionszunahme und -abnahme nahezu gleich groß sind, was für eine Verschiebung verschiedener Chlorophyll- und Pheophytinbanden durch elektrochrome Effekte der Ladungen auf Q_A und Cyt b_{559} als Ursache des Musters spricht.

Um Aufschluss über die Lage des Carotinkations in PS II-Proben mit Cyt b_{559}^{ox} zu erhalten, lassen sich Lineardichroismusexperimente durchführen. Dafür werden die Proben mit Gelatine zu einem Gel verrührt und über eine Presse zusammengedrückt. Durch den mechanischen Druck orientieren sich die Proteine bevorzugt in die Richtung, in der sie der wirkenden Kraft den geringsten Widerstand entgegensetzen. Die PS II-Proteinkomplexe werden so orientiert, dass die Membrannormale hauptsächlich in der Richtung des Drucks liegt. Da nun die Orientierungen der Proteine nicht mehr statistisch verteilt sind, ergibt sich eine Anisotropie der Absorption. Dabei wird die Absorption maximal, wenn der Winkel θ zwischen dem elektrischen Feld des Lichts \vec{E} und dem Dipolmoment $\vec{\mu}$ des absorbierenden Moleküls 180° erreicht:

$$A = \left|\vec{\mu}\right|^2 \cdot \left|\vec{E}\right|^2 \cdot \cos^2\theta \tag{3.1}$$

Abb. 3.5 zeigt den Lineardichroismus in den Absorptionsdifferenzspektren von PS II bei 77 K, wobei das Messlicht durch Polarisationsfilter senkrecht bzw. parallel zur Membranebene polarisiert eingestrahlt wurde. Die Absorption von Car⁺ ist deutlich höher für parallel zur Membranebene polarisiertes Licht. Dies spricht für eine bevorzugte Lokalisierung des Radikals auf dem Carotinmolekül Car_{D2}, da das Dipolmoment parallel zum konjugierten Doppelbindungssystem liegt, welches wiederum für Car_{D2} parallel zur Membranebene liegt(siehe Abb. 1.2). Die beiden anderen Carotine Car_{D2} und Car₁₅ im Reaktionszentrum zeigen eher eine senkrechte Orientierung zur Membranebene.



Abbildung 3.5 Absorptionsdifferenzspektren vom PS II aus *T. elongatus* bei 77 K mit 3 mM Ferricyanid für linear polarisiertes Licht senkrecht zur Membranebene (rote Kurve) und parallel dazu (blaue Kurve).

ESR-Spektroskopie

Neben der UV/Vis-Spektroskopie lässt sich die Identität der Kofaktoren in den verschiedenen Zuständen wegen ihrer Radikalnatur auch über die ESR-Spektroskopie nachweisen. Bei dieser Methode stellt die Vielzahl der Pigmente kein Problem dar, da nur die Kofaktoren mit ungepaarten Elektronen detektiert werden. Dadurch treten auch die durch Licht induzierten Änderungen in den Spektren wesentlich deutlicher zu Tage als in den Absorptionsspektren. Aufgenommen wurden die Spektren bei 15 K mit einer Chlorophyllkonzentration von ungefähr 2 mM. Die Belichtung erfolgte mit Weißlicht von einer 150 W Halogenlampe durch einen 10 cm Wasser- und einen 2 mm dicken Wärmeschutzfilter (KG3 von Schott). Abb. 3.6 zeigt die ESR-Spektren für dunkeladaptierte und belichtete Proben und die korrespondierenden Differenzspektren mit anfänglich reduziertem bzw. größtenteils oxidiertem Cyt b_{559} . Die Messung für komplett oxidiertes Cyt b_{559} fehlt, da das Oxidationsmittel Ferricyanid ein sehr starkes und breites ESR-Signal im Bereich der Cytochromsignale hat, was diese verdeckt. Abhängig von den Bedingungen der Isolierung und Aufreinigung der PS II-Proben kann das Cytochrom trotzdem in den meisten Zentren oxidiert vorliegen. Im Bereich des Carotin- bzw. Chlorophyllsignals hat das Ferricyanid keinen Beitrag und es



Abbildung 3.6 ESR-Spektren vom PS II aus *T. elongatus* bei 15 K und pH 6.5, die schwarzen Kurven sind die Spektren der dunkeladaptierten Probe, die roten Kurven Spektren während der Belichtung und die blauen Kurven die resultierenden Differenzen. a) ESR-Differenzsignale von größtenteils anfänglich oxidiertem Cytochrom ohne Zugabe von Ferricyanid, b) Tyr_D^{ox}-Signal (schwarze Kurve) plus Car⁺/Chl⁺-Signal (rote Kurve) nach Zugabe von Ferricyanid, c) Cytochromdifferenzsignale nach Ascorbat/PMS-Zugabe, d) wie b) anstatt Ferricyanid Zugabe von Ascorbat/PMS. ESR-Messparameter für die Cytochromsignale: Mikrowellenfrequenz von 9.56 GHz, Modulationsfrequenz von 12.5 kHz, Zeitkonstante von 82 ms, Mikrowellenleistung von 10 mW, Modulationsamplitude von 10 G. Geänderte Parameter für die Tyr_D- bzw. Chl⁺/Car⁺-Signale: Mikrowellenleistung von 10 μ W, Modulationsamplitude von 2 G.

lassen sich Spektren mit komplett oxidiertem $Cyt b_{559}$ aufnehmen. Im Dunkelspektrum mit $Cyt b_{559}^{ox}$ kommt das größte Signal vom oxidierten Tyrosin Tyr_D. In den Proben mit Ascorbat/PMS fehlt dieses Signal fast völlig. Das kleine Signal im Bereich des Tyr_D, das trotz mitunter starker Reduktionsmittel verbleibt, könnte eventuell vom Q_A^- kommen⁴, wenn das Nicht-Hämeisen Fe(II) in einer Low-Spin-Konfiguration (S = 0) vorliegt und damit magnetisch entkoppelt vom Q_A^- ist⁵ [156].

Unter der Belichtung lässt sich die Cytochromoxidation als ein Anwachsen der Banden bei $g_u \approx 2.18$ und $g_z \approx 3.05$ beobachten, was zu den positiven Signalen in den Differen-

⁴Reduziert durch die zugesetzten Chemikalien.

⁵Normalerweise liegt das Fe(II) als S = 2 vor und ist magnetisch an das Q_A^- gekoppelt. Dadurch ergeben sich sehr breite und recht schwache ESR-Signale bei $g \approx 1.65$, $g \approx 1.82$ und $g \approx 1.9$ [155].

zen führt [123]. Das Auftreten eines sehr starken Signals bei g = 2.0027 bei Proben mit anfänglich oxidiertem Cyt b_{559} , welches dem Tyr^{ox}_D-Signal überlagert ist, wird der Car/Chl-Oxidation zugeschrieben [123]. Bei anfänglich reduziertem Cyt b_{559} tritt im Tyr_D-Bereich ein schwaches Signal mit der Belichtung auf. Ursache könnte das entstehende, entkoppelte Q_A^- sein oder ebenfalls Carotin- bzw. Chlorophylloxidation in einem Bruchteil der Zentren. Bei den hier im X-Band durchgeführten Messungen lässt sich nicht zwischen Chl⁺ und Car⁺ unterscheiden. Dies wird erst möglich durch Hochfeld-ESR-Experimente [107]. Weitere interessante Möglichkeiten bieten fortgeschrittenere ESR-Methoden wie ELDOR⁶ und ESEEM⁷, bei denen aus den Spektren die Abstände zwischen Radikalpaaren extrahiert werden können[95, 169]. So wurde zum Beispiel für das Radikalpaar Tyr^o_DChl⁺_Z ein Abstand von 29.5 Å bestimmt [96]. Dieser Abstand spricht eher für die Lokalisierung der positiven Ladung auf dem Chlorophyll Chl_{Z,D2} als auf Chl_{Z,D1}.

Raman-Spektroskopie

Das Spektrum der Möglichkeiten zur Charakterisierung der sekundären Donatoren wurde noch durch die Schwingungsspektroskopie in Form der Raman-Spektroskopie erweitert. Die Spektren werden dominiert von den Banden der β -Carotinmoleküle (Abb. 3.7). Deren Hauptbanden liegen bei 1526, 1157 und 1005 cm⁻¹. Ansonsten trägt nur noch das Chlorophyllschwingungsspektrum einen kleinen Teil zum Ramanspektrum des Photosystem II bei. Die Chlorophyllbanden sind am Spektrum der dunkeladaptierten Probe (schwarze Kurve) mit Sternen markiert. Nach Belichtung der Probe mit Weißlicht (rote Kurve) bei 77 K treten im Bereich zwischen 750 cm⁻¹ und 1650 cm⁻¹ viele neue Banden auf, die stärksten bei 1490, 1163 und 1002 cm⁻¹. Diese konnten nur bei einer Anregungswellenlänge des Lasers von 1064 nm detektiert werden, bei Wellenlängen des Lasers im sichtbaren Bereich wurden sie nicht beobachtet. Das spricht für die Bildung eines Carotinkationradikals, dessen Absorptionsmaximum mit 1002 nm (siehe Abb. 3.4) in Resonanz mit der Anregung bei 1064 nm liegt.

Diese Annahme wird durch quantenmechanische Berechnungen des Ramanspektrums eines β -Carotinkations bestätigt (siehe Kap. 3.3), welches eine gute Übereinstimmung zum Differenzspektrum (blaue Kurve) zeigt. Ein weiterer Hinweis, dass es sich zum Beispiel nicht um Markerbanden für ein Chlorophyllkationradikal handelt, kommt aus Ramanmessungen am PS I bei 77 K. Das Ramanspektrum vom PS I ist dem Spektrum vom PS II nahezu identisch. Der Einfluss des höheren Chl:Car-Verhältnisses im PS I führt lediglich zu einem leichten Anstieg der Intensitäten der Chlorophyllbanden. Die unterschiedlichen Proteinumgebungen scheinen keinen Einfluss auf das Ramanspektrum der Carotine zu haben. Wird das PS I nun bei tiefen Temperaturen belichtet, entsteht der stabile Zustand

⁶ELDOR, engl. electron-electron double resonance.

⁷ESEEM, engl. electron spin echo envelop modulation.



Abbildung 3.7 Ramanspektren vom PS II aus *T. elongatus* bei 77 K, pH 6.5 und einer Anregungswellenlänge des Lasers von 1064 nm. Die schwarze Kurve ist das Spektrum der dunkeladaptierten Probe, die rote Kurve das Spektrum nach Belichtung mit Weißlicht und die blaue Kurve die resultierende Differenz. Banden der Chlorophylle im Dunkelspektrum sind mit Sternchen markiert.

 $P_{700}^+F^-$. Es entsteht also ein Chlorophyllkationradikal. In den Ramanspektren der belichteten PS I-Probe aber treten die charakteristischen Banden im Bereich zwischen 750 cm⁻¹ und 1650 cm⁻¹ wie im PS II nicht auf (Daten nicht gezeigt). Banden, die für die Chlorophylloxidation charakteristisch wären [67, 68], konnten bei der Anregungswellenlänge des Lasers von 1064 nm innerhalb des Rauschens nicht festgestellt werden. In dem Wellenzahlenbereich zwischen 2000 cm⁻¹ und 3000 cm⁻¹ treten im PS II-Spektrum Banden auf, die im Spektrum des PS I nicht beobachtet werden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Kombinationsbanden und Obertöne der stärksten Moden des Carotinradikals. In Tab. 3.1 sind einige mögliche Kombinationen im Vergleich zu den im Experiment auftretenden Banden aufgelistet. Die Werte zeigen eine sehr gute Übereinstimmung.

Uber die Ramanspektroskopie lässt sich also sehr empfindlich die Carotinoxidation nachweisen. Eine detaillierte Betrachtung der Ramanspektren von β -Carotin und ihrer quantenmechanischen Berechnung erfolgt in Kap. 3.3.

Art der Kombination	berechneter Wert der Kombinations-	experimenteller Wert
bzw. des Obertons	bande bzw. des Obertons	
$ u_{1490} + u_{1163} $	$2653{\rm cm}^{-1}$	$2654\mathrm{cm}^{-1}$
$ u_{1490} + u_{1002} $	$2492 {\rm cm}^{-1}$	$2495{\rm cm}^{-1}$
$ u_{1163} + u_{1002} $	$2165\mathrm{cm}^{-1}$	ca. $2168 \mathrm{cm}^{-1}$
$2 \cdot \nu_{1490}$	$2980 {\rm cm}^{-1}$	$2967\mathrm{cm}^{-1}$
$2 \cdot \nu_{1163}$	$2326 {\rm cm}^{-1}$	$2324{\rm cm}^{-1}$
$2 \cdot \nu_{1002}$	$2004{\rm cm}^{-1}$	ca. $2004 \mathrm{cm}^{-1}$

Tabelle 3.1Berechnete und experimentelle Werte der Ramanverschiebung der Kombinationsbanden und
der Obertöne der stärksten Banden aus dem Ramanspektrum vom PS II bei 77 K.

3.1.2 Bildung und Zerfall der ladungsgetrennten Zustände

Über die verschiedenen spektroskopischen Methoden lassen sich gut die sekundären Kofaktoren charakterisieren, die bei tiefen Temperaturen die beschriebenen langlebigen, ladungsgetrennten Zustände bilden. Zur weiteren Untersuchung wurden Experimente durchgeführt, um die Quantenausbeuten und Kinetiken der Bildung und des Zerfalls der jeweiligen Zustände zu bestimmen. So lassen sich Aussagen über die Quantenausbeuten treffen, wenn die Proben mit hinreichend hellen und kurzen Lichtblitzen belichtet werden, so dass jedes Reaktionszentrum durch genau ein Photon angeregt wird und die Bildung der Zustände in Abhängigkeit der Blitzzahl betrachtet werden. Abb. 3.8 zeigt die Absorptionsdifferenzspektren von PS II mit anfänglich oxidiertem $Cytb_{559}$ für verschiedene Blitzzahlen und kontinuierlicher Belichtung mit weißem Licht für eine Minute. Deutlich zu sehen ist die ansteigende Carotin- und Chlorophylloxidation und die Q_A-Reduktion mit zunehmender Belichtung.

Für die Untersuchung der Korrelation zwischen der Bildung von $\operatorname{Car}^+/\operatorname{Chl}^+$ und Q^-_A wurden die Amplituden der Markerbanden für die Chlorophyll-/Carotinoxidation und Q_A -Reduktion⁸ als relative Ausbeuten zu den Amplituden, z.B. bei 68 Blitzen, gegen die Blitzzahl aufgetragen (siehe Abb. 3.9). Es zeigt sich, dass die beiden Donatoren und das Chinon die gleiche Bildungscharakteristik aufweisen, also zusammen jeweils ein Radikalpaar bilden, und somit keinen Hinweis darauf geben, dass noch ein weiterer Donor involviert ist.

Für eine Abschätzung des Verhältnisses mit dem die sekundären Donatoren gebildet werden, wurden aus den Absorptionsänderungen mit den Extinktionsdifferenzkoeffizienten $\Delta \varepsilon$ die Konzentrationen berechnet und miteinander verglichen. Die in der Literatur

⁸Für Chl⁺ die Ausbleichung bei 433 nm, Car⁺ die Absorption bei 1002 nm und Q_A^- der Höhenabstand zwischen den Banden bei 540 nm und 546 nm.



Abbildung 3.8 Absorptionsdifferenzspektren vom PS II aus *T. elongatus* bei 77 K, pH 6.5, mit 1 mM Ferricyanid und 60 %Vol Glycerol mit oxidiertem Cytochrom b_{559} bei 77 K, für Belichtung mit einem Blitz (schwarze Kurve), 3 Blitzen (rot), 8 Blitzen (blau), 18 Blitzen (grün), 68 Blitzen (rosa) und 1 min Dauerlicht (türkis).

angegebenen Werte für $\Delta \varepsilon$ unterliegen allerdings einer recht großen Schwankung, weswegen das Verhältnis zwischen Carotin- und Chlorophylloxidation nur als grobe Näherung zu verstehen ist. Mit Werten von 130 mM⁻¹cm⁻¹ bei 1002 nm [117] und 50 mM⁻¹cm⁻¹ bei 433 nm [33] ergibt sich das Verhältnis Chl⁺ : Car⁺ zu ungefähr 1 : 0.6. Die Konzentrationen von Car⁺ und Chl⁺ ergeben zusammen ungefähr die P₆₈₀-Konzentration. Es wird also fast in jedem Zentrum ein langlebiger Zustand gebildet, der entweder ein Car⁺ oder ein Chl⁺ involviert.Für die Konzentrationsbestimmung des Zustandes Cytb⁺₅₅₉Q⁻_A wurde aus der Absorptionsdifferenz zwischen chemisch komplett oxidiertem bzw. reduziertem Cytochrom⁹ der Extinktionsdifferenzkoeffizient ($\Delta \varepsilon = \varepsilon_{\rm red} - \varepsilon_{\rm ox}$) bestimmt. Es ergibt sich ein Wert von 39 mM⁻¹cm⁻¹ und es zeigt sich, dass bei Belichtung der Probe mit anfänglich reduziertem Cytochrom der Zustand Cytb⁺₅₅₉Q⁻_A in ungefähr 70% der Zentren gebildet wird (siehe Anhang). In den restlichen Zentren bilden sich zu einem kleinen Teil die Zustände, diese Zentren lassen sich also nicht schließen.

⁹Durch Zugabe von Ferricyanid bzw. Dithionit oder Ascorbat/PMS.



Abbildung 3.9 Ausbeute der Bildung von Car⁺ (schwarze Kreise), Chl⁺ (rot) und Q_A^- (blau), bestimmt aus den Absorptionsspektren und normiert auf den Wert für 68 Blitze. Der Wert für 1 min Dauerlicht ist als *cw* markiert.

Mit steigenden Blitzzahlen werden pro Blitz absolut gesehen weniger langlebige Zustände gebildet, da mit jedem Blitz ein Teil der Zentren geschlossen wird¹⁰, in welchem im nächsten Blitz keine langlebigen Zustände mehr gebildet werden können. Das lässt sich mit Hilfe der Blitzlichtspektroskopie auch an dem Signal von der $P_{680}^+Q_A^-$ -Rekombination beobachten (siehe den eingebetteten Graphen in Abb. 3.10). Das Signal wird bei einer Messlichtwellenlänge von 826 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge lassen sich gut die Bildung und der Zerfall des P_{680}^+ verfolgen. Der Zerfall hat bei 5 K einen biexponentiellen Charakter mit Halbwertszeiten von 2.6 und 7.4 ms mit jeweils ungefähr gleich großen Amplituden. Mit fortschreitenden Blitzanregungen der Probe sinkt die Anfangsamplitude, da durch die Bildung der langlebigen Zustände nicht mehr so viel $P_{680}^+Q_A^-$ erzeugt werden kann. Nach 200 Blitzen sind etwas über die Hälfte der Zentren geschlossen, nach 1000 Blitzen sind es 65%. Im Licht fällt die Anfangsamplitude auf ungefähr 5% des Startwerts. Dies repräsentiert die Zentren, die sich nicht schließen lassen. Der genaue Wert hängt von der Lichtintensität und damit der Anregungsrate ab. Zwischen den Zuständen $P_{680}Q_A$ und $P_{680}^+Q_A^-$ stellt sich

¹⁰Eben durch die Bildung der langlebigen, sekundären Zustände in einem Teil der Reaktionszentren.



Abbildung 3.10 Anfangsamplitude bei 826 nm, erhalten aus den ΔA -Zeitverläufen bei 77 K (exemplarisch im eingebetteten Graphen für den 1. und 12. Blitz) als Maß für die Bildung des Zustandes $P_{680}^+Q_A^-$ pro Blitz (schwarze Kreise) mit einer Blitzrate von 0.5 Hz und mit Cyt b_{559}^{ox} . Die rote Kurve ist der Fit nach Gl. 3.2

im Licht ein Gleichgewicht ein, welches mit steigender Anregungsrate auf der Seite von $P_{680}^+Q_A^-$ liegt. Dadurch sinkt die Absorptionsänderung nach dem Blitz, da sich nicht mehr so viel P_{680}^+ bilden lässt. Abb. 3.10 zeigt die Auftragung der Anfangsamplituden in Abhängigkeit der Blitzzahl relativ zur Amplitude für den ersten Blitz bei 77 K¹¹. Die Werte der Anfangsamplituden A als Funktion der Blitzzahl n lassen sich als eine Verknüpfung von mindestens drei geometrischen Folgen fitten:

$$A = A_1 \cdot q_1^{n-1} + A_2 \cdot q_2^{n-1} + A_3 \cdot q_3^{n-3} + A_4$$
(3.2)

Dies spricht dafür, dass bei tiefen Temperaturen verschiedene Konformationssubzustände des Proteins eingefroren sind, die sich in der Quantenausbeute für die Bildung der langlebigen Zustände unterscheiden. Es ergibt sich für die Bildung der ladungsgetrennten, langlebigen Zustände $\operatorname{Car}^+ Q_A^-$ und $\operatorname{Chl}^+ Q_A^-$ pro Blitz in 25% der Zentren eine Ausbeute von 8%, in 30% eine Ausbeute von 0.9%, in 40% eine sehr geringe Ausbeute von 0.03%

¹¹Für Messungen bei 5 K ergibt sich ein sehr ähnliches Bild.

und eine konstante Zentrenzahl, die sich nicht schließen lässt, von ungefähr 5%. In diesem recht simplen Schema wird allerdings die Ladungsrekombination zwischen den sekundären Donatoren und dem Chinon vernachlässigt, die im Zeitbereich der Messungen auftritt. Da die Rekombination ebenfalls mehrphasig verläuft¹², ergäbe sich ein wesentlich komplexeres Schema, bei welchem auch der Effekt der Anregungsfrequenz berücksichtigt werden müsste. So ergibt sich mit fortschreitenden Blitzzahlen eine Art Gleichgewichtszustand, bei dem sich die Bildung und der Zerfall der langlebigen Zustände in der Waage halten und nahezu gleichviel $P_{680}^+Q_A^-$ pro Blitz erzeugt wird. Mit steigender Blitzrate sollte sich das Gleichgewicht zu Gunsten der Bildung der oxidierten sekundären Donatoren verschieben, was sich in höheren Ausbeuten für die Bildung niederschlagen sollte.

Um Aussagen über die Bildung des stabilen Zustands $Cyt b_{559}^+ Q_A^-$ treffen zu können, wurden die gleichen Experimente an PS II-Proben mit anfänglich reduziertem Cytochrom durchgeführt. In Abb. 3.11 sind die Absorptionsänderungen für verschiedene Blitzzahlen



Abbildung 3.11 Absorptionsdifferenzspektren vom PS II aus *T. elongatus* bei 77 K, pH 6.5, mit 5 mM Ascorbat, $10 \,\mu$ M PMS und 60 %Vol Glycerol mit anfänglich reduziertem Cytochrom b_{559} , für Belichtung mit einem Blitz (schwarze Kurve), 3 Blitzen (rot), 8 Blitzen (blau), 18 Blitzen (grün), 68 Blitzen (rosa) und 1 min Dauerlicht (türkis).

 $^{^{12}{\}rm Siehe}$ S. 55 ff.



Abbildung 3.12 Anfangsamplitude bei 826 nm, erhalten aus den ΔA -Zeitverläufen bei 77 K als Maß für die Bildung des Zustandes $P_{680}^+Q_A^-$ pro Blitz (schwarze Kreise) mit einer Blitzrate von 0.5 Hz mit Cyt b_{559}^{red} . Die rote Kurve ist der Fit nach Gl. 3.2. Der eingebettete Graph zeigt die Ausbeute der Bildung von Q_A^- (schwarze Kreise), Cyt⁺ bei 557 nm abgelesen (rot) und Cyt⁺ bei 428 nm abgelesen (blau), bestimmt aus den Absorptionsspektren und normiert auf den Wert für 68 Blitze. Der Wert für 1 min Dauerlicht ist als *cw* markiert.

und 1 min Dauerlicht zu sehen. Auch hier lässt sich wieder das sukzessive Anwachsen des langlebigen Zustands mit steigenden Blitzzahlen anhand der Markerbanden beobachten. Die entsprechende Auftragung in dem in Abb. 3.12 eingefügten Graphen zeigt eine starke Korrelation zwischen der Cytochromoxidation und der Chinonreduktion. Die zu Abb. 3.10 analoge Auftragung der Anfangsamplituden der blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei 826 nm in Abhängigkeit der Blitzzahl relativ zur Amplitude für den ersten Blitz zeigt auch für PS II mit anfänglich reduziertem Cyt b_{559} eine stark heterogene Verteilung der Quantenausbeuten. Über den Fit nach Gl. 3.2 ergeben sich in 40% der Zentren eine Ausbeute von 12.6%, in 38% eine Ausbeute von 1.3% und in dem Rest wieder ein sehr kleine Ausbeute von 0.05%. Die scheinbar höheren Ausbeuten als bei der Carotin- und Chlorophylloxidation deuten auf die unterschiedlichen Zerfallsprozesse hin. Der Zustand Cyt $b_{559}^+Q_A^-$ ist bei tiefen Temperatur stabil und zerfällt praktisch nicht. Durch die fehlende Rekombination kann mit der Zeit auch nicht wieder mehr $P_{680}^+Q_A^-$ erzeugt werden, wie



Abbildung 3.13 Absorptionsdifferenzspektren vom PS II aus *T. elongatus* mit oxidiertem Cyt b_{559} bei 77 K, pH 6.5, mit 1 mM Ferricyanid und 60 %Vol Glycerol für Messungen im Licht (schwarze Kurve), 1 min nach der Belichtung (rot), nach 6 min (blau), 15 min (grün), 30 min (rosa) und 60 min (türkis).

das in PS II-Proben mit voroxidiertem Cyt b_{559} , ob der Rekombination von Car⁺Q_A⁻ und Chl⁺Q_A⁻ der Fall ist.

Zur Untersuchung der Rekombinationsreaktionen wurden die Absorptionsänderungen in den Markerbereichen der UV/Vis/NIR-Spektren als Funktion der nach der Belichtung verstrichenen Zeit aufgenommen. Dafür wurden zum einen wieder die Absorptionsänderungen bei den Markerbereichen aus den Spektren abgelesen und zum anderen mit Hilfe des Kinetikprogramms der Cary-Spektrometersoftware die Absorption bei einer Wellenlänge als Funktion der Zeit gemessen. Beide Methoden haben Vor- und Nachteile, so ist die zeitliche Auflösung beim Ablesen von ΔA aus den Absorptionsdifferenzspektren wegen der für die Aufnahme der Spektren benötigten Zeit recht niedrig. Dafür können eventuelle Basislinienverschiebungen beobachtet und für die Auswertung berücksichtigt werden. Dies lässt sich bei den Messungen bei einer festen Wellenlänge nicht feststellen, im Gegenzug bieten diese Kinetikmessungen eine höhere zeitliche Auflösung. Abb. 3.13 zeigt die Absorptionsdifferenzspektren in den Markerbereichen für Chl⁺, Car⁺ und Q_A⁻ aufgenommen nach unterschiedlichen Zeiten im Dunkeln nach der Belichtung. Mit fortschreitender Zeit im Dunkeln werden die Absorptionsänderungen wieder kleiner, da die im Licht akkumulierten Zustände Chl⁺Q_A⁻ und Car⁺Q_A⁻ wieder zerfallen. Die gleichen Experimente



Abbildung 3.14 Absorptionsänderungen als Funktion der Zeit nach der Belichtung normiert auf die maximale Absorptionsänderung im Licht für die Rekombination von Chl⁺ (schwarze Vierecke) mit Q_{A}^{-} (grüne Vierecke) und Car⁺ (schwarze Kurve) mit Q_{A}^{-} (grüne Kreise). Die roten Kurven sind die Fits nach Gl. 3.3.

mit anfänglich reduziertem Cytochrom b_{559} zeigen, dass der bei tiefen Temperaturen unter der Belichtung gebildete Zustand Cytochrom $b_{559}^+Q_A^-$ stabil ist (Daten nicht gezeigt). Der Zerfall von Chl⁺Q_A^- und Car⁺Q_A^- als Funktion der Zeit im Dunkeln nach der Belichtung ist in Abb. 3.14 gezeigt. Die Absorptionsänderungen sind dabei auf die jeweiligen maximalen ΔA -Werte normiert, um zu verdeutlichen, dass der Rückgang von Chl⁺, Car⁺ und Q_A^die gleiche Kinetik aufweist. Von Messung zu Messung unterscheiden sich die Kinetiken in etwa in der Größenordnung wie der in Abb. 3.14 sichtbare Unterschied zwischen der Chl⁺Q_A^- und der Car⁺Q_A^-Rekombination, je nachdem, in welchen konformationellen Unterzuständen sich die PS II-Komplexe nach dem Einfrieren befinden. Diese Heterogenität lässt sich auch an den einzelnen Zerfallskurven beobachten. Um die Kurven mit einem exponentiellen Zerfall anzupassen, werden mindestens zwei Exponentialfunktionen benötigt. Diese weisen allerdings am Anfang des Zerfalls noch eine recht erhebliche Abweichung von den experimentellen Kurven auf, so dass für den Fit noch eine dritte Exponentialfunktion hinzugefügt wurde. Die gemessenen Kurven wurden dann mit der Gleichung

$$\Delta A(t) = A_1 \cdot \exp\left(-\frac{\ln 2 \cdot t}{t_{1/2}^1}\right) + A_2 \cdot \exp\left(-\frac{\ln 2 \cdot t}{t_{1/2}^2}\right) + A_3 \cdot \exp\left(-\frac{\ln 2 \cdot t}{t_{1/2}^3}\right) + A_0 \quad (3.3)$$

angefittet. Im Schnitt ergeben sich für alle durchgeführten Experimente die gleichen Werte für den Zerfall von Chl⁺, Car⁺ und Q_A⁻. Ein Teil der langlebigen Zustände $A_1 = (12 \pm 4) \%$ zerfällt mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2}^1 = (60 \pm 20)$ s und ein Teil $A_2 = (18 \pm 4) \%$ mit $t_{1/2}^2 = (700 \pm 200)$ s. Der Rest zerfällt im Stundenmaßstab $A_3 = (35 \pm 5) \%$ mit $t_{1/2}^3 = (1.5 \pm 0.5)$ h bzw. bleibt innerhalb der Messzeit¹³ stabil $A_0 = (30 \pm 5) \%$. Auch mit der dritten Exponentialfunktion verbleibt am Anfang des Zerfalls ein kleiner Rest ($\approx 5 \%$), der sich mit Gl. 3.3 nicht anpassen lässt und mit $t_{1/2} \approx 7$ s zerfällt.

3.1.3 Tieftemperaturmessungen an pflanzlichem PS II

Die beschriebenen Experimente zum Nachweis der sekundären Donatoren im PS II wurden neben dem Photosystem aus dem Cyanobakterium T. elongatus zum Teil auch an PS II-Proben aus Spinat durchgeführt. Die grundlegenden Beobachtungen der Kofaktoroxidation von Carotin, Chlorophyll und Cytochrom bleiben gleich. Es gibt jedoch einige interessante Effekte, die nur in dem pflanzlichen Photosystem auftreten.

Im PS II des Cyanobakteriums lässt sich anhand der Absorptionszunahme im NIR beobachten, dass nach rund 20 s intensiver Belichtung die maximale Ausbeute an Carotinoxidation erreicht ist. Eine weitere Belichtung zeigt keinen Effekt. Im PS II aus Spinat hingegen ist die maximale Ausbeute bereits nach wenigen Sekunden erreicht und eine weitere Belichtung führt zu einem Rückgang der Absorption bei 988 nm (siehe Abb. 3.15). Während durch andauernde Belichtung offensichtlich das Carotinkationradikal verschwindet, taucht um 828 nm eine kleinere Absorptionsbande auf, die sich in den Absorptionsspektren von PS II aus *T. elongatus* normalerweise nicht so deutlich beobachten lässt. Die Lage der Bande spricht für ein Chl⁺, könnte aber auch von einem Carotindikation kommen [85, 86, 113]. Zumindest die Chlorophylloxidation müsste sich mit einer Ausbleichung in der Soretregion bei 433 nm bemerkbar machen. In Abb. 3.16 sind die Absorptionsdifferenzspektren für eine kurze (ca. 60 s, schwarze Kurve) und eine lange Belichtung (ca. 1800 s, rote Kurve) gezeigt. Nach 60 s intensiver Belichtung ist noch der größte Teil der Carotinoxidation erhalten, wohingegen nach 1800 s Lichteinstrahlung bereits ein großer Teil von Car⁺ verschwunden ist (Abb. 3.15). Beide Differenzspektren weisen ein gleich großes Signal um 543 nm auf, das

¹³Die Dauer einzelner Messungen betrug bis zu 6 h.



Abbildung 3.15 Absorptionsdifferenzspektren vom PS II aus Spinat mit oxidiertem Cytochrom b_{559} bei 77 K, pH 6.5, mit 1 mM Ferricyanid und 60 %Vol Glycerol für Messungen nach einer Belichtung von 5 s (schwarze Kurve), von 60 s (rot) und von 500 s (blau). Der eingefügte Graph zeigt die Absorptionsänderungen bei 1002 nm für PS II aus *T. elongatus* (rote Kurve) und bei 988 nm für PS II aus *S. Oleracea* (blaue Kurve) als Funktion der Zeit während der Belichtung normiert auf die maximale Absorptionsänderung.

Carotinkationradikal rekombiniert also nicht mit dem Q_A^- im Licht. Da der Probe keine Zusätze zugegeben wurden, liegt in einem Teil der Zentren Cyt b_{559} reduziert vor, was zu der kleinen Ausbleichung bei 428 nm führt. In dem Differenzspektrum mit kurzer Belichtung lässt sich im Signal/Rausch-Verhältnis keine Ausbleichung bei 433 nm erkennen, die für die Chlorophylloxidation charakteristisch wäre. Dafür tritt bei 445 nm eine negative Bande auf. In Differenzspektren von Proben, in denen Cyt b_{559} durch Ferricyanidzugabe voroxidiert vorliegt, erscheint gleichzeitig bei ungefähr 418 nm eine positive Bande, die beim zum Teil reduziert vorliegendem Cyt b_{559} durch die Ausbleichung bei 428 nm überlagert wird. Positive und negative Bande zusammen mit dem Umkehrpunkt bei 433 nm könnten einem elektrochromen Effekt der positiven Ladung des Carotins auf ein benachbartes Chlorophyll geschuldet sein (z.B. Chl_z). Auch in der Q_y-Region sind vornehmlich elektrochrome Bandenverschiebungen zu sehen. Um zu verdeutlichen, was unter der längeren Belichtung im Vergleich zur kurzen Belichtung noch an Absorptionsänderungen auftritt, wurde von beiden Spektren wiederum ein Differenzspektrum erzeugt. Das heißt, vom Spektrum nach



Abbildung 3.16 Absorptionsdifferenzspektren vom PS II aus Spinat ohne Zusätze bei 77 K, pH 6.5 und mit 60 %Vol Glycerol für Messungen nach einer Belichtung von 60 s (schwarze Kurve) und von 1800 s (rot). Die blaue Kurve stellt die Differenz aus der schwarzen und der roten Kurve dar.

30 min Licht wurde das kürzer belichtete abgezogen (Abb. 3.16 blaue Kurve). Das derart erhaltene Doppeldifferenzspektrum offenbart deutliche Anzeichen der Chlorophylloxidation anhand der Ausbleichung bei 433 und 666 nm. Gleichzeitig nimmt die Absorption im Markerbereich des neutralen Carotins wieder an Intensität zu, was zu den positiven Banden bei 446, 476 und 507 nm führt. Es scheint, dass durch die lang andauernde Belichtung aus dem Zustand (Car⁺Q_A⁻) der Zustand (Chl⁺Q_A⁻) gebildet wird. Messungen für verschiedene Dunkeladaptionszeiten deuten an, dass (Chl⁺Q_A⁻) noch langlebiger als (Car⁺Q_A⁻) ist, da die Ausbleichung bei 433 nm einen langsameren Rückgang zeigt.

Um zu klären, ob der Mechanismus der Umwandlung von Car⁺ in Chl⁺ etwas mit der Anregung des Chlorophylls in einen angeregten Singulettzustand oder des Carotinkationradikals in einen angeregten Dublettzustand zu tun hat, wurde die Belichtung jeweils nur in bestimmten Wellenlängenbereichen durchgeführt. Dafür wurde zum einen das Licht durch ein Rotglas (RG 780 von Schott) gefiltert, welches nur Licht im nahen Infrarot ab 780 nm durchlässt. Zum anderen wurde durch ein Blauglas (BG 39 von Schott) und zusätzlich ein Wärmeschutzglas (KG 3 von Schott) das Licht auf den sichtbaren Bereich beschränkt.



Abbildung 3.17 Absorptions-Zeitverlauf bei 988 nm vom PS II aus Spinat mit 0.5 mM Ferricyanid bei 77 K, pH 6.5 und mit 60 %Vol Glycerol. Die Kurve wurde zu Teilen im Dunkeln (schwarz) und unter Belichtung aufgenommen (gelb - Weißlicht, rot - Belichtung im NIR, blau - Weißlicht ohne IR-Anteil). Weitere Details stehen im Text.

Durch das infrarote Licht sollte selektiv Car^+ mit seiner Absorptionsbande bei 988 nm angeregt werden, was durch das Licht im sichtbaren Bereich nicht geschieht. Dieses soll im Gegenzug dazu dienen, Chlorophyll anzuregen. In Abb. 3.17 ist das Ergebnis der verschiedenen Belichtungen anhand des Absorption-Zeit-Verlaufs bei einer Messwellenlänge von 988 nm dargestellt. Nach einer kurzen Dunkelphase am Anfang wurde die Probe für einige Sekunden mit dem weißen Licht ohne Filter belichtet (in Abb. 3.17 gelb markiert). Die Absorption steigt auf Grund der Bildung des Carotinkationradikals. Nach dieser Belichtung wurde die Probe für 10 min dunkeladaptiert, was zu der Rekombination von Car⁺ mit Q_A^- führt und damit zum Abfall der Absorption bei 988 nm. Erneute kurze Belichtung mit Weißlicht lässt die Absorption wieder auf den Wert vor der Dunkeladaption schnellen. Es lässt sich also reversibel wieder der Zustand (Car⁺ Q_A^-) bilden. In der anschließenden Belichtung mit dem durch das Rotglas gefilterten Licht (in Abb. 3.17 rot markiert) fällt die Absorption mit der Zeit mehr oder weniger mit der gleichen Kinetik ab wie in der Dunkeladaption. Eine weitere kurze Belichtung mit dem ungefilterten Licht lässt auch hier wieder die Absorption des Carotinradikals auf den Anfangswert steigen. Im Gegensatz dazu steht



Abbildung 3.18 Absorptionsdifferenzspektren von PS II aus Spinat mit 0.5 mM Ferricyanid bei 77 K, pH 6.5 und mit 60 %Vol Glycerol. Dargestellt sind die Spektren nach einer Belichtung mit weißem Licht ohne IR-Anteil von 60 s (rote Kurve), von 600 s (blau) und von 1800 s (schwarz) minus dem Spektrum nach einer Belichtung mit Weißlicht für 5 s.

die Messung unter Belichtung mit dem durch Blau- und Wärmeschutzglas gefilterten Licht (in Abb. 3.17 blau markiert) und längere Belichtung ohne Filter (gelb markiert). Der Abfall der Absorption zeigt in beiden Fällen den gleichen Zeitverlauf, der von dem in der Dunkeladaption und unter NIR-Belichtung abweicht. Auch nach dieser Belichtung wurde die Probe wieder 10 min dunkeladaptiert und es kommt wieder zur ($Car^+Q_A^-$)-Rekombination. Wird die Probe nun erneut belichtet, steigt die Absorption nur auf den Wert vor der letzten Dunkeladaption bzw. nach der langen Belichtung im sichtbaren Bereich des Lichts. Es lässt sich also nicht mehr die ursprüngliche Menge an Car⁺ generieren, da sich mit Chl⁺Q_A⁻ ein sehr langlebiger, ladungsgetrennter Zustand aufgebaut hat. Die Chlorophylloxidation lässt sich in Abb. 3.18 in den Absorptionsdifferenzspektren in der Soret-Region nur nach Belichtung mit Blau- und Wärmeschutzglas verfolgen. Mit steigender Belichtungszeit von 60 bis 1800 s wird die Ausbleichung bei 433 nm größer. Gleichzeitig steigt auch die Absorption für das neutrale Carotin wieder an. Die Belichtung mit Licht im NIR zeigt diesen Effekt nicht. Offensichtlich hat der Elektronentransfer von dem Chlorophyll zu dem Carotin nichts mit der Anregung des Carotinradikals zu tun, sondern eher mit der Anregung des Chlorophylls

in einen elektronisch angeregten Zustand. In diesem Zustand könnte dann das Reduktionspotential hoch genug liegen, um das Carotinradikal zu reduzieren [189]. Im Gegensatz zu diesem Phänomen im PS II aus Spinat erfolgt die Chlorophylloxidation im PS II aus dem Organismus T. elongatus in einem Großteil der Zentren (siehe Kap. 3.1.2) bereits nach kurzer Belichtung. Der Unterschied zwischen den beiden Organismen könnte in Änderungen der Proteinumgebung für die beiden Kofaktoren liegen, durch die sich die Redoxpotentiale verschieben können. Unter der Annahme, dass hauptsächlich die sekundären Donatoren in der D2-Untereinheit oxidiert werden, vornehmlich also Car_{D2} und $\operatorname{Chl}_{Z,D2}$ wurden die Aminosäuresequenzen von den D2-Einheiten beider Organismen verglichen (siehe Anhang). Sie weisen eine sehr hohe Homologie auf. Die einzigen, größeren Änderungen in der Nähe des $\operatorname{Chl}_{Z,D2}^{14}$ sind der Austausch von Leu43 in *T. elongatus* zu einem Phenylalanin und von Thr112 zu einem Alanin im PS II von Spinat. Die Alkoholgruppe des Threonins befindet sich in der Röntgenstruktur [59] unweit von der Ketogruppe an dem 13¹-Kohlenstoff vom Ring E des Chl_{Z,D2} mit 7.4Å und noch dichter an der Methylestergruppe am 13²-Kohlenstoff mit 5.5A. Obwohl dies noch nicht in Wasserstoffbrückenbindungsreichweite liegt, könnte der Austausch dieser Aminosäure einen Einfluss auf das Redoxpotential von Chl_{Z,D2} haben, wie es zum Beispiel für P_{700} gezeigt wurde [201]. Vorausgesetzt die Strukturen beider Systeme sind ähnlich homolog wie die Aminosäuresequenzen.

3.2 Tyrosinoxidation

Für die Untersuchung der Elektronentransferprozesse im PS II aus *T. elongatus* wurden neben den sekundären Donatoren auch noch die beiden redoxaktiven Aminosäuren Tyr_Z und Tyr_D betrachtet. Tyr_Z liegt zwischem dem Mangan-Calciumcluster und P₆₈₀ und spielt eine sehr wichtige Rolle für den Elektronentransfer zwischen dem OEC und dem primären Elektronendonator. Das nach der Anregung mit Licht entstandene P⁺₆₈₀ oxidiert bei Raumtemperatur Tyr_Z mit einer Halbwertszeit von rund 20 ns [20], wenn der wasseroxidierende Komplex im S₀- oder S₁-Zustand vorliegt. Daraufhin erhält das Tyrosin durch den OEC ein Elektron. Die Aktivierungsenergie für die Oxidation des Tyr_Z wurde durch Messungen in dem Temperaturbereich zwischen 250 und 295 K zu ungefähr 10 kJ/mol bestimmt [43]. Mit diesem Wert lägen die extrapolierten Halbwertszeiten z.B. bei 150 K bei 1 μ s oder bei 100 K bei 60 μ s. Diese Zeiten sind wesentlich kürzer als die Halbwertszeit von ungefähr 3 ms unterhalb von 200 K der Ladungsrekombination von P⁺₆₈₀ und Q⁻_A [73, 146]. Trotzdem wird bei diesen Temperaturen hauptsächlich die Rekombination beobachtet. Um diesen Umstand zu untersuchen, wurde die Temperaturabhängigkeit der Tyrosinoxidation bis zu kryogenen Temperaturen mit Hilfe der Blitzlichtspektroskopie ermittelt.

¹⁴Basierend auf der PS II-Struktur aus T. elongatus [59].



Abbildung 3.19 Blitzinduzierte Absorptionsänderung als Funktion der Zeit bei 830 nm im PS II aus T. elongatus bei 307 K in einer Messlösung mit pH 6.5 ohne Glycerol. Der eingeschobene Graph zeigt die Amplitude der ns-Phase normiert auf die maximale Amplitude in Abhängigkeit von der eingesetzten Glycerol-Volumenkonzentration.

3.2.1 Temperaturabhängigkeit der Tyrz-Oxidaion

Abb. 3.19 zeigt den Zeitverlauf der Absorptionsänderungen bei 830 nm nach dem ersten Blitz auf eine dunkeladaptierte PS II Probe ohne Glycerol bei einer Temperatur von 307 K. Bei 830 nm lassen sich gut die Bildung und der Zerfall von P_{680}^+ verfolgen, da dort nur das Chlorophyllkationradikal absorbiert. Der Zerfall weist die für die Reduktion vom P_{680}^+ in intaktem PS II mit hoher Sauerstoffentwicklungsrate typische Halbwertszeit von 20 ns auf [20]. Die Amplitude dieser Phase entspricht ungefähr 80% der maximalen Amplitude. Da für die Messungen bei tiefen Temperaturen mindestens 50%Vol Glycerol zu der Probe hinzugefügt werden muss, um ein transparentes Glas zu erhalten, wurde der Effekt des Glycerols auf die PS II-Aktivität analysiert. Mit steigender Glycerolkonzentration sinkt die Amplitude der ns-Phase und die Amplitude des langsamen Zerfalls nimmt zu. Bei einem Glycerolanteil von 60%Vol, der für die Tieftemperaturexperimente benutzt wurde, beträgt der Rückgang der Amplitude ungefähr 20% (in Abb. 3.19 eingefügter Graph). Dieser Effekt könnte durch eine Veränderung des Wasserstoffbrückennetzwerks durch das Glycerol verursacht werden. Dieses Netzwerk ist wichtig für die Redoxreaktionen um das Tyr_Z , da neben dem Elektronentransfer auch noch Protonentransfer auftritt (siehe zum Beispiel [36, 120]).

Die Zeitverläufe der Absorptionsänderungen bei 830 nm nach dem ersten Blitz für verschiedene Temperaturen sind in Abb. 3.20 zu sehen (übernommen und adapiert aus [162]). Die Halbwertszeit der ns-Phase steigt auf bis zu ungefähr 500 ns bei 180 K. Gleichzeitig nimmt die Amplitude unterhalb von 250K stetig ab. Mit sinkender Temperatur erfolgt demnach die P_{680}^+ Reduktion immer weniger über das Tyr_Z. Dieses Verhalten zeigt sich deutlich in Abb. 3.21 (übernommen und adapiert aus [162]). Aufgetragen ist die Amplitude der Phase, die der Tyrz-Oxidation zugeordnet wird, als Funktion der Temperatur, normiert auf den maximalen Wert bei 300 K. Die Amplitude fällt unterhalb von 250 K ab, bis sie bei 77 K gar nicht mehr auftritt. Messungen auf langsameren Zeitskalen zeigen, dass die Reduktion von P_{680}^+ durch Tyr_Z ersetzt wird durch die Ladungsrekombination von P_{680}^+ mit Q_A^- . Dies lässt sich nicht über die Kinetiken erklären, da die Ladungsrekombination mit einer Halbwertszeit von ca. 3 ms unterhalb von 200 K mehrere Größenordnungen langsamer ist als der Elektronentransfer vom Tyr_Z ($t_{1/2} \approx 250 \,\mathrm{ns}$). Ein möglicher Grund ist, dass bei tiefen Temperaturen Reorganisationsprozesse, die für die Stabilisierung des Zustands $P_{680}Tyr_Z^{ox}$ nötig sind, eingefroren werden. Dieses Einfrieren könnte in einer Verminderung der Triebkraft resultieren und damit die Gleichgewichtskonstanten zu Gunsten des Zustands P_{680}^+ Tyr_Z bei tiefen Temperaturen verschieben. Das würde auch erklären, warum beim Ubergang zu kryogenen Temperaturen, wie in der Literatur beschrieben, nicht mehr der S_2 -Zustand gebildet wird [24].

Aus den Ratenkonstanten für die P_{680}^+ Reduktion im Temperaturbereich zwischen 120 und 320 K wurde über die Arrhenius-Gleichung die Aktivierungsenergie für den Elektronentransfer vom Tyr_Z zum P_{680}^+ bestimmt. Die Auftragung der logarithmierten Ratenkonstanten über die reziproke Temperatur ergibt eine Gerade, aus deren Steigung sich ein Wert für die Aktivierungsenergie von (11.8 ± 0.3) kJ/mol ergibt (in Abb. 3.21 eingefügter Graph). Dieser stimmt gut mit den aus Messungen zwischen 250 und 295 K erhaltenen Wert von 10 kJ/mol überein [43].

3.2.2 Tyr_z-Oxidation bei tiefen Temperaturen?

Während die Ergebnisse aus der Absorptionsdifferenzspektroskopie nahelegen, dass die Tyr_z-Oxidation bei tiefen Temperaturen ($T \leq 150 \text{ K}$) so gut wie gar nicht mehr auftritt, wurde in der Literatur die Oxidation in bis zu 50% der PS II-Zentren bei Temperaturen bis 5 K diskutiert [147, 203, 204]. Diese Zuordnung erfolgte über die Auswertung von ESR-Experimenten, bei denen in den Spektren unter der Belichtung von dunkeladaptierten Proben bei tiefen Temperaturen neben dem Signal des Tyr_D^{ox} zwei Signale bei $g \approx 2$



Abbildung 3.20 Blitzinduzierte Absorptionsänderung als Funktion der Zeit bei 830 nm im PS II aus *T. elongatus* in einer Messlösung mit pH 6.5 und 60 %Vol Glycerol bei verschiedenen Temperaturen: 290 K (schwarze Kurve), 265 K (rot), 240 K (blau), 220 K (grün), 200 K (rosa) und 180 K (türkis). Übernommen und adapiert aus [162].

auftraten. Ein sogenanntes Split-Signal mit g-Werten von 2.05 und 1.95 und ein Signal bei g = 2.03. Diese Signale wurden dem Zustand Tyr₂[•]Q_A⁻ zugeschrieben. Sie werden erklärt durch magnetische Wechselwirkungen des Tyr₂[•] mit dem OEC in seinem S_0 - bzw. S_1 -Zustand auf. Dabei führt die Wechselwirkung mit S_0 zu dem Splitsignal und mit S_1 zu dem Signal bei g = 2.03. Die Ausbeuten für die beiden Signale wurden über die Amplituden der Q_A^- Fe²⁺, Q_A^- Fe²⁺ Q_B^- und Cyt b_{559} Signale und den Vergleich der Flächen des Car⁺/Chl⁺ mit dem Tyr_D⁻ Signals bestimmt [203].

Da in den hier vorgelegten Messungen sowohl in der Absorptions- als auch in der Absorptionsdifferenzspektroskopie kein Hinweis für eine signifikante Oxidation des Tyr_Z unterhalb von 77 K gefunden werden konnte, wurde ebenfalls mit Hilfe der ESR-Spektroskopie eine Abschätzung der Ausbeuten für die verschiedenen Zustände getroffen. Neben den bereits in Abb. 3.6 gezeigten Signalen, konnte auch ein Signal bei g = 2.037 beobachtet werden (siehe Abb. 3.22), wenn die Mikrowellenleistung auf 20 mW erhöht wurde¹⁵.

¹⁵Die Mikrowellenleistung für die Aufnahme des Tyr^{ox}_D-Spektrums betrug $10\,\mu$ W.



Abbildung 3.21 Ausbeute der Tyr_Z-Oxidation in Abhängigkeit der Temperatur, bestimmt aus den auf den Maximalwert bei 300 K normierten Amplituden der ns-Kinetik. Der eingeschobene Graph zeigt die Auftragung der logarithmierten Ratenkonstanten über die reziproke Temperatur. Über die Arrhenius-Gleichung ergibt sich ein Wert für die Aktivierungsenergie von (11.8 ± 0.3) kJ/mol. Übernommen und adapiert aus [162].

Für die Abschätzung der Chlorophyll- bzw. Carotinoxidation in einer PS II-Probe ohne chemische Zusätze mit 50 %Vol Glycerol und einer Chlorophyllkonzentration von ungefähr 2 mM wurde die Fläche des Tyr_D-Radikalsignals um g = 2 in dem Dunkelspektrum über das Doppelintegral bestimmt. Unter der Annahme, dass Tyr_D komplett oxidiert vorliegt, entspricht diese Fläche dann genau einem Spin pro Reaktionszentrum. Die Fläche des nach Belichtung entstehenden Car⁺/Chl⁺-Signals entsprach bei diesen PS II-Proben 55% des Tyr_D⁻-Signals, in etwas mehr als der Hälfte der Zentren wurde also der Zustand Car⁺/Chl⁺Q_A⁻ akkumuliert. Da in einem Teil der Zentren Cyt b_{559} reduziert vorlag, trat mit der Belichtung auch die Cytochromoxidation ein. Die ESR-Signale des Cytochroms sind sehr breit und nicht so gut lokalisiert wie die von den Carotin- und Chlorophyllradikalen. Daher ließen sich die Flächen nicht auf das Tyr_D^{ox}-Signal normieren. Eine Abschätzung gelang über den Vergleich mit einer Probe gleicher Konzentration und gleichen Volumens, in der Cyt b_{559} durch Ascorbat und PMS komplett reduziert war. Durch Belichtung wird dann in 70% der Zentren der stabile Zustand Cyt b_{559}^+ gebildet (siehe Kap. 3.1.2 und Anhang).


Abbildung 3.22 ESR-Differenzspektrum vom PS II aus *T. elongatus* aus dem Spektrum während der Belichtung mit Weißlicht minus dem Spektrum der dunkeladaptierten Probe bei 15 K, pH 6.5 und mit 50 %Vol Glycerol. Neben dem durch die hohe Mikrowellenleistung übersteuerten $\text{Tyr}_{D}^{\text{ox}}$ -Signal um $g \approx 2$ tritt durch die Belichtung ein Signal bei g = 2.037 auf. ESR-Messparameter: Mikrowellenfrequenz von 9.56 GHz, Modulationsfrequenz von 12.5 kHz, Mikrowellenleistung von 20 mW, Modulationsamplitude von 10 G, Zeitkonstante von 82 ms.

Der Vergleich der Flächenzuwächse in den Spektren der beiden Proben zeigt dann, dass in der Probe ohne Zusätze in ungefähr 35% der Zentren die Cytochromoxidation auftritt. Zusammen mit der Car/Chl-Oxidation wurden damit in 90% der Zentren die langlebigen Zustände gebildet. Unter der Annahme, dass PS II auf eine einzelne Ladungstrennung bei tiefen Temperaturen beschränkt ist, kann das Signal bei g = 2.037 somit höchstens 10% der PS II-Komplexe entsprechen, in Übereinstimmung mit den UV/Vis/NIR-Absorptionsund Absorptionsdifferenzmessungen.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zu den in der Literatur abgeschätzten Werten könnte in der Verwendung von Glycerol liegen. Zhang *et al.* diskutieren, dass Glycerol das g = 2.03-Signal stark verkleinert [203]. Nugent *et al.* sehen im Gegensatz dazu durch Glycerol eine Erhöhung der Ausbeute, aber auch, dass in der Gegenwart von Glycerol das Signal durch längere Belichtung schnell abnimmt [133]. Daher wurden auch ESR-Spektren mit PS II-Proben ohne Glycerol gemessen, allerdings konnte in diesen Spektren das g = 2.03-Signal nicht beobachtet werden. Das Glycerol scheint demnach in der Tat einen Einfluss auf die Ausbeute des Signals zu haben, nur dass hier der entgegengesetzte Befund zu [203] auftritt. Auch in den Experimenten ohne Glycerol zeigt die Abschätzung der Ausbeuten für die Car/Chl/Cyt-Oxidation wieder, dass wenig Spielraum für die Tyrosinoxidation bleibt. Die Ursache für den Unterschied zur Literatur bleibt unklar.

3.2.3 Temperatur- und pH-Abhängigkeit der Tyr_D-Oxidation in PS II

Auch das reduzierte Tyr_{D} kann wegen der Delokalisierung der positiven Ladung zu einem Teil auf dem P_{D2} im ns-Bereich ein Elektron an P_{680}^+ abgeben [44, 45, 47] und eine mögliche Rolle als Schutz vor Photoinhibition bei der Photoaktivierung des PS II wurde diskutiert [115]. Wenn die beiden Tyrosine reduziert vorliegen, sind sie bei physiologischem pH wahrscheinlich protoniert [10, 131]. Aus ESR-Messungen wurde geschlossen, dass mit der Oxidation die neutralen Tyr_{Z/D}-Radikale Y–O $^{\bullet}$ gebildet werden [50, 185]. Das heißt, neben dem Elektronentransfer wird auch noch ein Proton übertragen. Wie der exakte Mechanismus aussieht und ob es sich dabei zum Beispiel um einen konzertierten Protonen-/Elektronentransfer handelt, ist noch nicht abschließend geklärt. Die meisten Untersuchungen zur Tyr_D-Oxidation wurden am PS II nach der Abtrennung des OEC durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass selbst bei Temperaturen von 2 bis 15 K eine fast vollständige Tyr_D-Oxidation auftritt, wenn sich die Probe bei alkalischen pH-Werten befindet [45, 47]. Für die Bildung des Tyr_D-Radikals ergab sich eine pH-Abhängigkeit mit einem pK_a von ungefähr 7.6 für eine einzelne protonierbare, funktionelle Gruppe. In einer ESR-Studie an aktivem PS II aus Spinat konnte die Tyr_D-Oxidation auch beobachtet werden und es ergab sich ein p $K_{\rm a}$ von ungefähr 8.0 [66].

Um ein tieferes Verständis für die in den Mechanismus der Tyr_D-Oxidation involvierten Prozesse zu erlangen, wurde neben der pH-Abhängigkeit der Oxidation auch die Temperaturabhängigkeit im PS II aus dem Cyanobakterium *T. elongatus* untersucht. Dazu wurde zuerst betrachtet, ob die PS II-Proben mit intaktem OEC aus *T. elongatus* überhaupt eine Tyr_D-Oxidation zeigen. Dafür wurden die Proben bei 277 K und pH 9 mit jeweils 8 mM Ferri- und Ferrocyanid dunkelinkubiert. Dies führt zur Reduktion des Tyr_D in dem größten Teil der Zentren, wie sich am ESR-Spektrum der dunkeladaptierten Probe bei 15 K zeigt (Abb. 3.23 schwarze Kurve). Nach Belichtung durch 6 Blitze eines frequenz-verdoppelten Nd:YAG Lasers (YG411 von Quantel, $\lambda = 532 \text{ nm}$) tritt deutlich das Signal des Tyr_D^{ox} auf (rote Kurve). Eine weitere Belichtung mit einer 150 W Halogenlampe durch einen 10 cm Wasserfilter und ein Wäremschutzglas (KG 3 von Schott) ließ das Signal weiter anwachsen (blaue Kurve). Größtenteils entstand zusätzlich noch das für die Chl/Car-Oxidation



Abbildung 3.23 ESR-Spektren vom PS II aus *T. elongatus* bei 15 K, pH 9.0, mit 8 mM Ferri- und Ferrocyanid und 60 % Vol Glycerol. Das Spektrum der dunkeladaptierten Probe zeigt die schwarze Kurve, nach Belichtung mit sechs Laserblitzen (rot), während Belichtung mit Weißlicht (blau) und Differenz aus dem Spektrum während der Dauerbelichtung minus dem Spektrum nach den Blitzen (grün). Für Details siehe Text. ESR-Messparameter: Mikrowellenfrequenz von 9.56 GHz, Modulationsfrequenz von 12.5 kHz, Mikrowellenleistung von 10 μ W, Modulationsamplitude von 2 G, Zeitkonstante von 82 ms.

typische Signal bei g = 2.0025 (grüne Kurve), welches sich in der Differenz des Dauerlichtspektrums minus dem Spektrum nach den Blitzen zeigt¹⁶.

Die Tyr_D-Oxidation lässt sich auch mit der Blitzlichtspektroskopie nachweisen. In Abb. 3.24 sind die Absorptionsänderungen bei 830 nm und 77 K für PS II bei einem pH von 6.5 (schwarze Kurve) mit 1.3 mM Ferricyanid und 70 μ M DCBQ, bei pH 9 mit 1.3 mM Ferricyanid und 50 μ M DCBQ (rote Kurve) und bei pH 9 mit 7 mM Ferri-/Ferrocyanid (blaue Kurve) im ns-Bereich gezeigt. In allen drei Messungen ist die Bildung von P⁺₆₈₀ nach dem Blitz zu sehen. Sowohl in der Messung bei pH 6.5 als auch bei pH 9 mit Ferricyanid bleibt die Amplitude nach dem Blitz in diesem Zeitbereich konstant¹⁷, P⁺₆₈₀ wird also nicht durch einen schnellen Elektronentransfer von zum Beispiel einem Tyrosin wieder reduziert.

 $^{^{16}}$ Das Spektrum nach den Blitzen wurde dafür mit einem Faktor von 1.2 multipliziert, um das weitere Anwachsen des $\rm Tyr_D^{ox}$ -Signals im Licht zu berücksichtigen und ein reines Car⁺/Chl⁺-Signal zu erhalten.

¹⁷Der kleine Ausschlag nach dem Blitz bei der roten Kurve ist eine Uberlagerung durch Fluoreszenz.



Abbildung 3.24 Blitzinduzierte Absorptionsänderung als Funktion der Zeit bei 830 nm im PS II aus *T. elongatus* bei 77 K (schwarze Kurve), mit 60 %Vol Glycerol und bei pH 6.5 mit 1.3 mM Ferricyanid und 70 μ M DCBQ (schwarze Kurve), bei pH 9.0 mit 1.3 mM Ferricyanid und 50 μ M DCBQ (rot) und bei pH 9.0 mit 7 mM Ferri-/Ferrocyanid (blau).

Im Gegensatz dazu tritt bei pH 9 mit Ferri-/Ferrocyanid eine schnelle ns-Phase auf, mit der P_{680}^+ in über der Hälfte der Zentren wieder reduziert wird. Mit weiteren Blitzanregungen nimmt die Amplitude dieser Phase ab (siehe Abb. 3.25), was für die Ausbildung eines langlebigen Zustands spricht, in Analogie zu der Oxidation der sekundären Donatoren (Abb. 3.12). Die schnelle ns-Kinetik wie auch die ESR-Experimente (Abb. 3.23) deuten darauf hin, dass es sich dabei um den Zustand Tyr_D^oxQ_A^- handelt.

Die Beteiligung von Q_A^- an diesem Zustand zeigt sich in Absorptionsdifferenzspektren im sichtbaren Bereich bei 77 K. In der Differenz aus dem Spektrum nach dem ersten Blitz minus dem Spektrum der dunkeladaptierten PS II-Probe ist bereits deutlich ein sehr großes Signal um 543 nm für die Q_A -Reduktion zu sehen (Abb. 3.26 schwarze Kurve). Mit weiterer Belichtung nimmt das Signal nur noch wenig zu, das heißt, mit dem ersten Blitz ist bereits in einem Großteil der Zentren ein ladungsgetrennter Zustand aufgebaut worden. Messungen im NIR-Bereich belegen, dass nach dem ersten Blitz nur in einem kleinen Teil der Zentren Car⁺ gebildet wird (Daten nicht gezeigt). Die Chl-Oxidation lässt sich in Gegenwart von 8 mM Ferri-/Ferrocyanid nicht im Soretbereich verfolgen, durch die starke Absorption der



Abbildung 3.25 Blitzinduzierte Absorptionsänderung als Funktion der Zeit bei 830 nm im PS II aus *T. elongatus* bei 77 K, pH 9.0, mit 7 mM Ferri-/Ferrocyanid und 60 %Vol Glycerol nach einem Blitz (rote Kurve) bzw. nach 10 Blitzen (blau).

Blutlaugensalze. Einen Hinweis, dass im ersten Blitz auch kaum Chl⁺ gebildet wird, kommt aus der Abschätzung der Fläche unter den Banden in der Q_y -Region. Während in dem Differenzspektrum nach der Belichtung mit Dauerlicht die Fläche deutlich negativ ist und diese Ausbleichung damit für die Bildung eines Chl⁺ spricht, addieren sich nach dem ersten Blitz die positiven und negativen Banden ungefähr zu Null. Es treten also nur elektrochrome Bandenverschiebungen und keine Ausbleichung auf, die auf Chl⁺ schließen ließe. Eine für die Cytochromoxidation typische Ausbleichung bei 557 nm tritt auch nach langer Belichtung nicht auf. Cyt b_{559} liegt demnach mit dem Gemisch von Ferri-/Ferrocyanid voroxidiert vor.

Das große Signal der Q_A -Reduktion, bereits nach dem ersten Blitz bei pH 9 mit reduziertem Tyr_D, ist also nicht mit der Bildung von Car⁺, Chl⁺ oder Cyt b_{559}^+ korreliert. Die Ausbeute an Q_A^- nach dem ersten Blitz im Vergleich zu dem Maximalwert nach 1 min Dauerlicht wurde in Abhängigkeit des pH-Wertes gemessen (siehe Abb. 3.27). Bei niedrigen pH-Werten (ph ≤ 7.5) ergibt sich die gleiche geringe Ausbeute wie in PS II-Proben, die zusätzlich nur Ferricyanid enthielten (vgl. Kap. 3.1.2 und Abb. 3.9). Mit steigendem



Abbildung 3.26 Absorptionsdifferenzspektren aus den Spektren nach Belichtung minus dem Dunkelspektrum vom PS II aus *T. elongatus* bei 77 K, pH 9.0, mit 8 mM Ferri-/Ferrocyanid und 60 %Vol Glycerol für Belichtungen mit einem Blitz (schwarz), 18 Blitzen (rot), 68 Blitzen (blau) und einer Minute Dauerlicht (grün).

pH wächst die Ausbeute stark an, bei pH 9.6 werden im ersten Blitz fast 90% der Zentren geschlossen. Aus der Titrationskurve ergibt sich ein Wert für pK_a von ungefähr 8.4. Dieser Wert entspricht ungefähr dem pK_a von 8.0, der für die Tyr_D-Oxidation in aktivem PS II aus Spinat über ESR-Experimente bestimmt wurde [66]. Für die Erklärung der pH-Abhängigkeit gibt es in einem vereinfachten Schema, das nur Tyr_D und das benachbarte D2-His189 betrachtet, zwei Ansätze [45, 47]. Im ersten Fall stünde der gemessene pK_a -Wert für die Titration des Tyr_D. Bei höheren pH-Werten läge dann das Tyrosinat mit einer Wasserstoffbrückenbindung zum Histidin vor (siehe Abb. 3.28 rechte Seite). Normalerweise liegt der pK_a für die Deprotonierung eines Tyrosins bei 10. Die Abweichung zu dem pK_a der Tyr_D-Oxidation könnte aber durch die Proteinumgebung verursacht werden. Ausgehend vom Tyrosinat ist für die Bildung des Tyr^{OX} kein Protonentransfer nötig und es handelte sich um einen reinen Elektronentransfer, der problemlos auch bei tiefen Temperaturen auftritt. Im zweiten Fall wurde diskutiert, dass bei hohem pH der Wasserstoff der Phenolgruppe des Tyrosins mit dem Histidin eine Wasserstoffbrückenbindung eingeht, die das Tunneln des Protons mit dem Elektronentransfer erlaubt und sich somit ein konzer-



Abbildung 3.27 Abhängigkeit der Q_A^- -Ausbeute nach dem ersten Blitz bestimmt aus den Absorptionsdifferenzspektren und normiert auf den Maximalwert nach 1 min Dauerlicht von dem pH-Wert der Reaktionslösung in der Gegenwart von 8 mM Ferri-/Ferrocyanid.

tierter Protonen-/Elektronentransfer ergibt (siehe Abb. 3.28 linke Seite). Das Tunneln von Protonen entlang einer Wasserstoffbrückenbindung wurde in der Literatur auch für tiefe Temperaturen als möglich diskutiert [32, 104, 179, 184]. Neuere Arbeiten sprechen mehr für den konzertierten Protonen-/Elektronentransfer als dem zu Grunde liegenden Mechanismus. So wurde zum Beispiel über eine FTIR-spektroskopische Untersuchung das für einen reinen Elektronentransfer wichtige Tyrosinat ausgeschlossen [71]. Für die Reduktion des Tyr_D-Radikals wurde ebenfalls der gekoppelte Protonen-/Elektronentransfer angenommen, da bei hohem pH die Rate der Reduktion einen großen Isotopeneffekt zwischen den Messungen in H₂O und D₂O zeigte [87, 88].

Neben der pH-Abhängigkeit wurde die Tyr_D-Oxidation auch auf ihre Temperaturabhängigkeit untersucht. Im Gegensatz zu der Tyr_Z-Oxidation ist die Kinetik der schnellen ns-Phase mit $t_{1/2} \approx 30$ ns aber über den gesamten gemessenen Temperaturbereich von 260 bis 5 K konstant (siehe Abb. 3.29). Es handelt sich also bei der Tyr_D-Oxidation bei hohem pH offensichtlich um einen aktivierungslosen Prozess. Tendenziell spricht dies auf den ersten Blick eher für den Mechanismus des reinen Elektronentransfers. Nach Faller



Abbildung 3.28 Vereinfachtes Schema für die Tyr_D-Oxidation im PS II bei alkalischem pH, für den Fall A) eines konzertierten Elektronen- und Protonentransfers und für den Fall B) eines reinen Elektronentransfers. Gezeigt ist neben dem Phenolring des Tyrosins der Imidazolring des benachbarten Histidins D2-His189.

et al. läuft die Oxidation des Tyr_D über einen Übergangszustand, der schließlich in einen Endzustand relaxiert. Die Relaxation nach dem Mechanismus des konzertierten Protonen-/Elektronentransfers wird dabei nur durch eine Protonenbewegung dominiert. Bei dem Prozess des reinen Elektronentransfers ausgehend vom Tyrosinat dominiert hingegen bei der Relaxation in den Endzustand die Bewegung der Proteinumgebung [45]. Die Temperatur sollte einen größeren Einfluss auf die Beweglichkeit der Proteinumgebung haben als auf die Protonenbewegung. Das Auftreten des aktivierungslosen Prozesses wäre demnach leichter vorstellbar bei der Relaxation durch Protonenbewegung. Das heißt, im Hinblick auf die Relaxation nach der eigentlichen Oxidation spricht die Temperaturunabhängigkeit der Tyr_D-Oxidation mehr für den Mechanismus des konzertierten Protonen-/Elektronentransfers.

Für die Tyr_Z-Oxidation wurde über Isotopen-Austauschexperimente nachgewiesen, dass der Protonentransfer nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist [94], und es wurde der Elektronentransfer mit der dazugehörigen Aktivierungsenergie vom Tyr_Z zum P⁺₆₈₀ im Rahmen der Marcus-Theorie diskutiert. Die Abschätzungen für die Tyr_Z-Oxidation durch P⁺₆₈₀ ergaben für die Reorganisationsenergie λ einen Wert von \approx 700 meV bei einer freien Reaktionsstandardenthalpie ΔG^0 von \approx 60 meV [162]. Unter der Annahme, dass auch bei der Tyr_D-Oxidation der Protonentransfer nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, würde es sich nach der Marcus-Theorie um einen aktivierungslosen Prozess für den reinen Elektronentransfer handeln, wenn λ gleich $-\Delta G^0$ ist. Um diese Annahme zu stützen, sind Isotopen-Austauschexperimente auch für die Tyr_D-Oxidation in Planung. Für die Oxidation von Tyr_D durch P⁺₆₈₀ wurde ein wesentlich höheres ΔG^0 mit \approx 490 meV als bei der Tyr_Z-Oxidation durch P⁺₆₈₀ ermittelt [140]. Die Umgebung von Tyr_D ist außerdem sehr hydrophob, was zu einer Absenkung der Reorganisationsenergie führen könnte und es somit möglich erscheinen lässt, dass durchaus der Fall $-\Delta G^0 = \lambda$ eintritt. Für diesen Fall lässt sich mit der empirischen Beziehung

$$k_{op} = 10^{13} \,\mathrm{s}^{-1} \cdot \exp(-\beta (R - R_0)) \tag{3.4}$$

die Ratenkonstante k_{op} ausrechnen, mit $\beta = 1.4$ Å und $R_0 = 3.6$ Å für den van-der-Waals-Kontakt [128]. Dafür muss sowohl der Fall betrachtet werden, dass die positive Ladung des P₆₈₀ auf P_{D1} lokalisiert ist, als auch der etwas unwahrscheinlichere Fall der Lokalisierung auf P_{D2}. Der Kantenabstand R beträgt zwischen P_{D1} und Tyr_D 16.2Å und zwischen P_{D2} und Tyr_D 8.6Å [59]. Für den Elektronentransfer zwischen P_{D1} und Tyr_D ergibt sich nach Gl. 3.4 eine optimale Rate von $\approx 2.2 \times 10^5 \, \text{s}^{-1}$ bzw. eine Halbwertszeit von $\approx 3.2 \, \mu$ s, dies ist wesentlich langsamer als die experimentell beobachtete 30 ns-Phase. Der Elektronentransfer geht also nicht zum P_{D1}. Für P_{D2} und Tyr_D ergibt sich nach Gl. 3.4 eine maximale Rate von $\approx 9.1 \times 10^9 \, \text{s}^{-1}$ bzw. eine Halbwertszeit von $\approx 76 \, \text{ps}$. Die gemessene Kinetik der Tyr_D-Oxidation ist mit einer Halbwertszeit von 30 ns nicht so schnell wie der erwartete Elektronentransfer zwischen P_{D2} und Tyr_D, wenn die positive Ladung komplett auf P_{D2} lokalisiert wäre. Da zum größeren Teil die positive Ladung aber auf P_{D1} lokalisiert ist, könnte dies zu der beobachteten langsameren Phase führen. Sowohl die Kinetik als auch die Aktivierungslosigkeit des Prozesses lassen sich demnach im Rahmen der klassischen Marcus-Theorie über einen reinen Elektronentransfer bei der Tyr_D-Oxidation erklären.

3.3 Ramanspektroskopie und QM-Rechnungen am Carotin

Um die in den Ramanspektren der dunkeladaptierten Photosysteme auftretenden Banden eindeutig zuordnen zu können, bietet es sich an, die Spektren der hauptsächlich vorkommenden Pigmente Chlorophyll a und β -Carotin isoliert in Lösungsmitteln zu messen und mit den Spektren der Pigment-Proteinkomplexe zu vergleichen. Eine weitere Möglichkeit bietet die quantenmechanische Berechnung der Ramanspektren. Diese wurden sowohl für das Carotin im Grundzustand als auch für dessen Kationradikal durchgeführt.

3.3.1 DFT-Rechnungen am neutralen Carotin

Der erste Schritt in der Berechnung ist die Optimierung der Grundzustandsstruktur. Dafür wurde als Startpunkt die Struktur des Carotins aus der Röntgenkristallstruktur vom PS II übernommen [111]. Diese wurde dann innerhalb der Programme Gaussian03 [51] oder TURBOMOLE [1] soweit optimiert, bis das globale Minimum auf der Potentialhyperfläche



Abbildung 3.29 Blitzinduzierte Absorptionsänderung als Funktion der Zeit bei 830 nm im PS II aus *T. elongatus* in einer Messlösung mit pH 9.0, 8 mM Ferri-/Ferrocyanid und 60 %Vol Glycerol bei verschiedenen Temperaturen: 260 K (schwarze Kurve), 120 K (rot) und 5 K (blau).

erreicht war. Die erhaltene Struktur weist, über das ganze Molekül betrachtet, keine Symmetrie auf (s. Abb. 3.30). Für das konjugierte Doppelbindungssystem zwischen den beiden β -Iononringen, unter Vernachlässigung der beiden Ringe, ergibt sich in guter Näherung eine C_{2h} -Symmetrie. Der Vergleich der berechneten Struktur mit der experimentell bestimmten Kristallstruktur [167] zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit mittleren Abweichungen von 0.012Å bei den Bindungslängen und 0.9° bei den Bindungswinkeln. Die Abweichungen sind ein wenig kleiner als bei der von Requena *et al.* optimierten Struktur [150], die ebenfalls mit dem B3LYP-Funktional und dem 6-31G^{*}-Basissatz berechnet worden ist.

Im nächsten Schritt wurden ausgehend von der optimierten Struktur die Schwingungsfrequenzen der Normalmoden und die Hesse-Matrix innerhalb von Gaussian03 bestimmt. Über die Software GVA [171] wurden dann die Kraftkonstanten mit den weiter oben beschriebenen Skalierungsfaktoren multipliziert (siehe Tab. 2.1) und die Ramanspektren berechnet. Abb. 3.31 zeigt das berechnete Ramanspektrum von β -Carotin *in vacuo* und das experimentelle Spektrum, aufgenommen bei einer Anregungswellenlänge von 1064 nm in Hexan. Der Vergleich offenbart, dass sich das experimentelle Spektrum sehr gut durch die



Abbildung 3.30 Optimierte Sruktur von β -Carotin im elektronischen Grundzustand aus DFT-Rechnungen *in vacuo*, die Kohlenstoffatome sind durchnummeriert.

DFT-Rechnungen reproduzieren lässt. Die mittlere Abweichung bei den Schwingungsfreguenzen beträgt ungefähr $\pm 10 \,\mathrm{cm}^{-1}$ und auch die Intensitäten stimmen sehr gut überein, bis auf eine zu intensiv berechnete Mode bei $1198 \,\mathrm{cm}^{-1}$ im Vergleich zur experimentellen Bande bei $1191 \,\mathrm{cm}^{-1}$. Im dem Bereich zwischen 750 und $1650 \,\mathrm{cm}^{-1}$, in welchem der überwiegende Teil der Ramanbanden auftritt, lassen sich die Normalmoden nach ihrer Zusammensetzung und der Schwingungsfrequenz in fünf Gruppen aufteilen (siehe Tab. 3.2). Zwischen 1500 und $1650 \,\mathrm{cm}^{-1}$ werden die Modenzusammensetzungen von den C=C-Streckschwingungen der Polyenkette dominiert, wobei die ν_{66} -Mode die größte Ramanintensität aufweist¹⁸. Die Moden im Bereich zwischen 1400 und $1500 \,\mathrm{cm}^{-1}$ haben überwiegend Methyldeformationsschwingungscharakter und nur geringe Ramanintensitäten. Die größte Intensität in diesem Bereich hat die Bande bei $1456 \,\mathrm{cm}^{-1}$ bzw. $1447 \,\mathrm{cm}^{-1}$ im Experiment. Von 1250 bis $1400 \,\mathrm{cm}^{-1}$ beherrschen C-H-Schaukelschwingungen das Spektrum. Neben den Streckschwingungen der konjugierten Doppelbindungen weisen die dazugehörigen Einfachbindungen die höchste Ramanintensität auf. Sie befinden sich im Bereich zwischen 1150 und 1250 cm^{-1} mit der stärksten Bande bei 1168 cm^{-1} (bzw. 1157 cm^{-1} experimentell). Die letzte größere Gruppe sind die Methylschaukelschwingungen zwischen 950 und $1050 \,\mathrm{cm}^{-1}$. In Tabelle 3.2 sind nur die berechneten Normalmoden aufgelistet, die eine Intensität von mehr als 0.5% relativ zur stärksten Ramanmode ν_{66} aufweisen. Die Zusammensetzung der Gesamtheit aller Normalmoden befindet sich im Anhang. Es zeigt sich, dass unterhalb von $800 \,\mathrm{cm}^{-1}$ keine Moden mit mehr als $1.5\,\%$ relativer Intensität auftreten, was in guter Übereinstimmung mit dem experimentellen Spektrum steht.

¹⁸Die drei Banden mit den höchsten Ramanintensitäten bei 1525, 1157 und $1005 \,\mathrm{cm}^{-1}$ werden in der Literatur häufig als ν_1 , ν_2 und ν_3 bezeichnet.

Rechnung				Experiment	
Mode	PED	$\nu/{\rm cm}^{-1}$	I_{Ra}	$\nu/{\rm cm}^{-1}$	I_{Ra}
59	C=C str (6,5) 11.2	1625	0.5	1615	0.1
62	$C=C \ str \ (28,27) \ 14.2; \ (8,7) \ 13.8$	1600	6.9	1594	9.3
63	C=C str (10,9) 18.8; (26,25) 18.4	1589	3.9	1579	7.5
66	C=C str (20,19) 20.3; (24,23) 11.7; (16,11) 11.6	1535	100	1526	100
67	C=C str (22,21) 22.9; (18,17) 22.4	1527	47.3	1519	25.8
79	Asym Methyl def (37) 55.9	1462	1.4		
84	Asym Methyl def (35) 29.7; (36) 29.2	1456	9.3	1447	9.6
86	Asym Methyl def (38) 78.7	1455	1.0		
87	Asym Methyl def (12) 85.9	1454	1.0		
95	C-H rock (25) 11.4	1403	0.9	1392	2.4
97	Sym Methyl def (36) 17.2; (37) 15.4	1395	0.7		
109	Sym Methyl def (36) 16.5; (35) 15.1;	1363	1.5	1354	2.6
	C–H rock (21) 10.6				
116	C-H rock (28) 41.4 ; C=C str (28,27) 12.8	1323	1.2	1301	3.2
117	$C-H \ rock \ (7) \ 40.1$	1321	0.8		
119	$C=C \ str \ (20,19) \ 11.6$	1314	0.5		
120	C-H rock (27) 9.7; C=C str (24,23) 8.9	1308	0.5		
122	Ringmethylen $twist$ (33) 32.5; (31) 17.7	1288	1.7	1281	2.1
123	Ringmethylen twist (2) 31.2; (4) 19.4	1286	0.5		
124	С-Н rock (24) 18.1; (11) 17.6	1279	8.1	1268	6.7
128	C=C str (20,19) 8.7; C-C str (17,16) 6.5	1227	5.6	1213	7.2
135	C-C str (27,26) 8.4	1198	42.7	1191	44.7
139	Methyl $rock$ (39) 11.0	1177	9.3	1174	2.8
140	Methyl $rock$ (14) 12.6	1173	7.7		
141	C-C str (19,18) 13.9; (21,20) 13.9; (11,10) 12.2;	1168	66.7	1157	86.8
	(25,24) 11.3				
143	C-C str (21,20) 8.5	1151	3.7	1150	32.0
158	Methyl rock (35) 16.1; (12) 15.3; (13) 10.0	1018	3.9	1022	3.6
159	Methyl rock (39) 11.9 ; C–C str (38,30) 10.9	1018	3.6	1005	30.3
160	Methyl rock (40) 18.7 ; (36) 17.2 ; (38) 13.6 ;	1017	5.4		
161	(39) 11.1 Mothyl rock (19) 14 1. (25) 14 1. (19) 12 2	1017	5.4		
169	Mothyl rock (12) 14.1, (33) 14.1, (13) 13.3 Mothyl rock (26) 15.1. (27) 14.0	1017	$\frac{1}{7}$		
102	Methyl rock (50) 13.1; (51) 14.9 Mothyl rock (15) 11.8	1014	1.0 6.7		
100	$\begin{array}{cccc} \text{Methyl } 1000 & (10) & 11.0 \\ \text{C} & \text{H} & \text{con} & (9) & 16.5, \text{ Toroison} & (9.7) & 10.9 \\ \end{array}$	1007	0.1		
104	$0-11 \ oop \ (0) \ 10.0; \ 10181011 \ (0-1) \ 10.0$	1001	ง.7 1.0		
107	$\begin{array}{c} \text{Methyl } TOCK \ (14) \ 11.9 \\ \text{Terrier} \ (24, 22) \ 12.0 \ C \ \text{II} \ \text{err} \ (22) \ 10.5 \\ \end{array}$	992 099	1.0		
170	10rsion (24-23) 12.0; C-H oop (23) 10.5	982	0.0		

Abkürzungen: asym, asymmetrisch; def, Deformation; I_{Ra} , Ramanintensität relativ zur stärksten Ramanmode ν_{66} ; oop, engl. out-of-plane; PED, engl. potential energy distribution, der prozentuale Anteil der einzelnen Koordinaten ist kursiv geschrieben und die beteiligten C-Atome stehen in Klammern (siehe Abb. 3.30); rock, engl. rocking; str, engl. stretching; sym, symmetrisch; twist, engl. twisting.



Abbildung 3.31 Vergleich des DFT, *in vacuo* berechneten Ramanspektrums von β -Carotin in der optimierten Grundzustandsstruktur (blaue Kurve) mit dem experimentellen Ramanspektrum von im Hexan gelösten β -Carotin bei einer Anregungswellenlänge von 1064 nm (rote Kurve).

3.3.2 DFT-Rechnungen am Carotinkationradikal

Um bei der Zuordnung der Banden zu helfen, die im PS II mit $Cyt b_{559}^{0x}$ bei tiefen Temperaturen unter Belichtung auftreten, wurde das Ramanspektrum auch für das β -Carotinkationradikal berechnet. Die Struktur des Radikals wurde ausgehend von der optimierten Struktur des neutralen Carotins mit einer Ladung von +1 und einer Spinmultiplizität von 2 neu optimiert. Auf dieser Grundlage wurde dann das Schwingungsspektrum des Radikals bestimmt. Abb. 3.32 zeigt das erhaltene Ramanspektrum. Die grundlegende Struktur des Differenzspektrums des Photosystems wird reproduziert, doch gibt es starke Abweichungen zwischen den berechneten und den experimentellen Intensitäten. Mögliche Gründe dafür könnten die in den Rechnungen vernachlässigten Wechselwirkungen des Carotins mit seiner Umgebung sein. Diese sind unter Umständen für das geladene Radikal von größerer Bedeutung als für das neutrale Carotin. Ein weiterer Punkt ist die Wahl der Anregungswellenlänge für das Experiment. Die Differenzsignale lassen sich nur mit einer Anregung von 1064 nm detektieren, was für eine Verstärkung der Ramansignale in Resonanz mit der Absorptionsbande des Carotinkationradikals um 1000 nm spricht. Somit wäre

Rechnung				Experiment	
Mode	PED	$\nu/{\rm cm}^{-1}$	$I_{\rm QM}$	$\nu/{\rm cm}^{-1}$	$I_{\rm exp}$
59	C=C str (6,5) 16.4	1583	7.2	1586	6.9
61	$C=C \ str \ (6,5) \ 14.5$	1554	15.7	1570	6.0
62	$C=C \ str \ (30,29) \ 12.7$	1552	8.9	1563	5.2
64	C=C str $(30,29)$ 7.9; $(10,9)$ 7.5; C-H rock (27) 6.4	1532	100	1531	33.5
67	C-H rock (19) 11.1; (20) 10.5	1488	8.2	1491	91.6
80	Asym Methyl def (37) 36.3; (36) 21.8	1459	1.9	1465	10.8
81	Ringmethylen $scis$ (4) 57.8	1456	5.7	1447	9.6
91	Asym Methyl def (12) 67.4	1447	12.7	1442	8.7
92	Asym Methyl def (38) 45.1; Ringmethylen $scis$ (31) 13.7	1442	4.5		
93	C-H rock (21) 19.2; (18) 19.0	1426	7.0	1418	15.2
94	Asym Methyl def (37) 6.6	1404	4.4	1403	3.7
98	Sym Methyl def (14) 40.8; (13) 29.9	1393	1.1	1396	1.7
99	Sym Methyl def (40) 41.8; (39) 38.8	1391	1.6		
104	Ringmethylen $wagg$ (31) 21.1; (33) 12.0	1373	1.1	1366	8.9
105	Sym Methyl def (36) 20.9 ; (35) 14.5 ; (15) 11.4 ; (37) 11.1	1371	2.5		
116	C-H rock (28) 36.4; C=C str (28,27) 25.6	1326	5.6	1333	3.3
117	C-H rock (7) 35.3; C=C str $(8,7)$ 24.9	1322	2.2	1306	11.6
123	Ringmethylen twist (2) 36.3; (4) 22.9	1286	1.0	1291	7.9
125	C-H rock (24) 15.3; (11) 14.8	1278	4.0	1270	10.6
128	C=C str (20,19) 17.5; C–C str (25,24) 12.0; (11,10) 11.9	1236	13.7	1225	9.8
131	C-H rock (11) 9.7; (24) 8.6	1222	3.0	1213	11.1
137	$C-C \ str \ (19,18) \ 10.5; \ (21,20) \ 10.4$	1191	1.6	1189	42.1
139	C-C str $(38,30)$ 10.8; $(31,30)$ 10.6; Methyl rock (38) 10.1	1180	1.4		
143	$C=C \ str \ (20,19) \ 16.7$	1158	21.2	1163	90.1
144	C-C str (7,6) 17.0; Methyl rock (13) 11.9	1142	2.0	1149	70.4
145	$C-C \ str \ (29,28) \ 21.6$; Methyl rock (40) 10.1	1138	2.3	1135	27.9
146	Ringmethylen rock, twist (31) 24.5	1127	1.2	1123	18.9
147	Ringmethylen rock, twist (4) 19.5	1126	1.3		
151	Methyl rock (38) 25.2	1046	2.2	1053	3.1
156	Methyl rock (35) 18.5; (37) 10.3; (15) 10.2	1032	8.0	1045	2.9
157	Methyl rock (36) 23.5; (37) 19.0	1032	4.7	1026	14.4
161	Methyl rock (13) 15.0; (35) 15.0	1008	0.7	1002	100.0
162	Methyl rock (36) 21.0; (37) 18.6	1002	0.8		
169	C-H oop (10) 11.7; Torsion (16-11) 10.4	965	2.0	970	29.2
170	C-H oop (25) 13.1; (27) 10.5; Torsion (24-23) 11.3	963	3.9		
171	Torsion (8-7) 19.9; C–H oop (8) 16.8; (7) 14.9	952	8.8	955	16.6
172	Torsion (28-27) 21.7; C–H oop (27) 20.2; (28) 15.6	949	2.5	948	18.5
180	C-H oop (10) 18.8; (7) 10.5	884	3.2	895	2.9
188	C-H oop (24) 11.3	853	1.6	855	4.7
191	Ringmethylen rock (31) 36.3; (33) 15.0	839	1.4	841	1.5
196	C-C str (34,33) 15.5; (39,34) 15.3	780	1.5	795	4.5
197	$C-C \ str \ (14,1) \ 17.5; \ (2,1) \ 15.6$	776	1.3		

Abkürzungen: asym, asymmetrisch; def, Deformation; I_{exp} , Ramanintensität relativ zur stärksten experimentellen Ramanmode bei 1002 cm⁻¹; I_{QM} , Ramanintensität relativ zur stärksten berechneten Ramanmode ν_{64} ; oop, engl. out-ofplane; PED, engl. potential energy distribution, der prozentuale Anteil der einzelnen Koordinaten ist kursiv geschrieben und die beteiligten C-Atome stehen in Klammern (siehe Abb. 3.30); rock, engl. rocking; scis, engl. scissoring; str, engl. stretching; sym, symmetrisch; twist, engl. twisting; wagg, engl. wagging.



Abbildung 3.32 Vergleich des DFT, *in vacuo* berechneten Ramanspektrums von β -Car^{+•} in der optimierten Grundzustandsstruktur (blaue Kurve) mit dem experimentellen Resonanzramandifferenzspektrum zwischen belichtetem und dunkeladaptiertem PS II bei einer Anregungswellenlänge von 1064 nm (rote Kurve).

das experimentelle Spektrum ein Resonanz-Ramanspektrum. Da das berechnete Spektrum ein reines Ramanspektrum ohne Berücksichtigung elektronisch angeregter Zustände ist, werden Intensitätsunterschiede auf Grund unterschiedlicher Resonanzverstärkung der einzelnen Banden nicht reproduziert. Die Positionen der Raman-aktiven Banden und ihre Modenzusammensetzungen sind in Tab. 3.3 dargestellt.

3.3.3 Ramananregungsprofil von Carotin in Lösung

Die Ramanspektroskopie ist eine sehr sensitive Technik, um Carotin nachweisen zu können. Es bietet sich daher an, ihre Anwendung nicht nur auf den Nachweis der allgemeinen Carotinoxidation zu beschränken, sondern zu versuchen, die einzelnen Carotine in dem Reaktionszentrum des PS II nachzuweisen (Abb. 3.1). Lineardichroismusmessungen an den Reaktionszentren vom PS II haben gezeigt, dass es zwei Carotinpopulationen (Carotinpools) gibt [106, 187, 192]. Ein Pool ist demnach annähernd parallel zur Membranebene mit Absorptionsmaximis bei 443, 473 und 507 nm. Der andere Carotinpool steht senkrecht zur Membranebene mit Absorptionsminima bei 429, 458 und 489 nm. Die Idee ist, die selektive Detektion der Carotinpools in den Ramanspektren über die Einstellung der Anregungswellenlänge zu verwirklichen. Telfer *et al.* verwendeten diesen Ansatz an PS II-Reaktionszentren und konnten Änderungen in der Position der ν_{66} -Bande und in dem Verhältnis der Intensitäten von ν_{66} zu ν_{141} in Abhängigkeit der Laserwellenlänge feststellen [181]. So befand sich bei einer Anregung von 514.5 nm¹⁹ die ν_{66} -Bande bei 1523 cm⁻¹ und bei einer Anregung von 488 nm²⁰ bei 1529.5 cm⁻¹. Das Verhältnis zwischen den beiden Banden ν_{66} und ν_{141} war bei 514.5 nm nahezu 1 : 1, wohingegen bei 488 nm die ν_{66} doppelt so intensiv wie die ν_{141} war. Diese Effekte wurden der selektiven Anregung der beiden Carotine zugeschrieben.

Prinzipiell wäre es natürlich auch denkbar, dass es sich dabei um Effekte handelt, die auf intrinsische Eigenschaften des β -Carotins zurückzuführen sind und nicht mit der unterschiedlichen Umgebung in der Proteinmatrix zusammenhängen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden in Zusammenarbeit mit Norman Tschirner und Katharina Brose aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Thomsen, TU Berlin, Messungen an reinem β-Carotin, gelöst in dem organischen Lösungsmittel Dichlormethan, für eine große Anzahl von Laserwellenlängen durchgeführt. Abb. 3.33 zeigt zwei Beispielspektren für Anregungen bei 465 und 514 nm, in denen deutliche Unterschiede zu sehen sind. Die ν_{66} -Bande weist eine Verschiebung um 4 cm^{-1} von 1521 cm^{-1} bei 514 nm zu 1525 cm^{-1} bei 465 nm auf. Auch das Verhältnis der Intensitäten der ν_{66} und ν_{141} ändert sich, sodass bei 514 nm die ν_{141} -Bande sogar intensiver als die ν_{66} ist. Die Verschiebung der ν_{66} -Bande tritt also auch bei Carotin in stark verdünnter Lösung auf²¹, wo die Umgebung für jedes Farbstoffmolekül äquivalent sein sollte. Eine mögliche Ursache lässt sich bereits an den DFT-Berechnungen der Ramanspektren erkennen. Neben der intensivsten Bande ν_{66} bei $1535 \,\mathrm{cm}^{-1}$ liegt sehr dicht noch eine starke Bande: ν_{67} bei 1527 cm⁻¹ (siehe Tab. 3.2 und Abb. 3.31). In der Tat werden für einen zufriedenstellenden Fit der experimentellen Bande zwei einzelne Lorentzbanden benötigt. Eine globale Analyse der umhüllenden Bande für alle Anregungswellenlängen zeigt eine gute Beschreibung dieser auf Basis zweier Lorentzbanden bei 1519 und $1526 \,\mathrm{cm}^{-1}$. In Abb. 3.34 ist dies am Beispiel der Spektren für 465 und 514 nm Anregung zu sehen. Die ν_{66} - und ν_{67} -Mode weisen dabei unterschiedliche Intensitätsverhältnisse mit der Anregung auf. Die scheinbare Verschiebung der Bandenumhüllenden mit der Anregungswellenlänge könnte sich demnach auf unterschiedlich starke Resonanzverstärkungen der beiden Moden zurückführen lassen. Dies wird durch die Messung der Ramananregungsprofile (REP, engl. Raman excitation profile) bestätigt. Um das REP aufnehmen zu können, wurden die Ra-

 $^{^{19}\}text{Bei}\ \lambda_{514.5}$ sollte bevorzugt Car_{507} angeregt werden.

 $^{^{20}\}text{Bei}\;\lambda_{488}$ sollte bevorzugt Car_{489} angeregt werden.

²¹Die Carotinkonzentration betrug je nach Anregungswellenlänge entweder 9 oder 70 μ M.



Abbildung 3.33 Resonanz-Ramanspektren von β -Carotin gemessen in einer Dichlormethanlösung bei 465 bzw. 514 nm Anregung (rote bzw. blaue Kurve). Die Spektren sind auf die mit dem Stern markierte Bande des Dichlormethans normiert.

manspektren bei den verschiedenen Laserwellenlängen mit einem internen Standard aufgenommen. Dafür diente die Bande bei 1423 cm⁻¹ des Lösungsmittels Dichlormethan. Durch den internen Standard werden Einflüsse der Laserleistung, des Strahlengangs und der ν^4 -Abhängigkeit der Ramanintensitäten kompensiert und es lassen sich direkt die Verhältnisse der ν_{66} - bzw. der ν_{67} -Bande zu der Dichlormethanbande gegen die Anregungswellenlänge auftragen, um die REPs zu erhalten (Abb. 3.35). Das REP der ν_{66} -Mode weist sein Maximum bei ungefähr 471 nm auf, wohingegen das Maximum bei der ν_{67} -Mode bei ungefähr 500 nm liegt. Die Maxima liegen dicht an denen der Absorptionsbande des Carotins in Dichlormethan mit 490 und 463 nm. Zum Vergleich ist in Abb. 3.35 das Absorptionsspektrum mit eingezeichnet.

Um die möglichen Gründe für die unterschiedlichen Anregungsprofile zu erhellen, wurden für das β -Carotin *in vacuo* auch die Resonanz-Ramanspektren für die verschiedenen Wellenlängen berechnet. Dafür wurde über TDDFT-Rechnungen die Struktur im elektronisch angeregten Zustand S₂ optimiert. Der Übergang S₀ \rightarrow S₂ ist der unterste erlaubte optische Übergang bei ungefähr 500 nm, da der niedriger liegende Übergang S₀ \rightarrow S₁



Abbildung 3.34 Resonanz-Ramanspektren von β -Carotin gemessen in einer Dichlormethanlösung bei 465 bzw. 514 nm Anregung (rote bzw. blaue Kurve) mit vergrößerter Darstellung der Region der ν_{67} (1519 cm⁻¹) und der ν_{66} (1526 cm⁻¹). Die gepunkteten Linien entsprechen den zwei Lorentzbanden des Fits der experimentellen Bandenumhüllenden.

aus Symmetriegründen verboten ist. Aus den Unterschieden Δs zwischen den beiden Gleichgewichtsstrukturen im Grund- und angeregten Zustand für die einzelnen Moden und der Kramers-Kronig-Transformation des Absorptionsspektrums wurden schließlich die Resonanz-Raman-Intensitäten bestimmt. Die Rechnungen bestätigen die Verstärkung der Raman-aktiven Moden, wenn die Anregung in Resonanz mit dem $S_0 \rightarrow S_2$ Übergang liegt. Das Ansteigen der Intensität der ν_{141} relativ zur ν_{66} von nichtresonanten bis zu vollresonanten Bedingungen wird ebenfalls reproduziert. Sich verändernde Relationen zwischen ν_{66} und ν_{67} werden in den Rechnungen nicht beobachtet. In dem theoretischen Ansatz wird allerdings nur die A-Term-Verstärkung berücksichtigt, die für den Fall der Resonanz der Anregung mit einem starken erlaubten elektronischen Übergang zutrifft. Schlussendlich werden dadurch die Verstärkungen der Moden nur durch die Franck-Condon-Faktoren und damit die Δs -Werte bestimmt. Eine detaillierte Betrachtung der ν_{66} - und ν_{67} -Modenzusammensetzung offenbart (Tab. 3.2), dass beide Moden durch die C=C-Streckschwingungen der Polyenkette dominiert werden, wobei unterschiedliche Bindungen



Abbildung 3.35 Ramananregunsprofile der Moden ν_{67} (rote Kreise) und ν_{66} (blaue Kreise) von β -Carotin in einer Dichlormethanlösung. Die durchgezogenen Linien dienen nur zur Veranschaulichung des Verlaufs. Zum Vergleich ist das Absorptionsspektrum von β -Carotin in Dichlormethan eingezeichnet (gepunktete Linie, willkürlich skaliert).

involviert sind. Die berechneten Δs -Werte für beide Moden sind dabei sehr gleich, was zu nahezu identischen berechneten REPs der ν_{66} und ν_{67} führt (siehe Anhang).

Auf Basis des derzeitig implementierten theoretischen Levels ist es also nicht möglich, den experimentellen Befund der unterschiedlich REPs zu reproduzieren. Eine mögliche Erkärung könnten Symmetriebetrachtungen liefern. So führten Schlücker *et al.* [161] bei der Berechnung ihrer Carotinstruktur Einschränkungen in der Optimierung ein, um eine C_1 -Symmetrie zu erhalten. Dabei sind die Normalmoden dann entweder IR- (A_u) oder Ramanaktiv (A_g). In der Tat zeigen sowohl der Vergleich der experimentellen IR- und Ramanspektren [161] als auch die Normalmodenanalyse (siehe Anhang), dass nur wenige Moden gleichzeitig Raman- und IR-Intensität aufweisen. Die ohne Einschränkungen optimierte Struktur dürfte also relativ dicht an einer C_1 -Symmetrie sein. Unter diesen Voraussetzungen wäre eine Resonanzverstärkung von A_u-Moden über vibronische Kopplung mit einem elektronischen Übergang geeigneter Symmetrie möglich. Diese Möglichkeit ist jedoch recht unwahrscheinlich, da im Infrarotspektrum keine A_u-Mode auftritt, die für die experimentelle Ramanbande bei 1519 cm⁻¹ in Frage käme. Außerdem existiert kein elektronischer Übergang geeigneter Symmetrie, der dicht genug am dem $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang wäre, um an diesen vibronisch zu koppeln.

Eine weitere Möglichkeit wäre, die Betrachtungen auf das delokalisierte π -Elektronensystem zu begrenzen, für das ohne die sterische Hinderung durch die β -Iononringe eine C_{2h} -Symmetrie gilt. Damit hätten die Ramanaktiven Moden entweder A_g oder B_g -Symmetrie und wiesen somit unterschiedliche Polarisationsverhältnisse auf. Diese Eigenschaften wurden anhand von polarisationsabhängigen Resonanz-Raman-Messungen an PS II Kristallen für die ν_{66} und ν_{67} untersucht [23]. Für die ν_{66} -Mode legen die Experimente eine A_g -Symmetrie nahe, für ν_{67} eine B_g -Symmetrie. Ramanmessungen am β -Carotin in Lösung zeigen unabhängig von der Anregungswellenlänge Depolarisationsverhältnisse für ν_{66} von 0.27 und für ν_{67} von 0.43. Jedoch liegt auch für eine B_g -Mode kein elektronischer Übergang geeigneter Symmetrie in der Nähe des $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangs, mit dem sich eine Resonanzverstärkung über eine vibronische Kopplung erklären ließe.

Schließlich bleibt noch die Möglichkeit, dass sich die Normalmoden unter der elektronischen Anregung verändern. Die Hauptanteile zu den PEDs der beiden Moden ν_{66} und ν_{67} liefern die C=C-Streckschwingungen der Polyenkette in einem alternierenden Muster: Für ν_{66} sind die wichtigsten die C₂₀=C₁₉, C₂₄=C₂₃ und C₁₆=C₁₁ und für ν_{67} die C₂₂=C₂₁ und C₁₈=C₁₇ (siehe Tab. 3.2 und Abb. 3.30). Mit dem Übergang S₀ \rightarrow S₂ werden diese Bindungen ungefähr 0.025Å länger mit einer durchschnittlichen Bindungslänge von 1.401Å. Gleichzeitig verringern sich die Längen der benachbarten Einfachbindungen um nahezu den gleichen Betrag auf 1.411Å, so dass sich die Einfach- und Doppelbindungen der Polyenkette sehr ähnlich werden. Es wäre demnach also durchaus möglich, dass sich im angeregten Zustand die C-C-Streckschwingungsmoden²² mit den ν_{66} - und ν_{67} -Moden mischen (Duschinsky-Rotation) [27]. In Analogie zu Arbeiten von Spiro *et al.* an Transferrin [53, 172] könnte dies die beobachteten Unterschiede in den Anregungsprofilen der ν_{66} - und ν_{67} -Moden erklären. Der Abstand zwischen den Maxima der REPs liegt bei ca. 1230 cm⁻¹, ein Wert, der innerhalb der C-C-Streckschwingungsregion liegt und damit auf eine Mischung der C=C- und C-C-Koordinaten im angeregten Zustand hinweist.

3.3.4 Ramananregungsprofil von Carotin in der Proteinumgebung von PS I und PS II

Zum Vergleich der Eigenschaften von β -Carotin in Lösung und in der Proteinumgebung wurden auch die Ramanspektren von PS I und PS II in einem größeren Wellenlängenbereich aufgenommen. Da bei Anregungen in der Nähe des roten Spektralbereiches die Fluoreszenz stark zunimmt und die Ramanspektren überlagert, wurden die Messungen nur bis zu einer Laserwellenlänge von 568 nm durchgeführt. Im blauen Spektralbereich wurde

²²Wie zum Beispiel die ν_{141} -Mode.



Abbildung 3.36 Resonanz-Ramanspektren von PS I gemessen in einem 20 mM MES-Puffer (pH 6.5, 10 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂, $0.02\% \beta$ -DM) mit 50 %Vol Glycerol bei 465 bzw. 514 nm Anregung (rote bzw. blaue Kurve). Die Spektren sind auf die mit dem Stern markierte Bande des Glycerols normiert.

bis 465 nm gemessen. Unterhalb dieser Wellenlänge werden die Chlorophyllbanden durch die Resonanz mit der Soretbande verstärkt und können die Auswertung des Carotinspektrums stören. Bei der Untersuchung der Spektren zeigt sich, dass sich das Carotinspektrum in der Proteinumgebung (siehe Abb. 3.36 und figure:results24) kaum von dem Spektrum in Lösung unterscheidet. In allen Umgebungen tritt die "scheinbare" Verschiebung der Bande um 1525 cm⁻¹ auf und auch die Änderung des Verhältnisses zwischen ν_{66} und ν_{141} mit der Anregungswellenlänge ist zu sehen. Die Verschiebung reicht von 1524 cm⁻¹ bis 1521 cm⁻¹ bzw. 1522 cm⁻¹ für PS I bzw. PS II. Die globale Analyse der Bande ergibt, wie bei der Analyse der Lösungsmittelspektren von β -Carotin, zwei Komponenten, deren Maxima sich bei 1520 cm⁻¹ und 1526 cm⁻¹ befinden. Für die Messung der Raman-Anregungsprofile von β -Carotin in PS I und PS II wurde als interner Standard die Raman-Bande von Glycerol bei 1465 cm⁻¹ gewählt. Die erhaltenen REPs sind in Abb. 3.38 gezeigt. Sie zeigen zwischen den beiden Proteinkomplexen kaum Unterschiede, außer dass das Intensitätsverhältnis ν_{66}/ν_{67} unterhalb von 480 nm im PS I geringer als im PS II ausfällt. Das könnte unter anderem durch die steigende Resonanzverstärkung der Ramansignale von den Chlorophyllmolekü-



Abbildung 3.37 Resonanz-Ramanspektren von PS II gemessen in einem 20 mM MES-Puffer (pH 6.5, 10 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂, $0.02\% \beta$ -DM) mit 50 %Vol Glycerol bei 465 bzw. 514 nm Anregung (rote bzw. blaue Kurve). Die Spektren sind auf die mit dem Stern markierte Bande des Glycerols normiert.

len, die die Auswertung der ν_{66}/ν_{67} -Bandenumhüllende stören, verursacht werden. Dieser Effekt wäre im PS I stärker ausgeprägt, da dort das Chl/Car-Verhältnis größer als im PS II ist.

Den Anregungsprofilen der ν_{66} und ν_{67} von β -Carotin in Lösung sehen die REPs von β -Carotin in den Proteinkomplexen sehr ähnlich. Sie sind aber um bis zu 15 nm rotverschoben, mit dem Maximum der ν_{67} bei ca. 507 nm und der ν_{66} bei ca. 486 nm. Die Verschiebung korrespondiert ungefähr mit der Rotverschiebung des Absorptionsspektrums von Carotin in den Photosystemen im Vergleich zum Absorptionsspektrum des Carotins in Dichlormethan, was den Einfluss der Umgebung auf den S₀ \rightarrow S₂ Übergang widerspiegelt. Interessanterweise liegen die Maxima ebenfalls sehr dicht an den Werten für die beiden Carotinpools aus den LD-Messungen an PS II und auch im Bereich für Werte aus LD-Messungen am PS I [11]. Dieser Befund für sich alleine genommen würde dafür sprechen, dass es möglich ist die unterschiedlichen Carotine selektiv mit der Resonanz-Ramanspektroskopie über die Einstellung der Anregungswellenlänge zu detektieren. Die Berücksichtigung der REPs von Carotin in Dichlormethan zeigt aber, dass diese Zuordnung schwierig aufrecht



Abbildung 3.38 Ramananregunsprofile der Moden ν_{67} (rote Kreise) und ν_{66} (blaue Kreise) von β -Carotin in den Proteinumgebungen vom PS I (links) und PS II (rechts). Die durchgezogenen Linien dienen nur zur Veranschaulichung des Verlaufs.

zu erhalten ist, da die gleichen Effekte wie in den Proteinkomplexen auch in Lösung des isolierten Pigments auftreten. Das spricht dafür, dass es sich bei der Verschiebung der ν_{66}/ν_{67} -Bandenumhüllenden um eine intrinsische Eigenschaft des Carotins handelt und somit für den Nachweis der spektral unterschiedlichen Carotine in den Photosystemen nicht geeignet ist.

3.4 Spektroskopische Charakterisierung des PS I aus A. marina

Neben der Untersuchung der Elektronentransferprozesse im Photosystem II aus dem Organismus T. elongatus war ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit die spektroskopische Charakterisierung des Photosystem I aus dem Cyanobakterium Acaryochloris marina. Dieser Organismus wurde 1996 zum ersten Mal beschrieben und stellt eine bemerkenswerte Ausnahme dar [126]. Er weist als Hauptpigment nicht wie bei den photosynthetischen Organismen allgemein üblich Chlorophyll a, sondern Chlorophyll d auf. Der Unterschied zwischen den Molekülen ist der Austausch der Vinylgruppe in Chl a durch eine Formylgruppe in Chl d (siehe Abb. 1.5). Dadurch verschiebt sich die Absorption der Zellen um bis zu 40 nm zu größeren Wellenlängen im Vergleich zu Chl a-enthaltenden PS I.

In A. marina wird neben Chl d stets auch zu einem kleinen Prozentsatz ($\leq 5\%$ aller Chlorophylle) Chl a nachgewiesen [4, 126, 160] und es wurde spekuliert, ob Chl a als Kofaktor in den Elektronentransferketten vom PS I und PS II beteiligt ist [3]. Besonders im PS II war die Frage, ob die niedrigere Photonenenergie durch die rotverschobene Chl d-Absorption überhaupt ausreicht, um die Wasserspaltung anzutreiben. Für den dabei auftretenden Zustand P⁺Q⁻_A wurde diskutiert, ob P⁺ ein Chl d- oder ein Chl a-Kationenradikal ist [84, 163, 188]. Die Absorptionsdifferenzspektren von P⁺Q⁻_A – PQ_A zeigen in der Soretregion eine Ausbleichung bei 435 nm und im nahen Infrarot eine Absorptionszunahme um 820 nm, was charakteristisch für die Bildung eines Chl a-Radikals ist [163].

Im PS I von A. marina zeigen die blitzinduzierten Absorptionsänderungen durch die Photooxidation des primären Donators starke Ausbleichungsbanden bei 455 und 740 nm²³ [80]. Nach der Ausbleichung in der Q_y -Region wurde der primäre Donator als P_{740} bezeichnet und über ENDOR [125] und FTIR [63, 170] als ein Chlorophylldimer identifiziert. Analysen der Pigmentzusammensetzung deuten darauf hin, dass es sich bei dem Dimer P_{740} um einen Heterodimer aus einem Chl d und einem Chl d' handelt [2], in Analogie zu dem Heterodimer P_{700}^{24} [91, 101].

Auch im Photosystem I von A. marina tritt neben Chl d noch Chl a auf. Auf ein P_{740} kommt dabei ungefähr ein Chl a in aufgereinigten PS I-Komplexen [80]. Basierend auf optischer Femtosekundenspektroskopie wurde dieses Chl a als der primäre Elektronenakzeptor A₀ identifiziert [105]. Für die restlichen Kofaktoren auf der Elektronenakzeptorseite sind die Zuordnungen noch nicht sehr eindeutig. Für den sekundären Akzeptor A₁ zeigen ESR-Messungen einen Abstand zwischen A₁ und dem primären Elektronendonator [157], der dem in Chl a-bindenden PS I sehr ähnelt, [12] und es gibt Hinweise, dass A₁ auch ein Phyllochinon wie im Chl a-bindenden PS I ist [80], doch fehlt noch der spektroskopische Nachweis dafür. Für die terminalen Elektronenakzeptoren wird zumindest für die beiden Eisen-Schwefelcluster F_A und F_B eine große Ähnlichkeit zwischen Chl d- und a-bindendem PS I in den ESR-Spektren beobachtet [157]. Über den F_X-Kofaktor ist zur Zeit noch so gut wie nichts bekannt.

3.4.1 Absorptionsdifferenzspektroskopie bei Raumtemperatur

Um die in den Elektronentransferreaktionen des PS I von *A. marina* involvierten Kofaktoren näher zu charakterisieren, wurden die blitzinduzierten Absorptionsdifferenzspektren bei

 $^{^{23}\}mathrm{Im}\,\mathrm{PS}\,\mathrm{I}\,\mathrm{Chl}\,a\text{-}\mathrm{enthaltender}\,\mathrm{Organismen}$ treten die gleichen Absorptionsänderungen bei 435 und 700 nm auf.

 $^{^{24}}P_{700}$ setzt sich aus einem Chl a und einem Chl a', dem 13² Epimer von Chl a, zusammen



Abbildung 3.39 Blitzinduzierte Absorptionsänderung als Funktion der Zeit bei 455 nm im PS I aus A. marina bei Raumtemperatur und pH 7.5 (schwarze Kurve) mit einer Anpassung durch einen zweiphasigen, exponentiellen Zerfall (rote Kurve). Der eingeschobene Graph zeigt die Ratenkonstanten der Reduktion von P_{740} in Abhängigkeit von der eingesetzten PMS-Konzentration.

tiefen Temperaturen und bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Spektren bei Raumtemperatur zur Untersuchung der Ladungstrennung zwischen dem primären Donator P₇₄₀ und den terminalen Eisen-Schwefelclustern wurden an der PS I reichen F3-Fraktion (siehe Kap. 2.1) und an Thylakoidmembranen in der Gegenwart von zugesetzten Elektronendonatoren und -akzeptoren²⁵ aufgenommen. Die Messungen wurden in der ms-Skala durchgeführt und der Zeitverlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderungen wurde mit zwei Exponentialfunktionen für eine langsame und eine schnelle Komponente angepasst (siehe Abb. 3.39 als Beispiel für eine Messlichtwellenlänge von 455 nm). Die Anfangsamplitude repräsentiert dabei die Absorptionsänderungen, die durch die Bildung des Zustandes $P_{740}^+ F_{A/B}^-$ verursacht werden, da die vorgelagerten Elektronentransferschritte zu schnell sind, um zeitlich aufgelöst werden zu können. Die Amplitude der schnellen Phase mit einer Halbwertszeit zwischen 0.5 und 5 ms kann der Oxidation der reduzierten Eisen-Schwefelcluster zugeschrieben werden [92, 97]. Ein kleiner Teil (ungefähr 14%) der Oxidation erfolgt über die La-

 $^{^{25}5\,{\}rm mM}$ Ascorbat und ungefähr $10\,\mu{\rm M}$ PMS bzw. 1-5 mM Ascorbat, $200\,\mu{\rm M}$ TMPD und $50\,\mu{\rm M}$ MV für Messungen zwischen 300 und 450 nm.



Abbildung 3.40 Blitzinduzierte Absorptionsdifferenzspektren von PS I aus *A. marina* bei Raumtemperatur und pH 7.5 für die Oxidation von P₇₄₀ (blaue Kreise), die Reduktion der terminalen Eisen-Schwefelcluster (rote Vierecke) und die Bildung von $P_{740}^+F_{A/B}^-$ (grüne Dreiecke) in der Gegenwart von 5 mM Ascorbat und 7 μ M PMS.

dungsrekombination mit P_{740}^+ und ansonsten über die Elektronenabgabe an den externen Elektronenakzeptor, also entweder PMS^{ox} oder MV. Daher hängt die Halbwertszeit dieser Reaktion von der Art und der Konzentration des hinzugefügten Elektronenakzeptors ab. Die restlichen ungefähr 86% des P_{740}^+ werden durch den externen Elektronenakzeptors tor (PMS^{red} oder TMPD) mit der langsameren Kinetik reduziert. Deren Halbwertszeit ist proportional zu der Konzentration des hinzugefügten Elektronendonators²⁶ mit einer Geschwindigkeitskonstanten von (6.2 ± 0.4) × 10⁶ M⁻¹s⁻¹ bei pH 7.5 (in Abb. 3.39 eingefügter Graph). Die Amplitude der langsamen Phase aufgetragen gegen die Wellenlänge des Messlichtes ergibt dann das ($P_{740}^+ - P_{740}$)-Differenzspektrum (Abb. 3.40 blaue Kreise)²⁷. Es zeigt die Hauptausbleichung bei 455 nm, positive Banden bei 472 und 415 nm und eine breite Absorptionszunahme zwischen 480 und 588 nm. Die Struktur des Spektrums ist die gleiche wie für das ($P_{700}^+ - P_{700}$)-Differenzspektrum [97], nur dass das ($P_{740}^+ - P_{740}$)-Differenzspektrum

 $^{^{26}\}mathrm{Hier}$ reduziertes PMS.

 $^{^{27}}$ Damit das Differenzspektrum 100% der PS I-Komplexe repräsentiert wurden die Amplituden mit dem Faktor 1.16 multipliziert.

eine Rotverschiebung von $22 \,\mathrm{nm}$ dazu aufweist. Das zeigt, dass in A. marina ein Chl d und kein Chl *a* oxidiert wird. Das Differenzspektrum $(F_{A/B}^- - F_{A/B})$ (Abb. 3.40 rote Vierecke) für die Reduktion der terminalen Eisen-Schwefelcluster wurde durch die Subtraktion des $(P_{740}^+ - P_{740})$ - von dem $(P_{740}^+ F_{A/B}^- - P_{740}F_{A/B})$ -Differenzspektrum (Abb. 3.40 grüne Dreiecke und in [80, 122]) erhalten. Es weist eine breite Ausbleichung um 432 nm auf in sehr guter Ubereinstimmung mit dem $(F_{A/B}^- - F_{A/B})$ -Differenzspektrum in Chl *a*-bindendem PS I [17, 74, 97]. Dadurch wird die Schlussfolgerung aus den ESR-Experimenten [157] untermauert, dass die terminalen Elektronenakzeptoren im PS I aus A. marina mit denen aus Chl a-bindendem PS I identisch sind. Ein weiteren Hinweis dafür erbringen die Messungen der Ladungsrekombination zwischen P_{740}^+ und $F_{A/B}^-$, die eine Halbwertszeit von 60 ms aufweisen. Diese Zeit ähnelt der, die in Chl a-bindendem PS I bestimmt wurde [92]. Durch Inkubation der Probe mit 6.8 M Harnstoff für 1 min bis 180 min wird diese langsame Reaktion durch eine schnellere mit $t_{1/2} = 2 \,\mathrm{ms}$ ersetzt. Die Behandlung mit Harnstoff entfernt die PsaC-Untereinheit, welche die beiden terminalen Eisen-Schwefelcluster koordiniert [56, 110, 136]. Dadurch erfolgt die Ladungsrekombination von P_{700}^+ mit dem reduzierten Eisen-Schwefelcluster F_X , der durch den PsaA/PsaB-Heterodimer gebunden wird. Die 2 ms-Phase in A. marina ist etwas langsamer als in PS I-Komplexen aus anderen Cyanobakterien ohne die PsaC-Untereinheit mit $t_{1/2} = 1 \text{ ms} [56, 110, 136]$, ist dieser aber sehr ähnlich. Das deutet darauf hin, dass in Analogie zu der Rekombination zwischen P_{700}^+ und F_{X}^{-} in Harnstoff behandelten Chl *a*-bindendem PS I auch im PS I von A. marina ein F_X -Cluster vorhanden ist.

Abb. 3.41 zeigt das $(P_{740}^+ - P_{740})$ -Differenzspektrum vom PS I aus A. marina (blaue Kreise) und zum Vergleich aus T. elongatus (rote Vierecke) in der Q_v -Region. Es ähnelt sehr denen von Hu et al. [80] und Mi et al. [122] mit einer breiten Ausbleichung, die möglicherweise auf die Uberlappung von zwei Banden bei 740 und 730 nm zurückgeht. Weitere Ausbleichungen befinden sich bei 711, 693 und 660 nm. Die Nulldurchgänge liegen bei 774 und 588 nm. Um den Unterschied zwischen den molaren Extinktionskoeffizienten von P_{740}^+ und P_{740} bei 740 nm zu bestimmen, wurde nach Hiyama und Ke [75] TMPD als Elektronendonator hinzugegeben. Die Reduktion von P_{740}^+ ist dann an die Oxidation von TMPD gekoppelt. Die Oxidation des TMPD wurde am isosbestischen Punkt der P₇₄₀-Oxidation bei 588 nm gemessen. Bei pH 7.5 hat das oxidierte TMPD dort einen molaren Extinktionskoeffizienten von 10.2 mM⁻¹cm⁻¹. Aus dem Verhältnis der Absorptionsänderungen bei 588 und 740 nm konnte damit der molare Extinktionsdifferenzkoeffizient für die Bildung des P_{740}^+ bestimmt werden. Es ergab sich ein Wert von $(45 \pm 4) \,\mathrm{mM^{-1} cm^{-1}}$, der wesentlich niedriger ist als bei Hu et al. [80]. Mit diesem Extinktionsdifferenzkoeffizienten konnte das Chl d/P_{740} -Verhältnis anhand der maximalen blitzinduzierten Ausbleichung in der Q_v -Region durch die P_{740} -Photooxidation berechnet werden. Es ergab sich ein Verhältnis von Chl dzu P_{740} von 150 ± 10 für die F3-Präparationen und von 200 ± 10 für die Thylakoidmembra-



Abbildung 3.41 Blitzinduzierte Absorptionsdifferenzspektren bei Raumtemperatur und pH 7.5 vom PS I aus *A. marina* für die Oxidation vom P_{740} (blaue Kreise) und vom P_{700} aus *T. elongatus* (rote Vierecke) in der Gegenwart von 5 mM Ascorbat und 7 μ M PMS. Die Bande bei 703 nm im ($P_{700}^+ - P_{700}$)-Differenzspektrum ist zum besseren Vergleich auf die Ausbleichung bei 740 nm des ($P_{740}^+ - P_{740}$)-Differenzspektrums normiert.

nen. Das Verhältnis für die Thylakoidmembranen ist konsistent mit folgenden vereinfachten Überlegungen. Unter den Annahmen PS I : PS II ≈ 1 [2, 15, 178], Chld : PS I ≈ 100 wie im Chl *a*-bindenden PS I [6, 91], Chld : PS II ≈ 40 [48, 111] und vier Pcb-Proteinen pro PS II mit jeweils 15 Chlorophyllen [28] erhält man rund 200 Chlorophylle pro P₇₄₀. Das Verhältnis von 150 Chl *d* pro P₇₄₀ in den Proben der F3-Präparation zeigt, dass diese auch ein wenig PS II und Pcb-Proteine enthalten.

Das Absorptionsdifferenzspektrum $(P_{740}^+ - P_{740})$ im NIR ist in Abb. 3.42 gezeigt. Oberhalb von 780 nm stellt das gezeigte Differenzspektrum das Absorptionsspektrum des P_{740}^+ -Radikals dar, da P_{740} in diesem Wellenlängenbereich nicht absorbiert. Die Absorption des Radikalkations im NIR erstreckt sich ungefähr 40 nm weiter zu höheren Wellenlängen im Vergleich zum P_{700}^+ im Chl *a*-bindenden PS I. Die Größen der Absorptionsänderungen im Soret-, Q_y - und NIR-Bereich, die in Abb. 3.40-3.42 gezeigt sind, lassen sich direkt miteinander vergleichen. Da die Absorption im nahen Infrarot um 840 nm ungefähr 5-mal kleiner als die Ausbleichung bei 740 nm ist, ergibt sich somit für das P_{740}^+ im NIR ein Extinkti-



Abbildung 3.42 Blitzinduzierte Absorptionsdifferenzspektren vom PS I aus *A. marina* bei pH 7.5 für die Oxidation vom P_{740} bei Raumtemperatur (Kreise) und bei 77 K (Dreiecke) in der Gegenwart von 5 mM Ascorbat und 7 μ M PMS.

onskoeffizient von ca. $9 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ in guter Übereinstimmung mit dem erwarteten Wert für ein Chlorophyllkationradikal. Der Wert für P⁺₇₀₀ liegt mit ca. $7.5 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei 830 nm ein wenig niedriger, wahrscheinlich verursacht durch eine niedrigere Absorption des Chl *a*-Kations im Vergleich zum Chl *d*.

3.4.2 Bestimmung des Mittelpunktpotentials von P_{740}

Die blitzinduzierten Absorptionsänderungen im NIR wurden auch in Abhängigkeit des Potentials gemessen. Das Potential wurde durch die Zugabe von Ferri- und Ferrocyanid in unterschiedlichen Verhältnissen eingestellt und mit einer kombinierten Pt/Ag/AgCl-Elektrode (Schott PT5900A) gemessen. Die Elektrode wurde gegen das Redoxpotential einer gesättigten Chinhydronlösung als Funktion des pH-Wertes kalibriert. Zum Messen der Potentiale wurde ein pH-Meter (Knick PHM82) benutzt. Die Redoxpotentiale sind alle gegen die Standardwasserstoffelektrode angegeben. Die Redoxtitration wurde sowohl an gelösten PS I-Komplexen der F3-Bande als auch an Thylakoidmembranen durchgeführt. Für die Messungen ergab sich innerhalb der Fehlergrenzen stets das gleich Bild (siehe Abb.



Abbildung 3.43 Redoxtitration für die Oxidation vom P_{740} im PS I aus *A. marina* bei Raumtemperatur und pH 7.5. Die Redoxpotentiale wurden durch Zugabe von Ferri- und Ferrocyanid in unterschiedlichen Verhältnissen eingestellt. Dargestellt ist die auf den Maximalwert normierte Anfangsamplitude der Absorptionsänderung nach einem Blitz bei 826 nm als Funktion des Potentials der Lösung (schwarze Kreise). Das Mittelpunktspotential von 450 mV ergibt sich über den Fit mit einer Nernstgleichung für ein übertragenes Elektron (rote Kurve).

3.43) und die Anderungen der Absorptionsänderungen in Abhängigkeit des Potentials liefen sich sehr gut mit der Nernstgleichung für ein übertragenes Elektron fitten. Für das Mittelpunktspotential ergab sich ein Wert von (450 ± 10) mV, was sehr dicht an dem Wert für P₇₀₀ im PS I aus *T. elongatus* liegt, der unter den gleichen Bedingungen ermittelt wurde. Das bestimmte Mittelpunktspotential für P₇₀₀ von 440 mV stimmt sehr gut mit dem Literaturwert überein [200]. Dagegen gibt es eine große Diskrepanz zwischen dem ursprünglich durch Hu *et al.* [80] bestimmten Wert für P₇₄₀ von 355 mV und den (450 ± 10) mV aus dieser Arbeit. Das Problem könnte die Durchführung der Redoxtitration bei 740 nm in [80] sein, da unter Umständen P₇₄₀ durch das Messlicht oxidiert wurde. Das höhere Mittelpunktspotential wurde in neueren Arbeiten bestätigt [7, 186].

Als Konsequenz des Oxidationspotentials von 450 mV und der Rotverschiebung der Absorption von P₇₄₀ im Q_y-Bereich liegt der niedrigste angeregte Singulettzustand von P₇₄₀ ungefähr 90 mV niedriger als der von P₇₀₀. Trotzdem sollte das sich ergebende Redukti-



Abbildung 3.44 Blitzinduzierte Absorptionsdifferenzspektren von $(P_{740}^+ A_1^- - P_{740}A_1)$ bei 5 K, pH 7.5 und mit 65 % Vol Glycerol im PS I aus *A. marina* in der Gegenwart von 5 mM Ascorbat und 2 μ M PMS.

onspotential von P_{740}^* ($E_m \approx -1.23 \text{ V}$) ausreichen, um sowohl Chl d ($E_m \approx -0.91 \text{ V}$ in Acetonitril) als auch Chl a ($E_m \approx -1.12 \text{ V}$ in Acetonitril) [100] zu reduzieren. Wenn das Phyllochinon A_1^{28} in A. marina das gleiche Redoxpotential wie im Chl a-bindenden PS I aufweist, müsste die Triebkraft für den Elektronentransfer vom angeregten primären Donator zum sekundären Elektronenakzeptor um 90 mV kleiner sein. Sollte, wie in der Literatur vorgeschlagen, A_0 ein Chl a sein [84, 105] und die Chlorophylle eC_{A2} und eC_{B2} Chl d, dann wäre die Reduktion von A_0 durch diese Chl d-Moleküle ein energetisch sehr ungünstiger Prozess, einen sequentiellen Elektronentransfer und ähnliche Reduktionspotentiale wie in Acetonitril vorausgesetzt. Durch geeignete Protein-Kofaktorwechselwirkungen könnten die Redoxpotentiale im PS I von A. marina aber so geändert sein, dass dies kein Problem mehr darstellt.

 $^{^{28}\}mathrm{F\ddot{u}r}$ die Diskussion über die Natur von A₁ siehe unten.



Abbildung 3.45 Blitzinduzierte Absorptionsdifferenzspektren von $(P_{740}^+ A_1^- - P_{740}A_1)$ bei 77 K, pH 7.5 und mit 65 %Vol Glycerol im PS I aus *A. marina* in der Gegenwart von 5 mM Ascorbat und 2 μ M PMS.

3.4.3 Absorptionsdifferenzspektroskopie bei tiefen Temperaturen

Neben den Messungen bei Raumtemperatur wurden auch Tieftemperaturexperimente durchgeführt. Dadurch eröffnen sich weitere Möglichkeiten zur spektroskopischen Charakterisierung des PS I. Bei tiefen Temperaturen zeigt der Elektronentransfer im PS I eine Heterogenität [164]. Diese wird auch im PS I von *A. marina* beobachtet. Bei 77 K tritt in ungefähr 20% der Zentren ein irreversible Ladungstrennung, ob der Bildung der stabilen Zustände $P_{740}^+F_A^-$ und $P_{740}^+F_B^-$ auf. Das zeigt sich am Rückgang der Anfangsamplitude der blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei 826 nm als Funktion der Blitzzahl. Im größten Teil der Zentren jedoch (ca. 70%) entsteht der Zustand $P_{740}^+A_1^-$, der mit einer Halbwertszeit von rund 150 μ s wieder rekombiniert. Die gleiche Zeit wurde auch in Chl *a*-bindendem PS I beobachtet [164]. Die Messungen erfolgten an PS I-Proben, die im Dunkeln mit 5 mM Ascorbat und 2 μ M PMS eingefroren wurden. Unter diesen Bedingungen ist P₇₄₀ reduziert und die Elektronenakzeptoren sind oxidiert. Eventuelle Beiträge von PS II zu den blitzinduzierten Absorptionsänderungen durch die Ladungsrekombination von



Abbildung 3.46 Blitzinduzierte Absorptionsdifferenzspektren bei 5 K vom PS I aus *A. marina* für die Bildung von ${}^{3}P_{740}$ (blaue Kreise) in einem 100 mM CAPS-Puffer (pH 10, 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 0.02% β -DM) mit 65%Vol Glycerol in der Gegenwart von 10 mM Dithionit und 7 μ M PMS. Vor dem Einfrieren wurden die Proben bei 260 K für 3 min mit einer fokussierten 250 W Kaltlichtquelle belichtet. Die Bande des Vergleichsspektrum aus *T. elongatus* [200] bei 700 nm ist zum besseren Vergleich auf die Ausbleichung bei 740 nm des (${}^{3}P_{740} - P_{740}$)-Differenzspektrums normiert.

 $P^+Q^-_A$ konnten kinetisch getrennt werden, da $P^+Q^-_A$ mit einer Halbwertszeit von 2 ms bei tiefen Temperaturen zerfällt [163], was mehr als eine Zehnerpotenz langsamer ist als die $P^+_{740}A^-_1$ -Rekombination.

Das Absorptionsdifferenzspektrum ($P_{740}^+A_1^- - P_{740}A_1$) in der Q_y -Region für 5 K²⁹ ist in Abb. 3.44 gezeigt. Dafür wurde die jeweilige Amplitude der 150 μ s-Zerfallsphase gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die langwelligste Ausbleichung bei 744 nm wird dem Verschwinden der niederenergetischen Exzitonenbande durch die Oxidation von P_{740} zugeschrieben. Daneben befindet sich noch eine stärkere Ausbleichung bei 730 nm. Kleinere negative Banden liegen bei 711 und 664 nm. Eine breite positive Bande erscheint um 700 nm, eine kleinere bei 719 nm. Interessanterweise treten ebenfalls eine negative Bande bei 687 nm und eine positive Bande bei 674 nm auf. Diese könnten ein Hinweis für einen elektrochromen Effekt von P_{740}^+ und A_1^- auf ein Chl *a* im Reaktionszentrum sein.

 $^{^{29}\}mathrm{Die}$ Spektren bei 5 und 77 K sind annähernd gleich

Das Absorptionsdifferenzspektrum ($P_{740}^+ A_1^- - P_{740}A_1$) zwischen 300 und 550 nm ist in Abb. 3.45 gezeigt. Die Hauptausbleichung liegt, ob der Oxidation von P_{740} , bei 455 nm. Daneben gibt es noch einige elektrochrome Bandenverschiebungen. In der Region zwischen 350 und 400 nm verursacht die Oxidation von P_{740} nur geringe Absorptionsänderungen (siehe Abb. 3.40). Die auftretenden Absorptionsänderungen können daher der Reduktion von A_1 zugeschrieben werden. In Chl *a*-bindendem PS I wurde diese Absorptionszunahme auch beobachtet und der Reduktion von Phyllochinon zugeordnet [17, 21, 110]. Sowohl das Absorptionsspektrum als auch die identischen Zerfallszeiten deuten demnach darauf hin, dass im PS I von A. marina A_1 auch ein Phyllochinon ist. Konsistent damit ist auch der über die ESEEM-Messungen [157] bestimmte Abstand von (25.23 ± 0.05)Å zwischen den elektronischen Spins von P_{740}^+ und A_1^- in A. marina, der sehr dicht an dem Abstand zwischen P_{700}^+ und dem Phyllochinon PhQ⁻ in Chl *a*-bindendem PS I liegt [12].

Zusätzlich zum $(P_{740}^+A_1^- - P_{740}A_1)$ -Absorptionsspektrum wurde bei tiefen Temperaturen auch noch das Triplett-minus-Singulett-Differenzspektrum von P_{740} gemessen. Dazu werden Bedingungen gewählt, unter denen der sekundäre Akzeptor A_1 bereits reduziert vorliegt. Ublicherweise wird die Probe vor dem Einfrieren bei ungefähr 270 K in der Gegenwart von Dithionit und bei hohem pH belichtet. Wenn A_1 vorreduziert vorliegt, ist der Elekronentransfer dorthin blockiert und das primäre Radikalpaar $P^+A_0^-$ rekombiniert mit hoher Ausbeute unter Bildung des Triplettzustandes von P. Die sich bei 5K ergebenden blitzinduzierten Absorptionsdifferenzspekren für A. marina und zum Vergleich für T. elongatus sind in Abb. 3.46 dargestellt. Im PS I von A. marina (Abb. 3.46 blaue Kreise) befindet sich die sehr breite Hauptausbleichung um 738 nm und eine kleinere Ausbleichung bei 688 nm. Daneben liegt mit 712 nm als Mittelpunkt eine Bandenverschiebung. Die analoge Verschiebung tritt im PS I von T. elongatus um 685 nm herum auf (Abb. 3.46 rote Vierecke und [200]). Sie wird durch veränderte Exzitonenwechselwirkungen der untereinander gekoppelten Chlorophylle in dem Reaktionszentrum nach der Triplettbildung verursacht [200]. Allgemein sehen sich die beiden Differenzspektren bis auf die Rotverschiebung des A. marina-Spektrums sehr ähnlich. Auch in diesem Organismus wird also die Bildung und der Zerfall vom ³P beobachtet, nur dass der Triplettzustand auf einem Chl *d*-Molekül lokalisiert ist, mit großer Wahrscheinlichkeit auf P_{740} . Die Zerfallskinetik von ${}^{3}P_{740}$ ließ sich bei 5 K durch zwei Komponenten mit Halbwertszeiten von $170 \,\mu s$ (ca. 70%) und 1.4 ms (ca. 30%) beschreiben. Oberhalb von 50 K konnte der Zerfall mit einer mono-exponentiellen Funktion und $t_{1/2} \approx 200 \,\mu s$ angepasst werden. Dieses Verhalten ist nicht ungewöhnlich, da bei sehr tiefen Temperaturen der Übergang zwischen den einzelnen drei Spinunterzuständen langsam wird [13]. Im Vergleich zu der Zerfallskinetik von ${}^{3}P_{700}$ mit $t_{1/2} \approx 0.7 \,\mathrm{ms}$ (65%) und $7\,\mathrm{ms}$ (35%) [165] ist der Zerfall von $^3\mathrm{P}_{740}$ we sentlich schneller. Um zu untersuchen, ob es sich dabei um eine intrinsische Eigenschaft des Chl d handelt, wurden die Bildung und der Zerfall des Triplettzustandes von Chl d in Detergens-Micellen, wie für Chl a beschrieben, gemessen [72]. Die blitzinduzierten Absorptionsänderungen ergeben ein charakteristisches Triplett/Singulett-Differenzspektrum (siehe Anhang), was dem von Di Valentin *et al.* beschriebenen sehr ähnelt [35]. Der beobachtete Zerfall war in der Tat fünfmal schneller als für Chl a, was auf ein wesentlich schnelleres ISC³⁰ im Chl d hindeutet.

³⁰ISC, engl. *intersystem crossing*
Kapitel 4

Zusammenfassung

Photosystem I und II sind Pigment-Proteinkomplexe in Pflanzen, Algen und Cyanobakterien, die die oxygene Photosynthese katalysieren. Über diesen Prozess sind die photosynthetischen Organismen in der Lage, die Energie des Sonnenlichts zu nutzen, um daraus energiereiche chemische Verbindungen zu erzeugen. Dafür wird in beiden Photosystemen die Lichtanregungsenergie durch die Antennenchlorophylle und -carotine in die Reaktionszentren geleitet. Der nächste Schritt zur Umwandlung der Lichtenergie führt aus dem ersten angeregten Singulettzustand eines Chlorophyllmoleküls zu einer Ladungstrennung, die über eine Reihe von weiteren Elektronentransferschritten stabilisiert wird. Ziel dieser Arbeit war es, einen Teil der dabei auftretenden primären und sekundären Elektronentransferprozesse und die darin involvierten Kofaktoren spektroskopisch zu charakterisieren.

Im PS II ist der primäre Donator P₆₈₀ so stark oxidierend, dass er die Wasseroxidation bewirken kann. Zum Schutz des Reaktionszentrums vor dieser stark oxidierenden Wirkung können im PS II sekundäre Prozesse auftreten, die eine Reihe von Kofaktoren beinhalten. Dabei handelt es sich um Carotine (Car_{D2}, Car_{D1} und Car₁₅), Chlorophylle (Chl_{Z,D2} und Chl_{Z,D1}), das Cytochrom b_{559} und das redoxaktive Tyrosin Tyr_D. Die lichtinduzierten, sekundären Prozesse lassen sich gut bei tiefen Temperaturen (T < 180 K) untersuchen, da dort die primären Elektronentransferschritte vom Q_A⁻ zum Q_B und zwischen dem OEC und P₆₈₀ blockiert sind. Für die Charakterisierung der sekundären Donatoren standen eine Vielzahl von spektroskopischen Methoden zur Verfügung, über die sich die einzelnen Kofaktoren detektieren ließen.

Die Carotinoxidation konnte in der UV/Vis/NIR-Spektroskopie selektiv durch die Absorptionsbande des Car⁺ bei 1000 nm und durch charakteristische Banden im Ramanspektrum nachgewiesen werden. Lineardichroismusmessungen legten nahe, dass die positive Ladung hauptsächlich auf Car_{D2} lokalisiert ist. In der ESR-Spektroskopie zeigte sich die Cytochromoxidation durch ein Anwachsen der Signale bei $g_y \approx 2.18$ und $g_z \approx 3.05$, im Absorptionsdifferenzspektrum durch die Ausbleichung bei 557 nm. Die Bestimmung des Extinktionsdifferenzkoeffizienten ($\Delta \varepsilon = \varepsilon_{\rm red} - \varepsilon_{\rm ox}$) ergab einen Wert von 39 mM⁻¹cm⁻¹. Für die quantitative Abschätzung der Chlorophylloxidation wurde zum ersten Mal die Ausbleichung der Soretbande ausgewertet, die einen wesentlich direkteren Zugang zur Bildung von Chl_z⁺ liefert als die Abschätzung der Fläche unter den Banden in der Q_y-Region. Die Auswertung der Absorptionsdifferenzspektren und der ESR-Spektren führte zu dem Ergebnis, dass im PS II aus *T. elongatus* bei physiologischem pH mit Cyt b_{559}^{ox} durch Belichtung bei tiefen Temperaturen in so gut wie jedem Reaktionszentrum der langlebige Zustand Car⁺Q_A⁻ bzw. Chl_z⁺Q_A⁻ gebildet wird.

In Übereinstimmung damit steht die Messung der Temperaturabhängigkeit der Tyrz-Oxidation, für die über transiente Absorptionsdifferenzspektroskopie gezeigt wurde, dass sie bei tiefen Temperaturen nicht auftritt. In der Literatur wurden anhand von Tieftemperatur-ESR-Experimenten Ausbeuten der Tyrz-Oxidation von bis zu 50% der Reaktionszentren diskutiert. Im Gegensatz dazu zeigen die hier aufgeführten Experimente, der UV/Vis/NIR-, ESR- und der Blitzlichtspektroskopie konsistent, dass die Tyrz-Oxidation bei tiefen Temperaturen nur in einem kleinen Teil der Zentren eine Rolle spielen kann. Für die Tyr_D-Oxidation konnte hingegen selbst bei sehr tiefen Temperaturen gezeigt werden, dass sie im PS II bei alkalischem pH (p $K_a = 8.4$) im Großteil der Zentren auftritt. Die gefundene Temperaturabhängigkeit bzw. -unabhängigkeit konnte im Rahmen der Marcus-Theorie mit einem reinen Elektronentransfer erklärt werden, wenn der Protonentransfer nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Messungen, um dies zu klären, sind in Vorbereitung.

Einen interessanten Effekt der Belichtung bei tiefen Temperaturen zeigte sich in Absorptionsdifferenzspektren vom PS II aus Spinat. Während sich bei längerer Belichtung im PS II aus *T. elongatus* ein Gleichgewicht zwischen erzeugtem und zerfallendem Car⁺ einstellt und damit im Licht immer gleich viel Car⁺ vorhanden ist, nimmt im PS II aus Spinat das Signal der Carotinoxidation im Licht ab. Gleichzeitig steigt die Chlorophylloxidation an. Als möglicher Mechanismus wurde die Reduktion des Car⁺ durch das Chl_z in einem angeregten Singulettzustand diskutiert.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Untersuchung des Raman-Spektrums von β -Carotin, welches das Spektrum der Photosysteme bei einer Laser-Anregung im sichtbaren und im nahen Infrarot dominiert. In der Literatur wurde in den Raman-Spektren von PS II für die intensive Bande des β -Carotins bei ungefähr 1525 cm⁻¹ in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge des Lasers eine Verschiebung der Bande beobachtet. Dies wurde als selektive Anregung der beiden Carotinpools gedeutet. In einem kombinierten Ansatz von experimenteller Raman-Spektroskopie und quantenmechanischen Rechnungen konnte jedoch hier gezeigt werden, dass diese Zuordnung nicht so eindeutig ist. Die Verschiebung wurde auf eine intrinsische Eigenschaft des β -Carotins zurückgeführt, die auf der unterschiedlichen Resonanzverstärkung zwei dicht benachbarter Moden unter der $1525 \,\mathrm{cm}^{-1}$ -Bandenumhüllenden basiert. Als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ramananregungsprofile der beiden Moden wurde eine Mischung der Normalmoden unter der elektronischen Anregung diskutiert. Sowohl in den Messungen des Carotins in Lösung als auch in den unterschiedlichen Proteinumgebungen der Photosysteme I und II zeigte sich der gleiche Effekt. Dadurch wird nahegelegt, dass die scheinbare Verschiebung der Bande um $1525 \,\mathrm{cm}^{-1}$ nicht als Indiz für die selektive Anregung der beiden Carotinpools genommen werden sollte.

Neben den spektroskopischen Untersuchungen am PS II wurde auch das PS I aus dem Organismus A. marina untersucht, der als Hauptpigment nicht Chl a, sondern Chl d aufweist, welches eine wesentliche Rotverschiebung der Absorption zeigt. Die spektroskopische Untersuchung ergab, dass die Elektronenakzeptorseite im PS I aus A. marina sehr der im Chl a-bindenden PS I ähnelt. Die Spektren und die Kinetiken der Elektronentransferschritte sprechen dafür, dass die terminalen Eisen-Schwefelcluster identisch sind und dass es sich bei dem sekundären Elektronenakzeptor ebenfalls um ein Phyllochinon handelt. Für den primären Donator P_{740} wurde für das Mittelpunktspotential ein Wert von $(450 \pm 10) \text{ mV}$ festgestellt, der dem im Chl a-bindenden PS I sehr ähnlich ist. Der Extinktionsdifferenzkoeffizient für die Oxidation von P_{740} wurde ebenfalls ermittelt. Es ergab sich ein Wert von $(45 \pm 4) \,\mathrm{mM^{-1}cm^{-1}}$, mit dem das Verhältnis von P₇₄₀ zu Chl d in Thylakoidmembranen zu 1 : ≈ 200 bestimmt wurde. In den Absorptionsdifferenzspektren bei tiefen Temperaturen traten neben den Absorptionsänderungen über 700 nm vom Chl d auch Banden um 680 nm auf, die für das Vorhandensein eines Chl a-Moleküls im Reaktionszentrum vom PS I aus A. marina sprechen. Eine Abschätzung über die Reduktionspotentiale von Chl a und Chl d in Lösung und von P_{740}^* ergab, dass es energetisch eher ungünstig wäre, wenn A_0 ein Chl *a* ist, wie es in der Literatur vorgeschlagen wurde. Obwohl dies durch geeignete Protein-Kofaktorwechselwirkungen kompensiert werden könnte, wäre es energetisch günstiger, wenn eins der Chlorophylle eC_{A2} oder eC_{B2} ein Chl *a* ist.

Anhang A

Abkürzungsverzeichnis und verwendete Pufferlösungen

A_0	primärer Akzeptor im Photosystem I
A_1	sekundärer Akzeptor im Photosystem I
ADP	Adenosindiphosphat
AMPSO	N-(1,1-Dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropansulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat
β-DM	n -Dodecyl- β -D-Maltosid
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CAPSO	3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propansulfonsäure
Car	Carotin
cc	core complexes
CCD	charge coupled device
CFD	constant fraction discriminator
CFQ	clear fused quartz
Chl	Chlorophyll
Cyt	Cytochrom
DFT	Dichtefunktionaltheorie
ELDOR	electron-electron double resonance
ENDOR	electron-nuclear double resonance
ESEEM	electron spin echo envelop modulation
ESR	Elektronenspinresonanz
F_A, F_B, F_X	Eisen-Schwefelcluster im Photosystem I
Fd	Ferredoxin
FNR	Ferredoxin:NADP ⁺ -Reduktase

FPLC	fast protein liquid chromatography
FTIR	Fourier-Transformation-Infrarot
GTO	gaussian type orbital
HEPES	N-(2-Hydroxethyl)-piperazin- $N'-2$ -ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
IR	Infrarot
LD	Lineardichroismus
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MV	Methylviologen
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NIR	nahes Infrarot
OEC	oxygen evolving complex
OX	oxidiert
P_{680}	primärer Donator im Photosystem II
P_{700}	primärer Donator im Photosystem I
P_{740}	primärer Donator im Photosystem I aus A. marina
PC	Plastocyanin
PED	potential energy distribution
Pheo	Pheophytin
PIPES	Piperazin-N, N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMS	Phenazinmethosulfat
PQ	Plastochinon
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
Q	Chinon
QM	quantenmechanisch
red	reduziert
REP	Raman excitation profile
STO	slater type orbital
TAPS	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfonsäure
TDDFT	time dependent density functional theory
TMPD	N, N, N', N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin
UV	ultraviolett
Tyr	Tyrosin
Vis	visible

Puffer	pН
MES	6.5
PIPES	7.0
HEPES	7.5
Tricin	8.0
TAPS	8.5
AMPSO	9.0
CAPSO	9.5
CAPS	10

Anhang B

Appendix zu Kap. 3.1



Abbildung B.1 Absorptionsspektren vom PS II aus *T. elongatus* bei 77 K unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen. Schwarze Kurve mit Zugabe von Ferricyanid, grün mit Zugabe von Dithionit, blau mit Zugabe von Ascorbat und PMS im Dunkeln, rot mit Zugabe von Ascorbat und PMS nach Belichtung. Die Absorption bei Raumtemperatur betrug 2.2 bei 674 nm.



Abbildung B.2 Ramanspektrum von reinem Chl *a* gelöst in Hexan bei Raumtemperatur. Die Lösungsmittelbanden wurden abgezogen. Anregungswellenlänge des Laser 1064 nm.



Abbildung B.3 Aminosäuresequenzvergleich der D2-Einheiten vom PS II aus Spinat (UniProt-Eintrag P06005) und *T. elongatus* (UniProt-Eintrag Q8CM25) bestimmt durch CLUSTAL (Version 2.0.12).

Anhang C

Appendix zu Kap. 3.3



Abbildung C.1 DFT, *in vacuo* berechnetes Ramanspektrum von β -Carotin für eine optimierte Grundzustandsstruktur mit einer erzwungenen C_{2h} -Symmetrie.

Mode	e [cm ⁻¹]	I(IR)	I(Raman)	PED
1	2058.46	25 20	0.00	(05.74%) C U STDE (24.76)
1	2057.51	22 78	0.00	(95.14%) C-D 51RE (24,70)
2	2041.71	22.65	0.00	(23.14%) C-D 31RE (11,57) (2.20%) C-D 51RE (11,57)
3	2020.74	33.03	0.00	(0.28%) C-H SIKE (27,78); (91.88%) C-H SIKE (28,79) (41.20%) C-H SIKE (27,78); (91.88%) C-H SIKE (28,79)
4	2022.60	0.02	0.00	(41.1976) C-n SIKE $(19,72)$, (43.0976) C-n SIKE $(20,75)$, (3.0376) C-n SIKE $(53,55)$, (3.1076) C-n SIKE $(50,67)$
5	3032.09	0.02	0.00	(40.30%) C-H SIKE (19,72); (57.71%) C-H SIKE (20,73); (9.81%) C-H SIKE (53,83); (10.15%) C-H SIKE (50,87)
0	3031.28	37.80	0.00	(12.//%) C-H SIRE (7,54); (80.55%) C-H SIRE (8,55)
7	3026.29	19.74	0.00	(86.88%) C-H SIRE (27,78); (5.98%) C-H SIRE (28,79)
8	3021.09	15.60	0.00	(63.05%) C-H SIRE (7,54); (22.80%) C-H SIRE (12,59); (5.43%) C-H SIRE (15,67)
9	3017.82	30.27	0.00	(9.12%) C-H SIRE (7,54); (10.83%) C-H SIRE (8,55); (61.77%) C-H SIRE (12,59); (9.93%) C-H SIRE (15,67)
10	3017.64	3.41	0.00	(6.06%) C-H SIRE (20,73); (22.70%) C-H SIRE (35,83); (42.56%) C-H SIRE (36,87); (13.47%) C-H SIRE (37,90)
11	3017.41	6.01	0.00	(26.86%) C-H SIRE (37,90); (52.21%) C-H SIRE (38,42)
12	3017.3	28.81	0.00	(4/.3/%) C-H SIRE (3/,90); (35.2/%) C-H SIRE (38,42)
13	3016.65	5.55	0.00	(7.29%) C-H STRE (7,54); (39.64%) C-H STRE (15,67); (17.35%) C-H STRE (35,83); (14.36%) C-H STRE (36,87)
14	3016.48	2.64	0.00	(5.10%) C-H STRE (7,54); (33.33%) C-H STRE (15,67); (7.00%) C-H STRE (19,72); (27.83%) C-H STRE (35,83); (11.89%) C-H STRE (36,87)
15	3010.33	0.74	0.00	(26.78%) C-H STRE (16,70); (11.88%) C-H STRE (18,71); (15.21%) C-H STRE (21,74); (37.02%) C-H STRE (23,75)
16	3009.32	126.38	0.00	(41.52%) C-H STRE (16,70); (9.15%) C-H STRE (18,71); (5.95%) C-H STRE (21,74); (30.85%) C-H STRE (23,75)
17	3003.49	0.18	0.00	(12.56%) C-H STRE (10,56); (15.04%) C-H STRE (18,71); (30.23%) C-H STRE (21,74); (36.04%) C-H STRE (25,77)
18	3002.72	5.57	0.00	(42.54%) C-H STRE (10,56); (23.06%) C-H STRE (18,71); (5.61%) C-H STRE (21,74); (24.53%) C-H STRE (25,77)
19	3001.30	0.36	0.00	(18.48%) C-H STRE (10,56); (9.87%) C-H STRE (16,70); (5.25%) C-H STRE (18,71); (21.33%) C-H STRE (21,74); (20.52%) C-H STRE (23,75) (23.42%) C-H STRE (25,77)
20	3000.60	16.64	0.00	(16.04%) C-H STRE (10,56); (18.25%) C-H STRE (16,70); (32.08%) C-H STRE (18,71); (18.10%) C-H STRE (21,74); (7.89%) C-H STRE (23,75) (5.03%) C-H STRE (25,77)
21	2988.44	43.91	0.00	(7.44%) C-H STRE (13,61); (63.99%) C-H STRE (14,65); (19.58%) C-H STRE (14,66)
22	2987.33	56.45	0.00	(47.75%) C-H STRE (39,91); (40.52%) C-H STRE (39,92); (8.39%) C-H STRE (40,96)
23	2987.15	34.01	0.00	(58.72%) C-H STRE (13,61); (28.34%) C-H STRE (13,62); (9.07%) C-H STRE (14,65)
24	2983.39	34.40	0.00	(7.25%) C-H STRE (39,92); (30.07%) C-H STRE (40,95); (56.89%) C-H STRE (40,96)
25	2975.64	107.61	0.01	(17.98%) C-H STRE (39,91); (23.73%) C-H STRE (39,92); (36.32%) C-H STRE (39,93); (12.38%) C-H STRE (40,94); (8.21%) C-H STRE (40,95)
26	2974.66	151.67	0.01	(6.08%) C-H STRE (13,61); (26.51%) C-H STRE (13,62); (32.75%) C-H STRE (13,63); (14.98%) C-H STRE (14,64); (17.37%) C-H STRE (14,66)
27	2971.17	17.19	0.00	(7.83%) C-H STRE (39,91); (8.99%) C-H STRE (39,93); (47.46%) C-H STRE (40,94); (22.18%) C-H STRE (40,95); (8.89%) C-H STRE (40,96)
28	2970.46	9.68	0.00	(6.02%) C-H STRE (13,61); (11.38%) C-H STRE (13,62); (17.37%) C-H STRE (13,63); (26.36%) C-H STRE (14,64); (35.45%) C-H STRE (14,66)
29	2955.89	30.44	0.00	(44.71%) C-H STRE (36,85); (45.82%) C-H STRE (36,86)
30	2955.80	7.85	0.01	(45.33%) C-H STRE (35,82); (45.21%) C-H STRE (35,84)
31	2953.50	17.03	0.01	(44.49%) C-H STRE (37,88); (55.55%) C-H STRE (37,89)
32	2953.10	17.98	0.01	(55.60%) C-H STRE (15,68); (44.45%) C-H STRE (15,69)
33	2948.69	72.94	0.01	(43.79%) C-H STRE (32,46); (47.69%) C-H STRE (32,47)
34	2948.34	53.67	0.01	(5.56%) C-H STRE (2,48); (47.71%) C-H STRE (3,50); (41.49%) C-H STRE (3,51)
35	2933.01	95.15	0.01	(62.36%) C-H STRE (12,58); (25.98%) C-H STRE (12,60)
36	2932.73	105.35	0.01	(15.66%) C-H STRE (32,47); (63.39%) C-H STRE (33,80); (16.32%) C-H STRE (33,81)
37	2931.78	91.72	0.01	(15.75%) C-H STRE (2,48); (56.72%) C-H STRE (2,49); (17.22%) C-H STRE (3,51)
38	2929.44	44.56	0.01	(44.19%) C-H STRE (38,43); (55.59%) C-H STRE (38,44)
39	2917.26	67.14	0.01	(5.60%) C-H STRE (2,48); (9.34%) C-H STRE (2,49); (20.85%) C-H STRE (3,50); (20.92%) C-H STRE (3,51); (32.85%) C-H STRE (4,52)
40	2915.01	35.03	0.01	(6.35%) C-H STRE (31,41); (24.86%) C-H STRE (32,46); (17.18%) C-H STRE (32,47); (7.42%) C-H STRE (33,80); (5.80%) C-H STRE (33,81) (12.13%) C-H STRE (39,93); (7.45%) C-H STRE (40,94); (6.62%) C-H STRE (40,95)
41	2914.67	49.21	0.01	(10.33%) C-H STRE (13,61); (14.78%) C-H STRE (13,62); (23.13%) C-H STRE (13,63); (21.59%) C-H STRE (14,64); (9.60%) C-H STRE (14,65) (10.64%) C-H STRE (14,66)
42	2913.93	59.16	0.01	(15.20%) C-H STRE (32,46); (14.11%) C-H STRE (32,47); (5.82%) C-H STRE (39,93); (18.59%) C-H STRE (40,94); (18.72%) C-H STRE (40,95) (11.89%) C-H STRE (40,96)
43	2912.65	1.61	0.01	(17.18%) C-H STRE (35,82); (17.27%) C-H STRE (35,84); (28.89%) C-H STRE (36,85); (28.04%) C-H STRE (36,86); (5.20%) C-H STRE (36,87)
44	2912.35	94.17	0.00	(28.35%) C-H STRE (35,82); (5.25%) C-H STRE (35,83); (28.50%) C-H STRE (35,84); (17.54%) C-H STRE (36,85); (17.02%) C-H STRE (36,86)
45	2910.54	73.48	0.03	(50.51%) C-H STRE (37,88); (38.63%) C-H STRE (37,89); (8.02%) C-H STRE (37,90)
46	2910.06	49.62	0.01	(7.64%) C-H STRE (15,67); (36.78%) C-H STRE (15,68); (48.18%) C-H STRE (15,69)
47	2909.83	8.65	0.00	(9.64%) C-H STRE (13,61); (13.29%) C-H STRE (13,62); (22.90%) C-H STRE (13,63); (25.01%) C-H STRE (14,64); (9.47%) C-H STRE (14,65) (11.49%) C-H STRE (14,66)
48	2908.95	6.27	0.00	(14.82%) C-H STRE (39,91); (15.80%) C-H STRE (39,92); (35.39%) C-H STRE (39,93); (12.70%) C-H STRE (40,94); (10.76%) C-H STRE (40,95) (7.43%) C-H STRE (40,96)
49	2905.73	11.77	0.00	(26.33%) C-H STRE (3,50); (13.26%) C-H STRE (3,51); (50.62%) C-H STRE (4,52)
50	2897.60	33.95	0.01	(70.98%) C-H STRE (31,41); (8.75%) C-H STRE (32,46); (6.24%) C-H STRE (38,43); (5.57%) C-H STRE (38,44)
51	2892.13	36.28	0.01	(23.61%) C-H STRE (12,58); (5.27%) C-H STRE (12,59); (57.23%) C-H STRE (12,60)
52	2892.06	56.30	0.01	(8.83%) C-H STRE (31,41); (5.45%) C-H STRE (38,42); (42.79%) C-H STRE (38,43); (31.22%) C-H STRE (38,44)

Normalmodenanalyse von β -Carotin mit der Modenzusammensetzung, den relativen Ramanintensitäten, den IR-Intensitäten und den Wellenzahlen berechnet über DFT mit dem B3LYP-Funktional und dem 6-31G*-Basissatz.

53	2891.58	30.41	0.00	(66.57%) C-H STRE (2,48); (24.52%) C-H STRE (2,49)
54	2890.94	38.73	0.00	(22.61%) C-H STRE (33,80); (72.13%) C-H STRE (33,81)
55	2862.33	57.79	0.02	(7.45%) C-H STRE (31,41); (90.86%) C-H STRE (31,45)
56	2859.04	34.40	0.02	(94.62%) C-H STRE (4,53)
57	1633.51	6.25	0.07	(7.59%) C=C STRE (6, 5); (6.77%) C=C STRE (8, 7); (14.66%) C=C STRE (28,27); (25.90%) C=C STRE (30,29); (5.53%) seed XY, C28- H79 ROCK
58	1632.59	41.86	0.01	(25.29%) C=C STRE (6, 5); (16.69%) C=C STRE (8, 7); (5.23%) C=C STRE (28,27); (13.72%) C=C STRE (30,29); (6.04%) seed XY, C7- H94 ROCK
59	1624.85	0.68	0.52	(11.20%) C=C STRE (6, 5); (6.39%) C=C STRE (16,11); (8.77%) C=C STRE (20,19); (8.03%) C=C STRE (24,23); (9.30%) C=C STRE (30,29)
60	1618.85	1.54	0.01	(7.23%) C=C STRE (10, 9); (7.95%) C=C STRE (18,17); (7.50%) C=C STRE (22,21); (6.21%) C=C STRE (26,25)
61	1607.97	19.70	0.02	(9.21%) C=C STRE (6, 5); (5.73%) C=C STRE (8, 7); (9.59%) C=C STRE (18,17); (9.79%) C=C STRE (22,21); (6.79%) C=C STRE (28,27) (7.84%) C=C STRE (30,29)
62	1599.70	2.92	6.89	(9.02%) C=C STRE (6, 5); (13.79%) C=C STRE (8, 7); (5.01%) C=C STRE (20,19); (14.22%) C=C STRE (28,27); (7.37%) C=C STRE (30,29)
63	1589.63	0.04	3.90	(18.84%) C=C STRE (10, 9); (8.68%) C=C STRE (20,19); (18.37%) C=C STRE (26,25)
64	1576.53	71.55	0.03	(7.48%) C=C STRE (10, 9); (6.56%) C=C STRE (18,17); (6.38%) C=C STRE (22,21); (7.44%) C=C STRE (26,25)
65	1571.54	57.97	0.00	(11.76%) C=C STRE (10, 9); (13.09%) C=C STRE (16,11); (13.11%) C=C STRE (24,23); (12.59%) C=C STRE (26,25)
66	1535.07	0.76	100.00	(11.62%) C=C STRE (16,11); (20.28%) C=C STRE (20,19); (11.73%) C=C STRE (24,23); (5.19%) seed XY, C11-H57 ROCK; (9.44%) seed XY, C19-H72 ROCK; (9.51%) seed XY, C20-H73 ROCK; (5.27%) seed XY, C24-H76 ROCK
67	1527.99	0.11	47.28	(22.36%) C=C STRE (18,17); (22.66%) C=C STRE (22,21)
68	1492.27	1.28	0.03	(9.84%) ring sXY2, X= C2 SCIS; (72.36%) ring sXY2, X= C3 SCIS; (8.87%) ring sXY2, X= C4 SCIS
69	1491.80	2.46	0.03	(7.42%) ring sXY2, X= C31 SCIS; (76.12%) ring sXY2, X= C32 SCIS; (8.71%) ring sXY2, X= C33 SCIS
70	1485.33	6.05	0.01	(64.14%) ring sXY2, X= C2 SCIS; (5.09%) ring sXY2, X= C3 SCIS; (16.89%) prim XY3 , X= C14 ADEFb
71	1483.09	4.47	0.01	(5.28%) ring sXY2, X= C32 SCIS; (64.89%) ring sXY2, X= C33 SCIS; (14.60%) prim XY3 , X= C39 ADEFb; (5.33%) prim XY3 , X= C40 ADEFb
72	1475.63	7.79	0.07	(7.20%) ring sXY2, X= C32 SCIS; (12.60%) prim XY3 , X= C39 ADEFb; (53.50%) prim XY3 , X= C40 ADEFa; (10.56%) prim XY3 , X= C40 ADEFb
73	1473.35	4.98	0.02	(8.07%) ring sXY2, X= C2 SCIS; (6.72%) ring sXY2, X= C3 SCIS; (33.68%) prim XY3, X= C13 ADEFb; (37.20%) prim XY3, X= C14 ADEFa
74	1472.33	2.30	0.03	(6.83%) ring sXY2, X= C33 SCIS; (36.23%) prim XY3 , X= C39 ADEFa; (24.15%) prim XY3 , X= C40 ADEFa; (19.64%) prim XY3 , X= C40 ADEFb
75	1469.28	5.60	0.03	(6 63%) ring sXY2, X= C2 SCIS; (11.26%) ring sXY2, X= C4 SCIS; (42.30%) prim XY3 , X= C13 ADEFa; (5.39%) prim XY3 , X= C14 ADEFa (21.95%) prim XY3 , X= C14 ADEFb
76	1466.90	4.71	0.13	(9.52%) ring sXY2, X= C3 SCIS; (65.78%) ring sXY2, X= C4 SCIS; (5.57%) prim XY3 , X= C14 ADEFb
77	1465.08	16.21	0.02	(7 86%) prim XY3 , X= C15 ADEFa; (16.05%) ring sXY2, X= C31 SCIS; (20.38%) prim XY3 , X= C35 ADEFa; (19.53%) prim XY3 , X= C36 ADEFa (12.87%) prim XY3 , X= C37 ADEFa
78	1464.76	11.59	0.08	(55.03%) ring sXY2, X= C31 SCIS; (5.88%) ring sXY2, X= C33 SCIS; (6.68%) prim XY3 , X= C35 ADEFa; (6.69%) prim XY3 , X= C36 ADEFa (9.32%) prim XY3 , X= C38 ADEFb
79	1462.04	0.19	1.41	(16.60%) prim XY3 , X= C15 ADEFa; (8.43%) prim XY3 , X= C36 ADEFa; (55.88%) prim XY3 , X= C37 ADEFa
80	1461.51	1.13	0.19	(50.00%) prim XY3 , X= C15 ADEFa; (16.29%) prim XY3 , X= C35 ADEFa; (8.28%) prim XY3 , X= C36 ADEFa; (7.99%) prim XY3 , X= C37 ADEFa
81	1459.74	25.53	0.05	(10.93%) prim XY3 , X= C12 ADEFa; (77.48%) prim XY3 , X= C12 ADEFb; (6.28%) prim XY3 , X= C12 ROCKb
82	1457.60	1.25	0.00	(53.45%) prim XY3 , X= C39 ADEFb; (5.44%) prim XY3 , X= C40 ADEFa; (18.56%) prim XY3 , X= C40 ADEFb
83	1456.98	14.93	0.32	(6.61%) rng sXY2, X= C31 SCIS; (8.08%) prim XY3, X= C38 ADEFa; (65.12%) prim XY3, X= C38 ADEFb; (5.27%) prim XY3, X= C38 ROCKb
84	1455.02	4.39	9.54	(22.63%) prim X13, X= C33 ADEF8; (29.25%) prim X13, X= C38 ADEF8; (8.30%) prim X13, X= C38 ADEF8
05	1455.95	5.55	1.02	(5/.04%) print A15, A=C15 ADEra, (5.75%) print A15, A=C15 ADEr0, (50.72%) print A15, A=C14 ADEr0
80 97	1452.00	2.06	0.05	(70.0576) pinii A13, A= C36 ADEFa (74.246) mim XV2, X= C12 ADEFa, (0.556) mim XV2, X= C12 ADEFa
07	1453.00	1.56	0.93	(14.34%) prim X13, X= C12 ADEF4, $(3.53%)$ prim X13, X= C12 ADEF0 (22.75%) min XV3, X= C12 ADEF4, (42.6%) min XV3, X= C14 ADEF6
80	1452.80	8 24	0.02	(43,75,6) prim X13, X=C15 ADEr 6, $(43,02,6)$ prim X13, X=C14 ADEr a (34,046) prim XY3, X=C25 ADEFb; $(54,976)$ prim XY3, X=C36 ADEFb
90	1452.46	0.24	0.07	(55,00%) nrim X13, X=C35 ADEEb, $(34,57/3)$ prim X13, X=C36 ADEEb
91	1451.82	3.63	0.01	(49.01%) prim XY3, X= C39 ADEFa: (5.42%) prim XY3, X= C40 ADEFa: (31.64%) prim XY3, X= C40 ADEFh
92	1449.94	10.30	0.01	(88 11%) prim XY3 X= C37 ADEEb: (7 14%) prim XY3 X= C37 ROCKb
93	1449 70	8 98	0.00	(88,24%) prim XY3 X= C15 ADEEb; (7.11%) prim XY3 X= C15 ROCKb
94	1408 16	50.66	0.01	(9.07%) seed XY C10- H56 ROCK: (8.23%) seed XY C18- H71 ROCK: (6.22%) seed XY C21- H74 ROCK: (5.85%) seed XY C25- H77 ROCK
95	1403.47	0.76	0.93	(9.24%) seed XY, C10-H56 ROCK; (5.46%) seed XY, C21-H74 ROCK; (11.36%) seed XY, C25-H77 ROCK; (6.63%) prim XY3 , X=C36 SDEF (6.2%) mr XY3 , X=C73 SDEF
96	1395.89	1.39	0.04	(6.04%) seed XY, C10- H56 ROCK; (17.66%) prim XY3, X= C15 SDEF; (6.55%) seed XY, C18- H71 ROCK; (10.64%) prim XY3, X= C35 SDEF (10.03%) prim XY3, X= C37 SDEF
97	1395.30	0.11	0.72	(5.46%) prim XY3, X= C15 SDEF; (7.25%) seed XY, C21- H74 ROCK; (9.72%) prim XY3, X= C35 SDEF; (17.23%) prim XY3, X= C36 SDEF (15.36%) prim XY3, X= C37 SDEF
98	1389.53	4.36	0.03	(7.70%) ring sXY2, X= C2 WAGG; (43.86%) prim XY3, X= C13 SDEF; (39.00%) prim XY3, X= C14 SDEF
99	1387.57	3.75	0.05	(10.52%) ring sXY2, X= C33 WAGG; (42.11%) prim XY3 , X= C39 SDEF; (37.00%) prim XY3 , X= C40 SDEF
100	1379.49	7.81	0.00	(88.63%) prim XY3 , X= C12 SDEF
101	1379.17	1.06	0.00	(86.61%) prim XY3 , X= C38 SDEF
102	1376.89	76.83	0.00	(10.80%) prim XY3 , X= C15 SDEF; (29.68%) prim XY3 , X= C35 SDEF; (28.18%) prim XY3 , X= C36 SDEF; (9.66%) prim XY3 , X= C37 SDEF
103	1372.87	6.27	0.08	(8.82%) ring sXY2, X= C2 WAGG; (9.19%) ring sXY2, X= C3 WAGG; (19.27%) ring sXY2, X= C4 WAGG; (13.34%) prim XY3 , X= C15 SDEF (5.13%) prim XY3 , X= C36 SDEF; (9.62%) prim XY3 , X= C37 SDEF
104	1371.31	55.51	0.06	(6.62%) ring sXY2, X= C2 WAGG; (7.58%) ring sXY2, X= C3 WAGG; (10.69%) ring sXY2, X= C4 WAGG; (10.66%) ring sXY2, X= C31 WAGG (6.74%) prim XY3 , X= C35 SDEF; (13.15%) prim XY3 , X= C37 SDEF
105	1369.62	22.74	0.11	(11.97%) prim XY3 , X= C15 SDEF; (18.47%) ring sXY2, X= C31 WAGG; (6.96%) ring sXY2, X= C32 WAGG; (12.47%) ring sXY2, X= C33 WAGG (5.74%) prim XY3 , X= C36 SDEF; (5.92%) prim XY3 , X= C40 SDEF

106	1367.04	2.45	0.00	(6.27%) seed XY, C10- H56 ROCK; (15.73%) prim XY3 , X=C15 SDEF; (5.49%) seed XY, C18- H71 ROCK; (7.45%) seed XY, C25- H77 ROCK (6.37%) prim XY3 , X=C35 SDEF; (16.89%) prim XY3 , X=C37 SDEF
107	1366.16	3.16	0.00	(43.42%) prim XY3 , X= C13 SDEF; (46.51%) prim XY3 , X= C14 SDEF
108	1364.90	3.85	0.01	(11.14%) ring sXY2, X= C32 WAGG; (37.69%) prim XY3 , X= C39 SDEF; (35.82%) prim XY3 , X= C40 SDEF
109	1363.54	0.14	1.45	(9.38%) seed XY, C18- H71 ROCK; (10.64%) seed XY, C21- H74 ROCK; (15.11%) prim XY3 , X= C35 SDEF; (16.53%) prim XY3 , X= C36 SDEF
110	1362.04	2.37	0.24	(18.84%) ring sXY2, X= C31 WAGG; (14.23%) ring sXY2, X= C32 WAGG; (10.08%) ring sXY2, X= C32 TWIST; (10.41%) ring sXY2, X= C33 TWIST (7.13%) prim XY3 , X= C39 SDEF; (8.92%) prim XY3 , X= C40 SDEF
111	1359.78	7.83	0.13	(6.50%) C-C STRE (4, 3); (13.62%) ring sXY2, X= C2 TWIST; (23.48%) ring sXY2, X= C3 WAGG; (10.77%) ring sXY2, X= C3 TWIST; (24.30%) ring sXY2, X= C4 WAGG
112	1352.26	0.63	0.02	(46.84%) ring sXY2, X= C2 WAGG; (20.82%) ring sXY2, X= C3 WAGG; (8.90%) ring sXY2, X= C3 TWIST
113	1350.78	0.26	0.01	(5.23%) ring sXY2, X= C31 WAGG; (31.93%) ring sXY2, X= C32 WAGG; (6.38%) ring sXY2, X= C32 TWIST; (36.72%) ring sXY2, X= C33 WAGG (6.58%) prim XY3, X= C39 SDEF
114	1331.49	0.69	0.08	(5.58%) C=C STRE (16,11); (11.66%) seed XY, C16- H70 ROCK; (9.75%) seed XY, C23- H75 ROCK
115	1329.72	54.38	0.01	(6.14%) C=C STRE (28,27); (7.23%) seed XY, C16- H70 ROCK; (7.49%) seed XY, C23- H75 ROCK; (5.91%) seed XY, C27- H78 ROCK (5.30%) seed XY, C28- H79 ROCK
116	1323.76	1.55	1.22	(12.84%) C=C STRE (28,27); (41.40%) seed XY, C28-H79 ROCK
117	1321.06	0.56	0.75	(15.80%) C=C STRE (8, 7); (40.12%) seed XY, C7- H94 ROCK; (7.46%) seed XY, C8- H95 ROCK
118	1313.60	0.01	0.52	(11.56%) C=C STRE (20,19); (5.51%) seed XY, C7- H94 ROCK; (8.88%) seed XY, C19- H72 ROCK; (8.98%) seed XY, C20- H73 ROCK
119	1310.55	8.37	0.00	(9.61%) C=C STRE (16,11); (5.05%) C=C STRE (24,23); (10.61%) seed XY, C8- H95 ROCK; (10.21%) seed XY, C11- H57 ROCK (8.47%) seed XY, C16- H70 ROCK; (6.66%) seed XY, C24- H76 ROCK; (6.47%) seed XY, C27- H78 ROCK
120	1308.42	0.43	0.53	(8.91%) C=C STRE (24,23); (6.38%) seed XY, C19- H72 ROCK; (6.64%) seed XY, C20- H73 ROCK; (8.05%) seed XY, C23- H75 ROCK (8.68%) seed XY, C24- H76 ROCK; (9.69%) seed XY, C27- H78 ROCK
121	1298.99	19.49	0.00	(6.58%) C-C STRE (17,16); (6.78%) C-C STRE (23,22); (13.99%) seed XY, C19- H72 ROCK; (12.78%) seed XY, C20- H73 ROCK
122	1288.11	2.60	1.72	(17.68%) ring sXY2, X= C31 TWIST; (32.50%) ring sXY2, X= C33 TWIST
123	1286.39	1.97	0.53	(31.25%) ring sXY2, X= C2 TWIST; (19.42%) ring sXY2, X= C4 TWIST
124	1279.32	0.61	8.12	(5.00%) seed XY, C8- H95 ROCK; (17.62%) seed XY, C11- H57 ROCK; (18.05%) seed XY, C24- H76 ROCK; (5.80%) seed XY, C27- H78 ROCK
125	1277.72	6.85	0.00	(15.74%) seed XY, C11- H57 ROCK; (6.27%) seed XY, C16- H70 ROCK; (6.32%) seed XY, C19- H72 ROCK; (5.84%) seed XY, C20- H73 ROCK (6.61%) seed XY, C23- H75 ROCK; (14.46%) seed XY, C24- H76 ROCK
126	1266.16	8.80	0.05	(5.21%) C-C STRE (34,33); (12.35%) seed XY, C27- H78 ROCK; (11.29%) seed XY, C28- H79 ROCK; (10.91%) ring sXY2, X= C31 TWIST (7.78%) ring sXY2, X= C32 TWIST; (5.13%) ring sXY2, X= C33 WAGG; (7.41%) ring tXY2, X= C34 WAGG; (6.25%) prim XY3 , X= C40 ROCKb
127	1265.25	9.43	0.09	(5.20%) C-C STRE (2, 1); (7.29%) ring tXY2, X=C1 WAGG; (5.57%) ring sXY2, X=C2 WAGG; (9.35%) ring sXY2, X=C3 TWIST (9.81%) ring sXY2, X=C4 TWIST; (13.47%) seed XY, C7- H94 ROCK; (11.21%) seed XY, C8- H95 ROCK; (6.49%) prim XY3 , X=C13 ROCKb
128	1226.59	0.25	5.56	(5.98%) C-C STRE (11,10); (6.52%) C-C STRE (17,16); (8.67%) C=C STRE (20,19); (5.93%) C-C STRE (23,22); (5.38%) C-C STRE (25,24) (8.03%) seed XY, C10- H56 ROCK; (5.18%) seed XY, C18- H71 ROCK; (7.03%) seed XY, C25- H77 ROCK
129	1217.41	47.44	0.06	(5.26%) C-C STRE (2, 1); (7.77%) C-C STRE (14, 1); (5.57%) 6-membered ring BEND; (9.54%) ring sXY2, X= C2 ROCK (21.06%) ring sXY2, X= C4 TWIST; (13.97%) prim XY3, X= C13 ROCKa
130	1216.42	5.42	0.01	(5.78%), C-C_STRE (34,33); (9.34%), C-C_STRE (39,34); (22.69%) ring sXY2, X= C31 TWIST; (10.25%) ring sXY2, X= C33 ROCK (13.86%) prim XY3, X= C40 ROCKa
131	1210.68	6.87	0.18	(16.94%) ring sXY2, X= C3 TWIST; (6.04%) seed XY, C10- H56 ROCK; (5.93%) seed XY, C25- H77 ROCK
132	1209.40	11.41	0.01	(15.42%) ring sXY2, X= C3 TWIST; (5.79%) seed XY, C10- H56 ROCK; (5.98%) seed XY, C25- H77 ROCK
133	1207.86	2.02	0.03	(8.40%) C-C STRE (40,34); (6.60%) ring sXY2, X= C31 WAGG; (32.23%) ring sXY2, X= C32 TWIST; (6.30%) ring tXY2, X= C34 ROCK (6.26%) prim XY3 , X= C39 ROCKa; (6.07%) prim XY3 , X= C39 ROCKb
134	1205.19	7.03	0.17	(6.72%) C-C STRE (17,16); (5.97%) C-C STRE (23,22); (5.53%) seed XY, C16- H70 ROCK; (13.84%) seed XY, C18- H71 ROCK (10.70%) seed XY, C19- H72 ROCK; (11.04%) seed XY, C20- H73 ROCK; (12.59%) seed XY, C21- H74 ROCK
135	1198.16	0.23	42.76	(6.65%) C-C STRE (9, 8); (8.41%) C-C STRE (27,26); (5.42%) seed XY, C10- H56 ROCK; (6.48%) seed XY, C16- H70 ROCK; (8.22%) seed XY, C23- H75 ROCK; (7.20%) seed XY, C25- H77 ROCK
136	1187.63	1.26	0.12	(5.35%) C-C STRE (11,10); (19,40%) C-C STRE (19,18); (21.19%) C-C STRE (21,20); (6.25%) C-C STRE (25,24); (5.29%) seed XY, C11- H57 ROCK (5.29%) seed XY, C24- H76 ROCK
137	1180.84	2.46	0.25	(14.03%) C-C STRE (31,30); (18.44%) C-C STRE (38,30); (5.62%) 6-membered ring BEND; (6.93%) ring sXY2, X= C31 WAGG; (11.59%) prim XY3, X= C38 ROCKa
138	1179.79	2.28	0.04	(16.60%) C-C STRE (5, 4); (16.40%) C-C STRE (12, 5); (9.18%) ring sXY2, X= C4 WAGG; (5.38%) ring tXY C12- C5 ROCK (15.48%) prim XY3, X= C12 ROCKa
139	1177.36	34.50	9.27	(5.12%) C-C STRE (34,29); (5.57%) C-C STRE (40,34); (6.41%) 6-membered ring BEND; (6.90%) ring sXY2, X= C32 TWIST (7.97%) ring sXY2, X= C33 TWIST; (10.98%) prim XY3, X= C39 ROCKb
140	1173.75	10.32	7.72	(5.42%), C-C STRE (6, 1); (7.06%), C-C STRE (13, 1); (9.95%), 6-membered ring, BEND; (9.73%), ring sXY2, X= C2 TWIST (12.59%), prim XY3, X= C14 ROCKb
141	1168.13	0.44	66.66	(12.19%) C-C STRE (11,10); (13.87%) C-C STRE (19,18); (13.89%) C-C STRE (21,20); (11.32%) C-C STRE (25,24)
142	1154.75	0.94	0.02	(12.44%) C-C STRE (11,10); (10.03%) C-C STRE (19,18); (7.49%) C-C STRE (21,20); (11.82%) C-C STRE (25,24)
143	1150.81	1.21	3.70	(5.08%) C-C STRE (11,10); (6.82%) C-C STRE (19,18); (8.50%) C-C STRE (21,20); (7.27%) C-C STRE (25,24)
144	1134.73	16.08	0.23	(5.31%) C-C STRE (11,10); (8.04%) ring sXY2, X= C2 TWIST; (5.64%) ring sXY2, X= C3 ROCK; (8.67%) ring sXY2, X= C4 ROCK (13.68%) ring sXY2, X= C4 TWIST; (9.29%) prim XY3 , X= C13 ROCKa
145	1133.81	1.16	0.11	(5.05%), C-C STRE (29,28); (7.33%) ring sXY2, X=C31 ROCK; (14.81%) ring sXY2, X=C31 TWIST; (9.66%) ring sXY2, X=C33 TWIST (5.47%) prim XY3, X=C38 ROCKb; (9.55%) prim XY3, X=C40 ROCKa
146	1123.15	7.28	0.04	(5.47%) C-C STRE (25,24); (15.61%) C-C STRE (29,28); (8.13%) ring sXY2, X= C31 ROCK; (6.46%) ring sXY2, X= C33 ROCK; (5.42%) prim XY3, X= C38 ROCKa
147	1122.12	1.04	0.05	(17.51%) C-C STRE (7,6); (5.92%) C-C STRE (11,10); (5.69%) 6-membered ring BEND; (5.62%) ring sXY2, X= C4 ROCK
148	1060.71	5.24	0.02	(11.72%) C-C STRE (3, 2); (7.66%) C-C STRE (4, 3); (5.55%) ring sXY2, X= C2 TWIST; (7.30%) ring sXY2, X= C3 WAGG (22.21%) prim XY3, X= C12 ROCKb; (8.56%) prim XY3, X= C13 ROCKb
149	1054.44	5.23	0.04	(5.19%) C-C: S1RE (32,31); (10.0%) C-C: STRE (33,32); (6.6%) ring aXY2, X= C32 WAGG; (6.68%) ring aXY2, X= C33 TWIST (20.38%) prim XY3 , X= C38 ROCKb; (5.69%) prim XY3 , X= C40 ROCKa; (6.63%) prim XY3 , X= C40 ROCKb
150	1048.66	3.52	0.03	(5.14%) C-C STRE (32,31); (13.26%) prim XY3 , X= C15 ROCKb; (7.01%) prim XY3 , X= C35 ROCKb; (8.84%) prim XY3 , X= C36 ROCKb (26.94%) prim XY3 , X= C37 ROCKb

151	1048.26	2.33	0.06	(5.38%) C-C STRE (32,31); (39.16%) prim XY3 , X=C15 ROCKb; (9.58%) prim XY3 , X=C35 ROCKb; (6.50%) prim XY3 , X=C37 ROCKb
152	1047.58	1.73	0.05	(9.42%) C-C STRE (32,31); (5.37%) C-C STRE (33,32); (5.91%) prim XY3 , X= C15 ROCKb; (9.42%) prim XY3 , X= C36 ROCKb (22.80%) prim XY3 , X= C37 ROCKb; (7.14%) prim XY3 , X= C38 ROCKb
153	1046.51	3.27	0.00	(9.79%) C-C STRE (3, 2); (19.56%) C-C STRE (4, 3); (5.57%) ring sXY2, X= C3 WAGG; (8.18%) prim XY3 , X= C12 ROCKa (6.16%) prim XY3 , X= C13 ROCKa
154	1046.00	0.31	0.02	(13.06%) prim XY3 , X= C15 ROCKb; (27.43%) prim XY3 , X= C35 ROCKb; (20.72%) prim XY3 , X= C36 ROCKb; (14.20%) prim XY3 , X= C37 ROCKb
155	1044.65	0.01	0.00	(32.15%) prim XY3 , X= C35 ROCKb; (37.33%) prim XY3 , X= C36 ROCKb; (5.68%) prim XY3 , X= C37 ROCKb
156	1035.03	0.38	0.38	(25.84%) prim XY3 , X= C15 ROCKa; (16.30%) prim XY3 , X= C35 ROCKa; (6.55%) prim XY3 , X= C36 ROCKa; (10.40%) prim XY3 , X= C37 ROCKa
157	1034.80	1.06	0.02	(9.67%) prim XY3 , X= C15 ROCKa; (5.75%) prim XY3 , X= C35 ROCKa; (15.86%) prim XY3 , X= C36 ROCKa; (26.46%) prim XY3 , X= C37 ROCKa
158	1018.06	11.98	3.90	(15.32%) prim XY3 , X= C12 ROCKb; (10.03%) prim XY3 , X= C13 ROCKb; (8.71%) prim XY3 , X= C14 ROCKa; (7.78%) prim XY3 , X= C14 ROCKb (16.13%) prim XY3 , X= C35 ROCKa
159	1017.48	11.01	3.55	(7.58%) C-C STRE (34,29); (10.88%) C-C STRE (38,30); (7.53%) prim XY3 , X= C36 ROCKa; (5.85%) prim XY3 , X= C38 ROCKa (5.05%) prim XY3 , X= C39 ROCKa; (11.90%) prim XY3 , X= C39 ROCKb
160	1016.63	14.23	5.44	(17.21%) prim XY3 , X= C36 ROCKa; (13.55%) prim XY3 , X= C38 ROCKb; (11.14%) prim XY3 , X= C39 ROCKa; (18.68%) prim XY3 , X= C40 ROCKb
161	1014.44	16.50	6.95	(14.01%) prim XY3 , X= C12 ROCKb; (13.30%) prim XY3 , X= C13 ROCKb; (8.15%) prim XY3 , X= C15 ROCKa; (14.14%) prim XY3 , X= C35 ROCKa
162	1007.97	31.24	7.22	(15.06%) prim XY3 , X= C36 ROCKa; (14.92%) prim XY3 , X= C37 ROCKa; (7.41%) prim XY3 , X= C40 ROCKb
163	1006.53	33.49	6.70	(5.85%) C-C STRE (12, 5); (6.27%) seed XY; C7- H94 OUT; (5.83%) seed XY; C8- H95 OUT; (5.81%) prim XY3 , X= C12 ROCKa (5.62%) prim XY3 , X= C14 ROCKb; (11.80%) prim XY3 , X= C15 ROCKa; (9.69%) prim XY3 , X= C35 ROCKa; (5.09%) torsion C8- C7 TORS
164	1000.52	55.73	3.70	(16.45%) seed XY, C8- H95 OUT; (10.80%) torsion C8- C7 TORS
165	998.81	57.29	0.26	(8.66%) seed XY, C23- H75 OUT; (10.68%) seed XY, C27- H78 OUT; (8.16%) torsion C20- C19 TORS; (5.91%) torsion C24- C23 TORS (6.00%) torsion C28- C27 TORS
166	995.64	0.43	0.93	(19.97%) seed XY, C27- H78 OUT; (7.40%) torsion C20- C19 TORS; (13.35%) torsion C28- C27 TORS
167	992.07	4.81	1.01	(7.17%) seed XY, C8- H95 OUT; (9.59%) prim XY3 , X= C12 ROCKb; (5.31%) prim XY3 , X= C13 ROCKa; (11.85%) prim XY3 , X= C14 ROCKa
168	988.05	0.52	0.11	(7.25%) ring sXY2, X= C31 ROCK; (12.42%) ring sXY2, X= C32 ROCK; (5.77%) ring sXY2, X= C33 ROCK; (14.33%) prim XY3 , X= C38 ROCKb (14.34%) prim XY3 , X= C39 ROCKa; (7.64%) prim XY3 , X= C40 ROCKa; (10.79%) prim XY3 , X= C40 ROCKb
169	985.66	1.22	0.03	(5.60%) seed XY, C8- H95 OUT; (5.68%) seed XY, C11- H57 OUT; (12.35%) seed XY, C16- H70 OUT; (9.33%) seed XY, C23- H75 OUT (6.66%) torsion C8- C7 TORS; (10.73%) torsion C16- C11 TORS; (7.79%) torsion C24- C23 TORS; (5.56%) torsion C28- C27 TORS
170	982.22	1.38	0.59	(6.64%) seed XY, C16-H70 OUT; (10.49%) seed XY, C23-H75 OUT; (6.95%) seed XY, C24-H76 OUT; (8.15%) torsion C16-C11 TORS (6.55%) torsion C20-C19 TORS; (12.03%) torsion C24-C23 TORS
171	973.99	10.63	0.36	(6.60%) C-C STRE (31,30); (10.37%) C-C STRE (33,32); (6.51%) C-C STRE (34,33); (12.69%) ring sXY2, X= C32 ROCK (14.71%) prim XY3 , X= C38 ROCKa; (7.78%) prim XY3 , X= C40 ROCKb
172	968.24	11.00	0.33	(7.94%) C-C STRE (2, 1); (6.37%) C-C STRE (3, 2); (18.25%) ring sXY2, X= C3 ROCK; (14.99%) prim XY3 , X= C12 ROCKa (9.74%) prim XY3 , X= C13 ROCKb; (6.11%) prim XY3 , X= C14 ROCKb
173	928.50	0.46	0.01	(26.44%) seed XY, C18- H71 OUT; (26.02%) seed XY, C21- H74 OUT
174	924.39	0.45	0.01	(21.05%) C-C STRE (32,31); (11.54%) C-C STRE (34,33); (7.28%) C-C STRE (38,30); (8.10%) C-C STRE (39,34); (6.75%) C-C STRE (40,34) (5.61%) prim XY3 , X=C38 ROCKa; (6.31%) prim XY3 , X=C39 ROCKa
175	923.64	0.05	0.01	(9,71%) C-C STRE (2, 1); (1541%) C-C STRE (4, 3); (5.93%) C-C STRE (12, 5); (19.49%) C-C STRE (13, 1); (5.15%) prim XY3 , X= C12 ROCKa (13.06%) prim XY3 , X= C14 ROCKb
176	918.99	0.33	0.54	(7.52%) seed XY, C7- H94 OUT; (34.00%) seed XY, C10- H56 OUT; (8.09%) seed XY, C11- H57 OUT; (11.13%) seed XY, C25- H77 OUT (5.63%) torsion C10- C9 TORS
177	918.48	0.32	0.01	(13.97%) C-C STRE (39,34); (21.82%) C-C STRE (40,34); (5.63%) prim XY3 , X= C39 ROCKa; (23.71%) prim XY3 , X= C39 ROCKb (22.47%) prim XY3 , X= C40 ROCKa
178	917.08	3.26	0.09	(7.62%) seed XY, C10- H56 OUT; (5.44%) seed XY, C11- H57 OUT; (12.40%) seed XY, C24- H76 OUT; (32.03%) seed XY, C25- H77 OUT (6.23%) seed XY, C28- H79 OUT
179	916.46	0.70	0.06	(7.03%) C-C STRE (4, 3); (7.53%) C-C STRE (13, 1); (23.48%) C-C STRE (14, 1); (25.33%) prim XY3 , X= C13 ROCKa (9.84%) prim XY3 , X= C14 ROCKb
180	908.14	0.05	0.00	(9.68%) seed XY, C11-H57 OUT; (19.90%) seed XY, C18-H71 OUT; (8.77%) seed XY, C19-H72 OUT; (8.89%) seed XY, C20-H73 OUT (20.14%) seed XY, C21-H74 OUT; (9.79%) seed XY, C24-H76 OUT
181	895.52	15.16	0.00	(5.26%) C-C STRE (34,29); (8.06%) C-C STRE (38,30); (5.27%) 6-membered ring BEND; (5.30%) seed XY, C28-H79 OUT (13.68%) ring sXY2, X= C33 ROCK; (6.39%) prim XY3, X= C38 ROCKa
182	895.21	20.94	0.01	(6.24%) C-C STRE (6, 1); (7.93%) C-C STRE (12, 5); (5.51%) 6-membered ring BEND; (17.47%) ring sXY2, X= C2 ROCK (5.54%) skel, C6 C8 C7 BEND; (8.01%) prim XY3 , X= C12 ROCKa
183	881.34	0.11	0.01	(7.12%) seed XY, C11-H57 OUT; (6.27%) seed XY, C16-H70 OUT; (32.14%) seed XY, C19-H72 OUT; (31.31%) seed XY, C20-H73 OUT (5.74%) seed XY, C23-H75 OUT; (6.04%) seed XY, C24-H76 OUT
184	872.65	10.00	0.11	(21.13%) C-C STRE (3, 2); (9.21%) C-C STRE (4, 3); (7.63%) C-C STRE (13, 1); (5.25%) C-C STRE (14, 1); (16.85%) ring sXY2, X= C4 ROCK (6.41%) seed XY, C7- H94 OUT
185	870.19	1.19	0.12	(8.93%) C-C STRE (32,31); (14.36%) C-C STRE (33,32); (8.25%) C-C STRE (37,26); (6.77%) ring sXY2, X= C31 ROCK
186	868.55	4.77	0.11	(7.07%) C-C STRE (15, 9); (14.06%) seed XY, C7- H94 OUT; (9.13%) seed XY, C8- H95 OUT; (5.76%) seed XY, C11- H57 OUT
187	863.65	2.92	0.02	(5.59%) C-C STRE (39,54); (5.69%) seed XY, C19-H/2 OUT; (5.68%) seed XY, C21-H/4 OUT; (9.44%) seed XY, C23-H/5 OUT (11.27%) seed XY, C24-H76 OUT; (7.34%) seed XY, C27-H78 OUT; (13.53%) seed XY, C28-H79 OUT
188	860.60	1.50	0.31	(5.03%) C-C STRE (15, 9); (16.27%) C-C STRE (35,17); (15.37%) C-C STRE (36,22); (5.60%) seed XY, C16- H70 OUT
189	854.35	2.07	0.42	(5.46%) C-C STRE (36,22); (12.24%) seed XY, C11-H57 OUT; (18.83%) seed XY, C16-H70 OUT; (7.35%) seed XY, C18-H71 OUT (5.17%) seed XY, C20-H73 OUT
190	852.42	6.22	0.46	(6.95%) C-C STRE (35,17); (5.17%) seed XY, C21- H74 OUT; (14.20%) seed XY, C23- H75 OUT; (8.13%) seed XY, C24- H76 OUT (6.03%) seed XY, C27- H78 OUT; (10.13%) seed XY, C28- H79 OUT
191	846.09	1.10	0.02	(5.91%) ring sXY2, X= C2 ROCK; (6.19%) ring sXY2, X= C4 ROCK; (13.54%) ring sXY2, X= C31 ROCK; (12.15%) ring sXY2, X= C33 ROCK
192	845.38	1.09	0.00	(11.34%) ring sXY2, X= C2 ROCK; (14.35%) ring sXY2, X= C4 ROCK; (16.71%) ring sXY2, X= C31 ROCK; (10.22%) ring sXY2, X= C33 ROCK
193	842.76	4.46	0.02	(8.93%) C-C STRE (35,17); (9.57%) C-C STRE (36,22); (7.06%) ring sXY2, X=C4 ROCK
194	820.15	0.07	0.03	(16.08%) C-C STRE (15, 9); (5.64%) C-C STRE (35,17); (7.02%) C-C STRE (36,22); (16.94%) C-C STRE (37,26)
195	809.64	1.78	0.00	(10.54%) C-C STRE (15, 9); (17.99%) C-C STRE (35,17); (17.11%) C-C STRE (36,22); (9.01%) C-C STRE (37,26)

196	780.01	4.22	0.13	(9.74%) C-C STRE (31,30); (15.57%) C-C STRE (34,33); (6.96%) C-C STRE (38,30); (16.57%) C-C STRE (39,34); (8.41%) C-C STRE (40,34)
197	777.25	3.97	0.14	(15.43%) C-C STRE (2, 1); (10.81%) C-C STRE (5, 4); (7.40%) C-C STRE (12, 5); (8.92%) C-C STRE (13, 1); (16.02%) C-C STRE (14, 1)
198	729.21	7.72	0.01	(5.75%) C-C STRE (2, 1); (10.59%) C-C STRE (5, 4); (7.49%) C-C STRE (14, 1); (10.44%) ring sXY2, X= C3 ROCK; (6.60%) ring tXY C7-C6 WAGG (7.75%) skel, C6 C8 C7 BEND; (5.31%) skel, C7 C9 C8 BEND
199	723.32	5.20	0.01	(11.91%) C-C STRE (31,30); (7.65%) C-C STRE (34,33); (7.45%) skel, C26 C28 C27 BEND; (8.56%) skel, C27 C29 C28 BEND (10.98%) ring sXY2, X= C32 ROCK
200	663.76	0.85	0.01	(7.35%) skel, C17 C19 C18 BEND; (7.79%) skel, C20 C22 C21 BEND; (5.31%) skel, C22 C24 C23 BEND; (14.09%) ring tXY C28- C29 WAGG
201	659.04	6.56	0.03	(5.50%) skel, C17 C19 C18 BEND; (14.57%) ring tXY C28- C29 WAGG; (5.17%) ring tXY2, X= C34 ROCK
202	641.89	8.46	0.01	(16.31%) ring tXY C7- C6 WAGG; (5.50%) tert XY3 , X= C22 ADEFa; (7.22%) skel, C22 C24 C23 BEND
203	630.39	2.42	0.00	(12.78%) ring tXY C7- C6 WAGG; (5.59%) skel, C9 C11 C10 BEND; (9.56%) skel, C11 C17 C16 BEND; (7.45%) tert XY3 , X= C17 ADEFa (5.85%) skel, C22 C24 C23 BEND
204	604.62	0.99	0.00	(7.78%) tert XY3 , X= C9 ADEFb; (14.36%) skel, C9 C11 C10 BEND; (5.94%) skel, C22 C24 C23 BEND; (6.31%) skel, C24 C26 C25 BEND
205	595.43	0.28	0.03	(6.01%) tert XY3 , X= C22 ADEFb; (10.45%) skel, C24 C26 C25 BEND; (6.93%) tert XY3 , X= C26 ADEFa
206	567.50	7.90	0.04	(10.53%) C-C STRE (6, 1); (11.15%) C-C STRE (12, 5); (9.66%) C-C STRE (13, 1); (24.76%) 6-membered ring BEND; (5.83%) ring sXY2, X= C2 ROCK; (5.47%) ring sXY2, X= C3 ROCK
207	566.73	2.85	0.01	(9.98%) C-C STRE (34,29); (11.33%) C-C STRE (38,30); (8.50%) C-C STRE (40,34); (24.74%) 6-membered ring BEND; (5.08%) ring sXY2, X= C32 ROCK; (6.14%) ring sXY2, X= C33 ROCK
208	538.01	3.18	0.00	(6.52%) t-planXY3umbr C9 SOUT; (5.24%) t-planXY3umbr C17 SOUT; (7.58%) t-planXY3umbr C22 SOUT; (11.96%) t-planXY3umbr C26 SOUT (6.32%) ring tXY C28- C29 ROCK
209	534.58	0.04	0.00	(11.89%) t-planXY3umbr C9 SOUT; (6.63%) t-planXY3umbr C17 SOUT; (5.87%) t-planXY3umbr C22 SOUT; (10.96%) t-planXY3umbr C26 SOUT
210	530.65	3.34	0.00	(19.76%) t-planXY3umbr C17 SOUT; (14.61%) t-planXY3umbr C22 SOUT
211	525.91	0.56	0.21	(9.52%) t-planXY3umbr C17 SOUT; (9.25%) tert XY3, X=C17 ADEFb; (6.30%) skel, C18 C20 C19 BEND; (5.88%) skel, C19 C21 C20 BEND (9.15%) t-planXY3umbr C22 SOUT; (8.23%) tert XY3, X= C22 ADEFb
212	522.53	1.19	0.25	(7.23%) t-planXY3umbr C17 SOUT; (6.93%) tert XY3 , X= C17 ADEFb; (15.11%) t-planXY3umbr C22 SOUT
213	519.50	1.36	0.09	(6.54%) t-planXY3umbr C9 SOUT; (5.05%) t-planXY3umbr C17 SOUT
214	492.47	3.10	0.23	(5.65%) 6-membered ring BEND; (6.77%) ring tXY2, X= C1 ROCK; (29.25%) t-planXY3umbr C9 SOUT; (5.03%) tert XY3, X= C9 ADEFa
215	489.15	0.33	0.06	(7.76%) 6-membered ring BEND; (8.69%) 6-membered ring BEND; (14.84%) t-planXY3umbr C26 SOUT; (5.94%) tert XY3 , X= C26 ADEFb
216	479.44	0.40	0.11	(13.73%) 6-membered ring BEND; (8.08%) 6-membered ring BEND; (5.49%) 6-membered ring BEND; (9.78%) t-planXY3umbr C26 SOUT (7.03%) ring tXY2, X=C34 WAGG
217	474.09	6.45	0.01	(10.94%) 6-membered ring BEND; (12.29%) 6-membered ring BEND; (8.63%) 6-membered ring BEND; (5.09%) ring tXY2, X= C1 SCIS (5.09%) tert XY3, X= C9 ADEFa
218	470.94	1.84	0.07	(5.47%) C-C STRE (40,34); (5.12%) 6-membered ring BEND; (21.59%) 6-membered ring BEND; (5.31%) tert XY3, X= C26 ADEFa; (5.49%) ring tXY2, X= C34 SCIS; (8.11%) ring tXY2, X= C34 ROCK
219	446.99	0.27	0.01	(5.52%) 6-membered ring BEND; (4.17%) tert XY3, X= C9 ADEPb; (15.66%) tert XY3, X= C1 / ADEPa; (10.01%) tert XY3, X= C22 ADEPa (9.95%) tert XY3, X= C26 ADEPb (11.10%) 6-membered ring BEND; (6.87%) ring tVV2, Y= C1 WAGG; (15.70%) ring tVV C12, C5 BOCK; (6.81%) ring tVV C12, C5 WAGG.
220	432.89	0.67	0.00	(11:57/0) Unication C18-C17 TORS; (5.64%) Iorsion C20-C19 TORS; (5.49%) Iorsion C22-C21 TORS (13:84%) rine tXY C12-C5 ROCK: (9.56%) Iorsion C18-C17 TORS; (14:78%) Iorsion C20-C21 TORS
222	421.78	0.57	0.05	(5.05%) C-C_STRE (34.33): (12.91%) 6-membered ring. REND: (10.25%) ring (XX C38, C30 ROCK: (10.43%) ring (XX C38, C30 WAGG
223	412.13	3.89	0.18	(32.10%) ring tXY2, X = C1 SCIS: (15.32%) ring tXY2, X = C1 ROCK: (12.68%) ring tXY2, X = C1 WAGG: (42.99%) ring tXY2 (12- C5 WAGG
224	402.98	5.41	0.24	(15.42%) 6-membered ring BEND; (45.44%) ring tXY C38- C30 WAGG; (14.49%) ring tXY2, X= C34 ROCK
225	394.79	1.06	0.00	(15.28%) tert XY3, X= C17 ADEFb; (6.50%) skel, C17 C19 C18 BEND; (6.09%) skel, C18 C20 C19 BEND; (6.06%) skel, C19 C21 C20 BEND (16.81%) skel, C20 C22 C21 BEND; (15.25%) tert XY3, X= C22 ADEFb
226	384.78	1.09	0.12	(5.56%) C-C STRE (6, 1); (19.66%) 6-membered ring BEND; (6.87%) 6-membered ring TORS; (12.42%) ring tXY2, X= C1 ROCK (6.13%) ring tXY2, X= C1 WAGG; (17.41%) ring tXY C12- C5 ROCK
227	374.81	0.95	0.01	(9.76%) 6-membered ring TORS; (5.09%) ring tXY C28- C29 ROCK; (23.90%) ring tXY C38- C30 ROCK; (7.65%) ring tXY2, X= C34 TWIST (5.37%) torsion C26- C25 TORS
228	371.34	0.54	0.09	(7.54%) tert XY3 , X= C9 ADEFb; (5.87%) skel, C10 C16 C11 BEND; (5.83%) skel, C18 C20 C19 BEND
229	367.02	0.60	0.01	(5.33%) 6-membered ring TORS; (5.87%) ring tXY C12- C5 ROCK; (10.78%) ring tXY C7- C6 ROCK; (12.87%) ring tXY C38- C30 ROCK (7.01%) torsion C10- C9 TORS
230	366.10	1.31	0.00	(9.12%) tert XY3 , X= C22 ADEFa; (5.86%) skel, C23 C25 C24 BEND; (6.64%) tert XY3 , X= C26 ADEFb; (6.75%) ring tXY C38- C30 ROCK (5.25%) ring tXY C38- C30 WAGG; (5.96%) ring tXY2, X= C34 ROCK; (9.44%) ring tXY2, X= C34 TWIST
231	355.81	0.19	0.03	(11.30%) tert XY3 , X= C26 ADEFa; (8.56%) ring tXY C28- C29 ROCK; (11.15%) ring tXY2, X= C34 SCIS; (14.13%) ring tXY2, X= C34 WAGG
232	347.90	5.52	0.03	(5.82%) ring tXY C7- C6 ROCK; (5.86%) tert XY3 , X= C17 ADEFa; (5.55%) torsion C9- C8 TORS; (5.82%) torsion C26- C25 TORS
233	340.91	0.39	0.23	(5.52%) 6-membered ring BEND; (9.87%) ring tXY2, X= C1 SCIS; (8.94%) ring tXY2, X= C1 TWIST; (9.27%) torsion C26-C25 TORS
234	332.04	0.74	0.42	(12.59%) ring tXY2, X= C1 SCIS; (5.75%) ring tXY2, X= C1 TWIST; (5.75%) torsion C9- C8 TORS; (10.86%) torsion C10- C9 TORS
235	315.73	0.08	0.15	(18.63%) ring tXY2, X= C1 SCIS; (13.84%) ring tXY2, X= C1 TWIST; (20.11%) ring tXY2, X= C34 SCIS
236	314.73	0.20	0.07	(10.30%) ring tXY2, X= C1 SCIS; (16.50%) ring tXY2, X= C1 TWIST; (22.59%) ring tXY2, X= C34 SCIS
237	308.18	0.47	0.67	(6.13%) ring tXY2, X= C1 SCIS; (5.01%) ring tXY2, X= C1 WAGG; (5.50%) ring tXY C7- C6 WAGG; (7.67%) skel, C6 C8 C7 BEND (5.32%) skel, C11 C17 C16 BEND; (9.34%) tert XY3, X= C17 ADEFa
238	292.17	0.57	0.95	(5.38%) ring tXY C28- C29 ROCK; (5.57%) ring tXY C28- C29 WAGG; (5.37%) ring tXY2, X= C34 SCIS; (7.95%) ring tXY2, X= C34 TWIST (6.84%) torsion C17- C16 TORS; (5.27%) torsion C18- C17 TORS; (5.34%) torsion C27- C26 TORS; (5.17%) torsion C39- C34 TORS
239	287.49	0.10	0.30	(11.95%) torsion C17- C16 TORS; (8.52%) torsion C18- C17 TORS; (8.70%) torsion C22- C21 TORS; (15.96%) torsion C23- C22 TORS (7.44%) torsion C26- C25 TORS; (5.24%) torsion C27- C26 TORS
240	272.97	0.55	0.01	(66.02%) torsion C40-C34 TORS
241	271.34	0.80	0.00	(7.71%) tert XY3, X= C9 ADEFa; (9.21%) skel, C9 C11 C10 BEND; (6.21%) tert XY3, X= C17 ADEFb; (10.23%) skel, C24 C26 C25 BEND; (5.60%) tert XY3, X= C26 ADEFa; (5.58%) tert XY3, X= C26 ADEFb; (10.36%) torsion C40-C34 TORS
242	268.21	0.16	0.04	(61.98%) torsion C13- C1 TORS; (19.37%) torsion C14- C1 TORS
243	259.45	0.39	0.02	(6.10%) 6-membered ring TORS; (30.03%) 6-membered ring TORS; (7.23%) ring tXY2, X= C1 ROCK; (12.85%) torsion C13- C1 TORS

244	257.87	0.46	0.07	(5.32%) 6-membered ring TORS; (19.98%) 6-membered ring TORS; (21.28%) 6-membered ring TORS; (11.60%) ring tXY2, X= C34 TWIST (7.47%) torsion C38- C30 TORS; (7.56%) torsion C39- C34 TORS
245	249.05	0.20	0.01	(14.56%) 6-membered ring TORS; (7.03%) ring tXY2, X= C34 ROCK; (15.04%) torsion C38- C30 TORS; (16.69%) torsion C39- C34 TORS
246	238.64	0.56	0.93	(7.88%) skel, C17 C19 C18 BEND; (7.16%) skel, C20 C22 C21 BEND; (16.13%) torsion C38- C30 TORS; (6.85%) torsion C39- C34 TORS
247	236.75	2.17	0.37	(5.44%) 6-membered ring TORS; (6.26%) torsion C7- C6 TORS; (8.83%) torsion C12- C5 TORS; (7.31%) torsion C17- C16 TORS
248	228.68	2.21	0.01	(18.87%) torsion C14- C1 TORS; (5.57%) torsion C19- C18 TORS; (5.66%) torsion C21- C20 TORS; (17.47%) torsion C39- C34 TORS
249	224.86	0.82	0.05	(6.20%) torsion C18- C17 TORS; (19.35%) torsion C19- C18 TORS; (19.41%) torsion C21- C20 TORS; (8.40%) torsion C22- C21 TORS (10.14%) torsion C23- C22 TORS; (6.37%) torsion C25- C24 TORS; (7.51%) torsion C38- C30 TORS
250	220.90	2.12	0.01	(6.50%) torsion C11- C10 TORS; (5.67%) torsion C12- C5 TORS; (8.21%) torsion C17- C16 TORS; (7.49%) torsion C23- C22 TORS (6.49%) torsion C25- C24 TORS
251	219.76	0.07	0.20	(5.87%) skel, C17 C19 C18 BEND; (6.46%) skel, C20 C22 C21 BEND; (7.40%) torsion C13- C1 TORS; (32.46%) torsion C14- C1 TORS (17.21%) torsion C39- C34 TORS
252	207.91	0.23	0.00	(5.20%) tert XY3 , X= C26 ADEFa; (8.38%) skel, C26 C28 C27 BEND; (5.61%) torsion C12- C5 TORS; (16.79%) torsion C38- C30 TORS
253	196.62	0.30	0.00	(5.61%) ring tXY C28- C29 WAGG; (5.92%) torsion C14- C1 TORS
254	183.41	0.04	0.28	(12.52%) torsion C12- C5 TORS; (10.66%) torsion C27- C26 TORS; (11.09%) torsion C38- C30 TORS
255	173.86	0.81	0.57	(11.23%) ring tXY C7- C6 WAGG; (5.36%) tert XY3, X= C9 ADEFb; (5.40%) skel, C17 C19 C18 BEND; (5.35%) skel, C20 C22 C21 BEND
256	172.76	4.23	0.14	(5.61%) skel, C7 C9 C8 BEND; (6.00%) ring tXY C28- C29 WAGG
257	162.16	0.39	1.23	(8.92%) torsion C9- C8 TORS; (22.66%) torsion C12- C5 TORS; (5.59%) torsion C27- C26 TORS; (11.39%) torsion C37- C26 TORS
258	152.32	0.05	0.10	(5.08%) torsion C9- C8 TORS; (5.55%) torsion C12- C5 TORS; (31.63%) torsion C15- C9 TORS; (5.19%) torsion C35- C17 TORS (5.43%) torsion C36- C22 TORS; (30.62%) torsion C37- C26 TORS
259	145.15	0.31	0.21	(36.29%) torsion C15- C9 TORS; (39.15%) torsion C37- C26 TORS
260	138.25	0.03	0.03	(19.26%) torsion C15- C9 TORS; (15.38%) torsion C35- C17 TORS; (33.43%) torsion C36- C22 TORS; (8.00%) torsion C37- C26 TORS
261	136.26	0.55	0.01	(58.25%) torsion C35- C17 TORS; (35.55%) torsion C36- C22 TORS
262	133.29	0.29	0.10	(56.29%) 6-membered ring TORS; (10.22%) 6-membered ring TORS; (9.09%) torsion C36- C22 TORS
263	121.31	0.03	0.04	(26.10%) 6-membered ring TORS; (9.36%) 6-membered ring TORS; (6.29%) ring tXY C12- C5 WAGG; (9.34%) torsion C12- C5 TORS
264	115.07	0.02	0.02	(15.85%) 6-membered ring TORS; (9.33%) 6-membered ring TORS; (5.76%) torsion C25- C24 TORS; (5.68%) torsion C35- C17 TORS (5.94%) torsion C36- C22 TORS
265	112.70	0.26	0.03	(13.37%) 6-membered ring TORS
266	109.46	0.10	0.14	(9.60%) 6-membered ring TORS; (12.03%) 6-membered ring TORS
267	90.33	0.08	0.12	(6.15%) skel, C6 C8 C7 BEND; (7.26%) skel, C11 C17 C16 BEND
268	89.02	0.08	0.06	(8.94%) 6-membered ring TORS; (6.43%) ring tXY C28- C29 ROCK; (5.49%) torsion C8- C7 TORS; (6.71%) torsion C28- C27 TORS
269	82.24	0.03	0.30	(5.83%) ring tXY C7- C6 ROCK; (5.43%) ring tXY C28- C29 ROCK
270	76.89	0.02	0.74	(15.67%) torsion C11- C10 TORS; (7.18%) torsion C17- C16 TORS; (6.26%) torsion C19- C18 TORS; (6.58%) torsion C21- C20 TORS (5.64%) torsion C23- C22 TORS; (14.82%) torsion C25- C24 TORS; (5.04%) torsion C29- C28 TORS
271	66.69	0.04	0.00	(19.61%) 6-membered ring TORS; (11.50%) 6-membered ring TORS
272	62.75	0.63	0.35	(5.15%) torsion C18- C17 TORS; (12.19%) torsion C19- C18 TORS; (12.29%) torsion C21- C20 TORS; (5.78%) torsion C22- C21 TORS (5.44%) torsion C28- C27 TORS
273	52.41	0.11	0.04	(24.14%) 6-membered ring TORS; (5.04%) 6-membered ring TORS; (15.12%) 6-membered ring TORS
274	46.97	0.12	0.12	(12.49%) 6-membered ring TORS; (11.68%) torsion C7- C6 TORS; (5.10%) torsion C23- C22 TORS; (12.12%) torsion C29- C28 TORS
275	42.09	0.11	0.02	(7.99%) 6-membered ring TORS; (8.08%) 6-membered ring TORS; (10.58%) skel, C6 C8 C7 BEND; (5.59%) skel, C7 C9 C8 BEND (5.36%) skel, C26 C28 C27 BEND; (10.63%) skel, C27 C29 C28 BEND
276	37.65	0.03	0.03	(6.55%) 6-membered ring TORS; (5.26%) torsion C10- C9 TORS; (7.24%) torsion C17- C16 TORS; (9.67%) torsion C23- C22 TORS (10.79%) torsion C26- C25 TORS; (7.24%) torsion C28- C27 TORS
277	28.59	0.00	0.19	(5.95%) torsion C7- C6 TORS; (7.27%) torsion C9- C8 TORS; (8.37%) torsion C10- C9 TORS; (6.32%) torsion C19- C18 TORS (6.07%) torsion C21- C20 TORS; (5.04%) torsion C26- C25 TORS; (6.16%) torsion C27- C26 TORS; (7.56%) torsion C29- C28 TORS
278	22.82	0.00	0.51	(7.43%) skel, C6 C8 C7 BEND; (5.19%) skel, C9 C11 C10 BEND; (8.49%) skel, C10 C16 C11 BEND; (5.29%) skel, C22 C24 C23 BEND (10.16%) skel, C23 C25 C24 BEND; (5.95%) skel, C24 C26 C25 BEND; (7.43%) skel, C27 C29 C28 BEND
279	15.90	0.01	0.30	(23.43%) torsion C7- C6 TORS; (13.37%) torsion C9- C8 TORS; (13.47%) torsion C11- C10 TORS; (8.75%) torsion C17- C16 TORS (5.48%) torsion C19- C18 TORS; (6.48%) torsion C22- C21 TORS
280	15.25	0.01	0.32	(7.64%) torsion C23- C22 TORS; (11.83%) torsion C25- C24 TORS; (14.31%) torsion C27- C26 TORS; (33.71%) torsion C29- C28 TORS
281	10.74	0.10	0.02	(6.84%) skel, C10 C16 C11 BEND; (6.79%) skel, C11 C17 C16 BEND; (8.36%) skel, C17 C19 C18 BEND; (12.38%) skel, C18 C20 C19 BEND (12.20%) skel, C19 C21 C20 BEND; (7.99%) skel, C20 C22 C21 BEND; (5.92%) skel, C22 C24 C23 BEND; (5.91%) skel, C23 C25 C24 BEND
282	7.92	0.02	0.03	(5.36%) seed XY, C18- H71 OUT; (5.23%) seed XY, C19- H72 OUT; (5.02%) seed XY, C20- H73 OUT; (8.16%) torsion C18- C17 TORS (7.63%) torsion C20- C19 TORS; (7.25%) torsion C22- C21 TORS

В	indungslänge	n / Å	Bir	Bindungswinkel / $^{\circ}$		
Bindung	S_0	S_2	Winkel	S_0	S_2	
$C_2 - C_1$	1.553	1.553	$C_3 - C_2 - C_1$	112.8	112.9	
$\tilde{C_3} - \tilde{C_2}$	1.532	1.531	$C_{4}^{2} - C_{3}^{2} - C_{2}^{1}$	109.8	109.6	
$C_4 - C_3$	1.535	1.534	$C_{5} - C_{4} - C_{3}$	114.1	114.2	
$C_5 - C_4$	1.522	1.520	$C_{6} - C_{5} - C_{4}$	122.8	122.8	
$C_6 - C_5$	1.363	1.372	$C_7 - C_6 - C_5$	123.3	124.0	
$C_7 - C_6$	1.477	1.462	$C_8 - C_7 - C_6$	126.4	127.9	
$C_8 - C_7$	1.358	1.374	$C_9 - C_8 - C_7$	126.6	126.1	
$C_9 - C_8$	1.457	1.439	$\ddot{C_{10}} - \ddot{C_{9}} - \dot{C_{8}}$	118.2	118.3	
$\tilde{C}_{10} - \tilde{C}_9$	1.373	1.394	$C_{11} - C_{10} - C_{9}$	128.4	128.5	
$C_{11}^{10} - C_{10}^{0}$	1.436	1.415	$C_{12} - C_5 - C_4$	113.0	113.1	
$C_{12}^{11} - C_5^{10}$	1.515	1.514	$C_{13} - C_1 - C_2$	107.5	107.1	
$C_{13} - C_1$	1.552	1.553	$C_{14}^{10} - C_{1}^{1} - C_{13}^{1}$	108.6	108.7	
$C_{14}^{10} - C_1^{1}$	1.555	1.555	$C_{15} - C_9 - C_8$	118.5	119.1	
$C_{15}^{11} - C_{9}^{1}$	1.512	1.512	$C_{16} - C_{11} - C_{10}$	122.7	122.9	
$C_{16}^{10} - C_{11}^{10}$	1.369	1.393	$C_{17} - C_{16} - C_{11}$	126.9	126.8	
$C_{17}^{10} - C_{16}^{11}$	1.445	1.419	$C_{18}^{11} - C_{17}^{10} - C_{16}^{11}$	118.3	118.5	
$C_{18}^{11} - C_{17}^{10}$	1.379	1.407	$C_{19}^{10} - C_{18}^{11} - C_{17}^{10}$	128.3	128.4	
$C_{19}^{10} - C_{18}^{11}$	1.430	1.404	$C_{20}^{10} - C_{19}^{10} - C_{18}^{11}$	123.5	123.8	
$C_{20}^{10} - C_{19}^{10}$	1.373	1.402	$C_{21} - C_{20} - C_{19}$	123.6	123.7	
$C_{21}^{-1} - C_{20}^{-1}$	1.430	1.403	$C_{22} - C_{21} - C_{20}$	128.2	128.4	
$C_{22}^{-1} - C_{21}^{-2}$	1.379	1.408	$C_{23} - C_{22} - C_{21}$	118.4	118.5	
$C_{23}^{-1} - C_{22}^{-1}$	1.445	1.419	$C_{24}^{-}-C_{23}^{-}-C_{22}^{-}$	126.8	126.9	
$C_{24}^{-0} - C_{23}^{-2}$	1.369	1.393	$C_{25} - C_{24} - C_{23}$	122.9	122.8	
$C_{25}^{-1} - C_{24}^{-3}$	1.436	1.414	$C_{26}^{-0} - C_{25}^{-1} - C_{24}^{-0}$	128.2	128.5	
$C_{26}^{-1} - C_{25}^{-1}$	1.373	.1395	$C_{27} - C_{26} - C_{25}$	118.3	118.3	
$C_{27} - C_{26}$	1.457	1.437	$C_{28} - C_{27} - C_{26}$	126.4	126.1	
$C_{28} - C_{27}$	1.359	1.375	$C_{29} - C_{28} - C_{27}$	125.8	127.2	
$C_{29} - C_{28}$	1.477	1.461	$C_{30} - C_{29} - C_{28}$	122.7	123.6	
$C_{30} - C_{29}$	1.363	1.373	$C_{31} - C_{30} - C_{29}$	122.9	123.0	
$C_{31} - C_{30}$	1.520	1.518	$C_{32} - C_{31} - C_{30}$	113.7	113.8	
$C_{32} - C_{31}$	1.533	1.532	$C_{33} - C_{32} - C_{31}$	109.3	108.9	
$C_{33} - C_{32}$	1.532	1.531	$C_{34} - C_{33} - C_{32}$	112.7	112.7	
$C_{34} - C_{33}$	1.553	1.554	$C_{35} - C_{17} - C_{16}$	118.6	119.3	
$C_{35} - C_{17}$	1.514	1.514	$C_{36} - C_{22} - C_{21}$	123.1	122.2	
$C_{36} - C_{22}$	1.514	1.514	$C_{37} - C_{26} - C_{25}$	123.2	122.5	
$C_{37} - C_{26}$	1.512	1.512	$C_{38} - C_{30} - C_{29}$	124.4	124.4	
$C_{38} - C_{30}$	1.515	1.513	$C_{39} - C_{34} - C_{33}$	109.9	109.8	
$C_{39} - C_{34}$	1.554	1.554	$C_{40} - C_{34} - C_{33}$	107.3	106.9	
$C_{40} - C_{34}$	1.554	1.555				

 $\label{eq:c.1} \begin{array}{ll} \textbf{Tabelle C.1} & Bindungslängen und -winkel zwischen den Kohlenstoffatomen β-Carotins berechnet über DFT für den elektronischen Grundzustand S_0 und den angeregten Zustand S_2. \end{array}$



Abbildung C.2 Über TDDFT, *in vacuo* berechnete Ramananregungsprofile der Moden ν_{67} (Vierecke) und ν_{66} (Kreise) von β -Carotin für die Resonanz mit dem erlaubten $S_0 \rightarrow S_2$ Übergang, erhalten aus den Intensitäten der beiden Moden in den bei verschiedenen Anregungswellenlängen berechneten Resonanz-Raman-Spektren. Für die Berechnung der Resonanz-Raman-Intensitäten wurde die Kramers-Kronig-Transformation des experimentellen Absorptionsspektrums von β -Carotin in Dichlormethan benutzt.

Anhang D

Appendix zu Kap. 3.4



Abbildung D.1 Absorptionsspektren bei Raumtemperatur der Pigmente aus *A. marina* (hauptsächlich Chl *d*) extrahiert mit wenig Aceton/Wasser (90%/10%) und mit verschiedenen Lösungsmitteln auf die gleiche Konzentration verdünnt. In Diethylether schwarze Kurve, in Aceton rot und in Methanol blau.



Abbildung D.2 Triplett-minus-Singulett-Absorptionsdifferenzspektrum bei Raumtemperatur von Chl d extrahiert aus A. marina in wässriger Lösung mit β -DM Detergensmizellen. Die Messungen erfolgten wie für Chl a beschrieben [72].

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schema der Elektronentransferkette in der Thylakoidmembran	13
1.2	Anordnung der Kofaktoren im Reaktionszentrum von PS II	14
1.3	Schema des Kokzyklus	15
1.4	Anordnung der Kofaktoren im Reaktionszentrum von PS I	16
1.5	Strukturformeln für Chlorophyll a und d	17
2.1	Absorptionsspektrum vom Chlorophyll a	21
2.2	Schematischer Aufbau des Cary 1E UV/Vis Spektrometers	22
2.3	Darstellung des Franck-Condon-Prinzips	24
2.4	Aufbau des Blitzlichtspektrometers mit einer Blitzlampe	26
2.5	Aufbau des Blitzlichtspektrometers mit einem gepulsten Laser	27
2.6	Typische Zeitverläufe blitzinduzierter Absorptionsänderungen $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	29
2.7	Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus der Elektronenspins	30
2.8	Darstellung des Prinzips der Feldmodulation bei der Aufnahme eines ESR-Spektrums $\ \ . \ .$	31
2.9	Beispiele für Hyperfeinwechselwirkungen	32
2.10	Energiediagramm und schematisches Ramanspektrum	34
2.11	Potentialkurven für den elektronischen Grund- und angeregten Zustand	37
3.1	Darstellung der Anordnung der Kofaktoren im PS II	46
3.2	Absorptionsspektrum Photosystem II bei Raumtemperatur	47
3.3	Absorptionsspektren Photosystem II bei 77 K	48
3.4	Absorptionsdifferenzspektren PS II für $Cytb_{559}^{red}$ und $Cytb_{559}^{ox}$	49
3.5	Lineardichroismus PS II	51
3.6	ESR-Spektren PS II pH 6.5	52
3.7	Ramanspektren PS II bei 77 K mit Belichtung	54
3.8	Absorptionsdifferenzspektren PS II für verschiedene Belichtungen mit $Cyt b_{559}^{ox}$	56
3.9	Ausbeute der Bildung von Car^+ , Chl^+ und Q_A^-	57
3.10	Bildung des Zustandes $P_{680}^+Q_A^-$ pro Blitz mit Cyt b_{559}^{ox}	58
3.11	Absorptionsdifferenzspektren PS II für verschiedene Belichtungen mit $Cytb_{559}^{red}$	59
3.12	Bildung des Zustandes $P_{680}^+Q_A^-$ pro Blitz mit Cyt b_{559}^{red}	60
3.13	Rückgang $\operatorname{Car}^+ Q_A^-$ und $\operatorname{Chl}^+ Q_A^-$ nach Belichtung	61
3.14	Zerfall von $\operatorname{Car}^+ Q_A^-$ und $\operatorname{Chl}^+ Q_A^-$ nach Belichtung $\ldots \ldots \ldots$	62
3.15	Absorptionsdifferenzspektren PS II aus Spinat mit $Cyt b_{559}^{ox}$	64
3.16	Absorptionsdifferenzspektren PS II aus Spinat ohne Zusätze	65
3.17	Absorptions-Zeitverlauf bei 988 nm PS II aus Spinat	66

3 18	Absorptionsdifferenzspektren PS II aus Spinat mit unterschiedlicher Belichtung	67
3 19	Absorptionsänderung PS II bei 830 nm und 307 K	69
3 20	Absorptionsänderung PS II bei 830 nm für verschiedene Temperaturen	71
3.21	Ausbeute der Tyrz-Oxidation	72
3.22	ESB-Differenzspektrum PS II $q = 2.03$ -Signal	73
3.23	ESR-Spektren PS II bei pH 9.0	75
3.24	Absorptionsänderung PS II bei 830 nm für verschiedene pH-Werte	76
3.25	Absorptionsänderung PS II bei 830 nm Blitzzahlabhängigkeit	77
3.26	Absorptionsdifferenzspektren PS II bei pH 9	78
3.27	Abhängigkeit der Q_{A}^{-} Ausbeute vom pH	79
3.28	Schema für die Tyr _D -Oxidation im PS II bei alkalischem pH	80
3.29	Absorptionsänderung PS II bei 830 nm Temperaturabhängigkeit	82
3.30	Optimierte Sruktur von Carotin	83
3.31	Vergleich Ramanspektrum des Carotins Rechnung mit Experiment	85
3.32	Vergleich Ramanspektrum des Carotinradikals Rechnung mit Experiment	87
3.33	Resonanz-Ramanspektren Carotin	89
3.34	Resonanz-Ramanspektren Carotin mit vergrößerter Darstellung ν_{67} und ν_{66}	90
3.35	Ramananregunsprofile Carotin in Lösung	91
3.36	Resonanz-Ramanspektren von PS I	93
3.37	Resonanz-Ramanspektren von PS II	94
3.38	Ramananregunsprofile Carotin in Proteinumgebung	95
3.39	Absorptionsänderung 455 nm PS I aus A. marina	97
3.40	Absorptionsdifferenzspektren PS I aus $A.\ marina$ bei Raumtemperatur im Soret-Bereich	98
3.41	Absorptions differenzspektren PS I aus A. marina bei Raumtemperatur im $\mathbf{Q}_{\mathbf{y}}\text{-}Bereich$	100
3.42	Absorptionsdifferenzspektren PS I aus A. marina im NIR-Bereich	101
3.43	Redoxtitration für die Oxidation vom P_{740}	102
3.44	Absorptionsdifferenzspektren von $(P_{740}^+A_1^ P_{740}A_1)$ bei 5 K	103
3.45	Absorptionsdifferenzspektren von $(P_{740}^+A_1^ P_{740}A_1)$ bei 77 K	104
3.46	$(^{3}P_{740} - P_{740})$ -Differenzspektrum bei 5 K	105
B.1	Absorptionsspektren PS II unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen	117
B.2	Ramanspektrum vom Chl a	118
B.3	Aminosäuresequenzvergleich D2-Einheiten PS II Spinat und <i>T. elongatus</i>	119
C.1	Berechnetes Ramanspektrum Carotin mit C_{2b} -Symmetrie	121
C.2	Berechnete Ramananregungsprofile Carotin	129
		-
D.1	Absorptionsspektren Pigmentextrakt aus A. marina	131
D.2	$ Iriplett-minus-Singulett-Absorptions differenz spektrum Chl d \dots $	132

Literaturverzeichnis

- AHLRICHS, R.; BÄR, M.; HÄSER, M.; HORN, H.; KÖLMEL, C.: Electronic structure calculations on workstation computers: The program system Turbomole. In: Chem. Phys. Lett. 162 (1989), S. 165–169
- [2] AKIYAMA, M.; GOTOH, T.; KISE, H.; MIYASHITA, H.; MIMURO, M.; KOBAYASHI, M.: Stoichiometries of chlorophyll d'/PSI and chlorophyll a/PSII in a chlorophyll d-dominated cyanobacterium Acaryochloris marina. In: Jpn. J. Phycol. 52 (2004), S. 67–72
- [3] AKIYAMA, M.; MIYASHITA, H.; KISE, H.; WATANABE, T.; MIMURO, M.; MIYACHI, S.; KOBAYASHI, M.: Quest for minor but key chlorophyll molecules in photosynthetic reaction centers – unusual pigment composition in the reaction centers of the chlorophyll d-dominated cyanobacterium Acaryochloris marina. In: Photosynth. Res. 74 (2002), S. 97–107
- [4] AKIYAMA, M.; MIYASHITA, H.; KISE, H.; WATANABE, T.; MIYACHI, S.; KOBAYASHI, M.: Detection of chlorophyll d' and pheophytin a in a chlorophyll d-dominating oxygenic photosynthetic prokaryote Acaryochloris marina. In: Anal. Sci. 17 (2001), S. 205–208
- [5] ALBRECHT, A.C.: On the theory of Raman intensities. In: J. Chem. Phys. 34 (1961), S. 1476–1484
- [6] AMUNTS, A.; DRORY, O.; NELSON, N.: The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4Å resolution. In: Nature 447 (2007), S. 58–63
- [7] BAILLEUL, B.; JOHNSON, X.; FINAZZI, G.; BARBER, J.; RAPPAPORT, F.; TELFER, A.: The Thermodynamics and Kinetics of Electron Transfer between Cytochrome b₆f and Photosystem I in the Chlorophyll d-dominated Cyanobacterium, Acaryochloris marina. In: J. Biol. Chem. 283 (2008), S. 25218–25226
- [8] BANIULIS, D.; YAMASHITA, E.; WHITELEGGE, J.P.; ZATSMAN, A.I.; HENDRICH, M.P.; HASAN, S.S.; RYAN, C.M.; CRAMER, W.A.: Structure-Function, Stability, and Chemical Modification of the Cyanobacterial Cytochrome b₆f Complex from Nostoc sp. PCC 7120. In: J. Biol. Chem. 284 (2009), S. 9861–9869
- [9] BERNARDING, J.; ECKERT, H.J.; EICHLER, H.J.; NAPIWOTZKI, A.; RENGER, G.: Kinetic Studies on the stabilization of the primary radical pair P680⁺ Pheo⁻ in different Photosystem II preparations from higher plants. In: *Photochem. Photobiol.* 59 (1994), S. 566–573
- [10] BERTHOMIEU, C. ; HIENERWADEL, R. ; BOUSSAC, A. ; BRETON, J. ; DINER, B.A.: Hydrogen Bonding of Redox-Active Tyrosine Z of Photosystem II Probed by FTIR Difference Spectroscopy. In: *Biochemistry* 37 (1998), S. 10547–10554
- [11] BIALEK-BYLKA, G.E.; SOFROVÁ, D.; SZURKOWSKI, J.; SKWAREK, R.; SOPKO, B.; MANIKOWSKI, H.: Linear dichroism, fluorescence polarization, and path of the thermal deactivation of excited cyanobacterial (Synechococcus elongatus) photosystem 1 immobilized and oriented in polymer films. In: Photosynthetica 38 (2000), S. 143–148
- [12] BITTL, R.; ZECH, S.G.: Pulsed EPR Study of Spin-Coupled Radical Pairs in Photosynthetic Reaction Centers: Measurement of the Distance Between and in Photosystem I and between and in Bacterial Reaction Centers. In: J. Phys. Chem. 101 (1997), S. 1429–1436
- [13] BLANKEN, H.J. den ; HOFF, A.J.: High-resolution absorbance-difference spectra of the triplet state of the primary donor P-700 in Photosystem I subchloroplast particles measured with absorbance-detected magnetic resonance at 1.2 K. Evidence that P-700 is a dimeric chlorophyll complex. In: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 724 (1983), S. 52–61

- [14] BLANKEN, H.J. den ; HOFF, A.J. ; JONGENELIS, A. ; DINER, B.A.: High-resolution triplet-minus-singlet absorbance difference spectrum of photosystem II particles. In: *FEBS Lett.* 157 (1983), S. 21–27
- [15] BOICHENKO, V.A.; KLIMOV, V.V.; MIYASHITA, H.; MIYACHI, S.: Functional characteristics of chlorophyll dpredominating photosynthetic apparatus in intact cells of Acaryochloris marina. In: Photosynth. Res. 65 (2000), S. 269–277
- [16] BRAUN, P. ; GREENBERG, B.M. ; SCHERZ, A.: D1-D2-cytochrome b559 complex from the aquatic plant Spirodela oligorrhiza: correlation between complex integrity, spectroscopic properties, photochemical activity, and pigment composition. In: Biochemistry 29 (1990), S. 10376–10387
- [17] BRETTEL, K.: Electron transfer from A_1^- to an iron-sulfur center with $t_{1/2} = 200$ ns at room temperature in photosystem I: characterization by flash absorption spectroscopy. In: *FEBS Lett.* 239 (1988), S. 93–98
- [18] BRETTEL, K.: Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. In: Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1318 (1997), S. 322–373
- [19] BRETTEL, K. ; LEIBL, W.: Electron transfer in photosystem I. In: Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1507 (2001), S. 100–114
- [20] BRETTEL, K. ; SCHLODDER, E. ; WITT, H.T.: Nanosecond reduction kinetics of photooxidized chlorophyll-a_{II} (P-680) in single flashes as a probe for the electron pathway, H⁺-release and charge accumulation in the O₂-evolving complex. In: Biochim. Biophys. Acta 766 (1984), S. 403–415
- [21] BRETTEL, K.; SÉTIF, P.; MATHIS, P.: Flash-induced absorption changes in photosystem I at low temperature: evidence that the electron acceptor A₁ is vitamin K₁. In: *FEBS Lett.* 203 (1986), S. 220–224
- [22] BROESS, K. ; TRINKUNAS, G. ; HOEK, A. van ; CROCE, R. ; AMERONGEN, H. van: Determination of the excitation migration time in Photosystem II Consequences for the membrane organization and charge separation parameters. In: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1777 (2008), S. 404–409
- [23] BROSE, K.; ZOUNI, A.; BROSER, M.; MÜH, F.; MAULTZSCH, J.: Polarised Raman measurements on the core complex of crystallised photosystem II. In: *Phys. Status Solidi B* 246 (2009), S. 2813–2816
- [24] BRUDVIG, G.W.; CASEY, J.L.; SAUER, K.: The effect of temperature on the formation and decay of the multiline electronparamagnetic-resonance signal species associated with photosynthetic oxygen evolution. In: *Biochim. Biophys. Acta* 723 (1983), S. 366–371
- BUSER, C.A.; DINER, B.A.; BRUDVIG, G.W.: Photooxidation of cytochrome b₅₅₉ in oxygen-evolving photosystem II. In: *Biochemistry* 31 (1992), S. 11449–11459
- [26] BUSER, C.A.; THOMPSON, L.K.; DINER, B.A.; BRUDVIG, G.W.: Electron-transfer reactions in manganese-depleted photosystem II. In: *Biochemistry* 29 (1990), S. 8977–8985
- [27] CHAMPION, P.M.; ALBRECHT, A.C.: Resonance Raman scattering: the multimode problem and transform methods. In: Annu. Rev. Phys. Chem. 33 (1982), S. 353–376
- [28] CHEN, M.; BIBBY, T.S.; NIELD, J.; LARKUM, A.W.D.; BARBER, J.: Structure of a large photosystem II supercomplex from Acaryochloris marina. In: FEBS Lett. 579 (2005), S. 1306–1310
- [29] CHEN, M.; QUINNELL, R.G.; LARKUM, A.W.D.: The major light-harvesting pigment protein of Acaryochloris marina. In: FEBS Lett. 514 (2002), S. 149–152
- [30] CHEN, M.; TELFER, A.; LIN, S.; PASCAL, A.; LARKUM, A.W.; BARBER, J.; BLANKENSHIP, R.E.: The nature of the photosystem II reaction centre in the chlorophyll *d*-containing prokaryote, *Acaryochloris marina*. In: *Photochem. Photobiol. Sci.* 4 (2005), S. 1060–1064
- [31] CRAMER, W.A.; THEG, S.M.; WIDGER, W.R.: On the structure and function of cytochrome b-559. In: Photosyn. Res. 10 (1986), S. 393–403

- [32] CUKIER, R.I.; NOCERA, D.G.: Proton-coupled electron transfer. In: Annu. Rev. Phys. Chem. 49 (1998), S. 337-369
- [33] DAVIS, M.S.; FORMAN, A.; FAJER, J.: Ligated chlorophyll cation radicals: Their function in photosystem II of plant photosynthesis. In: Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (1979), S. 4170–4174
- [34] DEL RIZZO, P.A.; BI, Y.; DUNN, S.D.; SHILTON, B.H.: The "Second Stalk" of Escherichia coli ATP Synthase: Structure of the Isolated Dimerization Domain. In: Biochemistry 41 (2002), S. 6875–6884
- [35] DI VALENTIN, M.; CEOLA, S.; AGOSTINI, G.; TELFER, A.; BARBER, J.; BÖHLES, F.; SANTABARBARA, S.; CARBONERA, D.: The photo-excited triplet state of chlorophyll d in methyl-tetrahydrofuran studied by optically detected magnetic resonance and time-resolved EPR. In: Mol. Phys. 105 (2007), S. 2109–2117
- [36] DINER, B.A.; BRITT, R.D.: The redox-active tyrosines Y_Z and Y_D. In: WYDRZYNSKI, T.J. (Hrsg.); SATOH, K. (Hrsg.): Photosystem II: The light-driven water: plastoquinone oxidoreductase. Springer Berlin Heidelberg New York, 2005, S. 207–233
- [37] DINER, B.A.; RAPPAPORT, F.: Structure, Dynamics, and Energetics of the Primary Photochemistry of Photosystem II of Oxygenic Photosynthesis. In: Annu. Rev. Plant Biol. 53 (2002), S. 551–580
- [38] DINER, B.A.; SCHLODDER, E.; NIXON, P.J.; COLEMAN, W.J.; RAPPAPORT, F.; LAVERGNE, J.; VERMAAS, W.F.J.; CHISHOLM, D.A.: Site-Directed Mutations at D1-His198 and D2-His197 of Photosystem II in Synechocystis PCC 6803: Sites of Primary Charge Separation and Cation and Triplet Stabilization. In: Biochemistry 40 (2001), S. 9265–9281
- [39] DÖRING, G.; RENGER, G.; VATER, J.; WITT, H.T.: Properties of the photoactive chlorophyll-aII in photosynthesis. In: Z. Naturforsch. B 24 (1969), S. 1139–1143
- [40] DÖRING, G. ; STIEHL, H.H. ; WITT, H.T.: A second chlorophyll reaction in the electron chain of photosynthesisregistration by the repetitive excitation technique. In: Z. Naturforsch. B 22 (1967), S. 639–644
- [41] DURRANT, J.R.; GIORGI, L.B.; BARBER, J.; KLUG, D.R.; PORTER, G.: Characterisation of triplet states in isolated Photosystem II reaction centres: oxygen quenching as a mechanism for photodamage. In: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1017 (1990), S. 167–175
- [42] DURRANT, J.R.; KLUG, D.R.; KWA, S.L.S.; GRONDELLE, R. van; PORTER, G.; DEKKER, J.P.: A multimer model for P680, the primary electron donor of photosystem II. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (1995), S. 4798–4802
- [43] ECKERT, H.J.; RENGER, G.: Temperature-Dependence of P680⁺ Reduction in O₂-Evolving PS-II Membrane-Fragments at Different Redox States S_i of the Water Oxidizing System. In: *FEBS Lett.* 236 (1988), S. 425–431
- [44] FALLER, P. ; DEBUS, R.J. ; BRETTEL, K. ; SUGIURA, M. ; RUTHERFORD, A.W. ; BOUSSAC, A.: Rapid formation of the stable tyrosyl radical in photosystem II. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), S. 14368–14373
- [45] FALLER, P. ; GOUSSIAS, C. ; RUTHERFORD, A.W. ; UN, S.: Resolving intermediates in biological proton-coupled electron transfer: A tyrosyl radical prior to proton movement. In: Proc. Natl. Acad. Sci., USA 100 (2003), S. 8732–8735
- [46] FALLER, P. ; PASCAL, A. ; RUTHERFORD, A.W.: β-Carotene Redox Reactions in Photosystem II: Electron Transfer Pathway. In: Biochemistry 40 (2001), S. 6431–6440
- [47] FALLER, P. ; RUTHERFORD, A.W. ; DEBUS, R.J.: Tyrosine D Oxidation at Cryogenic Temperature in Photosystem II. In: *Biochemistry* 41 (2002), S. 12914–12920
- [48] FERREIRA, K.N.; IVERSON, T.M.; MAGHLAOUI, K.; BARBER, J.; IWATA, S.: Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. In: Science 303 (2004), S. 1831–1838
- [49] FLOYD, R.A.; CHANCE, B.; DEVAULT, D.: Low temperature photo-induced reactions in green leaves and chloroplasts. In: Biochim. Biophys. Acta 226 (1971), S. 103–112
- [50] FORCE, D.A.; RANDALL, D.W.; BRITT, R.D.; TANG, X.S.; DINER, B.A.: ²H ESE-ENDOR study of hydrogen bonding to the tyrosine radicals Y[•]_D and Y[•]_Z of photosystem II. In: J. Am. Chem. Soc. 117 (1995), S. 12643–12644

- [51] FRISCH, M.J.; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H.B.; SCUSERIA, G.E.; ROBB, M.A.; CHEESEMAN, J.R.; MONTGOMERY JR, J.A.; VREVEN, T.; KUDIN, K.N.; BURANT, J.C. u.a.: Gaussian 03, Revision C. 02, Gaussian. In: Inc., Wallingford, CT (2004)
- [52] FROMME, P. ; WITT, H.T.: Improved isolation and crystallization of photosystem I for structural analysis. In: Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1365 (1998), S. 175–184
- [53] GABER, B.P.; MISKOWSKI, V.; SPIRO, T.G.: Resonance Raman Scattering from Iron(III)- and Copper(II)-Transferrin and an Iron(III) Model Compound. A Spectroscopic Interpretation of the Transferrin Binding Site. In: J. Am. Chem. Soc. 96 (1974), S. 6868–6873
- [54] GIBBONS, C. ; MONTGOMERY, M.G. ; LESLIE, A.G.W. ; WALKER, J.E.: The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4Å resolution. In: Nat. Struct. Mol. Biol. 7 (2000), S. 1055–1061
- [55] GOLBECK, J.H.: A comparative analysis of the spin state distribution of *in vitro* and *in vivo* mutants of PsaC. A biochemical argument for the sequence of electron transfer in Photosystem I as $F_X \rightarrow F_A \rightarrow F_B \rightarrow$ ferredoxin/flavodoxin. In: *Photosynth. Res.* 61 (1999), S. 107–144
- [56] GOLBECK, J.H.; PARRETT, K.G.; MEHARI, T.; JONES, K.L.; BRAND, J.J.: Isolation of the intact photosystem I reaction center core containing P700 and iron-sulfur center F_X. In: *FEBS Lett.* 228 (1988), S. 268–272
- [57] GROOT, M.L.; PAWLOWICZ, N.P.; WILDEREN, L.J.G.W. van; BRETON, J.; STOKKUM, I.H.M. van; GRONDELLE, R. van: Initial electron donor and acceptor in isolated Photosystem II reaction centers identified with femtosecond mid-IR spectroscopy. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005), S. 13087–13092
- [58] GUERGOVA-KURAS, M. ; BOUDREAUX, B. ; JOLIOT, A. ; JOLIOT, P. ; REDDING, K.: Evidence for two active branches for electron transfer in photosystem I. In: Proc. Natl. Acad. Sci., USA 98 (2001), S. 4437–4442
- [59] GUSKOV, A.; KERN, J.; GABDULKHAKOV, A.; BROSER, M.; ZOUNI, A.; SAENGER, W.: Cyanobacterial photosystem II at 2.9Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009), S. 334–342
- [60] HAAG, E.; IRRGANG, K.D.; BOEKEMA, E.J.; RENGER, G.: Functional and structural analysis of photosystem II core complexes from spinach with high oxygen evolution capacity. In: *Eur. J. of Biochem.* 189 (1990), S. 47–53
- [61] HANLEY, J.; DELIGIANNAKIS, Y.; PASCAL, A.; FALLER, P.; RUTHERFORD, A.W.: Carotenoid Oxidation in Photosystem II. In: Biochemistry 38 (1999), S. 8189–8195
- [62] HARIHARAN, P.C.; POPLE, J.A.: The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. In: *Theoret. chim. Acta* 28 (1973), S. 213–222
- [63] HASTINGS, G.: Time-resolved step-scan Fourier transform infrared and visible absorption difference spectroscopy for the study of photosystem I. In: Appl. Spectrosc. 55 (2001), S. 894–900
- [64] HASTINGS, G. ; KLEINHERENBRINK, F.A.M. ; LIN, S. ; BLANKENSHIP, R.E.: Time-resolved fluorescence and absorption spectroscopy of photosystem I. In: *Biochemistry* 33 (1994), S. 3185–3192
- [65] HAUMANN, M.; LIEBISCH, P.; MÜLLER, C.; BARRA, M.; GRABOLLE, M.; DAU, H.: Photosynthetic O₂ formation tracked by time-resolved X-ray experiments. In: *Science* 310 (2005), S. 1019–1021
- [66] HAVELIUS, K.G.V. ; STYRING, S.: pH dependent competition between Y_Z and Y_D in photosystem II probed by illumination at 5 K. In: *Biochemistry* 46 (2007), S. 7865–7874
- [67] HEALD, R.L.; CALLAHAN, P.M.; COTTON, T.M.: Resonance Raman spectra of electrochemically generated chlorophyll a cation radical. In: J. Phys. Chem. 92 (1988), S. 4820–4824
- [68] HEALD, R.L.; COTTON, T.M.: A resonance Raman investigation of the cation radical of chlorophyll a and several derivatives. In: J. Phys. Chem. 94 (1990), S. 3968–3975

- [69] HECKS, B.; WULF, K.; BRETON, J.; LEIBL, W.; TRISSL, H.W.: Primary charge separation in photosystem I: a twostep electrogenic charge separation connected with P700⁺A₀⁻ and P700⁺A₁⁻ formation. In: *Biochemistry* 33 (1994), S. 8619–8624
- [70] HEHRE, W.J.; STEWART, R.F.; POPLE, J.A.: Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. I. Use of Gaussian Expansions of Slater-Type Atomic Orbitals. In: J. Chem. Phys. 51 (1969), S. 2657–2664
- [71] HIENERWADEL, R.; DINER, B.A.; BERTHOMIEU, C.: Molecular origin of the pH dependence of tyrosine D oxidation kinetics and radical stability in photosystem II. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1777 (2008), S. 525–531
- [72] HILLMANN, B.: Ladungsrekombinationsreaktionen im Photosystem II, Technische Universität Berlin, Doktorarbeit, 1997
- [73] HILLMANN, B. ; SCHLODDER, E.: Electron transfer reactions in Photosystem II core complexes from Synechococcus at low temperature difference spectrum of P680⁺ Q_A⁻/P680 Q_A at 77 K. In: Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1231 (1995), S. 76–88
- [74] HIYAMA, T.; KE, B.: A further study of P430: a possible primary electron acceptor of photosystem I. In: Arch. Biochem. Biophys. 147 (1971), S. 99–108
- [75] HIYAMA, T. ; KE, B.: Difference spectra and extinction coefficients of P₇₀₀. In: Biochim. Biophys. Acta 267 (1972), S. 160–171
- [76] HIZHNYAKOV, V.; TEHVER, I.: Theory of Resonant Secondary Radiation due to Impurity Centres in Crystals. In: Phys. Status Solidi 21 (1967), S. 755–768
- [77] HOGANSON, C.W.; BABCOCK, G.T.: A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis. In: Science 277 (1997), S. 1953–1956
- [78] HOHENBERG, P. ; KOHN, W.: Inhomogeneous electron gas. In: Phys. Rev. B 136 (1964), S. B864–B871
- [79] HOLZWARTH, A.R.; MÜLLER, M.G.; REUS, M.; NOWACZYK, M.; SANDER, J.; RÖGNER, M.: Kinetics and mechanism of electron transfer in intact photosystem II and in the isolated reaction center: pheophytin is the primary electron acceptor. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006), S. 6895–6900
- [80] HU, Q. ; MIYASHITA, H. ; IWASAKI, I. ; KURANO, N. ; MIYACHI, S. ; IWAKI, M. ; ITOH, S.: A photosystem I reaction center driven by chlorophyll d in oxygenic photosynthesis. In: Proc. Natl. Acad. Sci. 95 (1998), S. 13319–13323
- [81] INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Hrsg.): Fourth Assessment Report. Cambridge University Press, 2007
- [82] INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (Hrsg.): World Energy Outlook 2009. Organisation for Economic Co-operation and Development OECD, 2009
- [83] ISHIKITA, H.; LOLL, B.; BIESIADKA, J.; SAENGER, W.; KNAPP, E.W.: Redox potentials of chlorophylls in the photosystem II reaction center. In: *Biochemistry* 44 (2005), S. 4118–4124
- [84] ITOH, S. ; MINO, H. ; ITOH, K. ; SHIGENAGA, T. ; UZUMAKI, T. ; IWAKI, M.: Function of chlorophyll d in reaction centers of photosystems I and II of the oxygenic photosynthesis of Acaryochloris marina. In: Biochemistry 46 (2007), S. 12473–12481
- [85] JEEVARAJAN, A.S.; KISPERT, L.D.; WU, X.: Spectroelectrochemistry of carotenoids in solution. In: Chem. Phys. Lett. 219 (1994), S. 427–432
- [86] JEEVARAJAN, J.A.; WEI, C.C.; JEEVARAJAN, A.S.; KISPERT, L.D.: Optical absorption spectra of dications of carotenoids. In: J. Phys. Chem. 100 (1996), S. 5637–5641
- [87] JENSON, D.L.; BARRY, B.A.: Proton-Coupled Electron Transfer in Photosystem II: Proton Inventory of a Redox Active Tyrosine. In: J. Am. Chem. Soc. 131 (2009), S. 10567–10573

- [88] JENSON, D.L.; EVANS, A.; BARRY, B.A.: Proton-coupled electron transfer and tyrosine D of photosystem II. In: J. Phys. Chem. B 111 (2007), S. 12599–12604
- [89] JOLIOT, P.; BARBIERI, G.; CHABAUD, R.: Un nouveau modele des centres photochimiques du systeme II. In: Photochem. Photobiol. 10 (1969), S. 309–329
- [90] JOLIOT, P.; JOLIOT, A.: Different types of quenching involved in photosystem II centers. In: Biochim. Biophys. Acta 305 (1973), S. 202–216
- [91] JORDAN, P. ; FROMME, P. ; WITT, H.T. ; KLUKAS, O. ; SAENGER, W. ; KRAUSS, N.: Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5Å resolution. In: *Nature* 411 (2001), S. 909–917
- [92] JORDAN, R.; NESSAU, U.; SCHLODDER, E.: Charge recombination between the reduced iron-sulfur clusters and P700⁺. In: Photosynthesis: Mechanisms and Effects 2 (1998), S. 663–666
- [93] KAN, P.J.M. van; OTTE, S.C.M.; KLEINHERENBRINK, F.A.M.; NIEVEEN, M.C.; AARTSMA, T.J.; GORKOM, H.J. van: Time-resolved spectroscopy at 10 K of the Photosystem II reaction center; deconvolution of the red absorption band. In: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1020 (1990), S. 146–152
- [94] KARGE, M.; IRRGANG, K.D.; SELLIN, S.; FEINÄUGLE, R.; LIU, B.; ECKERT, H.J.; EICHLER, H.J.; RENGER, G.: Effects of hydrogen/deuterium exchange on photosynthetic water cleavage in PS II core complexes from spinach. In: *FEBS Lett.* 378 (1996), S. 140–144
- [95] KAWAMORI, A.; KATSUTA, N.; MINO, H.; ISHII, A.; MINAGAWA, J.; ONO, T.A.: Positions of Q_A and Chl_Z Relative to Tyrosine Y_Z and Y_D in Photosystem II Studied by Pulsed EPR. In: J. Biol. Phys. 28 (2002), S. 413–426
- [96] KAWAMORI, A.; ONO, T-A.; ISHII, A.; NAKAZAWA, S.; HARA, H.; TOMO, T.; MINAGAWA, J.; BITTL, R.; DZUBA, S.A.: The functional sites of chlorophylls in D1 and D2 subunits of Photosystem II identified by pulsed EPR. In: *Photosynth. Res.* 84 (2005), S. 187–192
- [97] KE, B.: The rise time of photoreduction, difference spectrum, and oxidation-reduction potential of P430. In: Arch. Biochem. Biophys. 152 (1972), S. 70–77
- [98] KERN, J.; LOLL, B.; LÜNEBERG, C.; DIFIORE, D.; BIESIADKA, J.; IRRGANG, K.D.; ZOUNI, A.: Purification, characterisation and crystallisation of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* cultivated in a new type of photobioreactor. In: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1706 (2005), S. 147–157
- [99] KNAFF, D.B.; ARNON, D.I.: Light-induced oxidation of a chloroplast b-type cytochrome at -189°C. In: Proc. Natl. Acad. Sci. 63 (1969), S. 956-962
- [100] KOBAYASHI, M.; OHASHI, S.; IWAMOTO, K.; SHIRAIWA, Y.; KATO, Y.; WATANABE, T.: Redox potential of chlorophyll d in vitro. In: Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1767 (2007), S. 596–602
- [101] KOBAYASHI, M.; WATANABE, T.; NAKAZATO, M.; IKEGAMI, I.; HIYAMA, T.; MATSUNAGA, T.; MURATA, N.: Chlorophyll a'/P-700 and pheophytin a/P-680 stoichiometries in higher plants and cyanobacteria determined by HPLC analysis. In: Biochim. Biophys. Acta 936 (1988), S. 81–89
- [102] KOHN, W.; SHAM, L.J.: Self-consistent equations including exchange and correlation effects. In: Phys. Rev. A 140 (1965), S. A1133–A1138
- [103] KOK, B.; FORBUSH, B.; MCGLOIN, M.: Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-I. A linear four step mechanism. In: *Photochem. Photobiol.* 11 (1970), S. 457–475
- [104] KRISHTALIK, L.I.: The mechanism of the proton transfer: an outline. In: Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1458 (2000), S. 6–27
- [105] KUMAZAKI, S.; ABIKO, K.; IKEGAMI, I.; IWAKI, M.; ITOH, S.: Energy equilibration and primary charge separation in chlorophyll d-based photosystem I reaction center isolated from Acaryochloris marina. In: FEBS Lett. 530 (2002), S. 153–157

- [106] KWA, S.L.S.; NEWELL, W.R.; GRONDELLE, R. van; DEKKER, J.P.: The reaction center of photosystem II studies with polarized fluorescence spectroscopy. In: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1099 (1992), S. 193–202
- [107] LAKSHMI, K.V.; POLUEKTOV, O.G.; REIFLER, M.J.; WAGNER, A.M.; THURNAUER, M.C.; BRUDVIG, G.W.: Pulsed high-frequency EPR study on the location of carotenoid and chlorophyll cation radicals in photosystem II. In: J. Am. Chem. Soc. 125 (2003), S. 5005–5014
- [108] LEEGWATER, J.A.; DURRANT, J.R.; KLUG, D.R.: Exciton equilibration induced by phonons: theory and application to PS II reaction centers. In: J. Phys. Chem. B 101 (1997), S. 7205–7210
- [109] LEWIS, N.S.; NOCERA, D.G.: Powering the planet: Chemical challenges in solar energy utilization. In: Proc. Natl. Acad. Sci. 103 (2006), S. 15729–15735
- [110] LÜNEBERG, J.; FROMME, P.; JEKOW, P.; SCHLODDER, E.: Spectroscopic characterization of PS I core complexes from thermophilic Synechococcus sp.: identical reoxidation kinetics of A₁⁻ before and after removal of the iron-sulfur-clusters F_A and F_B. In: FEBS Lett. 338 (1994), S. 197–202
- [111] LOLL, B.; KERN, J.; SAENGER, W.; ZOUNI, A.; BIESIADKA, J.: Towards complete cofactor arrangement in the 3.0Å resolution structure of photosystem II. In: *Nature* 438 (2005), S. 1040–1044
- [112] LUBITZ, W.; REIJERSE, E.; GASTEL, M. van: [NiFe] and [FeFe] Hydrogenases Studied by Advanced Magnetic Resonance Techniques. In: Chem. Rev 107 (2007), S. 4331–4365
- [113] LUTNAES, B.F.; BRUÅS, L.; KILDAHL-ANDERSEN, G.; KRANE, J.; LIAAEN-JENSEN, S.: The charge delocalised β, βcarotene dication-preparation, structure elucidation by NMR and reactions with nucleophiles. In: Org. Biomol. Chem. 1 (2003), S. 4064–4072
- [114] MAGDO, I.; NEMETH, K.; MARK, F.; HILDEBRANDT, P.; SCHAFFNER, K.: Calculation of Vibrational Spectra of Linear Tetrapyrroles. 1. Global Sets of Scaling Factors for Force Fields Derived by ab Initio and Density Functional Theory Methods. In: J. Phys. Chem. A 103 (1999), S. 289–303
- [115] MAGNUSON, A.; ROVA, M.; MAMEDOV, F.; FREDRIKSSON, P.O.; STYRING, S.: The role of cytochrome b₅₅₉ and tyrosine_D in protection against photoinhibition during in vivo photoactivation of Photosystem II. In: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1411 (1999), S. 180–191
- [116] MALKIN, R.; BEARDEN, A.J.: Laser-flash-activated electron paramagnetic resonance studies of primary photochemical reactions in chloroplasts. In: *Biochim. Biophys. Acta* 396 (1975), S. 250–259
- [117] MATHIS, P.; VERMEGLIO, A.: Transitory forms of carotenoids: triplet state and radical cation. In: Photochem. Photobiol. 15 (1972), S. 157–164
- [118] MATHIS, P. ; VERMEGLIO, A.: Chlorophyll radical cation in photosystem II of chloroplasts. Millisecond decay at low temperature. In: Biochim. Biophys. Acta 396 (1975), S. 371–381
- [119] MELIS, A.: Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? In: Trends Plant Sci. 4 (1999), S. 130–135
- [120] MEYER, T.J.; HUYNH, M.H.; THORP, H.H.: The Possible Role of Proton-Coupled Electron Transfer (PCET) in Water Oxidation by Photosystem II. In: Angew. Chem. Int. Ed. 46 (2007), S. 5284–5304
- [121] MÜH, F.; ZOUNI, A.: Extinction coefficients and critical solubilisation concentrations of photosystems I and II from Thermosynechococcus elongatus. In: Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1708 (2005), S. 219–228
- [122] MI, D.; CHEN, M.; LIN, S.; LINCE, M.; LARKUM, A.W.D.; BLANKENSHIP, R.E.: Excitation dynamics in the core antenna in the photosystem I reaction center of the chlorophyll *d*-containing photosynthetic prokaryote *Acaryochloris* marina. In: J. Phys. Chem. B 107 (2003), S. 1452–1457
- [123] MILLER, A.F.; BRUDVIG, G.W.: A guide to electron paramagnetic resonance spectroscopy of Photosystem II membranes. In: Biochim. Biophys. Acta 1056 (1991), S. 1–18

- [124] MILOSLAVINA, Y. ; SZCZEPANIAK, M. ; MÜLLER, M.G. ; SANDER, J. ; NOWACZYK, M. ; RÖGNER, M. ; HOLZWARTH, A.R.: Charge Separation Kinetics in Intact Photosystem II Core Particles Is Trap-Limited. A Picosecond Fluorescence Study. In: *Biochemistry* 45 (2006), S. 2436–2442
- [125] MINO, H.; KAWAMORI, A.; AOYAMA, D.; TOMO, T.; IWAKI, M.; ITOH, S.: Proton ENDOR study of the primary donor P740⁺, a special pair of chlorophyll d in photosystem I reaction center of Acaryochloris marina. In: Chem. Phys. Lett. 411 (2005), S. 262–266
- [126] MIYASHITA, H.; IKEMOTO, H.; KURANO, N.; ADACHI, K.; CHIHARA, M.; MIYACHI, S.: Chlorophyll d as a major pigment. In: Nature 383 (1996), S. 402
- [127] MOSER, C.C.; DUTTON, P.L.: Application of Marcus Theory to Photosystem I Electron Transfer. In: Advances in Photosynthesis and Respiration 24 (2006), S. 583–594
- [128] MOSER, C.C. ; KESKE, J.M. ; WARNCKE, K. ; FARID, R.S. ; DUTTON, P.L.: Nature of biological electron transfer. In: Nature 355 (1992), S. 796–802
- [129] MROGINSKI, M.A.; KNEIP, C.; HILDEBRANDT, P.; MARK, F.: Excited state geometry calculations and the resonance Raman spectrum of hexamethylpyrromethene. In: J. Mol. Struct. 661 (2003), S. 611–624
- [130] MROGINSKI, M.A.; MURGIDA, D.H.; HILDEBRANDT, P.: Calculation of Vibrational Spectra of Linear Tetrapyrroles. 4. Methine Bridge C-H Out-of-Plane Modes. In: J. Phys. Chem. A 110 (2006), S. 10564–10574
- [131] NOGUCHI, T. ; INOUE, Y. ; TANG, X.S.: Structural Coupling between the Oxygen-Evolving Mn Cluster and a Tyrosine Residue in Photosystem II As Revealed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: *Biochemistry* 36 (1997), S. 14705–14711
- [132] NOGUCHI, T. ; MITSUKA, T. ; INOUE, Y.: Infrared spectrum of the radical cation of β-carotene photoinduced in photosystem II. In: FEBS Lett. 356 (1994), S. 179–182
- [133] NUGENT, J.H.; MUHIUDDIN, I.P.; EVANS, M.C.: Electron transfer from the water oxidizing complex at cryogenic temperatures: the S₁ to S₂ step. In: *Biochemistry* 41 (2002), S. 4117–4126
- [134] OKUBO, T.; TOMO, T.; SUGIURA, M.; NOGUCHI, T.: Perturbation of the Structure of P680 and the Charge Distribution on Its Radical Cation in Isolated Reaction Center Complexes of Photosystem II as Revealed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: *Biochemistry* 46 (2007), S. 4390–4397
- [135] OTTE, S.C.M.; Vos, R. Van d.; GORKOM, H.J. van: Steady state spectroscopy at 6 K of the isolated photosystem II reaction centre: analysis of the red absorption band. In: J. Photochem. Photobiol., B 15 (1992), S. 5–14
- [136] PARRETT, K.G.; MEHARI, T.; WARREN, P.G.; GOLBECK, J.H.: Purification and properties of the intact P-700 and F_x-containing Photosystem I core protein. In: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 973 (1989), S. 324–332
- [137] PETICOLAS, W.L.; RUSH III, T.: Ab initio calculations of the ultraviolet resonance Raman spectra of uracil. In: J. Comput. Chem. 16 (1995), S. 1261–1270
- [138] PLACZEK, G.: Rayleigh-Streuung und Raman-Effekt. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1934
- [139] PROKHORENKO, V.I.; HOLZWARTH, A.R.: Primary Processes and Structure of the Photosystem II Reaction Center: A Photon Echo Study. In: J. Phys. Chem. B 104 (2000), S. 11563–11578
- [140] RAPPAPORT, F. ; DINER, B.A.: Primary photochemistry and energetics leading to the oxidation of the (Mn)4Ca cluster and to the evolution of molecular oxygen in Photosystem II. In: *Coord. Chem. Rev.* 252 (2008), S. 259–272
- [141] RAPPAPORT, F. ; GUERGOVA-KURAS, M. ; NIXON, P.J. ; DINER, B.A. ; LAVERGNEP, J.: Kinetics and Pathways of Charge Recombination in Photosystem II. In: *Biochemistry* 41 (2002), S. 8518–8527
- [142] RASTOGI, V.K. ; GIRVIN, M.E.: Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. In: Nature 402 (1999), S. 263–268

- [143] RASZEWSKI, G. ; DINER, B.A. ; SCHLODDER, E. ; RENGER, T.: Spectroscopic properties of reaction center pigments in photosystem II core complexes: revision of the multimer model. In: *Biophys. J.* 95 (2008), S. 105–119
- [144] RASZEWSKI, G.; RENGER, T.: Light harvesting in photosystem II core complexes is limited by the transfer to the trap: can the core complex turn into a photoprotective mode? In: J. Am. Chem. Soc. 130 (2008), S. 4431–4446
- [145] RASZEWSKI, G. ; SAENGER, W. ; RENGER, T.: Theory of optical spectra of photosystem II reaction centers: location of the triplet state and the identity of the primary electron donor. In: *Biophys. J.* 88 (2005), S. 986–998
- [146] REINMAN, S. ; MATHIS, P.: Influence of temperature on photosystem II electron transfer reactions. In: Biochim. Biophys. Acta 635 (1981), S. 249–258
- [147] REN, Y.; ZHANG, C.; BAO, H.; SHEN, J.; ZHAO, J.: Probing tyrosine Z oxidation in photosystem II core complex isolated from spinach by EPR at liquid helium temperatures. In: *Photosynth. Res.* 99 (2009), S. 127–138
- [148] RENGER, G. ; RENGER, T.: Photosystem II: the machinery of photosynthetic water splitting. In: Photosynt. Res. 98 (2008), S. 53–80
- [149] RENGER, T.; MARCUS, R.A.: Photophysical properties of PS-2 reaction centers and a discrepancy in exciton relaxation times. In: J. Phys. Chem. B 106 (2002), S. 1809–1819
- [150] REQUENA, A.; CERÓN-CARRASCO, J.P.; BASTIDA, A.; ZÚÑIGA, J.; MIGUEL, B.: A Density Functional Theory Study of the Structure and Vibrational Spectra of β-Carotene, Capsanthin, and Capsorubin. In: J. Phys. Chem. A 112 (2008), S. 4815–4825
- [151] RIGBY, S.E.J.; NUGENT, J.H.A.; O'MALLEY, P.J.: ENDOR and special triple resonance studies of chlorophyll cation radicals in photosystem 2. In: *Biochemistry* 33 (1994), S. 10043–10050
- [152] RUSH III, T. ; PETICOLAS, W.L.: Ab Initio Transform Calculation of Resonance Raman Spectra of Uracil, 1-Methyluracil, and 5-Methyluracil. In: J. Phys. Chem. 99 (1995), S. 14647–14658
- [153] RUTHERFORD, A.W.: Photosystem II, the water-splitting enzyme. In: Trends Biochem. Sci. 14 (1989), S. 227–232
- [154] RUTHERFORD, A.W.; BOUSSAC, A.; FALLER, P.: The stable tyrosyl radical in Photosystem II: why D? In: Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1655 (2004), S. 222–230
- [155] RUTHERFORD, A.W.; ZIMMERMANN, J.L.: A new EPR signal attributed to the primary plastosemiquinone acceptor in Photosystem II. In: *Biochim. Biophys. Acta* 767 (1984), S. 168–175
- [156] SANAKIS, Y. ; PETROULEAS, V. ; DINER, B.A.: Cyanide binding at the non-heme Fe^{2+} of the iron-quinone complex of photosystem II: at high concentrations, cyanide converts the Fe^{2+} from high (S = 2) to low (S = 0) spin. In: *Biochemistry* 33 (1994), S. 9922–9928
- [157] SANTABARBARA, S.; CHEN, M.; LARKUM, A.W.D.; EVANS, M.C.W.: An electron paramagnetic resonance investigation of the electron transfer reactions in the chlorophyll *d* containing photosystem I of *Acaryochloris marina*. In: *FEBS Lett.* 581 (2007), S. 1567–1571
- [158] SAVIKHIN, S. ; XU, W. ; MARTINSSON, P. ; CHITNIS, P.R. ; STRUVE, W.S.: Kinetics of Charge Separation and $A_0^- \rightarrow A_1$ Electron Transfer in Photosystem I Reaction Centers. In: *Biochemistry* 40 (2001), S. 9282–9290
- [159] SCHENCK, C.C.; DINER, B.; MATHIS, P.; SATOH, K.: Flash-induced carotenoid radical cation formation in photosystem II. In: *Biochim. Biophys. Acta* 680 (1982), S. 216–227
- [160] SCHILLER, H. ; SENGER, H. ; MIYASHITA, H. ; MIYACHI, S. ; DAU, H.: Light-harvesting in Acaryochloris marina spectroscopic characterization of a chlorophyll d-dominated photosynthetic antenna system. In: FEBS Lett. 410 (1997), S. 433–436
- [161] SCHLÜCKER, S.; SZEGHALMI, A.; SCHMITT, M.; POPP, J.; KIEFER, W.: Density functional and vibrational spectroscopic analysis of β-carotene. In: J. Raman Spectrosc. 34 (2003), S. 413–419

- [162] SCHLODDER, E.: Temperature Dependence of the Reduction Kinetics of P680⁺ in Oxygen-Evolving PS II Complexes Throughout the Range from 320 to SI80K. In: *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis Research 2007* Springer Verlag, 2008, S. 187–190
- [163] SCHLODDER, E. ; ÇETIN, M. ; ECKERT, H.J. ; SCHMITT, F.J. ; BARBER, J. ; TELFER, A.: Both chlorophylls a and d are essential for the photochemistry in photosystem II of the cyanobacteria, Acaryochloris marina. In: Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1767 (2007), S. 589–595
- [164] SCHLODDER, E. ; FALKENBERG, K. ; GERGELEIT, M. ; BRETTEL, K.: Temperature dependence of forward and reverse electron transfer from A₁⁻, the reduced secondary electron acceptor in photosystem I. In: *Biochemistry* 37 (1998), S. 9466–9476
- [165] SCHLODDER, E. ; PAUL, A. ; ÇETIN, M.: Triplet states in photosystem I complexes from Synechococcus elongatus. In: Proceedings of the 12th International Congress on Photosynthesis. CSIRO Publishing: Melbourne, Australia. www. publishcsiro. au/ps2001; contribution S Bd. 6, 2001
- [166] SCHWEITZER, R.H.; BRUDVIG, G.W.: Fluorescence Quenching by Chlorophyll Cations in Photosystem II. In: Biochemistry 36 (1997), S. 11351–11359
- [167] SENGE, M.O.; HOPE, H.; SMITH, K.M.: Structure and conformation of photosynthetic pigments and related compounds 3. Crystal structure of β-carotene. In: Z. Naturforsch., C 47 (1992), S. 474–476
- [168] SERRE, L. ; VELLIEUX, F.M.D. ; MEDINA, M. ; GOMEZ-MORENO, C. ; FONTECILLA-CAMPS, J.C. ; FREY, M.: X-ray Structure of the Ferredoxin : NADP⁺ Reductase from the Cyanobacterium Anabaena PCC 7119 at 1.8Å Resolution, and Crystallographic Studies of NADP⁺ Binding at 2.25Å Resolution. In: J. Mol. Biol. 263 (1996), S. 20–39
- [169] SHIGEMORI, K. ; HARA, H. ; KAWAMORI, A. ; AKABORI, K.: Determination of distances from tyrosine D to Q_A and chlorophyll_Z in photosystem II studied by '2+1' pulsed EPR. In: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1363 (1998), S. 187–198
- [170] SIVAKUMAR, V. ; WANG, R. ; HASTINGS, G.: Photo-oxidation of P740, the primary electron donor in photosystem I from Acaryochloris marina. In: Biophys. J. 85 (2003), S. 3162–3172
- [171] SMIT, K.H.: Quantenmechanische Berechnung der Normalschwingungen von Tetrapyrrol-Chromophoren, Gesamthochschule Duisburg, Doktorarbeit, 1992
- [172] SPIRO, T.G.; STEIN, P.: Resonance effects in vibrational scattering from complex molecules. In: Annu. Rev. Phys. Chem. 28 (1977), S. 501–521
- [173] STEPHENS, P.J.; DEVLIN, F.J.; CHABALOWSKI, C.F.; FRISCH, M.J.: Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. In: J. Phys. Chem. 98 (1994), S. 11623–11627
- [174] STEWART, D.H.; BRUDVIG, G.W.: Cytochrome b₅₅₉ of photosystem II. In: Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1367 (1998), S. 63–87
- [175] STIEHL, H.H.; WITT, H.T.: Quantitative treatment of the function of plastoquinone in phostosynthesis. In: Z. Naturforsch., B 24 (1969), S. 1588–1598
- [176] STYRING, S.; RUTHERFORD, A.W.: Deactivation kinetics and temperature dependence of the S-state transitions in the oxygen-evolving system of photosystem II measured by EPR spectroscopy. In: *Biochim. Biophys. Acta* 933 (1988), S. 378–387
- [177] SUNDBY, C. ; MCCAFFERY, S. ; ANDERSON, J.M.: Turnover of the photosystem II D1 protein in higher plants under photoinhibitory and nonphotoinhibitory irradiance. In: J. Biol. Chem. 268 (1993), S. 25476-25482
- [178] SWINGLEY, W.D.; HOHMANN-MARRIOTT, M.F.; LE OLSON, T.; BLANKENSHIP, R.E.: Effect of Iron on Growth and Ultrastructure of Acaryochloris marina. In: Appl. Environ. Microbiol. 71 (2005), S. 8606–8610
- [179] SZCZESNIAK, M.M.; SCHEINER, S.: Effects of external ions on the dynamics of proton transfer across a hydrogen bond. In: J. Phys. Chem. 89 (1985), S. 1835–1840
- [180] TELFER, A.: What is β-carotene doing in the photosystem II reaction centre? In: Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 357 (2002), S. 1431–1440
- [181] TELFER, A.; FROLOV, D.; BARBER, J.; ROBERT, B.; PASCAL, A.: Oxidation of the two β-carotene molecules in the photosystem II reaction center. In: *Biochemistry* 42 (2003), S. 1008–1015
- [182] TELFER, A.; LENDZIAN, F.; SCHLODDER, E.; BARBER, J.; LUBITZ, W.: ENDOR and transient absorption studies of P680⁺ and other cation radicals in PS II reaction centers before and after inactivation of secondary electron donors. In: Photosynthesis Mechanisms and Effects 2 (1998), S. 1061–1064
- [183] TOMMOS, C. ; BABCOCK, G.T.: Oxygen production in nature: a light-driven metalloradical enzyme process. In: Acc. Chem. Res. 31 (1998), S. 18–25
- [184] TOMMOS, C.; BABCOCK, G.T.: Proton and hydrogen currents in photosynthetic water oxidation. In: Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1458 (2000), S. 199–219
- [185] TOMMOS, C. ; TANG, X.S. ; WARNCKE, K. ; HOGANSON, C.W. ; STYRING, S. ; MCCRACKEN, J. ; DINER, B.A. ; BABCOCK, G.T.: Spin-density distribution, conformation, and hydrogen bonding of the redox-active tyrosine Y_Z in photosystem II from multiple-electron magnetic-resonance spectroscopies: implications for photosynthetic oxygen evolution. In: J. Am. Chem. Soc. 117 (1995), S. 10325–10335
- [186] TOMO, T.; KATO, Y.; SUZUKI, T.; AKIMOTO, S.; OKUBO, T.; NOGUCHI, T.; HASEGAWA, K.; TSUCHIYA, T.; TANAKA, K.; FUKUYA, M. u.a.: Characterization of Highly Purified Photosystem I Complexes from the Chlorophyll d-dominated Cyanobacterium Acaryochloris marina MBIC 11017. In: J. Biol. Chem. 283 (2008), S. 18198–18209
- [187] TOMO, T. ; MIMURO, M. ; IWAKI, M. ; KOBAYASHI, M. ; ITOH, S. ; SATOH, K.: Topology of pigments in the isolated photosystem II reaction center studied by selective extraction. In: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1321 (1997), S. 21–30
- [188] TOMO, T. ; OKUBO, T. ; AKIMOTO, S. ; YOKONO, M. ; MIYASHITA, H. ; TSUCHIYA, T. ; NOGUCHI, T. ; MIMURO, M.: Identification of the special pair of photosystem II in a chlorophyll d-dominated cyanobacterium. In: Proc. Natl. Acad. Sci. 104 (2007), S. 7283–7288
- [189] TRACEWELL, C.A.; BRUDVIG, G.W.: Two Redox-Active β-Carotene Molecules in Photosystem II. In: Biochemistry 42 (2003), S. 9127–9136
- [190] TRACEWELL, C.A.; CUA, A.; STEWART, D.H.; BOCIAN, D.F.; BRUDVIG, G.W.: Characterization of Carotenoid and Chlorophyll Photooxidation in Photosystem II. In: *Biochemistry* 40 (2001), S. 193–203
- [191] TRINKUNAS, G. ; HOLZWARTH, AR: Kinetic modeling of exciton migration in photosynthetic systems. 3. application of genetic algorithms to simulations of excitation dynamics in three-dimensional photosystem I core antenna/reaction center complexes. In: *Biophys. J.* 71 (1996), S. 351–364
- [192] VAN DORSSEN, R.J.; BRETON, J.; PLIJTER, J.J.; SATOH, K.; VAN GORKOM, H.J.; AMESZ, J.: Spectroscopic properties of the reaction center and of the 47 kDa chlorophyll protein of photosystem II. In: *Biochim. Biophys. Acta* 893 (1987), S. 267–274
- [193] VAN GORKOM, H.J.: Identification of the reduced primary electron acceptor of photosystem II as a bound semiquinone anion. In: *Biochim. Biophys. Acta* 347 (1974), S. 417–438
- [194] VASIL'EV, S. ; BRUDVIG, G.W. ; BRUCE, D.: The X-ray structure of photosystem II reveals a novel electron transport pathway between P680, cytochrome b₅₅₉ and the energy-quenching cation, Chl⁺_Z. In: FEBS Lett. 543 (2003), S. 159–163
- [195] VIGNAIS, P.M.; BILLOUD, B.: Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. In: Chem. Rev. 107 (2007), S. 4206–4272
- [196] VISSER, J.W.M.; RIJGERSBERG, C.P.; GAST, P.: Photooxidation of chlorophyll in spinach chloroplasts between 10 and 180 K. In: Biochim. Biophys. Acta 460 (1977), S. 36–46

- [197] VRETTOS, J.S.; STEWART, D.H.; PAULA, J.C. de; BRUDVIG, G.W.: Low-temperature optical and resonance Raman spectra of a carotenoid cation radical in photosystem II. In: J. Phys. Chem. B 103 (1999), S. 6403–6406
- [198] WARSHEL, A. ; DAUBER, P.: Calculations of resonance Raman spectra of conjugated molecules. In: J. Chem. Phys. 66 (1977), S. 5477–5488
- [199] WILKENS, S. ; BORCHARDT, D. ; WEBER, J. ; SENIOR, A.E.: Structural Characterization of the Interaction of the δ and α Subunits of the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP Synthase by NMR Spectroscopy. In: *Biochemistry* 44 (2005), S. 11786–11794
- [200] WITT, H.; BORDIGNON, E.; CARBONERA, D.; DEKKER, J.P.; KARAPETYAN, N.; TEUTLOFF, C.; WEBBER, A.; LUBITZ, W.; SCHLODDER, E.: Species-specific differences of the spectroscopic properties of P700: analysis of the influence of non-conserved amino acid residues by site-directed mutagenesis of photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*. In: J. Biol. Chem. 278 (2003), S. 46760–46771
- [201] WITT, H.; SCHLODDER, E.; TEUTLOFF, C.; NIKLAS, J.; BORDIGNON, E.; CARBONERA, D.; KOHLER, S.; LABAHN, A.; LUBITZ, W.: Hydrogen Bonding to P700: Site-Directed Mutagenesis of Threonine A739 of Photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Biochemistry* 41 (2002), S. 8557–8569
- [202] WYDRZYNSKI, T.J. (Hrsg.); SATOH, K. (Hrsg.): Photosystem II: The light-driven water: plastoquinone oxidoreductase. Springer Berlin Heidelberg New York, 2005
- [203] ZHANG, C. ; BOUSSAC, A. ; RUTHERFORD, A.W.: Low-Temperature Electron Transfer in Photosystem II: A Tyrosyl Radical and Semiquinone Charge Pair. In: *Biochemistry* 43 (2004), S. 13787–13795
- [204] ZHANG, C. ; STYRING, S.: Formation of Split Electron Paramagnetic Resonance Signals in Photosystem II Suggests That Tyrosine_Z Can Be Photooxidized at 5 K in the S₀ and S₁ States of the Oxygen-Evolving Complex. In: *Biochemistry* 42 (2003), S. 8066–8076

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Eberhard Schlodder, für die stete Diskussionsbereitschaft, die sehr gute Betreuung und für das Eröffnen immer neuer Gesichtspunkte bei der Auswertung und der Durchführung der Experimente. Prof. Dr. Peter Hildebrandt danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens und die sehr gute Betreuung. Für die schnelle und unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. Thomas Renger bedanken. Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung und die große Hilfsbereitschaft der Menschen im Max-Volmer-Laboratorium nicht möglich gewesen. Mein Dank gilt:

Marianne Çetin und Heidemarie Pannier für viele Gespräche, spannende Messungen und dass auch Praktikumsbetreuung eine reine Freude sein kann. Den *EPR-experts* Dr. Friedhelm Lendzian und Dr. Miguel Saggu. Dr. David von Stetten, Francisco Velázquez Escobar, Khoa Ly und Mina Günther für die Unterstützung bei den Raman-Experimenten. Prof. Dr. Maria Andrea Mroginski, Steve Kaminski und Tillmann Utesch für die Hilfe bei den Berechnungen und Softwareproblemen. Dem kompletten ersten Stock mit Prof. Dr. Athina Zouni, Dr. Jan Kern, Dr. Frank Müh, Dr. Joachim Frank, Dörte DiFiore, Matthias Broser, Carina Glöckner und Julia Hellmich für die Versorgung mit Proben und ihre Hilfsbereitschaft.

Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei den Untersuchungen der Raman-Spektren β -Carotins danke ich Prof. Dr. Christian Thomsen, Norman Tschirner und Katharina Brose.

Für eine tolle Zeit und den einen oder anderen Blick über den Tellerrand der physikalischen Chemie möchte ich Dr. Martin Lichtenheldt und Stefan Kißner danken.

Nicht nur für die Unterstützung auf Arbeit auch für die Motivation und den Rückhalt durch meine Engel Karina, Tim und Mia, meine Eltern Bernd und Heidrun, meine Geschwister Katja, Michael und Thomas und meine Schwiegereltern Eva-Marie und Hans-Peter möchte ich mich bedanken.