



Zeitaufgelöste Blitzlichtspektroskopie der Ladungstrennung und -rekombination im photosynthetischen Reaktionszentrum

Evelyne Hamacher, Stefan Gryzbek, Christian Fogel, Andreas Barth, Jürgen Maurer, Stand: 30.07.2010

1 Motivation

Viele Reaktionen in biologischen Molekülen verlaufen so schnell, dass sie mit der Aufnahmezeit üblicher Spektrophotometer nicht verfolgt werden können. Die Blitzlichtspektroskopie ist eine Methode, bei der transiente Absorptionsänderungen nach einer photochemischen Anregung mit hoher Empfindlichkeit und Zeitauflösung aufgenommen werden können. Im Versuch charakterisieren Sie mit einem Blitzlichtphotometer die Elektronentransportreaktionen bei den primären Prozessen in der Photosynthese und messen Differenzspektren im Kurzzeitbereich bis zu Mikrosekunden. Sie lernen dabei die Eigenschaften der am Elektronentransfer beteiligten Moleküle kennen und untersuchen die Wirkung von Herbiziden.

2 Grundlagen

2.1 Bakterielle Photosynthese

2.1.1 Überblick

Bei Purpurbakterien befindet sich der Photosyntheseapparat in speziellen, in sich geschlossenen, intracytoplasmatischen Membransystemen, den Chromatophoren. Im ersten Schritt der Photosynthese wird Lichtenergie durch die Lichtsammelkomplexe eingefangen und zum Reaktionszentrum (RC) weitergeleitet. Dort wird die Lichtenergie in räumliche getrennte Ladungen umgewandelt und in dieser Form gespeichert. Dies ist die Voraussetzung für die Umwandlung der eingefangenen Lichtenergie in eine chemisch gebundene, physiologisch verwertbare Form.

2.1.2 Lichtsammelkomplexe

In der Photosynthese wird fast die gesamte Lichtenergie durch **Antennensysteme** eingefangen. Die Photonen werden durch Antennenpigmente absorbiert und in Richtung abnehmender Anregungsenergie durch strahlungslosen Energietransfer ("Förster-Mechanismus", s.u.) über weitere Antennensysteme zum Reaktionszentrum (RC) geleitet; das Reaktionszentrum wirkt hierbei als Energiefalle.

Bei den photosynthetisch aktiven Purpurbakterien, dienen zwei Antennensysteme zum Einfang der Lichtenergie. Sie werden als light harvesting (engl.: ernten) complex I (LHC I) und LHC II, bzw. nach ihren Absorptionsmaxima im nahen Infrarot als B875- und B800-850-Komplex bezeichnet. Beide bestehen bei Purpurbakterien jeweils aus zwei kleinen hydrophoben Proteinuntereinheiten in die die Antennenpigmente (Carotenoide und Bakteriochlorophylle) eingelagert sind.

Der B875-Komplex ist fest mit dem Reaktionszentrum assoziiert und wird in einer festen Stöchiometrie dazu gebunden. Das molare Verhältnis von Reaktionszentrum zu B875-Komplex beträgt ca. 1:12, die genaue Zahl ist jedoch unbekannt. Im Gegensatz zum B875-Komplex kann der B800-850-Komplex je nach Lichtverhältnissen und Wachstumsbedingungen in einer variablen Menge gegenüber dem Reaktionszentrum gebildet werden. Er dient zur Vergrößerung des Einfangquerschnittes für Photonen bei schlechten Lichtverhältnissen.

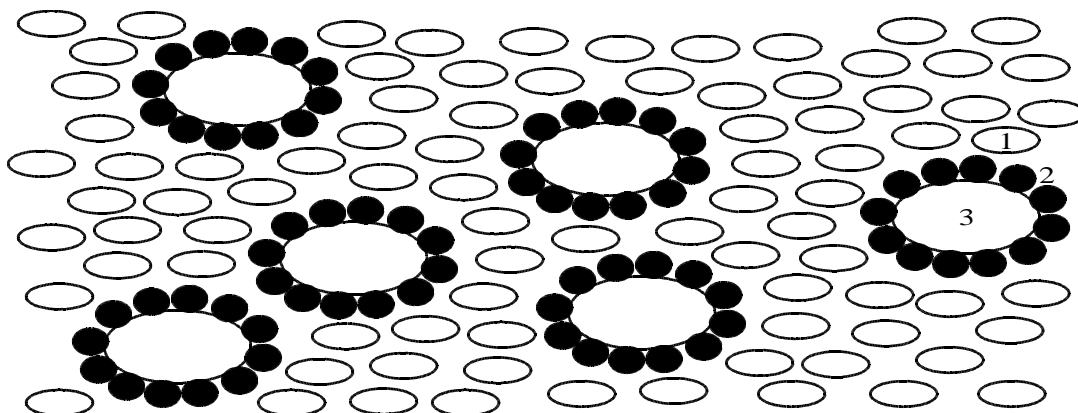


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Anordnung der Antennenkomplexe um das Reaktionszentrum. 1: B800-850-Komplex, 2: B875-Komplex, 3: Reaktionszentrum

Anregungsenergie, die im Reaktionszentrum nicht umgesetzt werden kann, wird durch Fluoreszenz abgestrahlt oder dissipativ abgeleitet, um die Zerstörung von Pigmenten durch photochemische Nebenreaktionen zu verhindern. Fluoreszenz ist somit ein wesentlicher Schutzmechanismus für die Pigmente der Photosynthese.

2.1.3 Weiterleitung der Lichtenergie in den Lichtsammelkomplexen

Bevor ein absorbiertes Lichtquant zum Reaktionszentrum gelangt, wird es im Antennenkomplex von einem Pigment-Molekül zum anderen strahlungslos weitergegeben. Dies lässt sich durch den **Förster-Resonanz-Energietransfer (kurz: FRET)** beschreiben. Eine spezielle Form des FRET, bei dem die beteiligten Moleküle Fluorophore sind, ist der Fluoreszenz-Energietransfer. Da die Wahrscheinlichkeit für den Energietransfer mit R^{-6} vom Abstand R zwischen den Fluorophoren abhängt, wird dieses physikalische Prinzip in der Fluoreszenzspektroskopie oft zur Abstandsbestimmung verwendet (siehe Anhang).

Der Energietransfer zwischen den Antennenpigmenten verläuft von solchen mit hoher Anregungsenergie zu solchen mit niedriger Anregungsenergie. Die Absorptionsspektren der Akzeptoren sind also generell rotverschoben gegenüber denen des Donors. Insbesondere hat das Reaktionszentrum eine besonders niedrige Anregungsenergie. Dies liegt daran, dass der angeregte Donor vor dem Energietransfer in den Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustands S_1 relaxiert. Die Energie, die für den Strahlungstransfer zur Verfügung steht, ist also geringer, als die Energie die der Donor absorbiert hat.

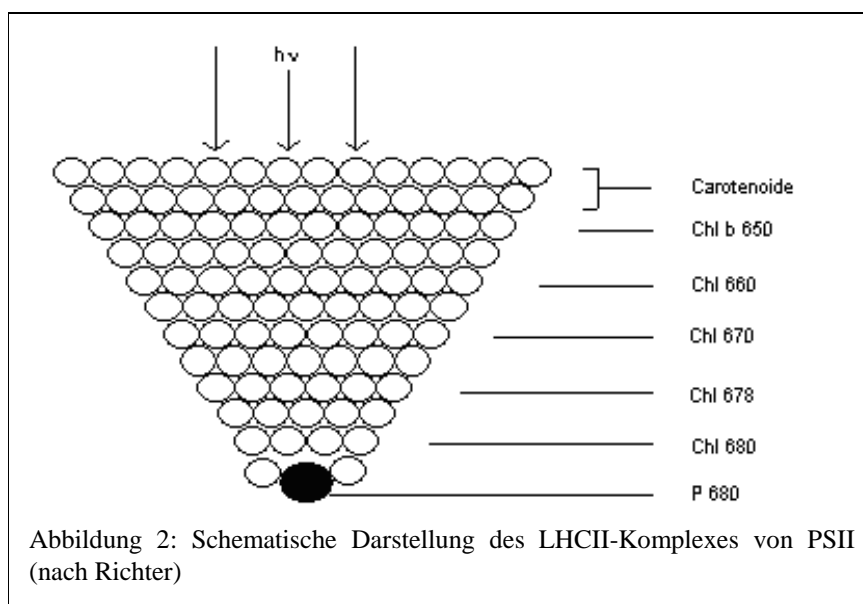


Abbildung 2: Schematische Darstellung des LHCII-Komplexes von PSII (nach Richter)

2.1.4 Das bakterielle Reaktionszentrum

Sehr gut charakterisiert und zum Teil in ihrer atomaren Struktur aufgeklärt sind die Reaktionszentren einiger photosynthetischer Bakterien. Das **Reaktionszentrum** (siehe Abb. 3), ebenfalls ein membranständiger Pigment-Protein-Komplex, wird von den drei Proteinen H, M und L und einer Reihe von Redoxkomponenten gebildet: einem 'special pair' von 2 Bakteriochlorophyll a oder b Molekülen (BChl₂ Dimer), zwei einzelnen Bakteriochlorophyllen a oder b (BChl), Bakteriopheophytin (BPheo), den Chinonmolekülen Q_A und Q_B und einem Eisen (Fe)-Atom. Diese Kofaktoren und Pigmente sind zum Teil aktiv an der Ladungstrennung beteiligt. Die redoxaktiven Kofaktoren bilden eine Elektronentransportkette, mit deren Hilfe senkrecht zur Membranebene Ladungen getrennt werden. An diese Ladungstrennung sind protolytische Reaktionen gekoppelt, die letztendlich zur Synthese von ATP führen, womit die eingefangene Lichtenergie in chemisch gebundene Energie umgewandelt worden ist.

Der **primäre Donor (P)**, ein Bakteriochlorophyll (BChl)-Dimer, wird durch Lichtanregung zu einem starken Reduktionsmittel. Dies hat eine Ladungstrennung zur Folge, die zur Reduktion des primären Akzeptors Q_A, einem Ubi- oder Menachinon, führt. Im Verlauf dieser sehr schnellen Reaktion (Pikosekunden-Bereich) werden der intermediäre Akzeptor I, ein Bakteriopheophytin (BPheo)-Monomer und möglicherweise auch ein akzessorisches BChl (B) kurzzeitig reduziert und wieder oxidiert. Durch die Anordnung der Pigmente im Reaktionszentrum wird eine transmembrane Ladungstrennung erreicht, die die erste, zeitlich stabile Form in der Elektronentransportkette darstellt, da alle weiteren Schritte im Elektronentransport wesentlich langsamer sind. Vom primären Akzeptor Q_A wird das Elektron weiter zum sekundären Akzeptor Q_B, einem Ubichinon, im Zeitbereich von ca. 100 µsec übertragen. In der intakten Membran wird der oxidierte primäre Donor durch ein lösliches Cytochrom c₂, bei manchen Bakterien auch durch eine mit dem Reaktionszentrum fest assoziierte Cytochrom c-Untereinheit, zurückreduziert. Das sekundäre Chinon Q_B ist nach einem zweiten Durchlauf der Reaktionsfolge zweifach reduziert. Es verlässt als elektrisch neutrales Hydrochinon das Reaktionszentrum und gibt seine Elektronen an die sekundäre Elektronentransportkette ab. Die freie Q_B-Bindungsstelle wird wieder durch ein neutrales Chinon besetzt.

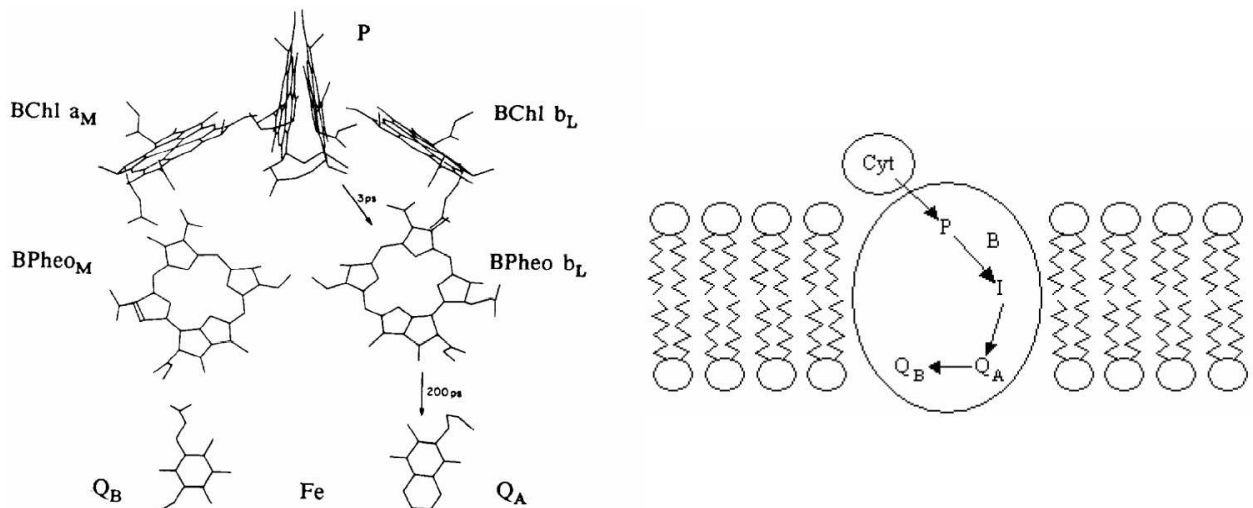
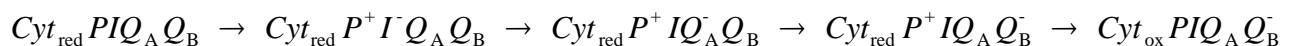
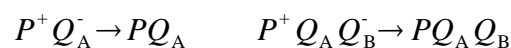


Abbildung 3: **links:** Anordnung der Pigmente im bakteriellen Reaktionszentrum. Der Elektronentransfer findet nur über den rechten Zweig statt. **Rechts:** Schema des Elektronentransfers. Nach neueren Erkenntnissen verläuft der Weg des Elektrons auch über den Bakteriochlorophyllmonomer B.

In zeitlicher Abfolge entstehen während der Ladungstrennung also folgende Zustände im Reaktionszentrum:



Im isolierten Reaktionszentrum fehlt das Cytochrom und die getrennten Ladungen rekombinieren zum Ausgangszustand. Die Ladungsrekombination erfolgt dabei aus dem Zustand P⁺Q_B⁻ mit einer Halbwertszeit von ca. 0.3 s bis 1.5 s, und falls kein Q_B vorhanden ist, aus dem Zustand P⁺Q_A⁻ mit einer Halbwertszeit von ca. 60 ms (die angegebenen Halbwertszeiten beziehen sich auf die vorgestellte Spezies *Rb. capsulatus*).



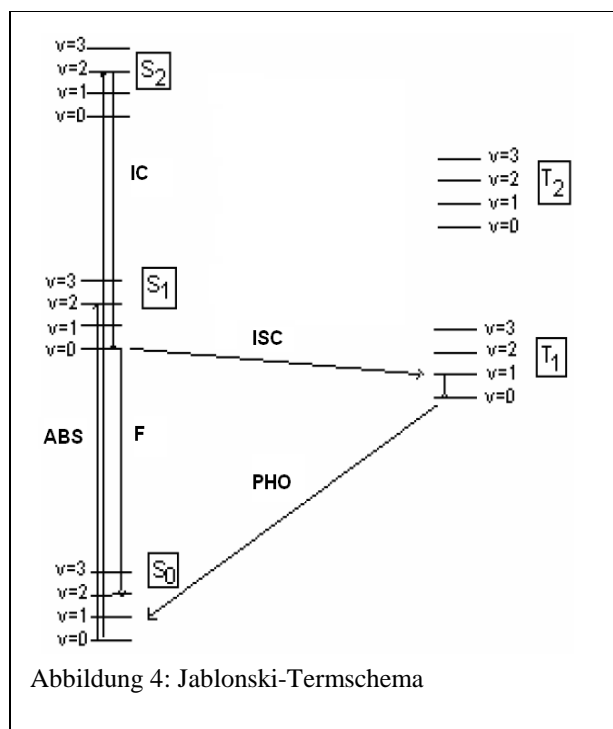
Mit den primären Elektronentransportschritten sind kurzzeitige spektrale Veränderungen im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich, sowie im nahen Infrarot (bis ca. 1000 nm) verbunden. Sie haben ihre Ursache in der

vorübergehenden Bildung der Radikale $(BChl)_2^+$, $BPheo^-$, Q^- , aber auch in der indirekten Einwirkung des elektrischen Feldes auf benachbarte Pigmente ("Elektrochromie-Effekte"). Aus der spektralen Abhängigkeit der lichtinduzierten Änderungen, ihrer Kinetik und ihrem Verhalten gegenüber äußeren Parametern (z.B. Redoxpotential, Hemmstoffe etc.), kann auf die Natur der am Elektronentransport beteiligten Pigmente und den Mechanismus ihrer Reaktionen geschlossen werden.

2.2 Elektronische Übergänge

Wechselwirkung zwischen elektromagnetischen Wellen und Molekülen führt bei der Absorption im Bereich des UV- und sichtbaren Lichtes zur Anregung von Elektronen, im allgemeinen von Valenzelektronen. Trifft Licht mit geeigneter Frequenz ν auf ein Molekül im Grundzustand, kann Absorption erfolgen und das Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand angehoben werden. Die Rückkehr in den Grundzustand kann durch spontane bzw. stimulierte Emission erfolgen. Das Wort "kann" drückt dabei Übergangswahrscheinlichkeiten für die beiden Strahlungsprozesse Absorption und Emission aus.

Die photophysikalischen Prozesse bei elektronischen Übergängen sind im **Jablonski-Termschema** zusammengefasst. Vom Grundzustand, hier S_0 , kommt man durch Absorption in die höheren Singulett-Zustände S_1 , S_2 usw.. Die Rückkehr zu S_0 kann von S_1 und von höheren Singulett-Zuständen S_n aus durch Emission von Strahlung (*Fluoreszenz*) oder durch strahlungslose Desaktivierung (*internal conversion, IC*) erfolgen. Meist erfolgt zunächst eine strahlungslose Relaxation in den Schwingungsgrundzustand von S_1 bevor ein Fluoreszenzphoton emittiert werden kann. Strahlungslose Spin-Umkehrprozesse führen zu Triplett-Zuständen T_n (*Intersystem crossing*), die entgegen dem Spin-Verbot durch Strahlungsemission (*Phosphoreszenz*) oder durch erneutes *Intersystem crossing* nach S_0 zurückkehren können.



Abs = Absorption

F = Fluoreszenz

PHO = Phosphoreszenz

IC = Internal conversion

ISC = Intersystem crossing

$S_{0,1,2,\dots}$: Singulett-Zustände

$T_{0,1,2,\dots}$: Triplett-Zustände

$\nu_{0,1,2,\dots}$: Schwingungszustände

2.3 Lichtabsorption und Spektrum

Fällt ein Lichtstrahl der Intensität I_0 auf ein homogenes, isotropes Medium der Schichtdicke d , dann kann er, abgesehen von Reflexions- und Strahlungsverlusten, durch Absorption geschwächt werden. Für die Intensität des austretenden Strahls gilt dann $I = I_0 - I_{\text{abs}}$. Aus dem differentiellen Ansatz $dI = -\alpha I dx$ für die Abnahme der Intensität dI im Schichtdickenbereich dx erhält man durch Integration: $I = I_0 e^{-\alpha d}$ mit α als substanzspezifischen Absorptionskoeffizienten. Für Lösungen, bei denen ausschließlich der gelöste Stoff der Konzentration c absorbiert, gilt:

$$\ln \frac{I_0}{I} = \alpha \cdot c \cdot d \quad \text{und daraus mit } \varepsilon = 2,303 \cdot \alpha:$$

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Lambert-Beersches Gesetz}$$

A : Absorption (optische Dichte, dimensionslos), c : Konzentration [mol l^{-1}], ε : molarer Extinktionskoeffizient [$\text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$] (korrekterweise sollte man eigentlich vom Absorptionskoeffizienten sprechen, dies hat sich aber bisher nicht durchgesetzt).

Das Lambert-Beersche Gesetz gilt streng genommen nur für paralleles, monochromatisches Licht und verdünnte, homogene Proben. Bestimmt man für alle Wellenlängen λ die Extinktion und daraus die substanzspezifische Größe ε , erhält man eine Absorptionskurve $\varepsilon(\lambda)$ und damit ein Absorptionsspektrum.

Eine Klassifizierung der elektronischen Übergänge lässt sich mit Hilfe der beteiligten Molekülorbitale vornehmen. Aus besetzten bindenden σ - oder π -Orbitalen oder aus nichtbindenden n -Orbitalen (einsame Elektronenpaare) kann ein Elektron in die leeren antibindenden σ^* - oder π^* -Orbitale angehoben werden. Entsprechend werden die elektronischen Übergänge (Banden im Absorptionsspektrum) kurz als $\sigma\sigma^*$, $\pi\pi^*$, $n\pi^*$, $n\sigma^*$ bezeichnet.

Die Lage der Absorptionsbanden hängt von der Natur des elektronischen Übergangs ab. Die $\sigma\sigma^*$ - und $\pi\sigma^*$ -Übergänge sind sehr energiereich, sie spielen *in vivo* bei photosynthetischen Vorgängen und auch in der VIS-Absorptionsspektroskopie keine Rolle, während $n\pi^*$ - und $\pi\pi^*$ -Übergänge für die Photochemie der Pigmente *in vivo* und *in vitro* verantwortlich sind.

Im elektronischen Grundzustand ist praktisch ausschließlich das unterste Schwingungsniveau besetzt ($n = 0$). Beim Übergang nach S_1 erreicht man verschiedene höhere Schwingungsniveaus $v' = 1, 2, 3, \dots$ mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit (Franck-Condon-Prinzip). Dies führt zu einer Feinstruktur im Spektrum des elektronischen Übergangs, die sich bei Raumtemperatur meist in einer Verbreiterung der Absorptionsbande äußert.

2.4 Spektroskopie der photosynthetischen Pigmente im sichtbaren Spektralbereich

Die Spektren der photosynthetischen Porphyrin-Pigmente zeigen im wesentlichen zwei Paare von Übergängen; ein Paar im blauvioletten oder UV-Bereich (Soret-Bande B) und ein Paar im roten oder nahen UV-Bereich (Q-Übergänge). Diese Übergänge können mit einem Vier-Orbital-Modell beschrieben werden; danach erfolgen die vier Übergänge zwischen den beiden obersten gefüllten und den beiden untersten ungefüllten Orbitalen. Bei den ausgedehnten, nahezu ebenen, konjugierten Molekülen wie den Porphyrinpigmenten liegen die Dipolmomente der Übergänge in der Ebene des Moleküls. Zwei von ihnen sind in x -Richtung, zwei in y -Richtung polarisiert, wobei die Polarisationsrichtungen entlang der beiden Moleküldiagonalen durch die N-Atome des Porphingerüsts verlaufen und die längerwelligen Übergänge als y -Übergänge bezeichnet werden. Der Q_y -Übergang entspricht damit einem S_0 - S_1 -Übergang, der Q_x -Übergang einem höherenergetischen S_0 - S_2 -Übergang. Der Q_x -Übergang ist ein Übergang relativ geringer Intensität, da er aus Symmetriegründen nur schwach erlaubt ist. Q_x - und Q_y -Bande zeigen im Absorptionsspektrum Schwingungsfeinstruktur.

Die B-Übergänge der Soret-Region sind weniger gut aufgelöst als die Q-Übergänge. Die B_x - und B_y -Bande bilden zusammen die Soret-Bande; auf der Seite zu kleineren Wellenlängen ist eine kleine Schulter, die η -Bande zu erkennen; sie wird einem weiteren $\pi\pi^*$ -Übergang zugeordnet.

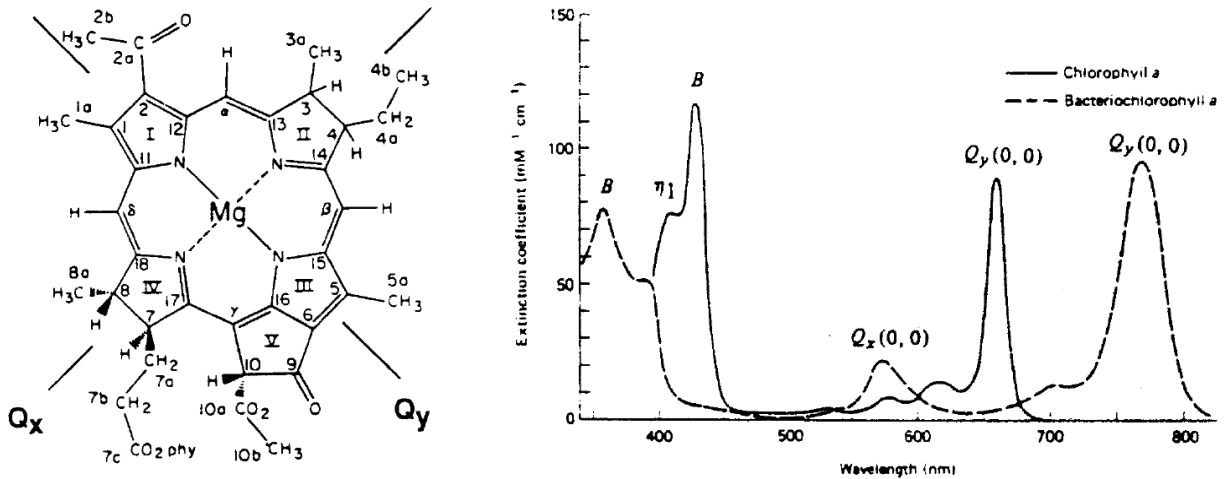


Abbildung 5: links: Strukturformel von BChl a , rechts: Absorptionsspektren von BChl a und Chl a in Äther

Insgesamt ergibt sich für das Reaktionszentrum folgendes Spektrum:

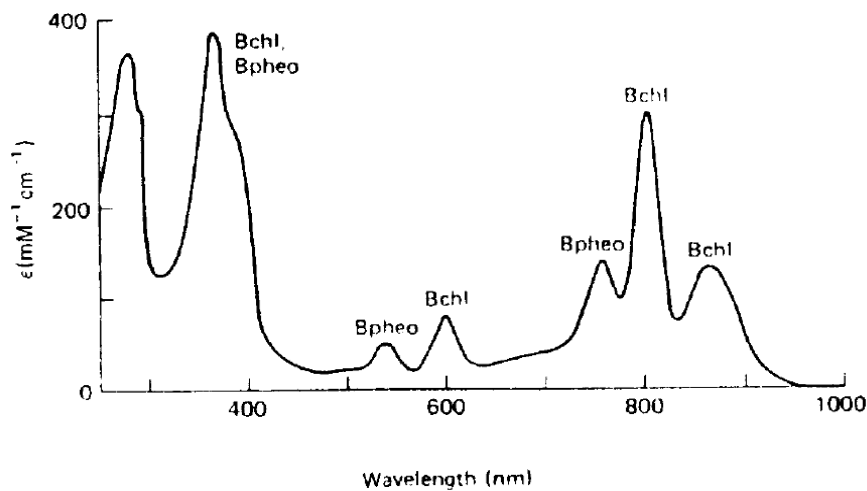


Abbildung 6: Absorptionsspektrum des bakteriellen Reaktionszentrums einer carotenoidfreien Mutante von *Rb.sphaeroides*

3 Quellen und Literatur

- D. Holten et al. (1978) Primary photochemical processes in isolated reaction centers of *Rp. viridis*; *Biochim Biophys. Acta* 501, S. 112-126
- R.K. Clayton (1980) *Photosynthesis: Physical mechanisms and chemical pattern*; Cambridge University Press, Kapitel 5.1 und 8.1
- W.W. Parson (1982) Photosynthetic bacterial reaction center; *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 11, 57-80
- D.-P.Häder, M.Tevini (1985) *Allgemeine Photobiologie*; G.Thieme-Verlag Stuttgart
- G.Drews, J.Oelze (1986) Photosynthese bei phototrophen Bakterien; *BIUZ* 4 113-123
- D.C. Youvan, B.L. Marss (1987) Molekulare Mechanismen der bakteriellen Photosynthese, *Spektrum der Wissenschaft*, August 1987, S. 62-68
- H.-J.Galla (1988), *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*; G.Thieme-Verlag Stuttgart
- W.Mäntele (1990) *Photosynthese; Biologie in unserer Zeit* 2 85-93

4 Vorbereitung auf den Versuch

Elektromagnetisches Spektrum (UV, sichtbarer Spektralbereich, nahes Infrarot), Absorption, Lambert-Beersches Gesetz, Absorptionsspektrum, Reaktionskinetik (Reaktion erster Ordnung), Zeitkonstante, Halbwertszeit, Reduktion, Oxidation, Radikal, (Bakterio-) Chlorophyll / Pheophytin.

5 Versuchsaufbau

Eine gebräuchliche Messmethode zur Erfassung kurzzeitiger spektraler Änderungen, ist die Blitzlichtphotometrie. In den durchzuführenden Experimenten wird sie zur Messung der Absorptionsänderungen, die beim Elektronentransport im Reaktionszentrum stattfinden, verwendet. Mit der verwendeten Apparatur sind allerdings die sehr schnellen Vorgänge der Ladungstrennung (Halbwertszeiten im Piko- und Sub-Mikrosekundenbereich) nicht messbar. Beobachtet werden können jedoch die Prozesse der Ladungsrekombination.

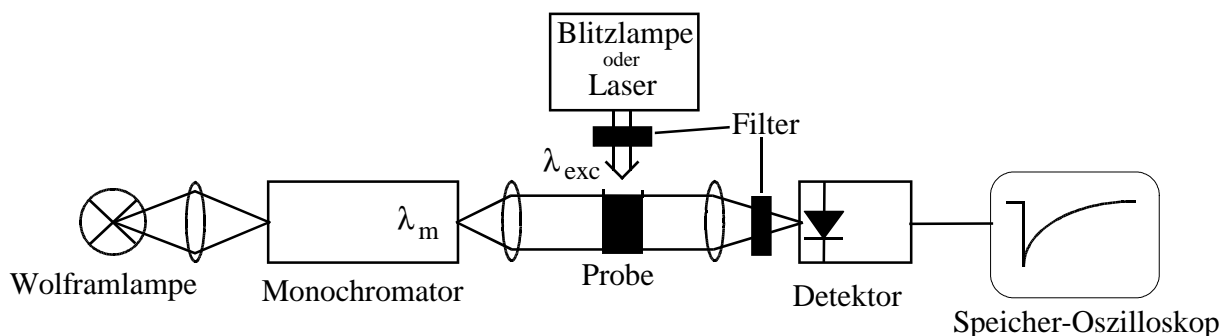


Abbildung 7: Versuchsaufbau

Licht von einer Wolframlampe wird in einem Monochromator spektral zerlegt (λ_m) und auf die Probe abgebildet. Der Anteil, der die Probe durchsetzt (I_1), wird in einem Detektor in einen Strom umgewandelt, der der Lichtintensität I proportional ist. Mit einer kurzen, intensiven Zusatzbeleuchtung (Laserblitz, Fotoblitz oder Lampe mit Fotoverschluss) bei einer geeigneten Anregungswellenlänge λ_{exc} (bzw. in einem geeigneten Wellenlängenbereich) wird der Elektronentransport angeregt. Die durch ihn hervorgerufenen Absorptionsänderungen ΔA werden bei der Messlichtwellenlänge λ_m als Intensitätsänderungen ΔI vom Detektor registriert. Durch optische Filter werden Anregungs- und Messlichtwellenlänge voneinander getrennt, so dass der Detektor kein Anregungslicht registriert. Das Detektorsignal wird verstärkt und mit einem Speicheroszilloskop aufgezeichnet. Für kleine Intensitätsänderungen ΔI besteht ein linearer Zusammenhang mit der Absorptions- (ΔA) bzw. Konzentrationsänderung Δc , d.h. $\Delta I \sim \Delta A \sim \Delta c$, wobei Δc für die durch die Zusatzbelichtung erzeugte Konzentrationsänderung steht.

6 Versuchsdurchführung

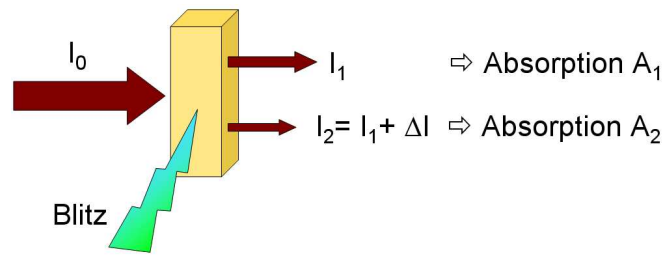
Für die Messungen zur Ladungsrekombination werden Membranen von Mutanten des Purpurbakteriums *Rhodobacter capsulatus* oder *Rhodobacter sphaeroides* verwendet. In diesen Mutanten befindet sich als photosynthetischer Komplex **nur** das Reaktionszentrum in den Membranen.

Aufgaben:

- a) Messung der Transmissionsspektren der beim Versuch verwendeten Filter.
- b) Messung des Absorptionsspektrums von RC (in 100 mM Phosphatpuffer pH 7, 0,02 % LDAO).
 - 1.) Puffer mit Referenz Luft
 - 2.) Reaktionszentrum mit Referenz Luft
 - 3.) Reaktionszentrum mit Referenz Puffer

Sie erhalten aus diesen drei Messungen zwei Absorptionsspektren. Berechnen Sie hieraus die RC-Konzentration mit $\epsilon_{770nm} = 10^5 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$. Notieren Sie sich die Positionen der Absorptionsmaxima.

- c) Messung der spektralen Abhängigkeit der Absorptionsänderung ΔA zwischen 700 nm und 1000 nm (Messung der Messlichtintensität und der maximalen blitz-induzierten Änderung kurz nach dem Blitz).



Differenzspektrum: $\Delta A = A_2 - A_1$

Abbildung 8: Prinzip der Messung

Sie werden dabei zwei Parameter messen:

- 1.) Die auf den Detektor vor dem Einblitzen auftreffende Lichtintensität I_1 .
- 2.) Die nach dem Einblitzen auftretende maximale Intensitätsänderung ΔI .

Ein Differenzspektrum erhält man aus der Differenz der Absorptionsspektren nach und vor dem Einblitzen. Hierbei erhalten Sie es aus den beiden gemessenen Parametern I_1 und ΔI .

Machen Sie sich klar, warum das so ist!

Legen Sie eine Tabelle in folgender Form an:

Wellenlänge λ (nm)	Intensität I_1 (V)	maximale Intensitätsänderung ΔI (mV)	Absorptionsänderung $\Delta A = \dots$ (mOD)
700			
710			
·			
·			
·			
1000			

d) Untersuchung der Ladungsrekombinations-Kinetik an der Stelle der maximalen Absorptionsänderung und anschließende Auswertung (Bestimmung der Halbwertszeit).

Nutzen Sie zum Darstellen einer solchen Kinetik möglichst das gesamte Oszilloskop-Display aus. Übertragen Sie dann diese Kinetik vom Oszilloskop an den PC. Hier können Sie die Daten in Form einer csv-Datei abspeichern (erste Spalte: Zeit, zweite Spalte: Spannung) und anschließend z.B. mit Origin auswerten.

Achtung: Beim Übertragen vom Oszilloskop an den PC wird nur das auf dem Oszilloskop dargestellte Bild übertragen (Pixel), die Informationen über die Skalierung der Zeit- bzw. Spannungsachse fehlen. Diese müssen vor der Auswertung erst berechnet werden:

Die Zeitachse ergibt sich durch: "erste Spalte" \cdot 0,04 \cdot (*Tim/Div*)

und die Spannungsachse durch: "zweite Spalte" / 200 \cdot [(*Volts/Pos*) + 4 \cdot (*Volts/Div*)]

Die Informationen über *Time/Div*, *Volts/Div* und *Volts/Pos* sind in jeder csv-Datei enthalten (unten). Sie geben an, welche Skalierung und welchen Offset man bei den Oszi-Einstellungen gewählt hat.

e) Rekonstitution der Q_B -Bindungsstelle mit Ubichinon 0 (UQ_0) (-80°C Truhe, 10 μ l in 1 ml EtOH)

→ Einfluss auf das Differenzspektrum und die Halbwertszeit der Reaktionskinetik.

f) Bestimmung der Wirkung des Herbizids Atraton (5 mM, entspricht 1 mg auf 1 ml EtOH)

→ Einfluss auf die Halbwertszeit der Reaktionskinetik.

7 Auswertung

- Erklären Sie die Absorptionsbanden des Absorptionsspektrums.
- Erklären Sie die Wirkungsweise der optischen Filter.
- Konstruieren Sie aus den zeitabhängigen Signalen bei verschiedenen Wellenlängen ein Differenzspektrum der primären Ladungstrennung $P^+IQ_A^-$
- Bestimmen Sie die Halbwertszeit der Ladungsrekombination mit/ohne Q_B sowie nach Herbizid-Zugabe.
- Erklären Sie die Wirkung der Q_B -sowie der Herbizid-Zugabe.

8 Anhang

Für Physiker und sonstige Interessierte: Nach Förster lässt sich dieser Strahlungstransfer durch den Grenzfall einer sehr schwachen Kopplung zwischen induzierten Dipolen beschreiben (\rightarrow Rechnung wird mit den unabhängigen Molekülwellenfunktionen durchgeführt, die Gesamtwellenfunktion ist der Produktzustand aus Donorwellenfunktion und Akzeptorwellenfunktion, nicht eine Linearkombination, wie im Falle starker Kopplung). Die Wechselwirkung zwischen den induzierten Dipolen lässt sich als Störpotential auffassen. Solche "Störungen" des Hamiltonoperators führen dazu, dass die Energieeigenzustände des ungestörten Hamiltonoperators nicht stationär sind und damit dazu, dass eine gewisse Wahrscheinlichkeit für den Übergang besteht. Somit wird Anregungsenergie vom Donor auf den Akzeptor übertragen.

Wegen der schwachen Kopplung bleibt die Form der Absorptionsspektren unverändert, im Gegensatz zur Excitonen-aufspaltung, die im Grenzfall starker Kopplung ebenfalls zwischen induzierten Dipolen auftritt. In der quantenmechanischen Rechnung ist dann zwar das Störpotential gleich, aber hier ergibt sich die Gesamtwellenfunktion aus einer Linearkombination der beiden Molekülwellenfunktionen.

Zur Ableitung der Transferwahrscheinlichkeit wollen wir Fermis goldene Regel verwenden. Diese besagt, dass die Wahrscheinlichkeit k proportional zum Quadrat des Skalarprodukts $\langle 1|V|0\rangle$. Hierbei sind 0 und 1 der Anfangs- bzw. der Endzustand, V der Operator des Störpotentials V (Kursivschrift deutet Operatoren an). Dieses ergibt sich aufgrund der Dipol-Dipolkopplung zu:

$$V = n - 2(\mu_D \mu_A) / R^3 - 3(\mu_D R)(\mu_A R) / R^5$$

μ sind die Dipolmomente von Donor und Akzeptor, R ist der Abstand zwischen beiden, n der Brechungsindex. Man kann dies vereinfachen, indem alle Effekte der Orientierung in einen Parameter κ gepackt werden. Damit ergibt sich:

$$V = n^2 \kappa \mu_D \mu_A / R^3$$

wobei mit μ hier der Betrag des Dipolmoments gemeint. Jetzt erhalten wir mit Fermis goldener Regel

$$k \sim |\kappa / R^3 \langle \psi_{D0} | \psi_{A1} | \mu_D \mu_A | \psi_{D1} | \psi_{A0} \rangle|^2$$

$|\psi_{D1} \psi_{A0}\rangle$ ist der Ausgangszustand (Donor angeregt, Akzeptor nicht) und $|\psi_{D0} \psi_{A1}\rangle$ der Endzustand (Donor abgeregt, Akzeptor angeregt). Dies lässt sich noch weiter vereinfachen, wenn man berücksichtigt, dass der Dipolmomentoperator von D nur auf die Donorzustände einwirkt. Analoges gilt für den Akzeptor.

$$k \sim n - 2\kappa^2 / R^6 |\langle \psi_{D0} | \mu_D | \psi_{D1} \rangle|^2 |\langle \psi_{A1} | \mu_A | \psi_{A0} \rangle|^2$$

Ausrechnen der Skalarprodukte und Zusammenfassen einiger Größen in R_0 ergibt:

$$k = \frac{1}{\tau} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

mit τ der Fluoreszenzlebensdauer des Donors, R : Abstand zwischen Donor und Akzeptor, R_0 : der Abstand zwischen D und A , bei dem strahlende Relaxation in den Grundzustand (Emission eines Lichtquants) und Dipol-Dipol-Übertragung nach dem Förster-Mechanismus in gleichem Ausmaß stattfinden. Die Übertragungsrates k ist $\sim R^{-6}$, und hängt damit extrem vom Abstand zwischen D und A ab. Für Chlorophylle wurden R_0 -Werte von $\sim 70 \text{ \AA}$ gefunden.