

Einzelmolekülspektroskopie an Photosystem-I-Komplexen und Bio-Nano-Hybridsystemen unter kryogenen Bedingungen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von:
Martin Hussels
aus Herford

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

26.02.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

PD Dr. Marc Brecht

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Alfred Meixner

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. Sebastian Mackowski

„Le savant doit ordonner ; on fait la science avec des faits comme une maison avec des pierres ; mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison.“

„The Scientist must set in order. Science is built up with facts, as a house is with stones.
But a collection of facts is no more a science than a heap of stones is a house.“

„Ein Wissenschaftler muss Ordnung schaffen. Wissenschaft ist aus Fakten gebaut wie ein Haus aus Steinen. Aber eine Sammlung von Fakten ist ebenso wenig Wissenschaft wie ein Steinhaufen ein Haus ist.“

Henri Poincaré, 1905

Kurzzusammenfassung

Photosystem I (PSI) ist ein essentielles Protein in der Photosynthese, das in seiner trimeren Form in Cyanobakterien ca. 300 Chlorophyllmoleküle bindet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Fluoreszenz einzelner PSI-Komplexe aus den Cyanobakterien *Thermosynechococcus elongatus* und *Arthrospira platensis* mithilfe eines konfokalen Mikroskops bei tiefer Temperatur (1,4 K) untersucht.

Glycerin bindet direkt an PSI.

Vergleichende Fluoreszenzuntersuchungen von Präparierungen von PSI aus *T. elongatus* bei 1,4 K in wässrigem Puffer ohne Zusätze, mit Glycerin bzw. in Polyvinylalkohol-Filmen (PVA) zeigten einen deutlichen und gegensätzlichen Einfluss von Glycerin und PVA auf die Konformation von PSI: Glycerin stabilisiert das Proteingerüst und führt zu einer kompakteren Proteinkonformation der PSI-Komplexe, während PVA destabilisierend wirkt und eine unnatürliche Veränderung des Proteingerüsts hervorruft. Durch weitere Experimente konnte gezeigt werden, dass mindestens ein Teil des stabilisierenden Effekts von Glycerin durch dessen Bindung an PSI vermittelt wird.

Der Redoxzustand des Reaktionszentrums beeinflusst die Fluoreszenz.

Spektren einzelner PSI-Komplexe aus *A. platensis* zeigen drei unterschiedliche Emissionsbanden, von denen bislang nur zwei aus Ensemblemessungen bekannt waren. Die neu entdeckte Emissionsbande zeichnet sich durch scharfe Nullphononenlinien aus. Die große Ähnlichkeit zu den Spektren von *T. elongatus* deutet auf eine strukturelle Ähnlichkeit der PSI-Komplexe dieser beiden Organismen hin. In Kooperation mit Eberhard Schlodder (TU Berlin) konnte in Experimenten an Ensembleproben für PSI-Komplexe aus *T. elongatus* eine bisher unbekannte Emissionsbande nachgewiesen werden, deren Intensität stark vom Redoxzustand des Reaktionszentrums in den

PSI-Komplexen abhängt. Sie entspricht einer für PSI-Komplexe aus *A. platensis* bereits bekannten Emissionsbande. Darüber hinaus wurde die Abhängigkeit der Emission vom Redoxzustand des Reaktionszentrums für beide Organismen erstmals an einzelnen PSI-Komplexen nachgewiesen.

Metall-Nanostrukturen ändern die Funktion von PSI-Komplexen.

Bio-Nano-Hybridsysteme werden wegen ihres Potentials zur Stromerzeugung und Wasserstoffproduktion intensiv erforscht. Untersuchungen von PSI-Komplexen aus *T. elongatus* auf hexagonal angeordneten periodischen Metallnanostrukturen – sog. Fischer-Pattern – aus Gold und Silber zeigten eine Verstärkung der Fluoreszenzemission, die bei Silber stärker ausfiel als bei Gold. Die zusätzlich nachgewiesene Abhängigkeit der Verstärkung von der Wellenlänge deutet auf eine Veränderung der Funktion der PSI-Komplexe durch die Metallnanostrukturen hin.

Ein neuartiges konfokales Tieftemperaturmikroskop für Einzelmolekülspektroskopie.

Das Herzstück des von Grund auf neu entwickelten konfokalen Tieftemperaturmikroskops für Einzelmolekülspektroskopie bilden Piezoaktuatoren zur Probenpositionierung und Piezoscanner zur Rasterung der Probe. Ein neuartiges Probentransfersystem erlaubt den Einbau bzw. das Wechseln einer Probe bei tiefen Temperaturen bis hinunter zu 4,2 K. Ein vergleichbares System wurde bisher nicht beschrieben. Eine parallel entwickelte Steuerungssoftware dient der Steuerung aller Komponenten und der Erfassung von Messdaten. Darüber hinaus wurde eine Auswertungssoftware zur Analyse der erfassten Daten entwickelt, mit der die Daten gesichtet und statistisch ausgewertet werden können.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
1 Einleitung	1
1.1 Photosynthese	5
1.1.1 Funktion der oxygenen Photosynthese	5
1.2 Photosystem I	7
1.2.1 Energietransfer in Photosystem I	10
1.3 Detektion einzelner Moleküle	11
1.4 Optische Eigenschaften von Molekülen	14
1.4.1 Relaxationsprozesse	15
1.4.2 Wechselwirkung mit der Umgebung und Temperaturabhängigkeit	17
1.5 Kopplung und Energietransfer	19
1.5.1 Schwache Kopplung	20
1.5.2 Starke Kopplung	22
1.5.3 Wechselwirkung mit metallischen Nanopartikeln	23
1.6 Proteindynamik	27
2 Experimenteller Aufbau	33
2.1 Optik	35
2.2 Probenhalterung und Positionierung	37
2.3 Probenpräparierung	39
2.4 Erzeugung tiefer Temperaturen	40
3 Umfang der Arbeit	41
3.1 Einfluss von Glycerin und PVA auf die Konformation von PSI	42

Inhaltsverzeichnis

3.2	Fluoreszenzemission einzelner PSI-Komplexe aus <i>A. platensis</i>	45
3.3	Wechselwirkung von PSI mit Fischer-Pattern aus Gold und Silber	48
3.4	Aufbau eines konfokalen Tieftemperaturmikroskops	51
4	Effect of glycerol and PVA on the conformation of Photosystem I	57
5	Evidence for direct binding of glycerol to Photosystem I	69
6	Red antenna states of Photosystem I trimers from <i>Arthrospira platensis</i> revealed by single-molecule spectroscopy	75
7	Fluorescence of the various red antenna states in Photosystem I complexes from cyanobacteria is affected differently by the redox state of P700	85
8	Plasmonic interactions of Photosystem I with Fischer patterns made of Gold and Silver	95
9	Interactions of Photosystem I with plasmonic nanostructures	103
10	Confocal sample-scanning microscope for single-molecule spectroscopy and microscopy with fast sample exchange at cryogenic temperatures	111
	Abkürzungsverzeichnis	117
	Literaturverzeichnis	119
	Publikationsliste	129
A	Steuerungssoftware	131
A.1	Funktionsumfang und grafische Oberfläche	131
B	Auswertungssoftware	139
B.1	Aufbau der Software	139
B.2	Grafische Oberfläche	140

Kapitel 1

Einleitung

Die Komplexität der molekularen Mechanismen des Lebens ist ohnegleichen. Alle grundlegenden Prozesse werden von molekularen Maschinen, meist Proteinkomplexen, vermittelt, von deren detailliertem Verständnis die Wissenschaft auch nach jahrzehntelanger Forschung und zahlreichen bahnbrechenden Erkenntnissen noch weit entfernt ist. Insbesondere die hohe Effizienz, Robustheit und Anpassungsfähigkeit der biologischen Systeme an unterschiedlichste Bedingungen sind beeindruckend und unerreichte Vorbilder für unsere in vieler Hinsicht hochtechnisierte Welt.

Einer der wichtigsten Prozesse, der auf diesen molekularen Mechanismen beruht, ist die Photosynthese, die unser Leben in vielerlei Hinsicht erst ermöglicht. So sind wir sowohl von der Freisetzung von Sauerstoff in die Atmosphäre als auch von der Kohlendioxidfixierung und damit verbundenem Pflanzenwachstum, das direkt oder indirekt über Verfüttern an Nutztiere unsere Nahrungsgrundlage bildet, abhängig. Sogar alle fossilen Energieträger sind ursprünglich aus der Photosynthese entstanden. Daher ist es nicht verwunderlich, dass dieser Vorgang seit fast 200 Jahren erforscht wird, wobei der Prozess als solcher und seine enorme Bedeutung erst im Laufe der Zeit erkannt wurden.

Die Geschichte der Photosyntheseforschung erstreckt sich dabei u.a. von der Entdeckung der Aufnahme von Substanz durch eine Pflanze aus der Atmosphäre 1727 durch Stephen Hales, der Beobachtung der Freisetzung von Gas, das später als Sauerstoff erkannt wurde, durch Laubblätter unter Wasser 1754 durch Bonnet über Experimente in den 1960er Jahren, die zu der Entdeckung der zwei an der Photosynthese beteiligten

Photosysteme führte, bis hin zu aktuellen Kristallstrukturen der beteiligten Proteinkomplexe mit nahezu atomarer Auflösung.[1, 2, 3, 4] Ein weiterer Beleg für die Bedeutung der Photosyntheseforschung ist die Vergabe von 19 Nobelpreisen an Forscher, die auf diesem Gebiet gearbeitet haben.[5] Trotz der enormen Fortschritte und der vielen Jahrzehnte Forschungsarbeit sind viele Mechanismen nach wie vor nicht im Detail verstanden und die Photosyntheseforschung ist weiterhin hochaktuell mit immer wieder überraschenden Erkenntnissen. So wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass verschiedene photosynthetisch aktive Proteinkomplexe Quantenkohärenzeffekte zeigen und diese anscheinend für den Energietransfer innerhalb des Proteins nutzen.[6, 7] Das führte zu der Vermutung, dass die Nutzung solcher Quanteneffekte vielleicht eher der Normalfall als eine Ausnahme ist und dass man so von der Natur lernen kann, Quantentechnologien zu entwickeln.[8]

Neben der Untersuchung dieser grundlegenden Mechanismen ist ein zunehmend wichtiger Aspekt der Photosyntheseforschung die Entwicklung zukünftiger Energiequellen. Von besonderem Interesse ist dabei die gute Lichtsammeleffizienz und die Robustheit der an der Photosynthese beteiligten Proteine. Insbesondere Photosystem I (PSI), das ähnlich wie eine Solarzelle Lichtenergie in elektrisches Potential umwandelt, bietet wegen der Kombination des Antennensystems aus etwa 100 Chlorophyllmolekülen pro Monomer großes Potential. So wurde vor Kurzem gezeigt, dass wenige Mikrometer dicke PSI-Kristalle Photospannungen von annähernd 50 V erreichen, was neue Möglichkeiten für Hochspannungsphotovoltaik eröffnen könnte.[9]

Näher an einer Anwendung sind Konzepte, bei denen sich PSI auf nanostrukturierten Oberflächen selbst anordnet [10] oder bei denen PSI auf p-dotiertes Silizium aufgetragen wird.[11] Außer der Erzeugung elektrischer Energie wurde auch die Produktion von Wasserstoff, der häufig als der Energieträger der Zukunft gehandelt wird, durch die Verwendung von Hybridsystemen aus PSI mit Nanostrukturen[12, 13] oder aber auch der Kombination von PSI mit einer sog. Hydrogenase, einem Protein, das molekularen Wasserstoff oxidieren oder umgekehrt freisetzen kann, demonstriert.[14]

Obwohl für alle diese Ansätze noch viele Probleme bis zum Alltagseinsatz gelöst werden müssen, zeigen sie doch das enorme Potential der Hybridsysteme aus Proteinen – insbesondere PSI – und künstlichen Strukturen. Um diese Systeme zu optimieren, ist vor allen Dingen das Verständnis der grundlegenden Prozesse notwendig. Besonders hervorzuheben ist dabei der Energietransfer innerhalb von PSI. Obwohl eine hoch-

auflösende Kristallstruktur für PSI vorliegt, können weder der Energietransfer noch die optischen Eigenschaften in theoretischen Modellen vollständig erklärt werden. Ein möglicher Grund dafür liegt im statischen Bild, das Kristallstrukturen von Proteinen liefern. Frauenfelder und Mitarbeiter haben jedoch gezeigt, dass Proteine im Gegensatz dazu dynamisch in ihrer Struktur sind und zwischen vielen möglichen Zuständen wechseln können.[15] So wird einigen Proteinen durch diese Dynamik ihre Funktion überhaupt erst ermöglicht.[16]

Diese Eigenschaft führt jedoch auch dazu, dass bei der Beobachtung eines Ensembles von Proteinen über viele Zustände gemittelt wird. In optischen Untersuchungen von Proteinen mit eingebetteten Farbstoffmolekülen, wie dem PSI, führt dies zu starker spektraler Verbreiterung, die Eigenschaften des einzelnen Proteins verdeckt.

Eine Möglichkeit, diese Schwierigkeit zu umgehen, bietet die Einzelmolekülspektroskopie bei tiefen Temperaturen, weil so zum einen durch die Beobachtung einzelner Proteine die Mittelung über viele Zustände umgangen wird und zum anderen durch Absenken der Temperatur die Dynamik des einzelnen Proteins verlangsamt wird, so dass sich die zeitliche Mittelung über viele Zustände des einzelnen Proteins verringert. So bietet diese Methode einen tieferen Einblick in die Eigenschaften von Proteinen, als mit Ensemblemethoden möglich ist. Bemerkenswert ist dabei jedoch, dass Proteine auch bei Temperaturen unter -271°C dynamische Veränderungen zeigen können, die in der Einzelmolekülspektroskopie in Form spektraler Sprünge – allgemein als spektrale Diffusion bezeichnet – beobachtet werden.[17, 18] Allerdings lassen sich über die spektrale Diffusion so selbst kleinste Veränderungen in der Umgebung der in ein Protein eingebetteten Farbstoffmoleküle beobachten. Das macht die Einzelmolekülspektroskopie zu einer exzellenten Methode, den Energietransfer in PSI zu untersuchen, weil so z. B. schon dynamische Veränderungen des Energietransfers innerhalb von PSI beobachtet werden konnten, die auf Änderungen der Kopplung der Chlorophyllmoleküle untereinander schließen lassen.[19]

Aufgrund dieser hervorragenden Eigenschaften wurde in dieser Arbeit Einzelmolekülspektroskopie bei tiefer Temperatur verwendet, um verschiedene offene Fragestellungen zu PSI aber auch allgemein zu Proteindynamik zu untersuchen.

So wurde untersucht, welchen Einfluss die bei Proteinpräparierungen üblichen Stoffe Glycerin und PVA auf die Eigenschaften von PSI haben, und ob diese Stoffe die Funktion von PSI beeinflussen. Dabei hat die verwendete Methode den besonderen

Vorteil, sowohl Einblick in unterschiedliche Zustände des Proteingerüsts als auch in die Dynamik zu ermöglichen, und so ein genaues Bild von Veränderungen zu liefern.

Ein weiterer Aspekt war die erstmalige Untersuchung einzelner PSI-Komplexe aus dem Cyanobakterium *Arthrospira platensis*, um diese mit bereits bekannten Ergebnissen für *Thermosynechococcus elongatus* zu vergleichen. Dabei wurde erstmals auch der Einfluss des Redoxzustandes des Reaktionszentrums der PSI-Komplexe auf die Fluoreszenzemission an einzelnen PSI-Komplexen untersucht, um so ein besseres Verständnis des Energietransfers und seiner Regulierung im PSI zu erhalten. Eng mit der Untersuchung des Energietransfers verbunden wurde auch die Wechselwirkung von PSI mit Metallnanostrukturen untersucht, da diese bekanntermaßen die optischen Eigenschaften von Farbstoffmolekülen stark beeinflussen können. Besonders interessant war dabei u.a. die Frage, ob Metallnanostrukturen die Lichtsammelleffizienz und den Energietransfer beeinflussen.

Zusätzlich zu den Untersuchungen an PSI bestand ein weiterer wesentlicher Teil dieser Arbeit im Aufbau eines neuen konfokalen Tieftemperaturmikroskops für Einzelmolekülspektroskopie. Im Mittelpunkt stand dabei die Herausforderung, unter Verwendung von Piezoscannern ein auch bei tiefen Temperaturen arbeitendes Probenwechselsystem zu entwerfen. Ein solches Probenwechselsystem ist besonders bei biologischen Proben, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, vorteilhaft, weil die sonst notwendigen langsamen Kühlprozesse im Kryostaten u.a. zur Austrocknung der Proben und damit zu unnatürlichen Veränderungen führen können. Darüber hinaus wird die Untersuchung vieler Proben innerhalb kurzer Zeit ermöglicht.

In dieser Dissertation sind die wissenschaftlichen Veröffentlichungen zu den Teilaspekten gebündelt und werden in Zusammenhang zueinander gebracht. Dafür werden in den folgenden Abschnitten theoretische Grundlagen zu den verschiedenen Teilaspekten dieser Arbeit, das für die Experimente verwendete und das neu aufgebaute konfokale Tieftemperaturmikroskop und der Umfang der durchgeführten Arbeiten beschrieben.

1.1 Photosynthese

Photosynthese ist der wichtigste Stoffwechselprozess für das Leben auf der Erde. Kein anderer Prozess hat das Aussehen der Erde und die Lebensbedingungen so stark beeinflusst. Erste Hinweise auf photosynthetische Prozesse ohne Sauerstofferzeugung (anoxygen) lassen sich etwa auf 3,5 Milliarden Jahre vor unserer Zeit datieren.[20, 21] Der Zeitpunkt der Entstehung der oxygenen (sauerstofferzeugenden) Photosynthese konnte bisher nicht geklärt werden. Sicher ist, dass sie sich vor 2,3 Milliarden Jahren gut etabliert hat und zu dieser Zeit zu einem sprunghaften Anstieg des Sauerstoffgehaltes der bis dahin sauerstoffarmen Atmosphäre auf ca. 3% führte.[22]

Neben der Anreicherung in der Atmosphäre führte die Sauerstofffreisetzung in den Ozeanen zu starken chemischen Veränderungen durch die Ausfällung von Karbonat, Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} und Oxidation von Sulfid zu Sulfat.[23] Erst nachdem diese Sauerstoffsinken gesättigt waren, stieg der Sauerstoffgehalt weiter, bis vor etwa 350 Millionen Jahren erstmals der heutige Gehalt ($\sim 21\%$) erreicht wurde.[22, 24] Gleichzeitig wurden die bis dahin dominierenden anaeroben Lebensformen, die für den Energiestoffwechsel z.B. H_2S oxidierten, durch die vor etwa 1,5 Milliarden Jahren aufkommenden aeroben Lebensformen weitgehend verdrängt. Ausschlaggebend für diese Verdrängung war der vielfach größere Energiegewinn eines sauerstoffbasierten Stoffwechsels und die Toxizität von Sauerstoff für viele anaerobe Lebensformen. Die oxygene Photosynthese hat so die Grundlage für alle höherentwickelten Lebensformen auf der Erde geschaffen.

1.1.1 Funktion der oxygenen Photosynthese

Die Photosynthese dient zur Umwandlung von Lichtenergie und deren Fixierung in chemischer Form, z. B. mit der Herstellung von Glucose aus CO_2 und H_2O . Mit der Lichtenergie werden dabei Elektronen eines Reduktionsmittels auf ein höheres Redoxpotential für nachfolgende Prozesse, wie z. B. den Aufbau eines Protonengradienten über die Membran, gehoben. Bei der oxygenen Photosynthese wird Wasser als Reduktionsmittel verwendet. Dabei entsteht durch die Spaltung von Wasser Sauerstoff als Nebenprodukt, während bei der anoxygenen Photosynthese häufig H_2S oder Fe^{2+} als Reduktionsmittel dienen. Die entsprechenden Nebenprodukte sind dann elementarer Schwefel bzw. Fe^{3+} . So ergibt sich für die oxygene Photosynthese als allgemeines

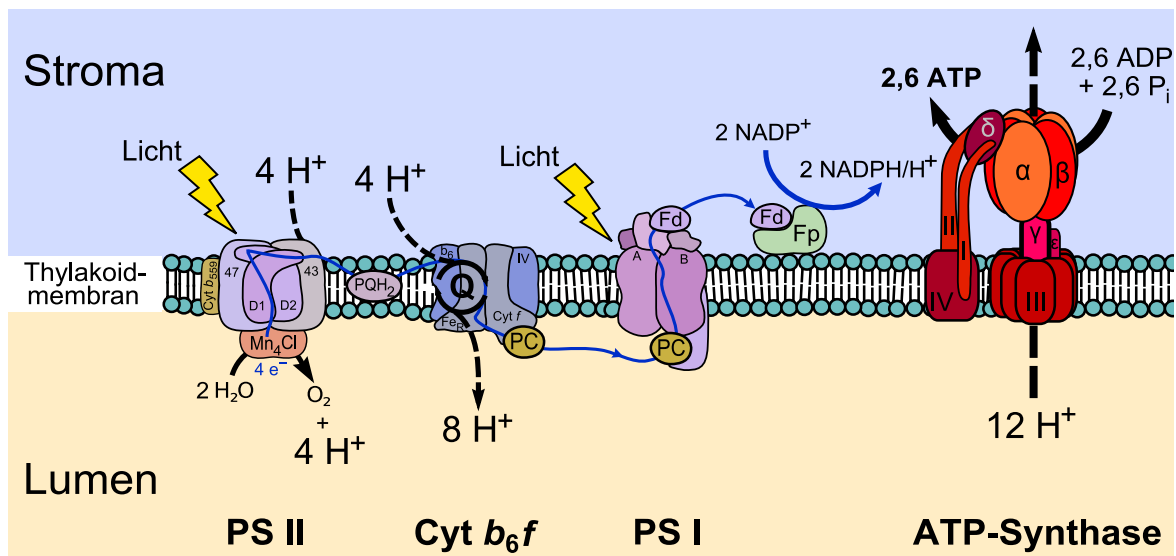
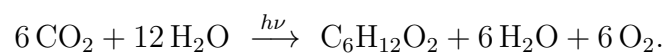


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Thylakoidmembran und des Ablaufes der Lichtreaktion der oxygenen Photosynthese mit den beteiligten Proteinen. Abkürzungen: PSI = Photosystem I; PS II = Photosystem II; PQH_2 = reduziertes Plastochinon; PC = Plastocyanin; Fd = Ferredoxin; Fp = Ferredoxin-NADP-Reduktase. (Abbildung entnommen aus [25])

Reaktionsschema:



Diese Reaktion läuft in Pflanzen, Algen und Cyanobakterien in Form einer Licht- und einer Dunkelreaktion ab. Die Lichtreaktion findet an der sog. Thylakoidmembran statt und ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt. An der Lichtreaktion sind die Membranproteinkomplexe Photosystem I (PSI), Photosystem II (PSII), Cytochrom- b_6f , ATP-Synthase und das wasserlösliche Protein Ferredoxin-NADP-Reduktase beteiligt. Die beiden Photosysteme sind dabei nacheinander geschaltet. Durch Lichtanregung wird am Reaktionszentrum vom PSII eine Ladungstrennung initiiert und die frei werdenden Elektronen gelangen über die Elektronentransferkette im PSII zur Bindungsstelle für Plastochinon. Dort reduzieren sie Plastochinon und werden von diesem innerhalb der Membran zum Cytochrom- b_6f transportiert, das mit der gewonnenen Energie einen Protonengradienten über die Membran aufbaut und die Elektronen an Plastocyanin im Lumen abgibt. Das Plastocyanin bindet danach an PSI und die Elek-

tronen werden erneut durch Lichtanregung auf ein höheres Redoxpotential gehoben. Dann gelangen sie über die Elektronentransferkette im PSI zur Bindungsstelle für Ferredoxin auf der stromalen Seite der Membran. Im Anschluss werden sie von Ferredoxin zur Ferredoxin-NADP-Reduktase transportiert, die damit NADP zu NADPH reduziert. Der durch Wasserspaltung und die Aktivität von Cytochrom- b_6f entstehende Protonengradient treibt parallel dazu ATP-Synthase-Komplexe und so die Synthese von ATP aus ADP und Phosphat. Also erhält man als Produkte der Lichtreaktion NADPH als Reduktions- und ATP als Energieäquivalent, mit denen in der Dunkelreaktion CO_2 fixiert und Glucose aufgebaut wird.

1.2 Photosystem I

PSI ist ein großes Membranprotein (~ 350 kDa), das in Pflanzen als Monomer und in Cyanobakterien als Trimer vorliegt.[26, 27] Seine Funktion besteht darin, Licht zu absorbieren und die Energie für eine Ladungstrennung am Reaktionszentrum zu verwenden. Darauf folgt dann ein gerichteter Elektronentransfer entlang verschiedener Kofaktoren durch die Thylakoidmembran vom Lumen zum Stroma. Funktionell kann es in ein Antennensystem aus ca. 100 Chlorophyll a -Molekülen, den primären Elektronendonoren in Form eines Chlorophylldimers (*special pair*) und eine Elektronentransferkette aus den Kofaktoren A_0 (Chlorophylle), A_1 (Phyllochinone) und den Eisen-Schwefel-Clustern F_X , F_A und F_B aufgeteilt werden. Das Chlorophyll dimer wird im PSI P700 genannt, weil seine Anregungsenergie äquivalent zu der von Licht mit 700 nm Wellenlänge ist.

Ein Elektronentransfer wird initiiert, wenn P700 vom Grundzustand S_0 in den ersten angeregten Singulettzustand S_1 angeregt wird und dieser innerhalb von wenigen Pikosekunden in den ladungstrennten Zustand $P700^+ A_0^-$ zerfällt.[28] Die Anregung kann dabei durch direkte Absorption von Licht durch P700 oder durch Energietransfer aus dem Antennensystem, das aufgrund seiner großen Anzahl gekoppelter Chlorophylle einen viel größeren Absorptionsquerschnitt hat als P700, erfolgen.

Der Absorptionsquerschnitt photosynthetischer Komplexe ist so groß, dass schon eine Monolage bis zu 20% des einfallenden Lichts absorbiert.[7] Ausschlaggebend für diese starke Absorption ist die sehr dichte Packung der Chlorophylle. In PSI entspricht diese Packung einer Chlorophyllkonzentration von 0,5 mol/l. Bemerkenswert

ist dabei, dass bei dieser hohen Konzentration ein effektiver Energietransport zum P700 stattfindet, während z. B. bei einer Chlorophyll *a*-Lösung in Ether schon bei einer Konzentration von 0,1 mol/l die Fluoreszenz nahezu vollständig ausgelöscht wird (*quenching*), also die Energie verloren geht und nicht zum energetisch niedrigsten Zustand transferiert wird.[29] Die Lösung für dieses Phänomen liegt in der strukturellen Anordnung der Chlorophyll *a*-Moleküle in PSI.

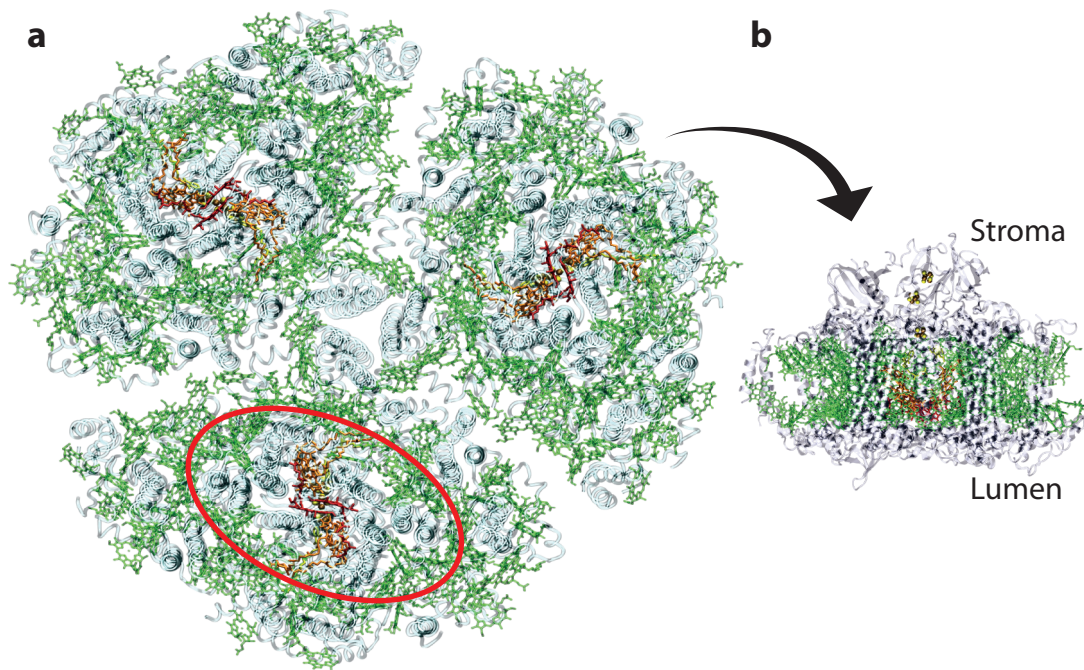


Abbildung 1.2: Struktur von Photosystem I aus *T. elongatus* (PDB-Eintrag: 1JB0 [2]). Teil **a** zeigt die Struktur des PSI als Trimer, wie es in der Thylakoidmembran vorliegt, von der luminalen Seite aus gesehen. Teil **b** zeigt die Seitenansicht auf ein Monomer. Die Chlorophylle des Antennensystems (Antennenchlorophylle) sind in Grün hervorgehoben, bei den Kofaktoren der Elektronentransferkette dagegen P700 Rot, A₀ Orange A₁ Gelb und die Fe₄S₄-Cluster F_X, F_A und F_B Braun/Gelb. Das Proteingerüst ist transparent Grau dargestellt.

Die Kristallstruktur mit der bisher besten Auflösung von 2,5 Å wurde 2001 von Jordan *et al.* [2] für PSI aus *T. elongatus* veröffentlicht. Abbildung 1.2 zeigt diese Struktur mit 96 Chlorophyll *a*-Molekülen, 2 Phyllochinonen und 3 Eisen-Schwefel-Clustern (Fe₄S₄) als Kofaktoren eingebettet in das Proteingerüst aus 12 Untereinheiten. Nicht dargestellt sind 22 Carotinoide und 4 Lipide, die ebenfalls Kofaktoren in PSI sind. Hervorgehoben sind die Chlorophylle des Antennensystems in Grün sowie die Elektro-

nentransferkette mit P700 in Rot, A_0 in Orange, A_1 in Gelb und die Fe_4S_4 -Cluster F_X , F_A und F_B in Braun/Gelb. Teil a der Abbildung zeigt PSI als Trimer, wie es in der Thylakoidmembran der Cyanobakterien vorliegt, mit Blick auf die Membranebene von der lumenalen Seite aus. Teil b zeigt dagegen den seitlichen Blick senkrecht zur Membranebene auf ein PSI-Monomer mit lumenaler Seite oben und stromaler Seite unten. Gut zu erkennen ist aus dieser Blickrichtung, dass die Chlorophylle von den transmembranen α -Helices koordiniert werden und so auf Höhe der Membran liegen. Die Eisen-Schwefel-Cluster am Ende der Elektronentransferkette dagegen liegen außerhalb der Membran auf der stromalen Seite. Eine Analyse der Anordnung der Chlorophylle zeigt, dass diese nicht zufällig wie in Lösung verteilt sind. Die Abstände benachbarter Moleküle betragen etwa 6 bis 25 Å. In der Draufsicht auf die Membranebene zeigt sich, dass die Antennenchlorophylle eine ovale Struktur um den primären Elektronendonator P700 bilden.

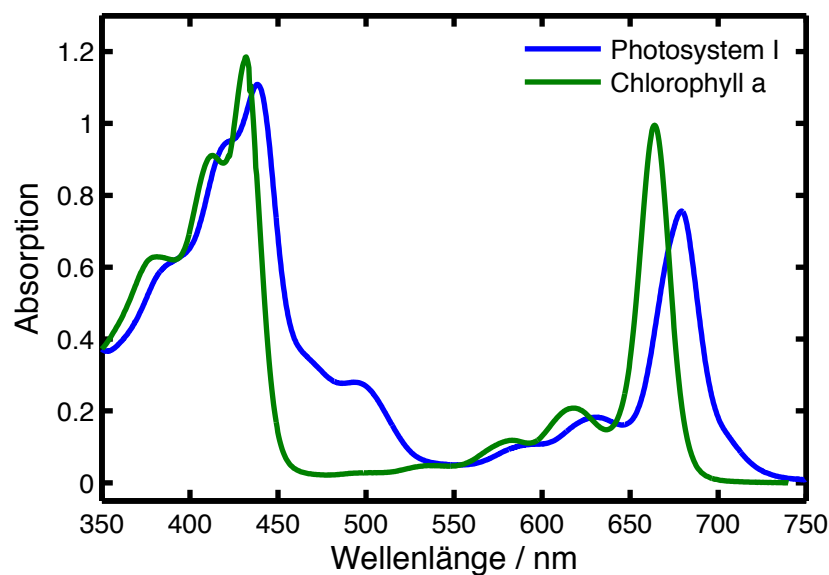


Abbildung 1.3: Vergleich der Absorption von PSI aus *T. elongatus* und Chlorophyll *a* bei Raumtemperatur in Lösung. PSI ist in Puffer gelöst und Chlorophyll *a* in 80% Aceton 20% Wasser. Die Chlorophyll-*a*-Konzentration ist in beiden Lösungen etwa gleich groß. (Die Daten wurden von Eberhard Schlodder zur Verfügung gestellt.)

Vergleicht man zusätzlich, wie in Abbildung 1.3 gezeigt, die Absorptionsspektren von PSI und Chlorophyll *a* in Lösung, fällt auf, dass das Absorptionsmaximum der Q_y -Bande der Antennenchlorophylle, das bei etwa 680 nm liegt, gegenüber dem von

Chlorophyll *a* in Lösung (664 nm in 80% Aceton [30]) ca. 15 nm rotverschoben ist. Diese Rotverschiebung entsteht durch die Wechselwirkung der Chlorophylle mit dem Proteingerüst und variiert bei verschiedenen Spezies.[31]

1.2.1 Energietransfer in Photosystem I

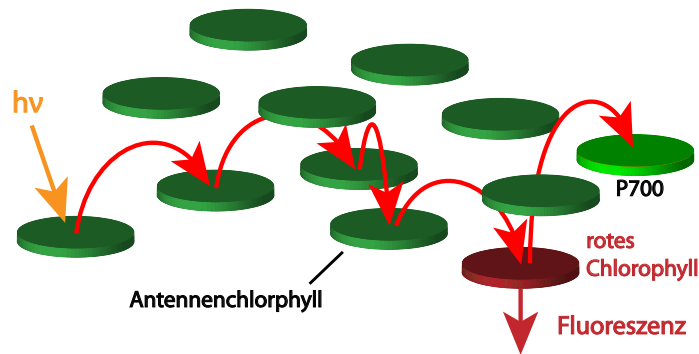


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Energietransfers zwischen den Antennenchlorophyllen von PSI nach Absorption eines Photons. Die Anregungsenergie eines Photons kann von den Antennenchlorophyllen direkt auf P700 oder auf ein rotes Chlorophyll übertragen werden. Gelangt die Anregungsenergie, wie hier gezeigt, auf ein rotes Chlorophyll, kann bei physiologischen Temperaturen P700 mithilfe thermischer Energie mit über 90% Effizienz angeregt werden. Bei tiefen Temperaturen (< 70 K) ist das nicht möglich, und die Energie wird überwiegend in Form von Fluoreszenz abgegeben.

Eine der faszinierendsten Eigenschaften von PSI ist der sehr effiziente Energietransfer (nahezu 100%) von den Antennenchlorophyllen zum primären Elektronendonator P700 und der damit einhergehenden Ladungstrennung.[28, 32] Ermöglicht wird diese Effizienz durch die Anordnung der Antennenchlorophylle zueinander, für die die schnelle Dynamik und Effizienz des Energietransfers mittels des Förstermechanismus erklärt werden kann.[7, 33, 34] Wird, wie in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt, ein Photon durch ein Antennenchlorophyll absorbiert, so bildet sich durch schnellen Energietransfer innerhalb von 100-200 fs ein Gleichgewicht in den Antennenchlorophyllen aus.[35] In einem weiteren Schritt wird die Anregungsenergie entweder innerhalb von 23-50 ps direkt zu P700 (*trapping*) oder innerhalb von 3,5-15 ps auf besondere energetisch tief liegende Antennenchlorophylle und dann innerhalb von 23-50 ps zu P700 transferiert.[36, 37] Die energetisch tief liegenden Antennenchlorophylle (rote Chlorophylle) haben Anregungsenergien, die unterhalb derer von P700 liegen, und

werden *red-most-chlorophylls*, *red-antenna-states* oder allgemein als *red pool* bezeichnet. Sie kommen bei Cyanobakterien im PSI je nach Spezies in unterschiedlicher Anzahl vor und spielen im Energietransfer eine sehr wichtige Rolle, da sie durch ihre energetische Lage mit P700 beim Energietransfer konkurrieren und so das *trapping* beeinflussen.[31, 37] Obwohl die Anregungsenergie der roten Chlorophylle unterhalb der von P700 liegt, und damit die Energie nicht ausreichen würde, um P700 anzuregen, können sie z. B. mithilfe thermischer Energie bei Raumtemperatur P700 anregen. Durch diesen Aufwärtstransfer kann vom PSI sogar noch Licht mit Wellenlängen bis 760 nm effizient zur Anregung von P700 und damit zur Ladungstrennung verwendet werden.[32] Wird jedoch die Temperatur abgesenkt, so zeigt sich, dass der Aufwärtstransfer wie zu erwarten zunehmend schlechter wird und Anregungsenergie, die auf die roten Chlorophylle transferiert wird, zunehmend als Fluoreszenzlicht abgestrahlt wird.[38] Dabei nimmt die Fluoreszenzquantenausbeute mit sinkender Temperatur zu, bis sie bei Temperaturen unterhalb von ca. 70 K konstant bleibt und je nach Redoxzustand von P700 10 bis 20 mal größer ist als bei Raumtemperatur.[39] Aufgrund dieser Eigenschaft lassen sich die roten Chlorophylle einzelner PSI-Komplexe bei tiefen Temperaturen direkt anhand ihrer Fluoreszenz untersuchen.[40, 41]

1.3 Detektion einzelner Moleküle

Die Detektion einzelner Moleküle stellt hohe Ansprüche an den experimentellen Aufbau. Die ersten Bilder einzelner Moleküle gelangen mithilfe hochauflösender Elektronenmikroskope in den 1970er Jahren.[42] Ein großer Nachteil der Elektronenmikroskopie ist jedoch die hochenergetische Strahlung, die für hohe Auflösung notwendig ist, weil sie innerhalb kurzer Zeit die untersuchten Moleküle irreversibel schädigt. Mit der Rastertunnelmikroskopie kam Anfang der 1980er Jahre eine wesentlich schonendere Methode auf, bei der die Auflösung nur durch die Größe der verwendeten Spitze begrenzt ist.[43, 44] Aus der Rastertunnelmikroskopie entwickelten sich im weiteren Verlauf Verfahren, bei denen statt des Tunnelstroms z. B. Kontaktkräfte oder magnetische Kräfte für die Bildgebung verwendet werden.

Die erste optische Detektion einzelner Moleküle gelang 1976, wobei es sich dabei um große mit Fluorescein markierte Proteine handelte, die jeweils ca. 100 Farbstoffmoleküle trugen.[45] Mit der fortschreitenden technischen Entwicklung optischer De-

tektoren mit hoher Empfindlichkeit gelang es 1987, die Fluoreszenz einzelner Phycoerythrinmoleküle (ein Phycobiliprotein) zu detektieren.[46] Die Phycoerythrinmoleküle wurden dafür in einem Lösungsmittel verdünnt und in einer Durchflusszelle mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Das Ziel dieses Experimentes war es, eine Methode zu entwickeln, DNA mit hoher Geschwindigkeit zu sequenzieren.[47] Die ersten spektroskopischen Messungen an einzelnen Farbstoffmolekülen wurden 1989 von Moerner *et al.* [48] und 1990 von Orrit *et al.* [49] durchgeführt. In beiden Fällen wurde Pentacen in p-Terphenyl Kristallen bei tiefer Temperatur untersucht.

Im Gegensatz zur Elektronen- und Rastersondenmikroskopie kann man mit optischen Methoden keine atomare Auflösung erreichen. Ein wesentliches Problem bei optischer Detektion einzelner Moleküle ist daher sicherzustellen, dass es sich bei den untersuchten Objekten tatsächlich um einzelne Moleküle handelt. Von Moerner *et al.* wird dies dadurch realisiert, dass die Messung am Rand der Absorptionsbande durchgeführt wurde und so nur einzelne Moleküle zur Absorption beitrugen.[48, 50] Dagegen wurde von Orrit *et al.* das Anregungs- und Detektionsvolumen möglichst klein gehalten und so bei einer sehr geringen Farbstoffkonzentration die Anregung und Detektion einzelner Moleküle durch räumliche Trennung ermöglicht.[49] Die räumliche Trennung der einzelnen Moleküle bietet gegenüber der Frequenzselektion den großen Vorteil, die Moleküle in all ihren möglichen Zuständen zu beobachten.

Der von Orrit *et al.* verwendete Aufbau wurde ursprünglich für *spectral-hole-burning*-Spektroskopie entwickelt und war daher nicht dafür geeignet, an verschiedenen Stellen in der Probe einzelne Moleküle zu suchen und spektroskopieren. In der weiteren Entwicklung der Einzelmolekülspektroskopie haben sich konfokale Mikroskope durchgesetzt, da sie auf einfache Weise kleine Volumina selektiv untersuchen können.

Abbildung 1.5 zeigt das Prinzip der konfokalen Mikroskopie, wie es von Marvin Minsky entwickelt und 1957 patentiert wurde. Die Bezeichnung konfokal resultiert aus dem gemeinsamen Fokusvolumen der Lichtquelle und des Detektors. In dem von Minsky vorgeschlagenen Aufbau ist dies durch ein Objektiv für die Lichtquelle und ein Objektiv für den Detektor realisiert, die beide auf das gleiche Fokusvolumen justiert sind. Für die optimale Funktionsweise sollten Lichtquelle und Detektor nahezu punktförmig sein. Für den Detektor wird dies meist durch eine Punktlochblende realisiert. Die Punktlochblende vor dem Detektor wirkt dabei wie ein Raumfilter, der alle Signale stark unterdrückt, die nicht direkt aus dem Fokusvolumen kommen. Statt

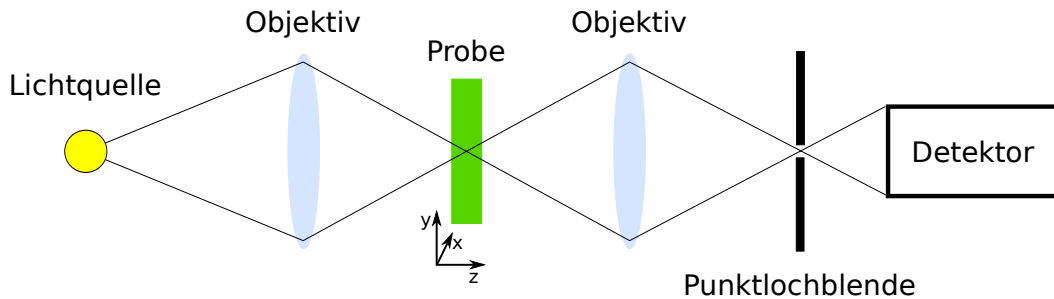


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des konfokalen Prinzips. Die Bezeichnung konfokal leitet sich daraus ab, dass die Foki der Lichtquelle und des Detektors übereinstimmen. Bei diesem Prinzip können nur Objekte innerhalb des beugungsbegrenzten Fokusbereichs detektiert werden, weshalb für eine bildhafte Darstellung die Probe in x- und y-Richtung gerastert werden muss. Ein Computer setzt dann die einzelnen Messpunkte zu einem Bild zusammen. Zusätzlich kann noch an verschiedenen z-Positionen gerastert werden, wodurch ein 3D-Bild entsteht.

wie von Minsky vorgeschlagen zwei Objektive zu verwenden, basieren die meisten aktuellen Aufbauten auf einem Objektiv, durch das mithilfe eines Strahlteilers sowohl die Beleuchtung bzw. Anregung als auch die Detektion des gestreuten oder emittierten Lichts realisiert wird. Durch die doppelte Fokussierung ergibt sich außerdem eine etwas höhere laterale Auflösung mit $\Delta x = 0,43 \frac{\lambda}{\text{N.A.}}$ gegenüber $\Delta x = 0,61 \frac{\lambda}{\text{N.A.}}$ bei einem konventionellen Mikroskop (Δx : minimaler auflösbarer Abstand zweier Punkte, λ : Wellenlänge des verwendeten Lichts, N.A.: numerische Apertur des Objektivs). Durch die effiziente Unterdrückung der Signale außerhalb der Fokusebene ergibt sich darüber hinaus die Möglichkeit, Teile dreidimensionaler Objekte wie z. B. Zellen mit hoher Auflösung zu untersuchen. Die Auflösung beträgt dabei $\Delta z = 1,5 \frac{n\lambda}{(\text{N.A.})^2}$ (Δz : minimaler auflösbarer Abstand zweier Punkte, n : Brechungsindex). Im Unterschied zu einem konventionellen Mikroskop entsteht auf dem Detektor jedoch kein vollständiges Bild aus der Fokusebene. Um ein Bild zu erhalten, muss daher die Probe gerastert und das Bild aus den Intensitätswerten der einzelnen Punkte rekonstruiert werden. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es mit einem konfokalen Mikroskop einfach möglich, einzelne Moleküle durch starke Verdünnung räumlich getrennt in Lösung oder einer festen Matrix eingebettet zu untersuchen.

1.4 Optische Eigenschaften von Molekülen

Die Wechselwirkung von Molekülen mit Licht wird durch ihre elektronische Struktur bestimmt. Für die Absorption von Licht durch ein Molekül muss die Resonanzbedingung erfüllt sein, d.h. ein Molekül kann nur Licht einer Frequenz, ν , absorbieren, deren Energie, $h\nu$ (h : Planksches Wirkungsquantum), einem elektronischen Übergang des Moleküls entspricht. Bei organischen Molekülen werden die optischen Eigenschaften überwiegend durch Systeme delocalisierter π -Elektronen bestimmt. Näherungsweise gilt: je größer das π -System, desto geringer die Energieabstände der Niveaus; ähnlich dem System eines Teilchens im Kastenpotential.

Die alleinige Betrachtung der elektronischen Übergänge eines Moleküls reicht jedoch nicht aus, um die Wechselwirkung mit Licht zu erklären, da zusätzlich Schwingungsübergänge im Molekül stattfinden können. Eine gute Beschreibung für die Kopplung von Schwingungsübergängen an elektronische Übergänge liefert das Franck-Condon-Prinzip. Die Kopplung entsteht dabei durch die veränderten Bindungskräfte innerhalb des Moleküls im elektronisch angeregten Zustand, die zu Veränderungen der Gleichgewichtsabstände der Kerne führen. Näherungsweise kann man dabei annehmen, dass der Kernabstand während der Absorption eines Photons und des Übergangs von Grund- in den angeregten Zustand konstant bleibt (Born-Oppenheimer-Näherung), weil der elektronische Übergang ($\sim 10^{-15}$ s) etwa zwei Größenordnungen schneller ist als die Kernschwingungen ($\sim 10^{-13}$ s). Das bedeutet, dass die Wellenfunktion, Ψ , näherungsweise in ein Produkt aus einer Elektronen-, Ψ_e , und einer Kernschwingungswellenfunktion, Ψ_k , aufgeteilt werden kann. Für das Übergangsdipolmoment, $\vec{P}_{\Psi \rightarrow \Psi'}$, des Übergangs eines Moleküls vom Zustand Ψ in den Zustand Ψ' ergibt sich damit:

$$\begin{aligned} \vec{P}_{\Psi \rightarrow \Psi'} &= \langle \Psi' | \vec{\mu} | \Psi \rangle \\ &= \langle \Psi'_e \Psi'_k | \vec{\mu} | \Psi_e \Psi_k \rangle, \end{aligned} \tag{1.1}$$

wobei $\vec{\mu} = -e\vec{r}$ der Dipoloperator ist mit der Elementarladung e und dem Ortsvektor \vec{r} . Teilt man nun $\vec{\mu}$ in einen Dipoloperator für die Elektronen $\vec{\mu}_e$ und einen für die

Kerne $\vec{\mu}_k$ auf so erhält man:

$$\begin{aligned}
 \vec{P}_{\Psi \rightarrow \Psi'} &= \langle \Psi'_e \Psi'_k | \vec{\mu}_e + \vec{\mu}_k | \Psi_e \Psi_k \rangle \\
 &= \langle \Psi'_e | \vec{\mu}_e | \Psi_e \rangle \langle \Psi'_k | \Psi_k \rangle + \underbrace{\langle \Psi'_e | \Psi_e \rangle}_{=0} \langle \Psi'_k | \vec{\mu}_k | \Psi_k \rangle \\
 &= \langle \Psi'_e | \vec{\mu}_e | \Psi_e \rangle \langle \Psi'_k | \Psi_k \rangle.
 \end{aligned} \tag{1.2}$$

Der erste Term $\langle \Psi'_e | \vec{\mu}_e | \Psi_e \rangle$ wird als elektronisches Übergangsmatrixelement bezeichnet. Der zweite Term $\langle \Psi'_k | \Psi_k \rangle$ ist das Überlappintegral zwischen den beiden betrachteten Kernschwingungswellenfunktionen.

Aus den so berechneten Übergangsdipolmomenten lässt sich die Intensität der verschiedenen Übergänge zueinander abschätzen, da sie proportional zum Betragsquadrat ist.

$$\begin{aligned}
 I_{\Psi \rightarrow \Psi'} &\propto |\vec{P}_{\Psi \rightarrow \Psi'}|^2 \\
 &\propto |\langle \Psi'_e | \vec{\mu}_e | \Psi_e \rangle|^2 |\langle \Psi'_k | \Psi_k \rangle|^2.
 \end{aligned} \tag{1.3}$$

Das bedeutet, dass für den Übergang eines Moleküls aus dem elektronischen Grundzustand die Intensität der Schwingungsübergänge mit dem Quadrat des Überlappintegrals der Kernschwingungswellenfunktion skaliert. Man nennt diesen Skalierungsfaktor Franck-Condon-Faktor. Für die Spektroskopie bedeutet das, dass für einen elektronischen Übergang der Schwingungsübergang mit dem größten Überlappintegral am intensivsten ist.

1.4.1 Relaxationsprozesse

Im vorherigen Abschnitt wurde nur der reine elektronische Dipolübergang mit gekoppelter Schwingung betrachtet. Zusätzlich finden in einem Molekül im angeregten Zustand jedoch verschiedene Relaxationsprozesse statt, über die das Molekül wieder in den Grundzustand übergehen kann. Eine Übersicht der verschiedenen Prozesse ist in Abbildung 1.6 in Form eines Jablonski-Schemas dargestellt.

Typischerweise geht ein Molekül mit Singulettgrundzustand durch ein Photon in einen schwingungsangeregten Zustand eines elektronisch angeregten Singulettzustandes über. Nach Kashas-Regel relaxiert es dann innerhalb von Pikosekunden in den Schwingungsgrundzustand, bevor es dann strahlend unter Emission eines Pho-

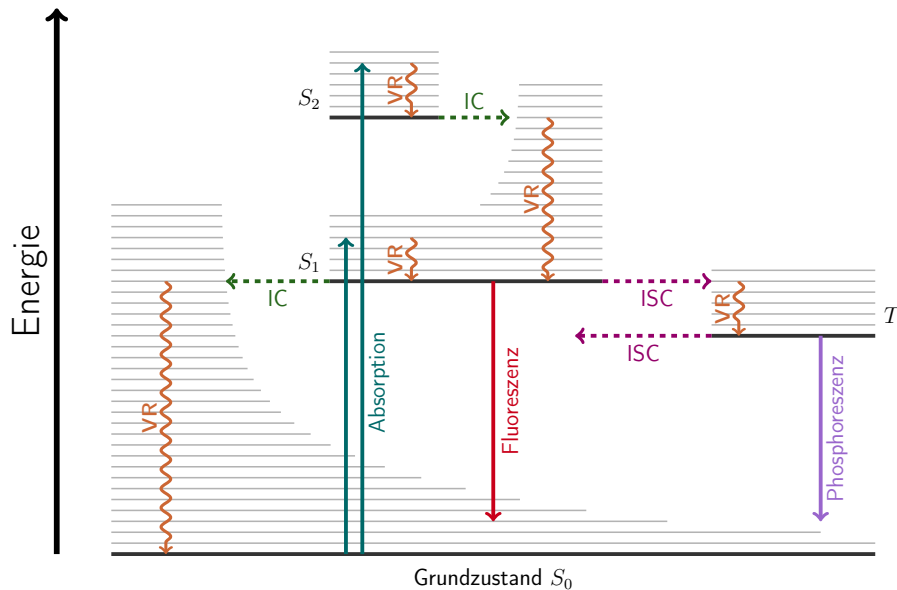


Abbildung 1.6: Jablonski-Schema zur Veranschaulichung der elektronischen Übergänge innerhalb eines Moleküls. IC – *internal conversion*: strahlungslose interne Umwandlung, ISC – *inter-system crossing*: strahlungslose Umwandlung mit Spinumkehr, VR – *vibronic relaxation*: Schwingungsrelaxation (verändert nach [51]).

tons (Fluoreszenz) oder strahlungslos über *internal conversion* in den Grundzustand bzw. über *inter-system crossing* in den metastabilen Triplettzustand übergeht. Bei der Relaxation über Fluoreszenz geht ein Molekül analog zur Anregung typischerweise vom Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustandes in einen schwingungsangeregten Zustand des Grundzustands über. Dabei ist die Intensitätsverteilung in Abhängigkeit von der Übergangsenergie näherungsweise spiegelsymmetrisch zu der Intensitätsverteilung in der Absorption. Bei *internal conversion* dagegen geht ein Molekül strahlungslos in einen hohen schwingungsangeregten Zustand des Grundzustandes über, der dann schnell in den Schwingungsgrundzustand relaxiert.

Die Wahrscheinlichkeit für den Übergang eines Moleküls von einem angeregten Singulettzustand in einen Triplettzustand unterscheidet sich stark bei verschiedenen Substanzen. Grundsätzlich gilt, dass der Übergang in den Triplettzustand durch starke Spin-Bahn-Kopplung der Elektronen begünstigt wird. Aus dem Triplettzustand kann ein Molekül entweder strahlend über Phosphoreszenz oder strahlungslos über *inter-system crossing* in den Singulettgrundzustand übergehen. Die Phosphoreszenz unter-

scheidet sich von der Fluoreszenz dadurch, dass sie eine Spinumkehr beinhaltet, also ein Übergang höherer Ordnung ist. Daraus ergibt sich ein großer Unterschied in der Lebensdauer des angeregten Singulettzustands von Nanosekunden zum Triplettzustand mit Mikrosekunden bis hin zu Minuten je nach Stoff. Für die Untersuchung einzelner Moleküle ist eine hohe Wahrscheinlichkeit für den Übergang in den Triplettzustand problematisch, da während der Verweildauer eines Moleküls im Triplettzustand keine erneute Anregung mit nachfolgender Emission stattfinden kann. Für diese Zeit ist ein Molekül also über Fluoreszenz nicht detektierbar.

1.4.2 Wechselwirkung mit der Umgebung und Temperaturabhängigkeit

Untersucht man Moleküle in der Gasphase, so reicht die Betrachtung der elektronischen Übergänge und ihre Kopplung an Molekülschwingungen zur Beschreibung der spektralen Eigenschaften aus. Möchte man aber spektrale Eigenschaften von Molekülen in Lösung oder in einer festen Matrix beschreiben, muss man zusätzlich ihre Wechselwirkung mit ihrer Umgebung betrachten.

Der Einfluss der Umgebung auf die spektralen Eigenschaften eines Moleküls kann mit der Elektron-Phonon-Kopplung beschrieben werden: Wenn ein elektronischer Übergang im Molekül stattfindet, werden Phononen (Gitterschwingungen der Umgebung) erzeugt oder vernichtet. Als Maß für die Stärke der Kopplung wird der Huang-Rhys-Faktor, S , angegeben, der mit dem Debye-Waller-Faktor, α , über $\alpha = e^{-S}$ zusammenhängt. Die Elektron-Phonon-Kopplung hat ihren Ursprung in der Veränderung der Ladungsverteilung eines Moleküls im angeregten Zustand gegenüber der Ladungsverteilung im Grundzustand. Durch die Veränderung der Ladungsverteilung und der damit einhergehenden Änderung des Potentials in der Umgebung des Moleküls kann es zu Reorientierungsprozessen kommen, die zu einer Absenkung der Übergangsenergie führen können. Im Fluoreszenzspektrum führt diese Absenkung zu einer Rotverschiebung.

Ein Modell zur Beschreibung der Elektron-Phonon-Kopplung und ihrer Auswirkung auf Absorption und Fluoreszenz wurde für die Erklärung von *spectral-hole burning* und *fluorescence-line narrowing* entwickelt.[52, 53, 54] Die Kopplung der Phononen an den elektronischen Übergang wird dabei ähnlich behandelt wie die Kopplung

der Molekülschwingungen. Ein wesentlicher Unterschied ist jedoch, dass die Phononen keine einzelnen spektral getrennten Übergänge bilden, sondern eine breite Verteilung, die man über eine Besetzungsdichte beschreiben kann. Meistens reicht es aus, eine oder wenige unterschiedliche Phononenfrequenzen anzunehmen und die Verteilung durch eine Kombination aus homogener und inhomogener Verbreiterung anzunähern.[52, 55]

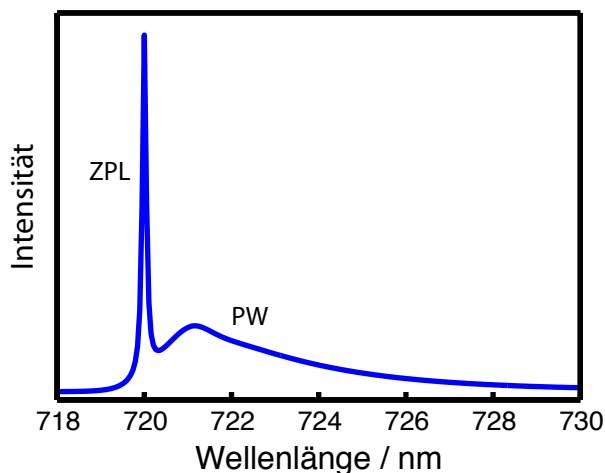


Abbildung 1.7: Simulierte Fluoreszenzlinienform eines einzelnen Moleküls mit *zero-phonon line* (ZPL) und *phonon wing* (PW) im Grenzfall tiefer Temperatur.

Abbildung 1.7 zeigt beispielhaft eine simulierte Linienform der Fluoreszenzemission eines einzelnen Moleküls im Grenzfall tiefer Temperatur. Die Fluoreszenz setzt sich aus der *zero-phonon line* (ZPL) und dem *phonon wing* (PW) zusammen. Die ZPL repräsentiert den sog. 0-0-Übergang bei dem keine Phononen erzeugt werden. Ihre Breite wird durch die Fluoreszenzlebensdauer begrenzt. Der PW entsteht durch die Erzeugung eines oder mehrerer Phononen und liegt daher gegenüber der ZPL energetisch tiefer. In der Absorption dagegen liegt der PW energetisch höher. Absorptions- und Emissionslinienform lassen sich durch Spiegelung an der ZPL ineinander überführen. Berechnet wurde diese Linienform mit einem für *fluorescence-line narrowing* und *spectral-hole burning* entwickelten Modell. Die frequenzabhängige Linienform, $L(\omega)$, der Emission im Limit tiefer Temperatur berechnet sich daraus zu [54]:

$$L(\omega) = \underbrace{e^{-S} l_0(\omega - \Omega)}_{\text{ZPL}} + \underbrace{\sum_{R=1}^{\infty} S^R \frac{e^{-S}}{R!} l_R(\omega - \Omega + R\omega_m)}_{\text{PW}} \quad (1.4)$$

mit der Frequenz des 0-0-Übergangs, Ω , und der Phononenfrequenz, ω_m . Die ZPL wird durch l_0 in Form einer Lorentzkurve repräsentiert. Der PW wird durch eine Summe über die Linienformen l_R für R erzeugte Phononen dargestellt. l_R setzt sich aus einer Gaußkurve auf der niederenergetischen Seite und einer Lorentzkurve auf der höherenergetischen Seite vom Maximum zusammen. Für $R > 1$ berechnet sich Linienform von l_R aus der Faltung $l_R = l_{R-1} \star l_1$, d.h. mit der Anzahl der erzeugten Phononen verbreitert sich die Linienform. Außerdem liegt das Maximum von l_R bei $\Omega + R\omega_m$. Für die Intensitäten der ZPL, I_{ZPL} , und des PW, I_{PW} , ergibt sich der einfache Zusammenhang:

$$e^{-S} = \frac{I_{ZPL}}{I_{ZPL} + I_{PW}}. \quad (1.5)$$

Der Huang-Rhys-Faktor lässt sich also direkt aus dem Fluoreszenzspektrum eines einzelnen Moleküls bestimmen (siehe Kapitel 6). Dies zeichnet die Einzelmolekülspektroskopie gegenüber *spectral-hole burning* und *fluorescence-line narrowing* aus, bei denen dafür komplexe Algorithmen notwendig sind. Man muss dabei jedoch beachten, dass diese Linienform nur im Limit tiefer Temperaturen gilt, weil die Elektron-Phonon-Kopplung über die Phononenbesetzungsdichte stark von der Temperatur abhängt. Mit steigender Temperatur nimmt die Zahl der besetzten Phononenzustände und gleichzeitig die Elektron-Phonon-Kopplung zu. Dieser Effekt ist so stark, dass für Werte, die typisch für Proteine sind, die ZPL schon bei 50 K kaum detektierbar ist, und ab ca. 100 K die Fluorezenzemission so stark verbreitert ist, dass man sie mit einer einzelnen Gaussverteilung nähern kann.[55]

1.5 Kopplung und Energietransfer

Bringt man Farbstoffmoleküle dicht aneinander so kann man je nach Art der Moleküle abhängig vom Abstand unterschiedliche Kopplungsmechanismen beobachten. Die Natur nutzt diese Eigenschaft z. B. in PSI und PSII, aber auch in vielen anderen Proteinen und Proteinkomplexen, die für die Absorption und Umwandlung von Lichtenergie wichtig sind. Bemerkenswert ist dabei, wie es die Natur schafft, die Kopplung zwischen proteingebundenen Farbstoffmolekülen zu steuern und z. B. so einen sehr effizienten Anregungsenergietransfer zu gewährleisten.[7] Die Kopplungen zwischen den Farbstoffmolekülen lassen sich dabei in eine schwache und eine starke Kopplung unterteilen.[56]

Neben der Kopplung von Farbstoffmolekülen untereinander gewinnt in der Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie zunehmend die Wechselwirkung von Farbstoffmolekülen mit metallischen Nanopartikeln an Bedeutung.[57, 58] Dabei treten u.a. ähnliche Wechselwirkungen auf, wie man sie zwischen verschiedenen Farbstoffmolekülen beobachtet.

1.5.1 Schwache Kopplung

Eine schwache Kopplung hat keinen Einfluss auf die Energieniveaus der Moleküle, und die quantenmechanischen Zustände bleiben lokalisiert auf den Molekülen. Unter diesen Voraussetzungen sind zwei unterschiedliche strahlungslose Energietransferwege von einem angeregten Donormolekül zu einem Akzeptormolekül möglich. Zum einen kann ein sog. Dexter-Transfer stattfinden, bei dem ein Elektronenaustausch stattfindet. Zum anderen ist ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) möglich, der über Dipol-Dipol-Kopplung vermittelt wird.

Dexter-Transfer

Beim Dexter-Transfer, der erstmalig 1953 von D. L. Dexter beschrieben wurde [59], springt das Elektron im angeregten Zustand auf das Akzeptormolekül, während gleichzeitig ein Elektron vom Akzeptormolekül auf das Donormolekül zurück springt, so dass das Donormolekül im Grundzustand ist und das Akzeptormolekül im angeregten Zustand.[59] Möglich wird dieser Transfer, wenn die Elektronenwellenfunktionen von Donor und Akzeptor teilweise überlappen. Daraus folgt, dass dieser Mechanismus nur über sehr kurze Distanzen von wenigen Å zwischen Molekülen möglich ist und die Transfereffizienz exponentiell vom Abstand abhängt. Näherungsweise lässt sich die Abstandsabhängigkeit der Transferrate, k , mit [60]:

$$k = \tau_D^{-1} \exp \left[\frac{2R_0}{L} \left(1 - \frac{r}{R_0} \right) \right] \quad (1.6)$$

beschreiben. Dabei ist τ_D die Fluoreszenzlebensdauer des Donormoleküls, L die durchschnittliche Länge eines Molekülorbitals, R_0 der Abstand, bei dem die Transfereffizienz 50% beträgt und, r der Abstand zwischen Donor und Akzeptor. In der Photosynthese ist der Dexter-Transfer ein wichtiger Prozess, um Triplettzustände von Chlorophyll-

molekülen auf Carotinoide zu übertragen, da diese sonst zur Bildung von für die Zelle gefährlichem Singulett-Sauerstoff führen können.[61] In Kombination mit der kurzen Lebensdauer des Triplettzustandes in Carotinoiden führt das insbesondere bei PSI zu einer schnellen Auslöschung der Triplettzustände von Chlorophyllmolekülen.[61]

Förster-Resonanzenergietransfer

Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) oder auch Fluoreszenzresonanzenergietransfer wurde erstmals 1946 von T. Förster theoretisch beschrieben.[62] Die Transfereffizienz hängt für ein Molekülpaar aus Donor und Akzeptor im Wesentlichen vom spektralen Überlapp, dem Abstand und von der Orientierung der Moleküle zueinander ab. Die Abstandsabhängigkeit der Transferrate, k , ist gegeben durch [63]:

$$k = \frac{9000 \ln 10 \Phi_D \kappa^2}{128 \pi^5 N n^4 \tau_D r^6} \int f(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda. \quad (1.7)$$

$f(\lambda)$ ist die normierte Fluoreszenzintensität des Donors, $\epsilon(\lambda)$ die Extinktion des Akzeptors, n der Brechungsindex des umgebenden Mediums, N die Avogadrozahl, τ_D und Φ_D die Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzquantenausbeute des Donors. Die Abstandsabhängigkeit, $\propto r^{-6}$, und der Orientierungsfaktor, κ , folgen direkt aus der Dipol-Dipol-Kopplung.

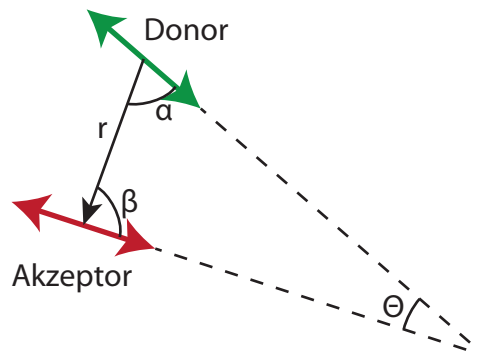


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Übergangsdipolmomente eines Donor-Akzeptor-Paares und der für die Berechnung des Orientierungsfaktors notwendigen Winkel.

Abbildung 1.8 zeigt schematisch die Orientierung der Übergangsdipolmomente eines Donor-Akzeptor-Paares. Aus den in der Abbildung skizzierten Winkeln lässt sich

für eine bekannte Orientierung der Übergangsdipolmomente eines Donor-Akzeptor-Paares, κ , mit:

$$\kappa = \cos \Theta - 3 \cos \alpha \cos \beta \quad (1.8)$$

berechnen. Dabei ist Θ der Winkel der Übergangsdipolmomente zueinander, α und β sind ihre jeweiligen Winkel zur Verbindungsachse (siehe Abbildung 1.8).

Typische Reichweiten von FRET sind mit ~ 10 nm erheblich größer als bei Dexter-Transfer und liegen damit im Bereich der Abstände der Chlorophyllmoleküle im PSI.[56] Allerdings ist der Transfer im Gegensatz zum Dexter-Transfer nur für Dipolübergänge erlaubt, es kann also z. B. kein Triplettransfer stattfinden.

1.5.2 Starke Kopplung

Der Förster-Transfer kann für kurze Abstände zwischen Molekülen, wie sie z. B. bei dem Chlorophyllpaar P700 im PSI vorliegen, in eine exzitonische Kopplung zwischen den Molekülen übergehen. Exzitonische Kopplung tritt auf, wenn die Wechselwirkungsenergie größer wird als die Linienbreite der elektronischen Übergänge der Moleküle. Dabei wird die Kopplung zwischen den Molekülen so stark, dass die Moleküle einen gemeinsamen angeregten Zustand bilden. Der angeregte Zustand ist dann nicht mehr auf einem Molekül lokalisiert, sondern über die beteiligten Moleküle delokalisiert. Die Absorption erfolgt dann, wie in Abbildung 1.9 schematisch dargestellt, von den ungestörten Grundzuständen in unterschiedlich gewichtete angeregte Zustände.[64] Das führt in der Absorption zu einer Aufspaltung der zwei ursprünglichen Absorptionswege der ungekoppelten Moleküle (blaue Pfeile) in vier Absorptionswege (rote Pfeile). Abhängig von den Energieniveaus und der Lage der Moleküle zueinander erhält man so bis zu vier Absorptionsbanden im Spektrum.

Aus der Dipol-Dipol-Kopplung erhält man für die Wechselwirkungsenergie, V_{12} , von zwei Punktdipolmomenten, μ_1 und μ_2 :

$$V_{12} = \frac{\vec{\mu}_1 \vec{\mu}_2}{r^3} - \frac{3(\vec{\mu}_1 \vec{r})(\vec{\mu}_2 \vec{r})}{r^5} \quad (1.9)$$

mit dem Verbindungsvektor \vec{r} . [64] Und man erhält zwei Energieniveaus E_+ und E_- :

$$E_{\pm} = \frac{1}{2} (E_1 + E_2) \pm \frac{1}{2} \sqrt{(E_2 - E_1)^2 + 4V_{12}^2}, \quad (1.10)$$

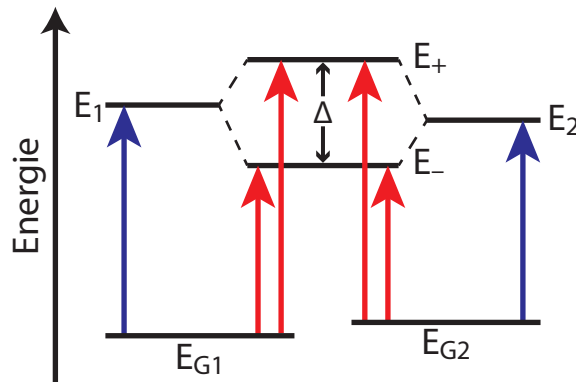


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der exzitonischen Aufspaltung des angeregten Zustandes zweier Moleküle. E_{G1} und E_{G2} bezeichnen jeweils die Energie des Grundzustandes der Moleküle, E_1 und E_2 die Energie der angeregten Zustände ohne exzitonische Kopplung, E_+ und E_- die beiden durch exzitonische Kopplung entstehenden angeregten Zustände, Δ ist die Energiedifferenz zwischen diesen exzitonischen Zuständen und beträgt $\Delta = \sqrt{(E_2 - E_1)^2 + 4V_{12}^2}$.

d.h. abhängig von der Wechselwirkungsenergie variiert die Energie des angeregten Zustandes, also die Frequenz der Absorptionsbande. Die Natur macht sich die exzitonische Kopplung in PSI zunutze, um den Energietransfer und die Absorption der Antennenchlorophylle zu beeinflussen.[65]

1.5.3 Wechselwirkung mit metallischen Nanopartikeln

Eine Möglichkeit, die Fluoreszenzemission und den Energietransfer in PSI zu beeinflussen, besteht in der Verwendung metallischer Nanopartikel. Dabei nutzt man ihre Wechselwirkung mit Farbstoffmolekülen, die auf den sog. Oberflächenplasmonen beruht. Diese entstehen in metallischen Nanopartikeln durch die Wechselwirkung der Elektronenwolke des Metalls mit einem elektrischen Wechselfeld, wie z. B. eingestrahlttem Licht. Dabei wird, wie in Abbildung 1.10 schematisch dargestellt, die Elektronenwolke etwas gegenüber dem Nanopartikel ausgelenkt, was einer induzierten Polarisierung entspricht. Die spektralen Eigenschaften metallischer Nanopartikel hängen stark von ihrer Form und Größe ab, da die Resonanzfrequenzen der Oberflächenplasmonen durch diese Parameter beeinflusst werden.[66, 67] Man kann also durch Größen- und Formveränderung die Resonanzfrequenz und damit die Wechselwirkung mit Farbstoff-

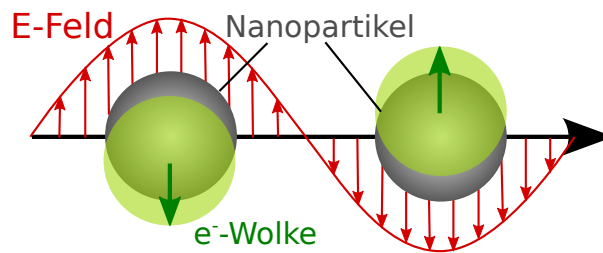


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der Wechselwirkung einer optischen Welle mit der Elektronenwolke eines sphärischen Metallnanopartikels. Das Wechselfeld führt zu einer kleinen Auslenkung der Elektronenwolke gegenüber dem Nanopartikel (mit Genehmigung verändert übernommen aus [67]. Copyright (2003) American Chemical Society).

molekülen in gewünschter Weise beeinflussen. Abbildung 1.11 zeigt, wie Extinktionsspektren von Gold- und Silbernanopartikeln von Größe und Form abhängen. In Teil a erkennt man, dass bei sphärischen Nanopartikeln mit zunehmender Größe die Plasmonenresonanz zu größeren Wellenlängen verschoben und gleichzeitig breiter wird. Teil b zeigt den Einfluss des Aspektverhältnisses (Verhältnis von Länge zu Dicke) von Goldnanostäbchen auf die Extinktionsspektren. Mit zunehmendem Aspektverhältnis verschiebt sich besonders die Resonanz für Plasmonen entlang der langen Achse zu größeren Wellenlängen, während die Plasmonenresonanz entlang der kurzen Achse kaum beeinflusst wird.

Man kann also metallische Nanopartikel passend zum verwendeten Farbstoff auswählen. Eine wichtige Eigenschaft, die sich damit beeinflussen lässt, ist die Fluoreszenzverstärkung (*metal-enhanced fluorescence*, MEF), die inzwischen breite Anwendung in der Biotechnologie und verwandten Gebieten findet.[58] Bei MEF sind drei unterschiedliche Prozesse relevant für die Wechselwirkung zwischen Farbstoffmolekül und Nanopartikel: zum einen der fluoreszenzunterdrückende Prozess des Energietransfer-Quenching, bei dem die Nähe eines Nanopartikels zu einer Dämpfung des oszillierenden Dipolmoments eines Farbstoffmoleküls im angeregten Zustand führt [68] und zum anderen zwei fluoreszenzverstärkende Prozesse, bei denen die Anregungsrate oder die Emissionsrate erhöht wird. Die Anregungsrate wird erhöht, wenn ein Nanopartikel als Antenne das elektrische Feld des eingestrahlten Lichts lokal konzentriert und so Farbstoffmoleküle in der Nähe eine größere Feldstärke spüren.[68] Die Erhöhung der Emissionsrate kann mit dem Modell strahlender Plasmonen beschrieben werden. Dabei findet

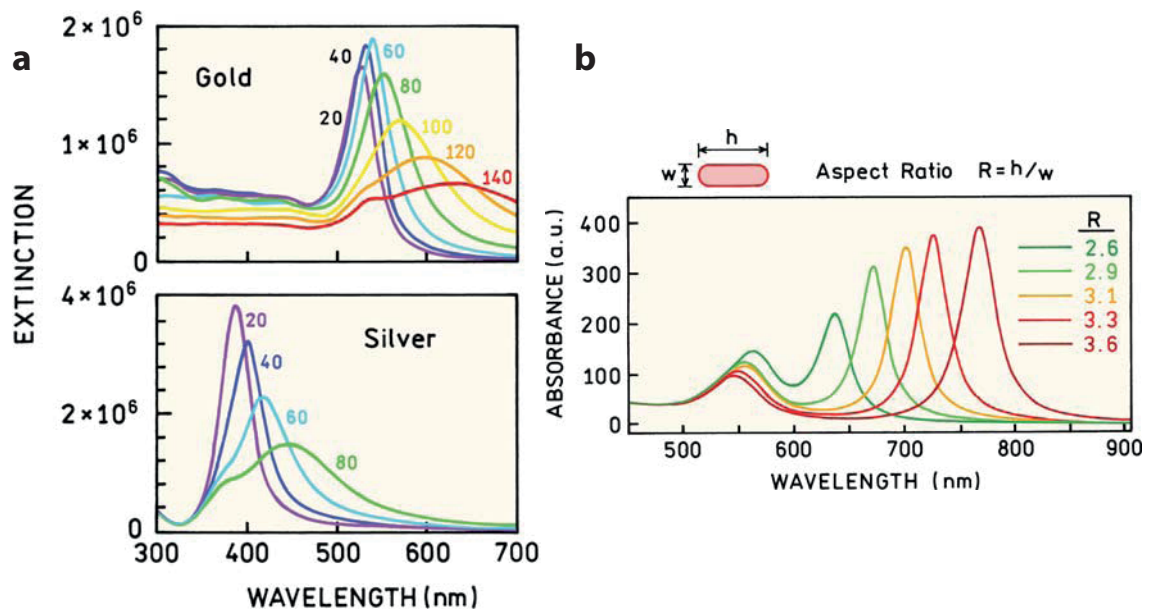


Abbildung 1.11: Extinktionsspektren unterschiedlicher Nanopartikel aus Gold und Silber. Teil **a** zeigt Extinktionsspektren sphärischer Nanopartikel für unterschiedliche Durchmesser (in nm) aus Gold (oben) und Silber (unten). Teil **b** zeigt Extinktionsspektren von Goldnanostäbchen für verschiedene Aspektverhältnisse (mit Genehmigung übernommen aus [57]). Copyright (2006) Springer International Publishing AG).

ein strahlungsloser Energietransfer von einem Farbstoffmolekül im angeregten Zustand zu Oberflächenplasmonen, die durch Emission eines Photons relaxieren, statt.[69] Die Anteile der Verstärkungsprozesse hängen dabei von der Resonanzfrequenz der beteiligten Oberflächenplasmonen ab. Überlappen die Resonanzfrequenzen stärker mit der Absorption als mit der Emission, so ergibt sich überwiegend eine Verstärkung durch erhöhte Absorption. Das umgekehrte Bild ergibt sich bei einer stärkeren Überlappung mit der Emission.

Vergleicht man die beiden verstärkenden Prozesse, so fällt auf, dass eine Erhöhung der Emissionsrate zu einer Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer und einer Erhöhung der Quantenausbeute der Farbstoffmoleküle führt, während eine Erhöhung der Anregungsrate keinen Einfluss hat. Dieser Effekt lässt sich mit den Ratengleichungen für die Fluoreszenzlebensdauer und die Quantenausbeute erklären. Für ein Farbstoffmolekül ohne Wechselwirkung mit einem Nanopartikel ergibt sich die Quantenausbeute,

Q , und die Fluoreszenzlebensdauer, τ , zu [57]:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{\text{nr}}} \quad (1.11)$$

$$\tau = (\Gamma + k_{\text{nr}})^{-1} \quad (1.12)$$

mit der Emissionsrate, Γ , und der Relaxationsrate durch nichtstrahlende Prozesse, k_{nr} . Führt man nun zusätzlich die durch die Wechselwirkung mit dem Nanopartikel erzeugte Emissionsrate, Γ_{NP} , ein, erhält man:

$$Q = \frac{\Gamma + \Gamma_{\text{NP}}}{\Gamma + \Gamma_{\text{NP}} + k_{\text{nr}}} \quad (1.13)$$

$$\tau = (\Gamma + \Gamma_{\text{NP}} + k_{\text{nr}})^{-1}. \quad (1.14)$$

Daraus folgt die oben erwähnte Erhöhung der Quantenausbeute bei gleichzeitiger Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer durch Wechselwirkung mit (metallischen) Nanopartikeln.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und Farbstoffmolekülen ist die Abstandsabhängigkeit. Anger *et al.* [70] haben gezeigt, dass für kurze Distanzen < 2 nm bei einem 100 nm großen sphärischen Goldpartikel Fluoreszenzquenching überwiegt, und mit zunehmendem Abstand die Fluoreszenzverstärkung bis zu einem Maximum bei ca. 13 nm ansteigt. Für größere Distanzen zeigte sich ein exponentieller Abfall der Fluoreszenzverstärkung.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Wechselwirkung von Nanopartikeln mit Farbstoffmolekülen ist ihr Einfluss auf den Förster-Transfer. Der Einfluss kann dabei zu einer Erhöhung der Transferreichweite und Transferrate oder umgekehrt sogar zu einer starken Unterdrückung des Transfers führen.[71, 72, 73] Die Erhöhung der Transferreichweite kann zwischen einigen Nanometern und ca. 100 nm liegen.[71, 72] Die Unterdrückung des Transfers kommt zustande, wenn die Plasmonenresonanz der Nanopartikel überwiegend mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappt.[73] Liegt die Resonanz jedoch zwischen Donoremission und Akzeptorabsorption oder überlappt stark mit der Akzeptorabsorption, ist ein Transfer möglich oder kann sogar verstärkt werden.[73]

1.6 Proteindynamik

Die Fortschritte in der Proteinkristallographie haben dazu geführt, dass heute für viele Proteine eine Kristallstruktur bekannt ist. Die Kristallstrukturen liefern jedoch nur ein statisches Bild der Proteinstuktur. Für die Funktion eines Proteins ist eine gewisse Flexibilität der Struktur notwendig. Z. B. nutzen Signalproteine plastische Strukturen, die durch ein Signal eine andere Konformation annehmen können.[16] Auch die Bindung von Liganden an Enzyme führt zu dynamischen Veränderungen im Protein.[74]

Aus ihren Untersuchungen an Myoglobin haben H. Frauenfelder und Mitarbeiter das Modell der Energielandschaft für Proteine entwickelt.[75, 15] Die Energielandschaft beschreibt die freie Energie eines Proteins abhängig von seiner Konformation. Die Konformation wird durch die Relativkoordinaten der Atome des Proteins bestimmt und ergibt somit für N Atome einen Konformationsraum mit $3N - 6$ Dimensionen. Die Energielandschaft lässt sich somit als Hyperfläche im hochdimensionalen Raum auffassen. Dabei ist diese Fläche nicht glatt, sondern es gibt viele sog. Konformationsunterzustände, die lokale Minima in der Fläche bilden. Die Energiebarrieren zwischen den Konformationsunterzuständen lassen sich in unterschiedliche Kategorien einteilen, die mit einer hierarchischen Struktur der Energielandschaft beschrieben werden können.

Abbildung 1.12 zeigt schematisch die Hierarchie und einen Querschnitt durch die Struktur der Energielandschaft von Myoglobin. Die Hierarchie der Energielandschaft lässt sich so verstehen, dass Konformationsunterschiede, die z. B. eine Umlagerung einer oder mehrerer Aminosäuren beinhalten, eine größere Energiebarriere haben als solche mit Umlagerung einer Seitengruppe einer Aminosäure oder einzelner Atome, und so hierarchisch höher liegen.

Die dynamische Veränderung der Proteinkonformation lässt sich in diesem Modell als eine Bewegung durch die Energielandschaft beschreiben. Dabei bedeuten kleine Veränderungen Wechsel zwischen Unterzuständen in den unteren Rängen der hierarchischen Energielandschaft. Durch mehrere dieser kleinen Veränderungen kann es dann zu einem Übergang zwischen Zuständen eines höheren Ranges kommen. Die Anzahl der erreichbaren Unterzustände hängt dabei u. a. von der Temperatur ab. Übergänge zwischen den Unterzuständen werden durch Tunnelprozesse, thermische Anregung (Arrheniusaktivierung) oder mechanische Kräfte induziert. Eine weitere Möglichkeit ist bei

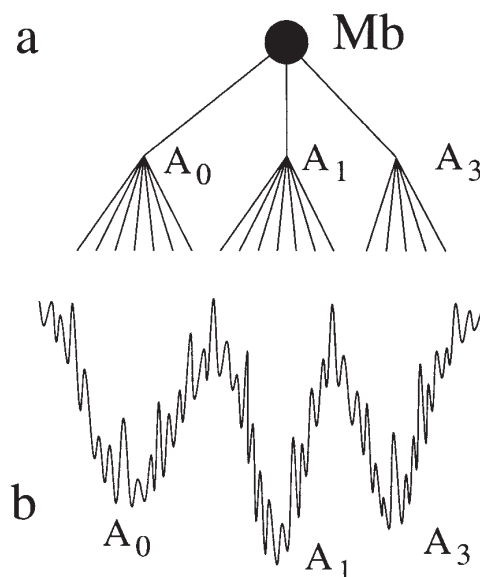


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der Energielandschaft von Myoglobin mit den drei taxonomischen Unterzuständen A_0 , A_1 und A_3 . Teil **a** zeigt die hierarchische Struktur der drei taxonomischen Unterzustände mit ihren jeweiligen statistischen Unterzuständen als Baumdiagramm. Teil **b** zeigt einen Querschnitt durch die Energielandschaft (übernommen aus [76]. Copyright (2001) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America).

Proteinen mit eingebetteten Farbstoffmolekülen die Aktivierung durch Lichtanregung der Farbstoffmoleküle.

Geht ein im Protein eingebettetes Farbstoffmolekül nach Lichtabsorption in den angeregten Zustand über, so verändert sich das elektrostatische Potential in seinem Umfeld. Diese Veränderung kann die Energiebarrieren zwischen verschiedenen Unterzuständen beeinflussen und so weitere Wege zum Wechsel zwischen Konformationszuständen ermöglichen. Einfach beschreiben lässt sich dieser Prozess für zwei Unterzustände in Form eines Zweiniveausystems (*two-level system*, TLS).[52]

In Abbildung 1.13 ist schematisch das Energiediagramm eines TLS für den Grundzustand, α , und den angeregten Zustand, β , dargestellt. Im hier dargestellten Fall befindet sich das System in der linken Potentialmulde im Grundzustand und geht durch Absorption eines Photons in den angeregten Zustand über (roter Pfeil). Im angeregten Zustand ist die Energiebarriere V_β zwischen den beiden Potentialmulden kleiner als V_α im Grundzustand. Daher kann ein Konformationsübergang von der

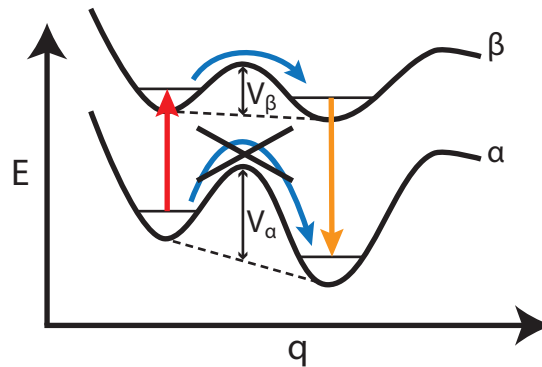


Abbildung 1.13: Schematisches Energiediagramm eines TLS im Grundzustand, α , und im angeregten Zustand, β , zur Beschreibung des lichtinduzierten Übergangs zwischen zwei Konformationszuständen. V_α und V_β geben die Höhe der Energiebarriere im Grund- und im angeregten Zustand an, E ist die potentielle Energie und q ist die intermolekulare Koordinate.

linken Potentialmulde zur rechten (blauer Pfeil) stattfinden, und das System geht in dieser Konformation unter Emission eines Photons in den Grundzustand über (oranger Pfeil). In diesem Fall ist der Energieabstand zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand größer als vorher bei der Anregung, was zu einer Blauverschiebung der Emission gegenüber der Absorption führt. Sind die Abstände umgekehrt verteilt, führt dies zu einer Rotverschiebung der Emission. Kann der Übergang vom Grundzustand in den angeregten Zustand für beide Konformationen angeregt werden, kann dies zu einem zyklischen Wechsel zwischen den beiden Konformationen führen. Der dabei hervorgerufene Wechsel zwischen verschiedenen Emissions- und Absorptionsfrequenzen führt zu Sprüngen im Emissions- und Absorptionsspektrum, die als spektrale Diffusion bezeichnet werden.

Da Proteine viele verschiedene Konformationszustände aufweisen, muss das TLS-Modell für ein im Protein eingebettetes Farbstoffmolekül durch ein Modell mit vielen Zuständen erweitert werden. Entsprechend beobachtet man bei der Untersuchung einzelner Proteine typischerweise spektrale Diffusion zwischen vielen unterschiedlichen Emissions-/Absorptionsfrequenzen.[77] Bei Raumtemperatur wechselt ein Protein seinen Konformationszustand aufgrund angeregter Molekülschwingungen innerhalb von Pikosekunden, so dass auch einzelne Moleküle eine mit Ensemblespektren vergleichbare Breite aufweisen. Bei tiefer Temperatur dagegen sind größere Konformations-

Veränderungen der Proteine eingefroren und nur Konformationsübergänge in den unteren Rängen der Energielandschaft, die zu spektraler Diffusion im Bereich von Nanometern führen, sind möglich.[78, 79] Den größten Einfluss auf die spektrale Diffusion haben dabei Konformationsübergänge des Farbstoffmoleküls oder seiner direkten Umgebung.[77, 18] Abhängig von der Rate und der Breite der spektralen Diffusion beobachtet man bei tiefen Temperaturen inhomogene Verbreiterungen der Absorption oder Emission einzelner Proteine oder Proteinkomplexe.[78, 17]

Abbildung 1.14 zeigt das Ergebnis mittels Monte-Carlo-Simulation berechneter Spektren eines einzelnen Emitters mit spektraler Diffusion. Die Simulation wurde selbst entwickelt und verwendet für die Berechnung der Linienform Gleichung 1.4 (siehe S. 18). In der Simulation wird zum einen die Wahrscheinlichkeit für die Emission eines Photons anhand der Linienform bestimmt. Zum anderen wird die spektrale Diffusion als *random walk* zwischen unterschiedlich entlang der Wellenlängenachse verschobenen Linienformen simuliert. Für die Abbildung wurden für exponentiell zunehmende Diffusionsraten Spektren mit einer Sekunde Akkumulationszeit berechnet. Man erkennt deutlich, wie mit zunehmender Diffusionsrate die zugrundeliegende Linienform bei gleichem Signal-Rausch-Verhältnis schlechter erkennbar wird, bis sie durch die starke Verbreiterung nicht mehr sichtbar ist.

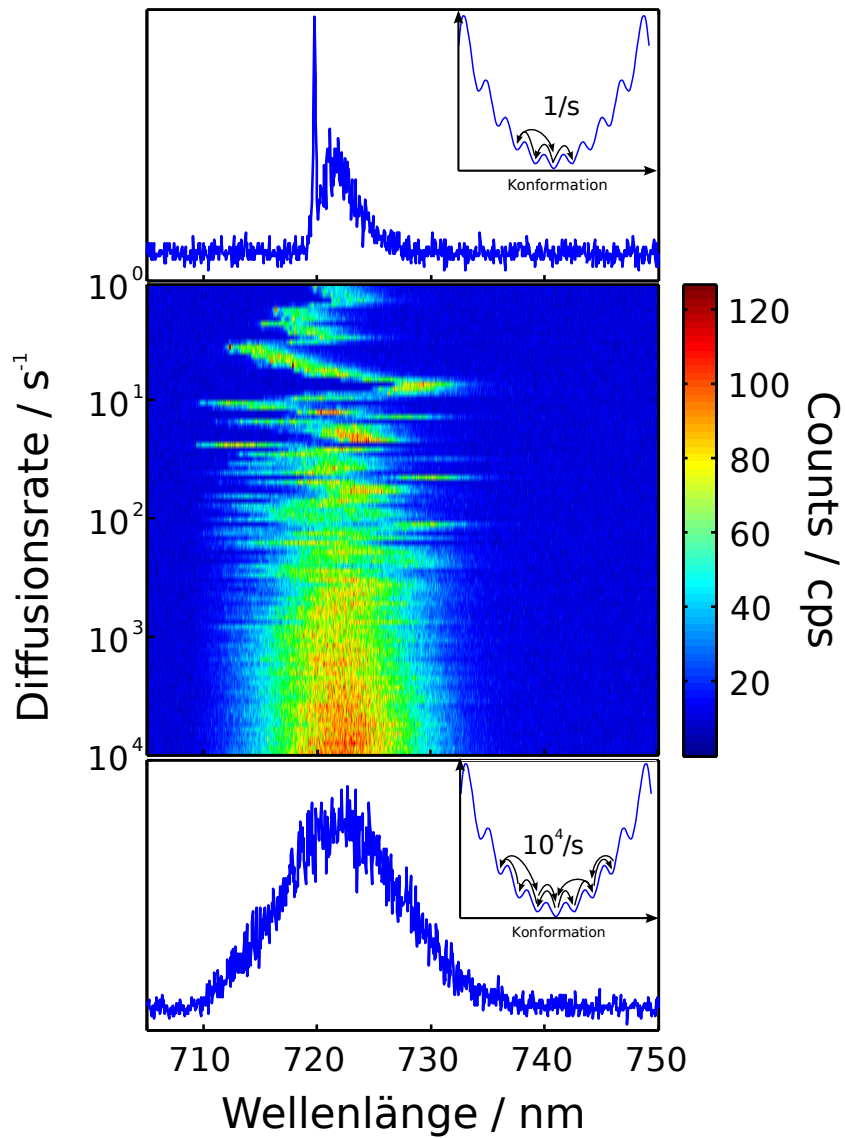


Abbildung 1.14: Monte-Carlo-Simulation zur Veranschaulichung des Einflusses der spektralen Diffusion auf das Emissionsspektrum eines einzelnen Emitters. Die Simulation zeigt wie mit zunehmender Diffusionsrate das Emissionsspektrum eines einzelnen Emitters verbreitert wird. Das obere Spektrum zeigt das über eine Sekunde gemittelte simulierte Emissionsspektrum bei einer Diffusionsrate von einem Sprung pro Sekunde, das untere das Spektrum bei einer Diffusionsrate von 10^4 Sprüngen pro Sekunde.

Kapitel 2

Experimenteller Aufbau

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Aufbauten für Einzelmolekülspektroskopie bei tiefen Temperaturen verwendet. Der eine Aufbau wurde ursprünglich von Hauke Studier (FU Berlin) im Rahmen seiner Dissertation an der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe Bittl aufgebaut.[80] Später wurde der Aufbau um Komponenten wie z. B. zeitkorrelierte Einzelphotonendetektion (TCSPC), gepulste Laser und zusätzliche Detektoren erweitert. Der zweite Aufbau wurde im Rahmen dieser Arbeit konzipiert und aufgebaut. Dabei wurde auch ein neuartiges Probentransfersystem entwickelt, das einen Probenwechsel bei tiefen Temperaturen (4,2 K) ermöglicht.

Beide Aufbauten sind aus einzelnen Komponenten aufgebaute konfokale Mikroskope für die Detektion der Fluoreszenzemission einzelner Moleküle. Zur Anregung der Fluoreszenzemission stehen jeweils verschiedene Laser über eine optische Faser zur Verfügung. Zur Schwingungsdämpfung sind die Komponenten bei beiden Aufbauten jeweils auf einem optischen Tisch mit aktiven Dämpfern (OPTA GmbH) montiert. Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Aufbauten besteht in der Umsetzung der bei konfokalen Mikroskopen notwendigen Rasterung der Probe. Der erste Aufbau verwendet das sog. *beam scanning*. Dabei wird der Laserstrahl in der Fokusebene des Objektivs über die Probe bewegt. Der zweite Aufbau dagegen verwendet das sog. *sample scanning*, bei dem die Probe im Fokus des Objektivs bewegt wird und der Laserstrahl fix bleibt. Dieser Unterschied lässt sich in Abbildung 2.1, in der beide Aufbauten schematisch dargestellt sind, nachvollziehen. Teil a zeigt den ersten Aufbau mit *beam scanning* und Teil b zeigt den zweiten Aufbau mit *sample scanning*.

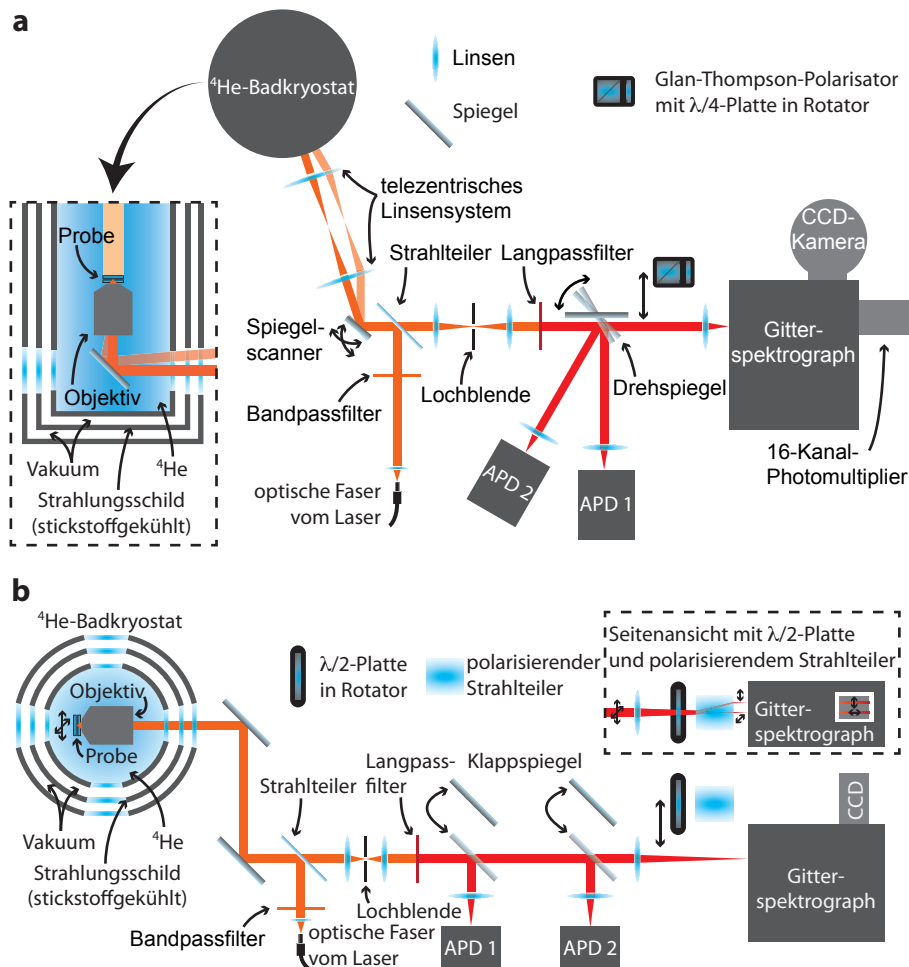


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der beiden in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Aufbauten. Teil **a** zeigt den Aufbau, der ursprünglich von Hauke Studier (FU Berlin) im Rahmen seiner Dissertation umgesetzt wurde. Teil **b** zeigt den Aufbau, der im Rahmen dieser Arbeit konzipiert und umgesetzt wurde.

2.1 Optik

Betrachtet man in beiden Teilabbildungen jeweils den Weg des Laserstrahls ausgehend von der optischen Faser, so verläuft dieser bei beiden durch eine Linse zur Kollimierung und einen Bandpassfilter (AHF Analysentechnik, HC 680/13 oder HC 660/13) zur Unterdrückung von Seitenbanden der Laser zu einem dichroitischen Strahlteiler (AHF Analysentechnik, Z 680 RDC oder ZQ 670 RDC), mit dem der Laserstrahl in den Strahlengang des Mikroskops reflektiert wird. Danach trifft der Laserstrahl im ersten Aufbau auf einen Spiegelscanner (ein um zwei Achsen kippbarer Spiegel, PI, S-334-2SL), mit dem der Laserstrahl computergesteuert in zwei Achsen abgelenkt werden kann. Mithilfe des nachfolgenden telezentrischen Linsensystems trifft so der Laserstrahl durch ein Fenster des Kryostaten (Janis, SVT-200) und einen Umlenkspiegel im Inneren in unterschiedlichen Winkeln in die Hauptebene des Objektivs (Mikrothek, $60\times$ N.A.=0.85). Da für paralleles Licht der Fokuspunkt vom Einfallswinkel in die Hauptebene des Objektivs abhängt, lässt sich mit dem Spiegelscanner auf diese Weise die Position des Laserfokus' in der Fokusebene des Objektivs steuern. Das telezentrische Linsensystem besteht aus zwei achromatischen Linsenpaaren mit 25 cm Brennweite (LINOS), die im Abstand von 50 cm ($2f$) voneinander stehen. Der Spiegelscanner befindet sich im Fokus der ersten Linse, und die Hauptebene des Objektivs liegt auf der gegenüberliegenden Seite im Fokus der zweiten Linse. Im Unterschied dazu trifft der Laserstrahl im zweiten Aufbau nacheinander auf zwei feste Spiegel, die den Strahl durch ein Fenster des Kryostaten in die Mitte des Objektivs leiten. Wie vorher schon erwähnt, bleibt hier der Laserfokus fix, und die Probe wird im Laserfokus bewegt. Außerdem ist das Objektiv in diesem Aufbau liegend im Kryostaten fixiert, so dass der Umlenkspiegel im Kryostaten wegfällt. Dieses Design wurde gewählt, weil so die aufwändige Ausrichtung des Umlenkspiegels entfällt und direkte Sicht auf das Objektiv besteht.

Das vom Objektiv gesammelte Fluoreszenzlicht aus dem Laserfokus läuft bei beiden Aufbauten entsprechend entgegen des Laserlichts zurück, passiert jeweils den Strahlteiler und danach ein System aus zwei Linsen und einer Punktlochblende, das als Raumfilter wirkt, bevor es zu den verschiedenen Detektoren gelangt. Dabei wird das Fluoreszenzlicht mit der ersten Linse auf eine Punktlochblende (*Pinhole*, $\varnothing = 50\ \mu\text{m}$, Thorlabs) fokussiert und hinter der Punktlochblende von einer zweiten Linse wieder

kollimiert (bei den Linsen handelt es sich um achromatische Linsenpaare mit 60 mm Brennweite). Auf diese Weise gelangt bei korrekter Justage nach dem konfokalen Prinzip nur Licht zu den Detektoren, das aus dem Laserfokus stammt, während die Anteile außerhalb des Fokus stark unterdrückt werden. Nach der zweiten Linse trifft das Fluoreszenzlicht bei beiden Aufbauten auf einen dielektrischen Langpassfilter (AHF Analystechnik, HQ 695 LP), der das gegenüber dem Laserlicht rotverschobene Fluoreszenzlicht zu über 90% passieren lässt, aber Laserlicht, das im Fokus oder einer anderen Stelle des Strahlengangs zurückgestreut wurde, stark unterdrückt.

Bei beiden Aufbauten stehen ähnliche Detektoren zur integralen und spektralen Analyse zur Verfügung: eine Avalanche-Photodiode (APD) mit hoher Quanteneffizienz ($\sim 90\%$) zur integralen Intensitätsmessung (Abb. 2.1: APD 1), eine APD mit aktivem *quenching* für TCSPC-Messungen (Abb. 2.1: APD 2) und ein Gitterspektrograph mit angeschlossener CCD-Kamera zur spektralen Analyse. Der erste Aufbau verfügt am Spektrographen zusätzlich über einen 16-Kanal-Photomultiplier für spektral aufgelöste TCSPC-Messungen. Die Detektoren werden über computergesteuerte Spiegel ausgewählt. Beim ersten Aufbau kommt ein drehbarer Spiegel zum Einsatz, mit dem das Fluoreszenzlicht entweder durch Linsen auf die beiden APDs fokussiert werden kann, oder es fällt, wenn der Spiegel aus dem Strahlengang heraus gedreht wird, direkt auf eine Linse, die es auf den Eingangsspalt des Gitterspektrographen fokussiert. Im Gitterspektrographen kann zusätzlich über einen eingebauten Klappspiegel zwischen der CCD-Kamera und dem 16-Kanal-Photomultiplier gewählt werden. Die Detektoren in diesem Aufbau sind: SPCM-ARQ-15 von Perkin-Elmer (APD 1), ID100 von ID Quantique (APD 2), SPEC10:100BR von Roper Scientific (CCD-Kamera) und PML-16-C von Becker&Hickl GmbH (16-Kanal-Photomultiplier). Der Gitterspektrograph (Princeton Instruments SpectraPro 300i) ist mit drei unterschiedlichen Reflexionsgittern mit 300, 600, und 1200 Linien pro Millimeter ausgestattet, so dass zwischen drei verschiedenen spektralen Auflösungen gewählt werden kann. Zusätzlich kann für polarisationsabhängige Messungen ein Glan-Thompson-Polarisator, der zusammen mit einer $\lambda/4$ -Platte in einen Rotor eingebaut ist, in den Strahlengang vor den Gitterspektrographen gestellt werden. So kann das Fluoreszenzlicht abhängig von der Polarisationsrichtung spektral analysiert und z. B mehrere Emitter in einem PSI anhand ihrer Polarisationsrichtung unterschieden werden.[41, 81] Die $\lambda/4$ -Platte erzeugt aus dem linear polarisierten Licht hinter dem Glan-Thompson-Polarisator zir-

kular polarisiertes, so dass Intensitätsmodulationen auf der CCD-Kamera, die durch die polarisationsabhängige Effizienz der Reflexionsgitter des Spektrographen auftreten können, minimiert werden.

Beim zweiten Aufbau werden zwei elektrische Klappspiegel zur Auswahl des Detektors verwendet. Sind beide Spiegel aus dem Strahlengang geklappt, wird das Fluoreszenzlicht von einer Linse auf den Eingangsspalt des Gitterspektrographen fokussiert. Um das Fluoreszenzlicht auf eine der APDs zu lenken wird der der APD gegenüberstehende Spiegel in den Strahlengang geklappt, so dass das Fluoreszenzlicht in Richtung der APD reflektiert und von einer Linse auf diese fokussiert wird. Die Detektoren in diesem Aufbau sind: Count-100C von Laser Components (APD 1), PD1CTC von Micro Photon Devices (APD 2) und DU920P-BR-DD von Andor Technology pic. (CCD-Kamera). Der Gitterspektrograph (Shamrock 500i, Andor Technology pic.) ist mit zwei unterschiedlichen Reflexionsgittern mit 200 und 400 Linien pro Millimeter ausgestattet und ermöglicht so zwei unterschiedliche spektrale Auflösungen. Ähnlich wie beim ersten Aufbau kann auch in diesem Aufbau das Fluoreszenzlicht abhängig von der Polarisation spektral analysiert werden. Dafür kann computergesteuert eine $\lambda/2$ -Platte in einem Rotor zusammen mit einem polarisierenden Strahlteiler (*polarizing beam displacer*) vor den Gitterspektrographen gefahren werden. Mit der $\lambda/2$ -Platte wird die Polarisationsebene des Fluoreszenzlichts abhängig von der Stellung des Rotors gedreht, und der polarisierende Strahlteiler trennt das Fluoreszenzlicht dann in zwei linear polarisierte Parallelstrahlen auf (siehe Abbildung 2.1b). Ein Strahl ist parallel und der andere senkrecht zur Ebene des optischen Tisches polarisiert. Mit der CCD-Kamera kann man so die Spektren für parallele und senkrechte Polarisation gleichzeitig aufnehmen.

2.2 Probenhalterung und Positionierung

Neben der Optik unterscheiden sich die beiden Aufbauten deutlich bei der Probenhalterung und Positionierung. Im Folgenden werden die beiden unterschiedlichen Systeme zur Probenhalterung und Positionierung kurz beschrieben. Eine detaillierte Beschreibung des ersten Aufbaus beinhalten die Dissertationen von Hauke Studier (FU Berlin) [80] und Jana Nieder (FU Berlin) [82].

Der erste Aufbau verwendet ein einfaches Probenhalterungssystem, bei dem die

Probe am unteren Ende eines etwa 1 m langen und 8 mm dicken Probenstabes montiert wird. Dieses Ende besteht aus Edelstahl und hat eine Vertiefung in der die Probe mithilfe von Vakuumpfett fixiert wird. Die Probe besteht dabei aus zwei Quarzgläschen, zwischen die weniger als $1 \mu\text{l}$ Probenlösung gebracht wird. Der mittlere Teil des Stabes besteht aus einem faserverstärkten Kunststoffrohr (HGW2375, Hesselmann), in das ein Temperatursensor (CX-1030-SD 0.3L, Lakeshore) eingebaut ist. Am oberen Ende wird der Stab durch ein Edelstahlrohr mit aufgesetzter Buchse für den Anschluss des Temperatursensors verschlossen. Für eine Messung wird dieser Stab mit der Probe am vorderen Ende von oben in den Kryostaten eingeführt, bis die Probe noch wenige Millimeter vom Objektiv entfernt ist. Dann wird der Stab am oberen Ende des Kryostaten an einem computergesteuerten Translationstisch mit Schrittmotor fixiert. Mit diesem Translationstisch wird der Stab dann schrittweise an das Objektiv angenähert, bis die Probe in der Fokusebene des Objektivs liegt. Dieses Design ist mechanisch leicht realisierbar, erfordert keine motorisierten Komponenten im Kryostaten und ermöglicht das Einsetzen und Herausnehmen bei tiefen Temperaturen. Ein Nachteil ist, dass nur der im Sichtfeld des Objektivs liegende Teil der Probe für Messungen zur Verfügung steht, weil die am Stab fixierte Probe nur entlang der optischen Achse bewegt werden kann.

Das mechanische Design des zweiten Aufbaus ist dagegen komplexer, weil die Probe für *sample scanning* auf einem Scantisch mit Piezoaktuatoren montiert werden muss. Dafür darf die Probe jedoch nicht wie im ersten Aufbau an einem langen Stab, sondern nur direkt am Scantisch fixiert sein. Eine Möglichkeit wäre, die Probe außerhalb des Kryostaten auf dem Scantisch zu fixieren und den Scantisch samt Probe in den Kryostaten zu transferieren. Man kann dann jedoch die Probe nicht in den gekühlten Kryostaten einbauen oder herausnehmen, was lange Kühl- und Heizprozeduren mit sich bringt. Insbesondere für Proteinproben, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, ist die langsame Abkühlung problematisch, da die Heliumatmosphäre im Kryostaten zur Austrocknung und damit zu einer Veränderung der Proteine führt. Aus diesen Gründen und um mögliches Festfrieren der Piezoaktuatoren durch Stickstoff oder Wasser zu verhindern, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiges Proben-transfersystem entwickelt, mit dem eine Probe auf einem Probenträger von außen in den Kryostaten eingebracht und auf den im Kryostaten eingebauten Scantisch transferiert werden kann. Bei diesem System wird die Probe auf einem Probenträger aus Edelstahl fixiert, der über eingebaute Permanentmagnete sowohl am Scantisch als auch

an einem Transferstab befestigt werden kann. Ähnlich wie beim ersten Aufbau ist der Stab 8 mm dick und über 1 m lang und besteht überwiegend aus einem faserverstärkten Kunststoffrohr (HGW2375, Hesselmann). Das untere Ende besteht aus Edelstahl und enthält einen Permanentmagneten zur Befestigung des Probenträgers. Am oberen Ende wird der Transferstab durch einen Edelstahlstab verschlossen. Im Gegensatz zum ersten Aufbau enthält der Stab keinen Temperatursensor, da er nur für den Transfer der Probe in den Kryostaten verwendet und vor einer Messung wieder aus dem Kryostaten herausgezogen wird. Daher wurde der Temperatursensor (CX-1030-SD-HT 0.3L, Lakeshore) fest in den im Kryostaten befindlichen Probenkopf eingebaut. Für eine Messung wird der Probenträger samt Probe am unteren Ende des Transferstabes montiert und mit dieser Seite voran von oben in den Kryostaten eingeführt. Der Transferstab wird soweit in den Kryostaten eingeführt, bis die Magnete im Probenträger in Kontakt mit den Haltemagneten im Scantisch kommen. In dieser Position wird der Probenträger dann mithilfe von piezogetriebenen Translationstischen durch seitliche Verschiebung vom Transferstab gelöst und vor dem Mikroskopobjektiv positioniert. Danach wird der Transferstab herausgezogen, und das Objektiv, das ebenfalls auf einem Translationstisch montiert ist, wird an die Probe herangefahren, bis die Probe im Fokus liegt. Eine detaillierte Beschreibung des mechanischen Aufbaus und des Transfermechanismus liefert Kapitel 10.

2.3 Probenpräparierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PSI-Proben mit PSI-Komplexen der Organismen *T. elongatus* und *A. platensis* verwendet. Zur Verfügung gestellt wurden die Proben in Form von isolierten PSI-Trimeren in Pufferlösung von Eberhard Schlodder (TU Berlin). Die Chlorophyll-*a*-Konzentration dieser Lösungen lag bei einigen Millimol pro Liter. Bei ca. 300 Chlorophyll-*a*-Molekülen pro PSI-Trimer entspricht das einer PSI-Trimer-Konzentration im Mikromolaren Bereich. Für ein Experiment ist diese Konzentration zu hoch, da man für die örtliche Separierung der einzelnen Trimere im konfokalen Mikroskop Konzentrationen im Picomolaren Bereich benötigt. Daher wurde für die einzelnen Experimente jeweils 1 μ l der Stammlösung entnommen und dann in drei Schritten in Pufferlösung auf einige Picomol pro Liter verdünnt. Von der verdünnten Lösung wurde dann weniger als 1 μ l auf ein Quarzglaschen ($4 \times 4 \times 0,2$ mm, Quarzglas

Komponenten und Service GmbH) aufgebracht und ein zweites darüber gelegt, so dass sich ein dünner Flüssigkeitsfilm zwischen den beiden Gläschen bildete. Danach wurde die Probe in den kalten (4,2 K) Kryostaten eingebaut.

Für die meisten Experimente wurde zur Verdünnung eine Pufferlösung mit pH 7,5 auf Wasserbasis mit 20 mmol/l Tricin, 25 mmol/l Magnesiumdichlorid (MgCl_2), 5 mmol/l Natriumascorbat und 0,4 mmol/l n-Dodecyl- β -D-Maltosid verwendet. Für die Experimente aus den Kapiteln 4 und 5 wurde der Wasseranteil der Pufferlösung durch Wasser/Glycerin- oder Wasser/Polyvinylalkohol-Gemische (PVA) ersetzt.

2.4 Erzeugung tiefer Temperaturen

Zur Erzeugung der für die Messung erforderlichen tiefen Temperaturen wird in beiden Aufbauten ein Heliumbadkryostat mit Reservoir Typ SVT-200 der Firma Janis verwendet. Der Kryostat besteht aus einem zentralen Probenrohr, um das im oberen Teil ein Heliumreservoir und darum ein Flüssigstickstofftank angeordnet sind. Das Heliumreservoir und das Probenrohr sind jeweils am unteren Ende durch eine Kapillare miteinander verbunden, durch die flüssiges Helium vom Reservoir in das Probenrohr geleitet werden kann. Der Zufluss wird dabei durch ein Nadelventil gesteuert. Der Teil des Probenrohrs unterhalb des Heliumreservoirs wird über einen Strahlungsschild, der am Flüssigstickstofftank befestigt und so von diesem gekühlt wird, vor Wärmestrahlung von außen geschützt. Der Raum zwischen den verschiedenen Kammern wird zur Wärmeisolation auf ca. 10^{-5} mBar evakuiert. Der Einbau einer Probe wird typischerweise bei der Siedetemperatur von flüssigem Helium (4,2 K) vorgenommen. Für eine Messung muss die Temperatur jedoch weiter abgesenkt werden, bis das flüssige Helium bei ca. 2,2 K in den suprafluiden Zustand übergeht, da sonst entstehende Gasbläschen des siedenden Heliums den Strahlengang stören und eine stabile Messung unmöglich machen. Zur Absenkung der Temperatur wird Heliumgas aus der Probenkammer abgepumpt, und so das flüssige Helium über Verdampfung gekühlt. Das gasförmige Helium aus dem Probenrohr wird in beiden Aufbauten jeweils durch ein zweistufiges Pumpensystem aus einer Drehschieberpumpe E1M40 bzw. E2M80 (Edwards) mit einer zusätzlichen Rootspumpe EH250 (Edwards) abgepumpt. Mit diesen Pumpensystemen erreicht man Temperaturen zwischen 1,3 und 1,6 K.

Kapitel 3

Umfang der Arbeit

Im Folgenden wird der Umfang der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente, der teilweise selbst entwickelten Auswertungsmethoden und des Aufbaus eines neuen konfokalen Tieftemperaturmikroskops für Einzelmolekülspektroskopie beschrieben. Die Experimente lassen sich dabei in drei Kategorien einteilen: (i) Einfluss von Glycerin und PVA auf die Konformation von PSI; (ii) Charakterisierung der Fluoreszenzemission einzelner PSI-Komplexe aus *A. platensis* und Vergleich mit PSI-Komplexen aus *T. elongatus*; (iii) Untersuchung der Wechselwirkung von PSI mit Fischer-Pattern aus Gold und Silber. Außerdem bestand ein wesentlicher Teil der Arbeit im Aufbau eines neuen Tieftemperaturmikroskops für Einzelmolekülspektroskopie inklusive der Erstellung einer Steuerungs- und einer Auswertesoftware.

Die folgenden Abschnitte beschreiben jeweils die durchgeführten Experimente und Auswertungen, die zu den Publikationen in den Kapiteln 4 bis 9 geführt haben. Dabei beschreibt Abschnitt 3.1 zum Einfluss von Glycerin und PVA auf PSI Experimente und Auswertungen für die Publikationen in den Kapiteln 4 und 5, Abschnitt 3.2 zur Fluoreszenz einzelner PSI Komplexe aus *A. platensis* Experimente und Auswertungen für die Publikationen in den Kapiteln 6 und 7 und Abschnitt 3.3 zur Wechselwirkung von PSI mit Fischer-Pattern aus Gold und Silber Experimente und Auswertungen für die Publikationen in den Kapiteln 8 und 9. In Abschnitt 3.4 werden Konzipierung und durchgeführte Arbeiten zum Aufbau eines Tieftemperaturmikroskops für Einzelmolekülspektroskopie beschrieben, das in der Publikation in Kapitel 10 vorgestellt wird.

3.1 Einfluss von Glycerin und PVA auf die Konformation von PSI

Glycerin und PVA werden häufig bei der Präparierung von Proteinproben verwendet. Während PVA zur Immobilisierung in der Einzelmolekülspektroskopie verwendet wird [83] kommt Glycerin sowohl als Glasbildner für Tieftemperaturexperimente als auch zur Stabilisierung in der Proteinkristallisation zum Einsatz.[84] Glycerin zeichnet sich außerdem durch seine gute Biokompatibilität aus. Zur Untersuchung des Einflusses auf die Konformation von PSI wurden PSI-Komplexe aus *T. elongatus* in Pufferlösung mit 25% (w/w) und 66% (w/w) Glyceringehalt und 1% PVA (w/w) präpariert. Anschließend wurde für diese verschiedenen Präparierungen Spektrenserien der Fluoreszenzemission einzelner PSI-Komplexe bei tiefer Temperatur aufgenommen. Zur Auswertung der so gewonnenen Daten wurden diese mit verschiedenen Methoden analysiert und mit zuvor von Volker Radics aufgenommenen Daten von PSI-Komplexen in reiner Pufferlösung verglichen.

Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Auswertung der Datensätze zu gewährleisten, wurden zwei Algorithmen zur statistischen Analyse der gewonnenen Daten entwickelt und in MATLAB implementiert. Zum einen wurde ein einfacher Algorithmus entwickelt, der zu jedem Datensatz die Wellenlängenposition der maximalen Fluoreszenz und die dazugehörige volle Breite auf halber Höhe (FWHM) bestimmt. Zum anderen wurde ein Algorithmus zur automatischen Erkennung von ZPLs in Spektrenserien entwickelt. Der Algorithmus basiert auf der Kantenerkennung mittels eines eindimensionalen Laplacefilters und bestimmt für jede Spektrenserie Bereiche, in denen ZPLs auftreten. Für eine zuverlässige Erkennung der ZPLs lassen sich verschiedene Parameter wie z. B. vorherige Glättung zur Rauschunterdrückung und der Schwellwert der Kantendetektion anpassen.

Die Ergebnisse des ersten Algorithmus wurden dann für die verschiedenen Präparierungen als Streudiagramme mit FWHM gegen die Position des Maximums aufgetragen. Die Streuung der Punktwolken in diesen Diagrammen sind ein Maß für die Heterogenität der Spektren und der Proteinkonformation, weil die Fluoreszenzemission der eingebetteten Chlorophylle empfindlich auf Veränderungen der Umgebung reagiert (siehe Abschnitt 1.6, S. 27). So wurde gezeigt, dass PSI in reiner Pufferlösung und in einem PVA-Film ähnlich heterogen sind, während PSI in Pufferlösung mit 25% und

66% Glycerin eine deutlich geringere Heterogenität aufweisen. Zusätzlich zeigt PSI in einem PVA-Film die Tendenz, dass bei größeren Emissionswellenlängen auch die Breite der Emissionsspektren zunimmt, was auf eine Veränderung der exzitonischen Kopplung der emittierenden Chlorophylle durch Destabilisierung des Proteingerüsts hinweist.

Mit den Ergebnissen des zweiten Algorithmus' dagegen lassen sich speziell die Chlorophylle untersuchen, deren Emission ZPLs aufweist. Die mit diesem Algorithmus gewonnenen Daten wurden für die verschiedenen Präparierungen als Histogramme der Häufigkeit von ZPLs über die Wellenlänge dargestellt. Dabei zeigen alle Präparierungen eine Häufung von ZPLs um 710 nm, die bereits aus früheren Experimenten bekannt war.[85] Die ZPL-Verteilung fungiert in diesem Fall als eine Art lokale Sonde, da man die Veränderung eines einzelnen Emitters in PSI unabhängig von den anderen Emittlern betrachten kann. Für die verschiedenen Präparierungen ließ sich die ZPL-Verteilung um 710 nm mit einer einfachen Gaußverteilung annähern, wobei in PVA eine fast doppelt so breite Verteilung wie in reiner Pufferlösung beobachtet wurde. In Glycerin dagegen ist die Verteilung etwas schmaler als in reinem Puffer. Diese Ergebnisse zeigen wie die des ersten Algorithmus' eine Stabilisierung des Proteingerüsts in Glycerin entsprechend einer schmalen Verteilung und eine Destabilisierung durch PVA entsprechend einer Verbreiterung. Auffällig ist außerdem, dass bei größeren Wellenlängen als 720 nm in Glycerin kaum ZPLs beobachtet wurden.

Zusätzlich zu diesen beiden Auswertungen wurde für einen Vergleich der gemessenen Daten mit bekannten Ensembledaten für die verschiedenen Präparierungen jeweils das Durchschnittsspektrum aller aufgenommenen Spektren bestimmt. Im Idealfall entspricht für eine ausreichend große Anzahl Datensätze das Durchschnittsspektrum dem Ensemblespektrum. Ein Nachteil dabei ist, dass Ensembledaten nur für Präparierungen mit Glycerin vorliegen. Allerdings stimmen diese gut mit den Durchschnittsspektren für die Präparierungen in Glycerin überein, so dass man davon ausgehen kann, dass die Durchschnittsspektren für PSI in PVA und in reiner Pufferlösung ebenfalls als Rekonstruktion der Ensemblespektren angenommen werden können. Der Vergleich der Durchschnittsspektren untereinander zeigte nahezu identische Spektren für die beiden Präparierungen in Glycerin, die gegenüber der Präparierung in reiner Pufferlösung etwa 4 nm zu größeren Wellenlängen verschoben waren. PSI in PVA zeigte dagegen eine Verschiebung gegenüber PSI in reiner Pufferlösung von ca. 7 nm zu kleineren

Wellenlängen zusammen mit Veränderungen der Form. Dieses Ergebnis zeigt ebenfalls einen starken Einfluss von PVA auf PSI.

Insgesamt konnte mit diesen Experimenten nachgewiesen werden, dass PVA, das häufig zur Präparierung von Proteinen in der Einzelmolekülspektroskopie verwendet wird, zu einer Destabilisierung von PSI führt. Für PSI sind daher Ergebnisse aus Präparierungen in PVA von begrenzter Aussagekraft für seine Funktion. Glycerin dagegen zeigt einen stabilisierenden Effekt auf PSI, der sich besonders in der verringerten Heterogenität der Spektren zeigt. Die Experimente ermöglichen jedoch keinen Rückschluss darauf, ob die stabilisierende Wirkung von Glycerin auf das Proteingerüst durch die in der Literatur diskutierten Wechselwirkungsmechanismen der direkten Wechselwirkung[86] mit dem Protein oder der durch die Hydrierungshülle vermittelten indirekten Wechselwirkung[87, 88] ausgelöst wird. Daher wurde ein weiteres Experiment konzipiert und durchgeführt, bei dem PSI nur kurzzeitig einer hohen Glycerinkonzentration ausgesetzt und dann in Pufferlösung verdünnt wurde, um eine mögliche Bindung von Glycerin an die Oberfläche von PSI nachzuweisen.

Dafür wurde die Probenpräparierung so verändert, dass die PSI-Lösung in einem ersten Schritt wie im vorherigen Experiment einer Glycerinkonzentration von 66% (w/w) ausgesetzt wurde. Danach wurde jedoch ein Teil dieser Lösung entnommen und in zwei Schritten in reiner Pufferlösung verdünnt, so dass die Glycerinkonzentration auf weniger als 0,01% abnahm. Für diese Präparierung wurden, wie in den vorherigen Experimenten, Fluoreszenzspektren einzelner PSI-Komplexe bei tiefer Temperatur gemessen. Anschließend wurden die Daten mit dem vorher beschriebenen Algorithmus zur Erfassung des Fluoreszenzmaximums und FWHM analysiert. Das Streudiagramm zeigt im Vergleich mit den Präparierungen in reiner Pufferlösung und in 66% Glycerin nahezu die gleiche Streuung wie für die Präparierung in 66% Glycerin. Auch das Durchschnittsspektrum war nahezu identisch mit dem für die Präparierung in 66% Glycerin. Also bleibt die stabilisierende Wirkung von Glycerin auf das Proteingerüst mindestens für die Zeit der Probenpräparierung erhalten.

Daraus lässt sich schließen, dass mindestens ein Teil der stabilisierenden Wirkung von Glycerin durch direkte Bindung an die Proteinoberfläche vermittelt wird, weil eine indirekte Stabilisierung vermittelt durch die Hydrierungshülle bei Verringerung der Glycerinkonzentration wieder verschwinden müsste. Der Grund dafür liegt darin, dass bei der indirekten Wechselwirkung Glycerin nur mit den Wassermolekülen der

Hydrierungshülle wechselwirkt, also nur sehr schwach gebunden ist, und daher die Wechselwirkung mit Verringerung der Glycerinkonzentration abnehmen und schließlich verschwinden muss. Ist dagegen Glycerin an die Oberfläche des Proteins gebunden, reicht die Verringerung der Glycerinkonzentration möglicherweise nicht aus, um es zu lösen, oder es löst sich erst nach einer gewissen Zeit. Für eine genauere Untersuchung der Bindung sind Experimente notwendig, bei denen z. B. verschiedene Zeitintervalle abgewartet werden, bevor man die Probe einfriert um die Bindungsstärke des Glycerins an die Proteinoberfläche zu testen.

3.2 Charakterisierung der Fluoreszenzemission einzelner PSI-Komplexe aus *A. platensis*

Zusätzlich zu den Untersuchungen an PSI-Komplexen aus *T. elongatus* wurden in dieser Arbeit Experimente an PSI-Komplexen aus *A. platensis* durchgeführt. Für PSI aus *A. platensis* sind in der Literatur ausführliche Ensemblestudien beschrieben, jedoch waren bisher keine Experimente an einzelnen Komplexen bekannt.[89, 90, 91] Zusätzlich zeichnet sich dieses gegenüber dem aus *T. elongatus* durch eine energetisch besonders tiefliegende Absorptionsbande um 740 nm aus, die in der Fluoreszenz bei ca. 760 nm ihr Maximum hat. Unter anderem wegen dieser Emissionsbande wurde in der Literatur angenommen, dass sich die roten Chlorophylle in PSI aus *A. platensis* stark von denen in *T. elongatus* unterscheiden.

Die Experimente zur Charakterisierung der Fluoreszenzemission wurden in Zusammenarbeit mit Volker Radics durchgeführt. Dafür wurden die PSI-Komplexe wie für *T. elongatus* in Pufferlösung präpariert und anschließend bei tiefer Temperatur Spektrenserien der Fluoreszenzemission aufgenommen. Die Spektren einzelner Komplexe waren wie bei *T. elongatus* aus Bereichen mit schmalen ZPLs und Bereichen breiter unstrukturierter Fluoreszenz zusammengesetzt. Der größte Unterschied bestand in der zusätzlichen breiten Emissionsbande um 758 nm.

Für eine genauere Analyse der beiden breiten Emissionsbanden um 726 (F726) und 758 nm (F760) wurde für jeden Datensatz jeweils die Position des Fluoreszenzmaximums und seine Intensität für beide Emissionsbanden ermittelt. Dafür wurde ein Algorithmus in MATLAB implementiert, der die Spektren in einen Bereich < 740 nm

und einen Bereich > 740 nm aufteilt und so für die beiden Emissionsbanden getrennt die Position und Intensität des Maximums bestimmt. Eine Darstellung der Maximumpositionen der beiden Emitter zeigte jeweils eine Verteilung mit einer Breite von etwa 6 nm FWHM. Außerdem wurde ein Streudiagramm erstellt, bei dem für jeden Datensatz die Wellenlängendifferenz der beiden Maxima über das Intensitätsverhältnis aufgetragen wurde, um einen möglichen Energietransfer von F726 zu F760 zu untersuchen. Ein solcher Energietransfer müsste im Streudiagramm eine Korrelation zwischen der Wellenlängendifferenz und dem Intensitätsverhältnis der beiden Emitter zeigen, weil der spektrale Überlapp zwischen der Emission von F726 und der Absorption von F760 von der Wellenlängendifferenz abhängt. Im Streudiagramm war jedoch keine Korrelation erkennbar. Daher ist ein Energietransfer von F726 zu F760 unwahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Übergangsdipolmomente der beiden Emitter nahezu senkrecht zueinander stehen. Bekräftigt wird diese Annahme durch eine Spektrenserie, bei der ein Polarisator vor dem Spektrographen kontinuierlich gedreht wurde und so die Polarisations Ebenen der beiden Emitter relativ zueinander bestimmt werden konnten. Für diese Spektrenserie betrug der Winkel zwischen den Polarisations Ebenen nahezu 90° . Allerdings ist hierbei zu beachten, dass man die Projektion der Übergangsdipolmomente in die Bildebene beobachtet und so nur den Winkel in der Projektion erhält.

Neben den breiten Emissionsbanden wurden die ZPLs analysiert. Wie bei den Daten für *T. elongatus* wurden die ZPLs mithilfe des selbstentwickelten Algorithmus' automatisch erfasst und die gewonnenen Daten in einem Histogramm dargestellt. Dabei zeigt sich ähnlich wie bei *T. elongatus* eine gaußförmige Verteilung. Außerdem war es für zwei Datensätze möglich, die ZPL mit PW von der sonstigen Fluoreszenzmission zu separieren und den Huang-Rhys-Faktor zu $0,30 \pm 0,05$ und $0,35 \pm 0,05$ zu bestimmen.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den Untersuchungen an *T. elongatus* zeigte große Ähnlichkeiten u.a. bei der Verteilung der ZPLs und als einzigen wesentlichen Unterschied die zusätzliche Emission von F760. Diese Ähnlichkeit widerspricht jedoch der bisherigen Literatur, in der die Emission der roten Chlorophylle für beide Organismen sehr unterschiedlich erklärt wurde. So kam die Frage auf, ob es bei *T. elongatus* eine mit F760 in *A. platensis* vergleichbare Emissionsbande gibt, die bisher nicht erkannt worden war.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden von Eberhard Schlodder (TU Berlin) Ensemblespektren von PSI der beiden Organismen bei verschiedenen Redoxpotentialen aufgenommen, weil für PSI aus *A. platensis* bekannt war, dass die Fluoreszenz von F760 stark vom Redoxzustand des Reaktionszentrums (P700) abhängt.[89] Bei PSI aus *A. platensis* zeigte sich dabei das bekannte Verhalten der starken Erhöhung der Fluoreszenz von F760 für das reduzierte Reaktionszentrum gegenüber dem oxidierten (P700⁺). Für PSI aus *T. elongatus* zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der Fluoreszenz bei reduziertem Reaktionszentrum gegenüber oxidiertem, aber zusätzlich auch eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu größeren Wellenlängen, die bisher so nicht bekannt war. In der Differenz der Spektren für reduziertes und oxidiertes Reaktionszentrum wurde eine zusätzliche vorher unbekannte Emissionsbande bei etwa 740 nm sichtbar, die zu der Verschiebung des Maximums führte. Zusammengenommen zeigte PSI aus *T. elongatus* eine ähnliche Emissionsbande wie F760 in *A. platensis*, die jedoch ca. 20 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben war.

Als Ergänzung der Ensemblemessungen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Fluoreszenz abhängig vom Redoxzustand des Reaktionszentrums an einzelnen PSI-Komplexen der beiden Organismen untersucht. Ein wesentliches Problem bestand dabei darin, das Reaktionszentrum während der Messung im reduzierten Zustand zu halten, da die Quanteneffizienz für eine Ladungstrennung durch Lichtanregung und die damit verbundene Oxidierung des Reaktionszentrums etwa 50% beträgt. Daher musste die Anregungsintensität für die Messung soweit verringert werden, dass der zeitliche Abstand zwischen zwei Anregungen vergleichbar war mit der Dauer der Rückreaktion vom oxidierten in den reduzierten Zustand, deren Halbwertszeit etwa 170 μ s beträgt. Für das verwendete Spektrometer ergab sich aus einer Abschätzung, dass die Leistung des Lasers für die Anregung von typischerweise verwendeten 100 μ W um den Faktor 1000 auf 0,1 μ W reduziert werden musste, so dass sich die Akkumulationszeit für Spektren entsprechend um den Faktor 1000 auf ca. 20 min erhöhte. Im Experiment konnte daraufhin gezeigt werden, dass die Fluoreszenz einzelner PSI-Komplexe vom Redoxzustand des Reaktionszentrums und dieser von der Anregungsrate abhängig ist. Ähnlich wie bei den Ensemblespektren war die Erhöhung der Fluoreszenz für PSI aus *A. platensis* direkt als Erhöhung der Fluoreszenz bei 760 nm erkennbar während bei PSI aus *T. elongatus* nur eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu größeren Wellenlängen beobachtet wurde.

Mithilfe dieser Experimente konnte also gezeigt werden, dass PSI-Komplexe aus *T. elongatus* und *A. platensis* ähnliche Emissionsbanden haben, die sich nur in ihrer Wellenlängenposition unterscheiden, und PSI aus *T. elongatus* eine bisher unbekannte Emissionsbande bei 740 nm hat, die vom oxidierten Reaktionszentrum stark unterdrückt wird. Stellt man die Emissionsbanden aus den Spektren einzelner Komplexe für beide Organismen gegenüber, ergibt sich folgendes Bild: PSI aus *A. platensis* zeigt ZPLs bei 714 nm und breite Emissionsbanden bei 726 und 758 nm; PSI aus *T. elongatus* zeigt die entsprechenden Emissionsbanden bei 710 nm für ZPLs und die breiten Emissionsbanden bei 730 und 740 nm. Die Fluoreszenz der Emissionsbande bei 758 nm für *A. platensis* und der bei 740 nm für *T. elongatus* wird vom oxidierten Reaktionszentrum stark unterdrückt.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der von Eberhard Schlodder (TU Berlin) durchgeführten Experimente konnte eine neue Zuordnung der Fluoreszenzbanden von PSI aus *T. elongatus* zu Chlorophyllmolekülen in der Kristallstruktur erstellt werden. Außerdem wird aufgrund der sehr ähnlichen spektralen Eigenschaften eine große strukturelle Ähnlichkeit der PSI-Komplexe beider Organismen vermutet (Details in Kapitel 6 und 7).

3.3 Wechselwirkung von PSI mit Fischer-Pattern aus Gold und Silber

Aufgrund der Experimente von Mackowski *et al.* [92] zur Fluoreszenzverstärkung photosynthetischer Proteine auf Metallnanostrukturen und der Experimente von Lubner *et al.* [12] zur Kopplung von PSI an Metallnanopartikel wurde im Rahmen dieser Arbeit die Wechselwirkung einzelner PSI-Komplexe mit Fischer-Pattern aus Gold und Silber untersucht. Fischer-Pattern sind hexagonal angeordnete Nanostrukturen, die mittels *Nanosphere-Shadow-Lithographie* hergestellt werden, d.h. man benutzt in hexagonaldichtester Packung angeordnete Nanokugeln als Maske für die Bedampfung von Oberflächen, so dass ebenfalls hexagonal angeordnete Nanostrukturen entstehen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente waren eine Erweiterung der von Jana Nieder (FU Berlin) durchgeführten Experimente, bei denen die Wechselwirkung einzelner PSI-Komplexe mit Silberinselfilmen (SIF) und Goldnanokugeln

untersucht wurde.[93] Ein wesentlicher Vorteil der Verwendung der Fischer-Pattern besteht gegenüber den SIF in der guten Kontrolle über die Größe und Anordnung der Strukturen und gegenüber Goldnanokugeln nur in ihrer genau definierten Anordnung. Die Präparierung der Fischer-Pattern bestehend aus der Präparierung der Masken aus Latexnanokugeln auf Quarzplättchen und der anschließenden Bedampfung mit Silber oder Gold wurde zusammen mit Piotr Patoka (FU Berlin) durchgeführt. Dabei wurde ein in der Arbeitsgruppe von Michael Giersig entwickeltes Verfahren zur Herstellung großflächiger monokristalliner Masken verwendet.[94, 95] Die Größe der Latexnanokugeln war für alle Experimente identisch, so dass die Fischer-Pattern ebenfalls die gleichen geometrischen Parameter aufwiesen.

Nach der Bedampfung und Reinigung der Quarzplättchen wurde ähnlich wie bei den vorherigen Experimenten ca. $1 \mu\text{l}$ Pufferlösung mit PSI aus *T. elongatus* auf die verschiedenen Substrate aufgebracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Anschließend wurden bei tiefer Temperatur Spektrenserien der Fluoreszenzemission aufgenommen. Für die spätere Analyse wurden außerdem die Substrate ohne PSI-Lösung bei tiefer Temperatur spektroskopiert und von Celine Elsäßer (FU Berlin) bei Raumtemperatur Extinktionsspektren aufgenommen. Ein Vergleich der Extinktionsspektren mit der Fluoreszenzemission von PSI zeigte außerdem, dass die Fluoreszenz von PSI etwa am Maximum der Extinktion für die Fischer-Pattern aus Silber lag und für die aus Gold an der zu größeren Wellenlängen hin steigenden Flanke.

Die Gegenüberstellung von 2D-Intensitätsscans der Probenoberfläche für PSI auf Fischer-Pattern aus Gold und Silber und der Fischer-Pattern ohne PSI zeigte für die Proben mit PSI intensive Fluoreszenz einzelner PSI-Komplexe auf der Oberfläche, gleichmäßige Lumineszenz mit einigen intensiveren Punkten für die Fischer-Pattern aus Silber und sehr schwache gleichmäßige Lumineszenz für die Fischer-Pattern aus Gold. Eine spektrale Analyse der Lumineszenz für die Fischer-Pattern aus Silber zeigte eine breitbandige Emission zwischen 700 und 800 nm, die sich deutlich von der Emission von PSI unterschied und so leicht von dieser trennen ließ.

Zur weiteren Analyse wurden die Daten für PSI auf den Fischer-Pattern mit Daten für PSI ohne Nanostrukturen, die zuvor von Volker Radics gemessen wurden, verglichen. Dabei zeigten sich deutliche Abweichungen sowohl in der Intensität als auch in der Form der Spektren einzelner PSI-Komplexe auf Fischer-Pattern gegenüber der Vergleichsprobe ohne Nanostrukturen.

Ein Vergleich der Durchschnittsspektren aller aufgenommenen Spektren für die drei Präparierungen zeigte eine deutliche Verstärkung der Fluoreszenz für PSI auf Fischer-Pattern, wobei für Silber die Verstärkung größer war als für Gold. Außerdem sind die Durchschnittsspektren für die Fischer-Pattern breiter als für reines PSI. Zusätzlich wurde wellenlängenabhängig die Verstärkung durch die Fischer-Pattern untersucht, indem die Durchschnittsspektren für PSI auf Fischer-Pattern durch das Durchschnittsspektrum für reines PSI geteilt wurden. Die beiden daraus erhaltenen Verstärkungsspektren zeigten jeweils zwischen 695 und 710 nm die größte Verstärkung mit Faktor 11 bis 16 für Silber und Faktor 5 bis 7 für Gold und blieben danach zu größeren Wellenlängen etwa konstant bei Faktor 4 bis 6 für Silber und Faktor 2 bis 3 für Gold.

Neben der Analyse der Durchschnittsspektren wurde für die drei Präparierungen die Fluoreszenzintensität der einzelnen PSI-Komplexe für den Bereich von 695 bis 780 nm integriert, um die Intensitätsverteilung für die drei Präparierungen zu erhalten. Für einen Vergleich wurden anschließend die Intensitätswerte auf die mittlere Intensität der PSI-Komplexe ohne Nanostrukturen normiert, indem durch diese geteilt wurde. Dadurch ergaben sich für die einzelnen PSI-Komplexe die Verstärkungsfaktoren, die das Verhältnis der Intensität eines einzelnen PSI-Komplexes zur mittleren Intensität eines PSI-Komplexes ohne Kopplung mit Nanostrukturen angeben. Die PSI-Komplexe auf den Fischer-Pattern zeigten in einer Histogrammdarstellung der Verstärkungsfaktoren eine breitere Verteilung als die ohne Nanostrukturen. Für Gold lagen die Verstärkungsfaktoren zwischen 1 und 10,5 und im Vergleich dazu für Silber zwischen 1,5 und 15. Im Mittel ergab sich für Silber ein Verstärkungsfaktor von 5,7 und für Gold von 2,2.

Mit diesen Experimenten konnte also gezeigt werden, dass die Wechselwirkung von PSI mit Fischer-Pattern aus Gold und Silber zu einer Verstärkung der Fluoreszenzemission führen. Insbesondere im Bereich zwischen 695 und 710 nm, in dem PSI typischerweise kaum Fluoreszenz aufweist, war die Verstärkung besonders groß. Das deutet darauf hin, dass der Energietransfer von den Antennenchlorophyllen zu den roten Chlorophyllen gestört wurde und Chlorophylle, die im ungestörten PSI keine Fluoreszenz zeigen, in diesem Bereich emittieren. Außerdem wiesen die verwendeten Fischer-Pattern selbst nur eine schwache Lumineszenz auf, weshalb sie kaum Einfluss auf die Messung der Fluoreszenzverstärkung hatten.

Aufgrund der Ähnlichkeit dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen der zuvor erwähn-

ten Experimente von Jana Nieder (FU Berlin) wurden zusätzlich diese miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass sich für alle verwendeten Nanostrukturen die Form der Durchschnittsspektren gegenüber PSI ohne Kopplung an Nanostrukturen veränderte und die Verstärkung im Bereich von 695 bis 710 nm besonders groß war. Außerdem zeigten die Fischer-Pattern mit $2,2\times$ für Gold und $5,7\times$ für Silber eine deutlich geringere mittlere Verstärkung als SIF mit $7\times$ und Goldnanokugeln mit $9\times$. Ähnlich war der Unterschied für die maximale Verstärkung eines einzelnen PSI-Komplexes mit $10,5$ für Gold und 15 für Silber bei den Fischer-Pattern gegenüber 36 für SIF und 37 für Goldnanopartikel. Ein Vergleich der Nanostrukturen ohne PSI zeigte jedoch, dass die Fischer-Pattern gegenüber SIF und Goldnanokugeln den wesentlichen Vorteil aufweisen, selbst kaum Lumineszenz zu emittieren und so insbesondere in Experimenten zur Fluoreszenzverstärkung einen wesentlich geringeren störenden Einfluss auf die Messungen haben.

3.4 Aufbau eines konfokalen Tieftemperaturmikroskops für Einzelmolekülspektroskopie

Neben den Experimenten und der Auswertung der Daten bestand ein wesentlicher Teil der Arbeit im Aufbau eines neuen Spektrometers für Einzelmolekülspektroskopie bei tiefer Temperatur zusammen mit der Entwicklung der Steuerungssoftware und passender Auswertungssoftware. Die Hauptanforderungen an den neuen Aufbau bestanden dabei in der Verwendung von Piezoaktuatoren zur Probenpositionierung und zum Rastern der Probe, der Möglichkeit, Proben mit geringem Aufwand auch bei tiefen Temperaturen einzubauen oder zu wechseln, und der Steuerung aller Komponenten mit einer spezialisierten Software zur schnellen und fehlerarmen Bedienung.

In einem ersten Schritt wurde die Optik außerhalb des Kryostaten, wie sie in Abschnitt 2.1 auf Seite 35 beschrieben ist, konzipiert. Durch die Verwendung eines Piezo-scanners zur Rasterung der Probe fiel dabei gegenüber dem vorherigen Aufbau sowohl der Spiegelscanner als auch das telezentrische Linsensystem weg, so dass dieser Teil gegenüber dem vorherigen Aufbau vereinfacht werden konnte. Um diese Vereinfachung fortzuführen, ergab sich für die Entwicklung des Probenkopfes im Kryostaten die Vorgabe, das Mikroskopobjektiv liegend auf der Höhe der optischen Fenster im Kryostaten

anzubringen, damit im Gegensatz zum vorherigen Aufbau ein direkter optischer Zugang durch ein Fenster zum Objektiv besteht.

Mit den Vorgaben, die Probe über möglichst große Bereiche positionieren zu können und einen möglichst großen Bereich hochauflösend rastern zu können, und mit den bekannten Maßen des Innenraumes des Kryostaten, wurden dann passende Piezoaktuatoren der Firma Attocube ausgewählt. So standen drei lineare Piezoaktuatoren mit 12 mm Stellweg für die Positionierung in drei Raumachsen, ein 2D-Piezoscanner mit $30 \times 30 \mu\text{m}$ Stellweg und ein linearer Piezoscanner mit $30 \mu\text{m}$ Stellweg zur Verfügung (Details siehe Kapitel 10). Mit den Dimensionen der Aktuatoren konnte daraufhin der Entwurf des Probenkopfes begonnen werden. Konstruktionszeichnungen dafür wurden mit der 3D-CAD-Software AutoCAD erstellt.

Aufgrund der Ausmaße und der großen Stellwege ließen sich dabei die linearen Piezoaktoren nur mittig im Probenrohr des Kryostaten platzieren. Wegen des geringen Abstandes der optischen Fenster zum Boden des Kryostaten war es außerdem nicht möglich, alle Piezoaktuatoren unterhalb des Objektivs zu platzieren. Daher wurde nur ein linearer Piezoaktor unterhalb des Objektivs platziert, um dieses zur Fokussierung entlang seiner optischen Achse bewegen zu können. Die anderen Piezoaktoren wurden von oben hängend platziert, so dass sich die am unteren Ende angebrachte Probe vor dem Objektiv positionieren lässt. Für diese Anordnung der Piezoaktuatoren wurde daraufhin ein Gerüst entworfen, das sowohl Befestigungsmöglichkeiten für die Piezoaktuatoren besitzt als auch deren Stellwege nicht einschränkt. Außerdem mussten die optischen Fenster und ein mechanischer Zugang von oben zur Einführung der Probe freigehalten werden.

Der größte Teil der weiteren Entwicklungsarbeit bestand darin, ein Probenübergabesystem zu entwerfen, mit dem sich eine Probe über einen Transferstab in den Kryostaten einführen, an den Piezoscantern befestigen und vom Transferstab lösen lässt. Dabei durften die Piezoscanner keinen größeren Kräften als wenigen Newton ausgesetzt sein. Also schieden Bajonettverschlüsse, wie sie z. B. häufig in Ultrahochvakuumkammern verwendet werden, wegen der auftretenden Kräfte aus. Auch eine Mechanik im Transferstab wurde verworfen, da die Wahrscheinlichkeit, dass diese bei den Bedingungen im Kryostaten festfriert, sehr hoch ist. Als mögliche Lösung kam die Verwendung von Permanentmagneten auf, da diese auch bei Ausmaßen von wenigen Millimetern ausreichende Haltekräfte von einigen Newton erreichen.

Das Problem lag nun darin, ein System zu entwickeln, bei dem die Probe zuverlässig sowohl am Transferstab als auch am Piezoscanner magnetisch befestigt werden und gleichzeitig gezielt die Probe vom Transferstab an den Piezoscanner oder umgekehrt übergeben werden kann. Nachdem verschiedene Konstruktionen verworfen werden mussten, wurde schließlich das System entwickelt, das in Kapitel 10 beschrieben ist. Die Grundidee besteht dabei darin, die Magnete für die Befestigung der Probe bzw. des Probenträgers am Transferstab senkrecht zu denen zur Befestigung am Piezoscanner anzuordnen und einen der linearen Piezoaktuatoren zu verwenden, um den Probenträger durch seitliches Verschieben vom Transferstab zu lösen. Durch die senkrechte Anordnung der Magnete zueinander ist außerdem die Haltekraft zwischen Probenträger und Transferstab größer als die Kraft, die benötigt wird, um die Magnete zur Halterung am Piezoscanner gegeneinander zu verschieben. So lässt sich mit diesem System der Probenträger zuverlässig mit dem Transferstab zum Piezoscanner transferieren und mithilfe des linearen Piezoaktuator von diesem lösen. Damit die Kraft, die während der seitlichen Verschiebung des Probenhalters gegenüber dem Transferstab auftritt, nicht auf den Piezoscanner wirkt, wurde eine Führungsplatte am linearen Piezoaktuator angebracht, die den Probenhalter bei seitlichen Bewegungen stabilisiert und die Kraft aufnimmt. Zum Entfernen des Probenträgers vom Piezoscanner muss nur in der passenden Position der Transferstab herangeführt werden, bis die entsprechenden Magnete in Kontakt kommen und dann der Transferstab samt Probenträger herausgezogen werden kann.

Nach ersten erfolgreichen Tests des Prinzips wurde eine Führung für den Transferstab entwickelt, um mögliche Beschädigungen des Piezoscanners durch Drehen des Transferstabes bei der Probenübergabe zu verhindern. Zusätzlich wurde ebenfalls die Verbindung zwischen Transferstab und Probenträger so angepasst, dass diese nicht gegeneinander gedreht werden können. Mit diesen Verbesserungen war es danach möglich, Tests im Kryostaten durchzuführen, bei denen nur eine eingeschränkte Sicht auf den Probenkopf bestand. Dafür wurde der Probenkopf an einem Gestell befestigt, mit dem er bis zum Boden des Kryostaten abgelassen werden konnte. Dieses Gestell besteht aus drei Rohren aus faserverstärktem Kunststoff, die durch vier Strahlungsschilde aus Kupfer in regelmäßigen Abständen verbunden sind. In den Kunststoffrohren wurden die Kabel zur Steuerung der Piezoaktuatoren und zum Auslesen eines Temperatursensors verlegt. Zur Führung des Transferstabes wurden zwischen den Strahlungs-

schilden Edelstahlrohre eingeklemmt, so dass vom obersten Strahlungsschild bis zum Anfang des Probenkopfes eine durchgängige Führung sichergestellt ist. Die Verbindung zwischen diesem Gestell und dem Deckel des Kryostaten wird durch zwei Bolzen am Deckel vermittelt, die in Passbohrungen im Gestell eingeführt werden. So wurde gewährleistet, dass sich der auf dem Boden des Kryostaten stehende Probenkopf samt Gestell beim Kühlprozess gegenüber dem Deckel in der Höhe um einige Millimeter bewegen, aber nicht verdrehen kann.

Zur Einführung des Transferstabes mit Probenträger durch den Deckel in den Kryostaten wurde ein System entwickelt, das auch den Transfer mit flüssigem Stickstoff gekühlter Proben ermöglicht. Das System besteht aus einem Überwurf für den Transferstab und einer Schleuse auf dem Deckel des Kryostaten. Der Überwurf setzt sich aus einem Edelstahlrohr und einer O-Ring-Kompressionsdichtung zusammen in das der untere Teil des Transferstabes mit Probenträger eingeführt und mit der O-Ring-Kompressionsdichtung befestigt wird. Das Edelstahlrohr hat bei gekühlten Proben die Funktion eines Strahlungsschildes und verhindert zusätzlich den Kontakt mit der Luft, wenn eine Probe aus flüssigem Stickstoff in den Kryostaten transferiert wird. Die Schleuse auf dem Deckel besteht aus einem mit einer Öffnung am Deckel befestigten Kugelhahn, auf dessen andere Öffnung ein kurzes Rohr mit einer zum Überwurf passenden O-Ring-Kompressionsdichtung montiert ist. Wenn also der Transferstab mit dem Überwurf in die Schleuse eingeführt wird, gewährleisten die beiden O-Ring-Kompressionsdichtungen die Abdichtung gegenüber der Atmosphäre. Für den Transfer der Probe in den Kryostaten kann in dieser Position der Kugelhahn geöffnet und der Transferstab weiter in den Kryostaten eingeführt werden. Mithilfe dieser Konstruktion gelangen nur sehr geringe Mengen Luft in den Kryostaten, so dass auch ein Transfer in den mit Helium gekühlten Kryostaten möglich ist ohne dabei Gefahr zu laufen, Luft einzufrieren.

Parallel zur Entwicklung des Probenkopfes wurden in Zusammenarbeit mit Alexander Konrad die Optik und die Detektoren aufgebaut und die LabVIEW basierte Software zur Steuerung entwickelt. Die wichtigsten Anforderungen an die Software lagen dabei in der schnellen und einfachen Bedienbarkeit kombiniert mit einer Datenerfassung, die alle wichtigen Parameter der Instrumente erfasst und die Daten nach Abschluss einer Messung automatisch speichert.

Die Steuerungssoftware setzt sich aus einem Hauptfenster zur Auswahl zwischen

den verschiedenen Detektoren und mehreren Unterfenstern zur Steuerung der Probenpositionierung, des Lasers und der Messungen mit den unterschiedlichen Detektoren zusammen. Zuerst wurde das Hauptfenster entwickelt, das in einer Schemazeichnung die aktuelle Position der Klappspiegel und der Polarisationsoptik mit dem dazu passenden Strahlengang zeigt, so dass man schnell den aktuellen Zustand des Aufbaus erfassen kann. Unterhalb der Schemazeichnung wurden an den entsprechenden Stellen Knöpfe positioniert, die die Unterfenster zu den verschiedenen Komponenten wie z. B. den Detektoren öffnen. Die Funktion der Knöpfe zur Auswahl der Detektoren wurde so umgesetzt, dass die Aktivierung eines der Knöpfe zur Stellung der Klappspiegel in die für diesen Detektor benötigte Position führt und gleichzeitig das dazugehörige Unterfenster geöffnet wird, damit sofort mit einer Messung begonnen werden kann. Im weiteren Verlauf der Entwicklung wurden dann die Unterfenster zu den Detektoren implementiert, in denen jeweils Parameter wie z. B. Belichtungszeit, Anzahl der Messpunkte, usw. eingestellt und verschiedene Messungen gestartet werden können.

Für die Messung mit der ersten APD wurden Algorithmen für 2D- und 3D-Intensitätsscans implementiert. Für Messungen mit der CCD-Kamera am Gitterspektrographen sind Funktionen zur Aufnahme von Einzelspektren und Spektrenserien implementiert worden. Zur Verwendung der Polarisationsoptik wurde für die Aufnahme von Spektrenserien die Möglichkeit eingebaut, nach jedem Einzelspektrum die $\lambda/2$ -Platte um einen einstellbaren Winkel zu drehen, so dass man winkelabhängig die Spektren erfassen kann. Der Teil für TCSPC-Messungen mit der zweiten APD befindet sich noch in der Entwicklung. Am Ende jeder Messung werden automatisch die Daten und Parameter in einem selbstdefinierten XML-Format gespeichert und nach Datum sortiert im Dateisystem abgelegt. Durch diese Automatik sollte die Wahrscheinlichkeit für den Verlust von Messdaten sehr gering gehalten werden. Außerdem kann das selbstdefinierte Datenformat für spätere Veränderungen oder Erweiterungen des Aufbaus mit geringem Aufwand angepasst werden.

Für die Darstellung und Auswertung der Messdaten wurde eine Software in MATLAB implementiert, die das selbstentwickelte XML-Format automatisch lesen kann. Die unterschiedlichen Messungsarten wie Spektren, Spektrenserien und 2D-/3D-Intensitätsscans werden in der Software durch verschiedene Datentypen repräsentiert. Für die verschiedenen Datentypen wurden zuerst Funktionen zum Laden aus dem XML-Format, Auswählen von Teilbereichen (z. B. Wellenlängenbereich) und zur grafischen

Darstellung implementiert. Danach wurde zusammen mit Caroline Arnold (Universität Tübingen) eine grafische Oberfläche entworfen und von ihr implementiert, mit der sich die Funktionen für die verschiedenen Datentypen steuern lassen. Zur Darstellung der unterschiedlichen Datentypen wurde die Anwendung in ein Hauptfenster mit jeweils einem Reiter für einen Datentyp und verschiedene Unterfenster unterteilt, die vom Hauptfenster aus geöffnet werden können. Das Hauptfenster zeigt alle geladenen Datensätze und die grafische Darstellung des aktuell ausgewählten. Die Unterfenster werden dagegen zur Darstellung verschiedener Auswertungen oder Steuerung von Auswertungsalgorithmen verwendet. Parallel zur Implementierung der grafischen Oberfläche wurden neue und bereits früher verwendete Auswertalgorithmen für die unterschiedlichen Datentypen implementiert, die anschließend in die grafische Oberfläche eingebettet wurden.

Zusammenfassend ist also in diesem Teil ein konfokales Tieftemperaturmikroskop für Einzelmolekülspektroskopie mit Probenrasterung durch Piezoscanner von Grund auf neu entwickelt und aufgebaut worden. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass dafür ein Probenwechselsystem entwickelt wurde, das auch bei tiefen Temperaturen einen Probenwechsel innerhalb weniger Minuten ermöglicht. Zusätzlich wurden sowohl eine Software zur Steuerung aller Komponenten und Erfassung der Daten als auch eine dazu passende Software zur Sichtung und Auswertung der Messdaten entwickelt. Eine Beschreibung der Steuerungs- und der Auswertungssoftware befindet sich in Anhang A und B.

Kapitel 4

Effect of glycerol and PVA on the conformation of Photosystem I

In diesem Kapitel wird der Effekt von Glycerin und Polyvinylalkohol (PVA) auf die Konformation von PSI untersucht. Glycerin und PVA werden häufig in der optischen Spektroskopie verwendet. Dabei wird Glycerin als Kälteschutzmittel und Glasbildner für Proteine verwendet, PVA hingegen zur Immobilisierung von einzelnen Molekülen oder Partikeln in einem dünnen PVA-Film in der Einzelmolekülspektroskopie.

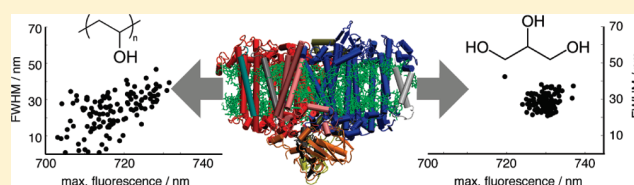
Für die Einzelmolekülmessungen wurden PSI-Komplexe aus *T. elongatus* in Pufferlösung ohne Zusätze, mit 25% w/w Glycerin, mit 66% w/w Glycerin und mit 1% w/w PVA verdünnt und auf Einzelkomplexniveau spektroskopiert. Neben der Veränderung des aus den Einzelspektren rekonstruierten Ensemblespektrums zeigte eine statistische Auswertung der spektralen Heterogenität und der Nullphononenlinien (*Zero-Phonon Lines*, ZPL) deutliche Effekte auf die Konformation der PSI-Komplexe. Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass Glycerin einen stabilisierenden Effekt auf die PSI-Komplexe hat und zu einer kompakteren Konformation führt. PSI-Komplexe in einem PVA-Film werden dagegen destabilisiert und liegen daher nicht in einem natürlichen Zustand vor.

Effect of Glycerol and PVA on the Conformation of Photosystem I

Martin Hussels and Marc Brecht*

Universität Tübingen, IPTC, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen, Germany

ABSTRACT: Single-molecule spectroscopy at cryogenic temperatures was used to examine the impact of buffer solution, glycerol/buffer mixtures (25% and 66%), and poly(vinyl alcohol) (PVA) films on the conformation of photosystem I (PSI) from *Thermosynechococcus elongatus*. PSI holds a number of chromophores embedded at different places within the protein complex that show distinguishable fluorescence at low temperatures. The fluorescence emission from individual complexes shows inter- and intracomplex heterogeneity depending on the solution wherein PSI was dissolved. Statistical evaluation of spectra of a large number of complexes shows that the fluorescence emission of some of these chromophores can be used as sensors for their local nanoenvironment and some as probe for the conformation of the whole protein complex. Preparation in glycerol/buffer mixtures yields a high homogeneity for all chromophores, indicating a more compact protein conformation with less structural variability. In buffer solution a distinct heterogeneity of the chromophores is observed. PSI complexes in PVA show highly heterogeneous spectra as well as a remarkable blue shift of the fluorescence emission, indicating a destabilization of the protein complex. Photosystem I prepared in PVA cannot be considered fully functional, and conclusions drawn from experiments with PSI in PVA films are of questionable value.



The proper functioning of proteins is a prerequisite for life. Beside intrinsic factors, the interaction of proteins with their surroundings is of high relevance, and a fundamental understanding of proteins must include extrinsic elements. System parameters like temperature, pressure, and pH value are important for the description of macroscopic system properties, but they fail in assisting us to describe proteins at the molecular level. A molecular description requires consideration of the protein moiety and the media wherein the protein is embedded. There, structure and dynamics of water close to the surface of proteins (hydration layer) are most important.^{1,2} The properties of the hydration layer depend upon additives to the protein environment. Such additives can be small water-miscible organic solvents (cosolvents) or even huge chains of polymers. The remarkable effect of additives on protein function and their influence on the results of spectroscopic studies motivated experimental and theoretical groups to focus on the molecular details of their interaction with proteins.^{3–12}

Here we focus on the influence of glycerol and PVA on the conformational properties of photosystem I (PSI). Glycerol is one of the most prominent cosolvents; due to its high biocompatibility, it is used in large amounts for cosmetics and pharmaceuticals. Glycerol is also used as a protein stabilizer during crystallization¹³ and as glass-forming agent for optical studies at low temperatures. The influence of glycerol on spectroscopic properties of proteins and their usability for the description of *in vivo* properties are examined by different experimental techniques^{3,5,12} as well as by molecular dynamic simulations.^{10,11} PVA is one of the most prominent water-soluble matrices; due to its excellent film forming, emulsifying, and adhesive properties, it is often used to immobilize proteins for experimental studies.¹⁴

To gain a molecular picture of the polymer–protein interaction is challenging because the structural composition of the polymer and its variation due to changes of the environmental conditions like their water content must be addressed before the interaction with proteins can be approached.¹⁵ On the basis of these restraints, a molecular picture for the interaction between these types of matrices and proteins is missing, and the influence of different types of matrices on the structure and function of proteins relies basically on phenomenological information.

Protein-embedded chromophores are native sensors for protein's conformation, which can be detected down to the single-molecule level. However, at room temperature the deduction of the conformational state and its dynamics is hampered by fast line broadening (spectral diffusion).^{16–18} Lowering the temperature reduces the impact of fluctuations on the chromophores' site energies,^{19,20} and the emission profile of a single emitter composed of a sharp zero-phonon-line (ZPL) and a phonon-wing (PW) becomes observable.^{21–24} Single ZPLs can be observed if the rate of spectral diffusion is lower than the rate of acquiring spectrally resolved data as nicely shown by single-molecule spectroscopy (SMS) on LH2 at 1.4 K.²⁵ The width of those spectral jumps reaches into the range of several nanometers,^{25,26} indicating remarkable changes in the site energy of the emitting molecules. However, in many cases the diffusion rate remains much larger than the acquisition rate, and only broadened lines are visible.^{27,28}

Received: January 28, 2011

Revised: March 4, 2011

Published: April 15, 2011

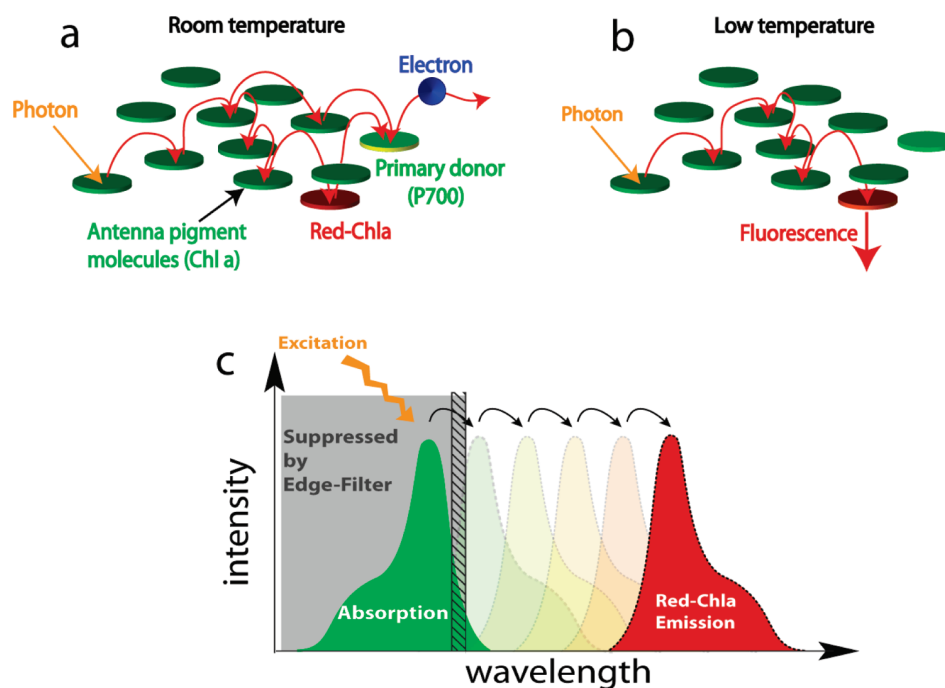


Figure 1. (a, b) Illustration of the excitation transfer within PSI at room and at low temperature. At room temperature, the initial excitation is transferred along energy transfer pathways until reaching P700 as indicated by red arrows. At low temperature the pathway from the red chlorophyll *a* molecules toward P700 is blocked. Next, the excitation is trapped in these states, and a large fraction of the initial energy is released by fluorescence emission. (c) The energetic arrangement of the different chromophores allows an effective excitation of the antenna system at the maximum of absorption. The large spectral separation of the maximum of absorption (green) and the fluorescence emission (dark red) ensures an efficient collection of the emission without restrictions by the edge filter (gray) used for blocking of stray light from the excitation source.

Here we study the fluorescence emission of single PSI complexes from cyanobacteria *Th. elongatus* dissolved in buffer solution, glycerol/buffer mixtures (25% and 66% (w/w)), and PVA films at cryogenic temperature (1.4 K). Over the past years we examined the fluorescence properties of single PSI complexes, and it turned out that PSI has preferential properties for general studies of protein dynamics at the single-molecule level.²⁹ The antenna system of PSI consists of ~90 chlorophyll *a* molecules that form a very effective exciton transfer network.^{30,31} This allows for efficient excitation of PSI at the absorption maximum (~680 nm) far from the 700 nm absorption of the pigments P700, which is responsible for the primary photochemistry in PSI (see Figure 1).^{32,33} A portion of the chlorophyll *a* molecules in the antenna system has site energies lower than 700 nm.³⁴ These low-energy pigments are often called the “red pools” or the “red-most” chlorophylls (for a review, see Gobets et al.³³ and Karapetyan et al.³²). A very interesting property of PSI is its high quantum yield for charge separation upon exclusive low-energy excitation of its red pool chlorophyll *a* at ambient temperatures. The energy required for P700 activation is provided by thermal energy (see Figure 1a). At low temperatures the reduced thermal energy is insufficient for this process, and the low-energy chlorophyll *a* act as end points of the excitation transfer network. Under these conditions, the excitation energy is partially released as fluorescence light^{35–37,34} with the maximum at wavelengths larger than 715 nm (see Figure 1b). This large red shift is very advantageous for SMS as the whole fluorescence emission of PSI composed of the several red pool emitters can be observed without interferences by the excitation light (see Figure 1c). The spectra of single PSI complexes show pronounced heterogeneities. In this article we use statistical analyses

to correlate the observed heterogeneities with the properties of the solution/matrix wherein the PSI complexes are embedded.

■ MATERIAL AND METHODS

Preparation of Samples. PSI trimers from *Th. elongatus* have been isolated as described in ref 38. Then the purified PSI trimers were diluted in buffer solution (pH 7.5) containing 20 mM Tricine, 25 mM MgCl₂, and 0.4 mM β-DM as detergent to reach a chlorophyll *a* concentration of ~20 μM. This amount of detergent is adequate for the critical solubilization concentration for a PSI trimer concentration of 0.5 μM to avoid PSI aggregation.³⁹ PSI samples in buffer solution were prepared adding 20 mM tricine, 25 mM MgCl₂, 4 mM β-DM, and 5 mM sodium ascorbate to Milli-Q water. Sodium ascorbate was added for prereduction of P700. The current mixtures were used to prepare PSI in glycerol/buffer and PVA/water mixtures instead of pure Milli-Q. In further steps the PSI-containing solution was diluted in buffer solution, buffer solution containing 25% glycerol (w/w), 66% glycerol (w/w), and 1% PVA (w/w). The final PSI trimer concentration was ~3 pM. For PSI in buffer and glycerol/buffer less than 1 μL of these samples was placed between coverslips. For PSI in PVA 2 μL was spin-coated on a coverslip, and a second was placed on top. Sample preparation and mounting were accomplished under indirect daylight. Finally, the samples were transferred directly into the cryostat and rapidly plunged into liquid helium. Experiments were carried out using a home-built confocal microscope operating at 1.3–1.4 K. For the imaging of single molecules, a piezo tip tilt module (Physik Instrumente PI S-334.2SL) was used to deflect the beams. The excitation source was a diode laser (680 nm Schäfer

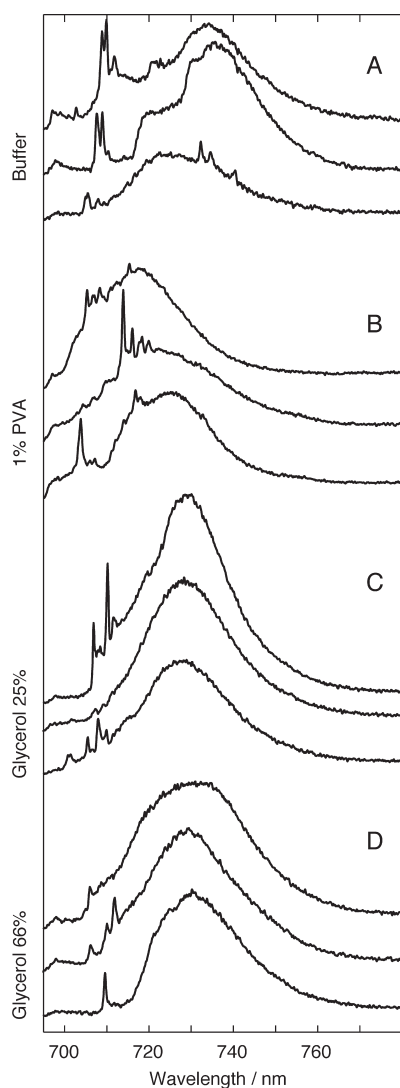


Figure 2. Fluorescence emission spectra obtained for single PSI complexes of *Th. elongatus* in different matrices. $\lambda_{\text{exc}} = 680$ nm, acquisition time 120 s, $T = 1.4$ K.

& Kirchhoff). The fluorescence emission was detected using either an avalanche photodiode (Perkin-Elmer SPCM-AQR-15, <50 dark counts/s) for fast integral fluorescence detection or an Acton Research 1/4 m spectrograph (Acton SpectraPro308) equipped with a back-illuminated CCD camera (Roper Scientific Spec-10:100BR/LN) for recording fluorescence spectra. Stray light of the laser was blocked by a Raman long-pass filter (AHF HQ695LP). For illumination and detection, the same microscope objective (60 \times , N.A. 0.8 JIS, Edmund Optics) was employed and immersed in liquid helium. A laser intensity of 100 μ W, measured behind the scanning module, was used for excitation. In a sequence of spectra, the usual exposure time for each spectrum is 1 s, resulting in a typical S/N-Ration of >6 for single PSI complexes at the given excitation power referred as time resolution in the following context.

Data Evaluation Procedures. For data analysis we used two different types of algorithms named in the following algorithm I and algorithm II. For all evaluation the software package Matlab was used.

Algorithm I is used to determine the wavelength position of the fluorescence maximum and its full width at half-maximum (fwhm). From the series of fluorescence spectra from individual PSI trimers an interval containing the first 120 s is selected, and the average spectra are calculated, resulting in a S/N > 60; then a constant offset due to the CCD camera is subtracted, and the wavelength position of the most intense contribution is determined. Starting from the maximum position the width is determined where the intensity reaches the half of the maximum value. The wavelength position and the fwhm are collected for all spectra and given in a 2D representation as shown in Figure 3.

Algorithm II is used for the evaluation of ZPL occurrence in series of fluorescence spectra from individual PSI trimers. It is based on three steps. First, the spectra series are smoothed in two dimensions (wavelength and time) using a moving average filter as provided in Matlab (Curve Fitting Toolbox). In a second step, a standard Laplace 1D edge filter is applied in the wavelength domain to enhance sharp and to suppress broad structures. In a third step, all wavelength positions are collected where the intensity surpasses a certain threshold, which implies the presence of narrow lines in the spectra. Finally, the information is collected for all PSI complexes and visualized in histograms as given in Figure 6.

RESULTS

Fluorescence Emission Properties of Single PSI Complexes in Different Matrices. PSI complexes were prepared in buffer solution, glycerol/buffer mixtures with 25% and 66% (w/w) and PVA films. The concentration of PSI trimers was ~ 3 pM to ensure a spatial separation of individual PSI trimers much larger than the width of the focus of the excitation beam. In total, we recorded spectral information for 137 PSI complexes (trimers) in buffer solution, 108 in 25% glycerol/buffer mixture, 108 in 66% glycerol/buffer mixture, and 124 in a PVA film. Spectra of single PSI complexes of *Th. elongatus* taken in the different matrices are shown in Figure 2. There, three representative examples for spectra of single complexes are given for each matrix. The spectra have two different components: ZPLs and broad intensity distributions. ZPLs are found predominately in the wavelength range <720 nm, whereas the maxima of the broad intensity distributions are found in the wavelength range >720 nm. The emitters showing ZPLs are focused to spectral diffusion in the range of the setup's time resolution, whereas the emitters showing broad distributions diffuse much faster.^{26,27}

Although the composition of the emission spectra is similar, a complex-to-complex variation of their shape is present. Nevertheless, a high similarity between the emission spectra is found in the glycerol/buffer mixtures. There, the wavelength position of the broad distributions undergoes slight changes, and only the width varies. In the case of the spectra taken in buffer solution and in PVA, the wavelength positions and the distribution width change. In glycerol/buffer mixtures the ZPLs are located in the region <715 nm, whereas for complexes in PVA films these lines can also be observed in the region around 720 nm and in buffer solution even in the far red region (up to 780 nm). The most red-shifted lines can be seen in the lower spectrum in Figure 2 for buffer solution, where lines are visible at 732, 734.5, and 740 nm. Aside from the line positions, their intensity shows remarkable variations. In spectra taken in buffer solution, the peak intensity of the ZPLs exceeds the intensity of the broad intensity distribution in some cases, whereas ZPLs found in the preparation with

glycerol/buffer never exceed the broad distribution and are generally of much lower intensity.

For better insight into the variation of the spectral shape present in different preparations, we used algorithm I (as described in the Material and Methods) to determine the wavelength position and the full width at half-maximum of the most intense contribution within the spectra regardless whether it is a ZPL or a broad distribution. These properties were determined and plotted for all spectra in 2D-scatter plots in Figure 3. This type of scatter plot serves as a helpful tool for the visualization of the heterogeneities present in different samples.⁴⁰ Scattering over wide wavelength and line width ranges is observed for buffer solution and PVA films; for the glycerol/buffer mixtures a reduced scattering is observed. The major proportion of spectra taken from PSI complexes in buffer solution show the most intense contribution within a wavelength range from 710 to 740 nm and the width varies between 15 and 40 nm. Besides this distribution, a number of contributions at around 710 nm are also present, showing very narrow line width. These contributions are due to the high intensity of the ZPLs sometimes exceeding the intensity of the broad intensity distributions as mentioned above. Such contributions are also found in the more red wavelength range around 733 nm.

The contributions found in the spectra taken on single complexes in PVA films also show a large scattering, and the whole distribution shows a blue shift. The span of the contributions found in PVA reaches from 703 to 730 nm for the wavelength positions and from 1 to 40 nm for the line width. Contributions at wavelengths >730 nm are rare, but a considerable number of contributions are observed at wavelength <710 nm.

Compared to buffer solution and PVA films, the spread of the contributions with the highest intensity found in glycerol/buffer mixtures is drastically reduced. This reduction is more pronounced for the wavelength positions of the contributions than for their line widths. For the 25% glycerol/buffer mixture, almost all contributions are found between 724 and 734 nm, and the width varies in the range of 22–38 nm. For the 25% glycerol/buffer mixture the uniformity of the spectra is more pronounced than for the 66% glycerol/buffer mixture: there more than 10 complexes also give rise to contributions outside of the compact region. Sharp lines with high intensity are not present over the whole wavelength region in glycerol/buffer preparation. Such lines remain features observed only in buffer solution and PVA films.

Average spectra obtained from summation of all investigated PSI complexes in the different matrices are shown in Figure 4. The maxima for the different preparations are found at 726.5 ± 0.5 nm (buffer solution), 730 ± 0.5 nm (glycerol/buffer mixtures 25%), 731 ± 0.5 nm (glycerol/buffer mixtures 66%), and 719 ± 1.0 nm (PVA films); see also Table 1. The shapes of the average spectra for PSI complexes in buffer solution and glycerol/buffer mixtures show great similarity. The shape of the average spectra for PSI complexes in PVA films deviates from the other average spectra. The slope on its blue side is larger than those of the other spectra, whereas the red tail again shows a similar shape.

Direct observation of spectral diffusion acting on chromophores becomes possible by reducing the accumulation time in combination with continuous recording of spectra. In Figure 5, cut-outs from two sequences of continuous recorded spectra of individual PSI complexes showing spectral diffusion of ZPLs are given. The cut-out given on the left shows sharp emission lines in the range ~ 707 –710 nm. One line seems to vary between two

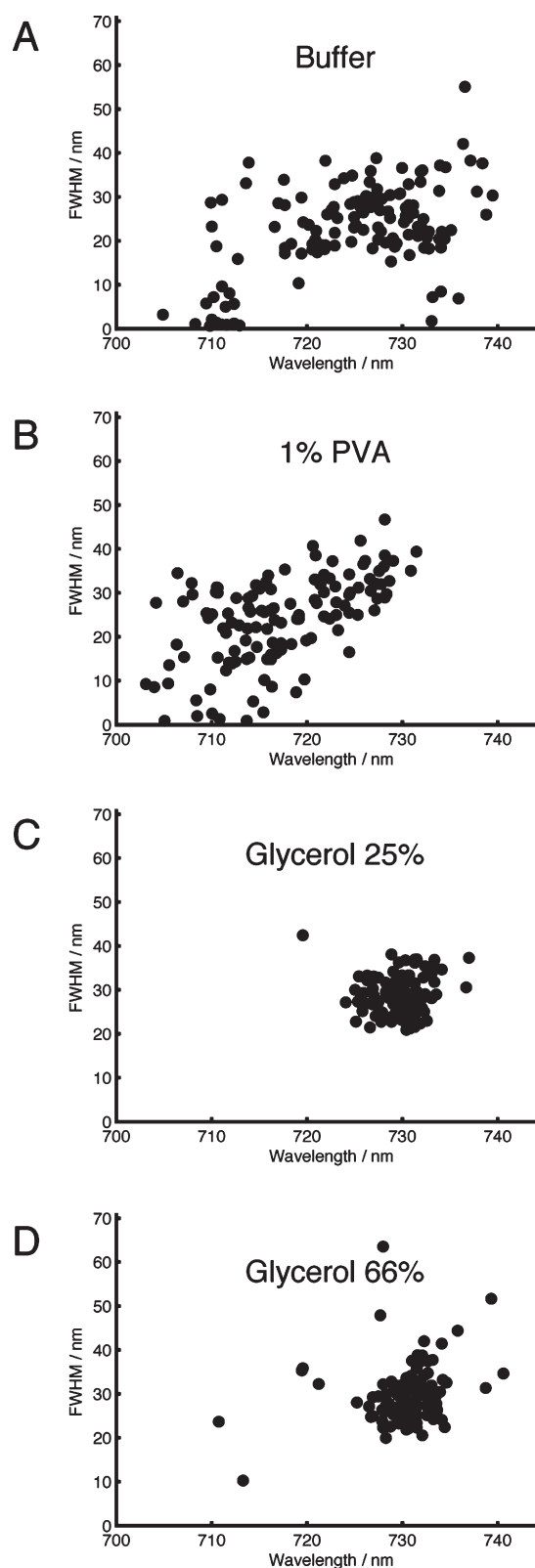


Figure 3. 2D-scatter plots obtained from the evaluation of the emission spectra from single PSI complexes in buffer solution (A), PVA (B), and glycerol/buffer mixtures of 25% (C) and 66% (D). Evaluation of the wavelength position and fwhm was done with algorithm I (for details see Material and Methods).

positions over time. The rate of spectral diffusion varies, but it remains mostly below the acquisition rate; therefore, one single line is observed in most spectra. More than one emitter contributes in the cut-out presented on the right. The emitter at ~ 710 nm changes its wavelength position only slightly during time. The largest jump of this line is observed after 43 s. The emission line beginning at 713.5 nm develops in a different way. After 15 s the line splits into two weaker lines. At $t = 59$ s these lines merge again to one stable line at ~ 717 nm.

Sequences of fluorescence spectra were recorded using the same experimental settings for all observed PSI complexes.

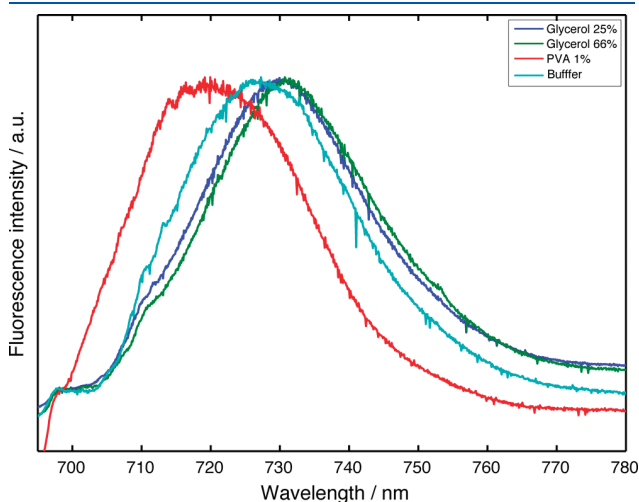


Figure 4. Averaged spectra obtained from the summation of 137 PSI complexes in buffer solution, 108 in 25% glycerol/buffer, 108 in 66% glycerol/buffer, and 124 in PVA film. Data were scaled to similar amplitude.

Algorithm II was used for the evaluation of the ZPL positions (as described in the Material and Methods). Algorithm II is specially designed to detect ZPLs in sequences of spectra. It accounts for their wavelength position, their time dependences, and occurrence. The intensity of the ZPLs is not object of the evaluation (like in the evaluation for the 2D-scatter plots in Figure 3). The data derived by algorithm II are given in Figure 6 together with their average spectra from Figure 4.

All histograms show the highest amount of ZPLs in the spectral region <720 nm; the maxima are found at around 710 nm (see Table 2). The widths of the distributions were determined by fitting with one Gaussian, they are: 3.1 nm for both glycerol/buffer mixtures, 4.1 nm for buffer solution, and 7.6 nm for PVA films. Sharp lines in the red wavelength range (>720 nm) are observed for around 30% of the complexes in buffer solution and 10% for PVA films, and for both glycerol/buffer mixtures almost no lines show up in the red region. The number of ZPLs detected within the sequence of spectra of one PSI complex are 1.6 in buffer solution, 3.0 in PVA films, and 1.2/1.1 for 25%/66% glycerol/buffer mixtures. The average widths of the ranges wherein algorithm II was able to determine the diffusion of the ZPLs are 1.1 nm in buffer solution, 1.4 nm in PVA films, and 1.0/0.9 nm for 25%/66% glycerol/buffer mixtures.

DISCUSSION

In this study we investigated the influence of buffer solution, glycerol/buffer mixtures, and PVA films on the optical properties of single PSI complexes at low temperatures.

First, we compare the spectral properties observed in our study with the results from ensemble experiments on PSI of *Th. elongatus*. Then, the capabilities of two evaluation methods are introduced, both of which could cope with the distinct spectral

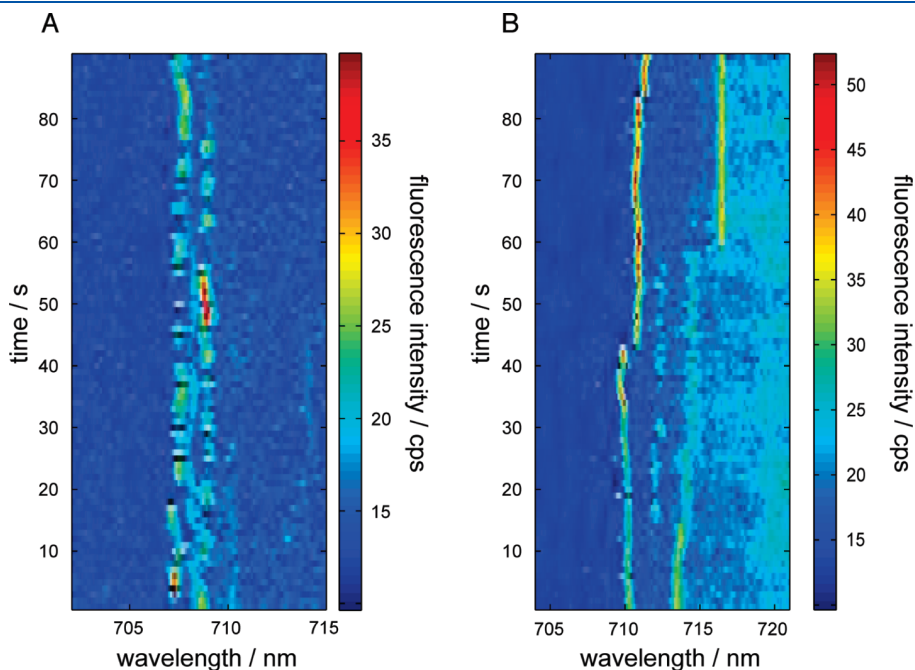


Figure 5. Time-dependent movement of ZPLs observed in the spectra of individual PSI complexes from *Th. elongatus*. Shown are 90 s cut-outs from time-dependent fluorescence emission spectra of two different complexes (A, B). The accumulation time for the individual spectra was 1 s; $\lambda_{exc} = 680$ nm; $T = 1.4$ K.

Table 1. Wavelength Position and Width of the Average Spectra Given in Figure 4 for the Different Preparations^a

matrix	wavelength position/nm	width/nm
buffer	726.5 ± 0.5	31.8 ± 0.5
PVA 1%	719 ± 1.0	33.5 ± 0.5
glycerol 25%	730 ± 0.5	30.5 ± 0.5
glycerol 66%	731 ± 0.5	31.0 ± 0.5

^a The error is due to the CCD camera calibration.

characteristics observed in the spectra of single PSI complexes. The results are related to structural changes of single chromophores or the whole protein complex. Finally, the molecular origin of the observed heterogeneity is considered.

Comparison of Single-Molecule and Ensemble Data. Optical measurements on PSI ensembles at low temperatures were only reported in glycerol/buffer mixtures; therefore, the comparison of ensemble and single-molecule data is restricted to this kind of preparation. The values of the fluorescence maximum in ensemble measurements were reported at 731 nm (70% w/v),³⁵ 730 nm (2:1 v/v),³⁷ and 732 nm (2:1).⁴¹ The maxima of the fluorescence emission in glycerol/buffer mixtures found in the present study are at 730 nm (25%) and 731 nm (66%), in good agreement with the reported values.

In our study and in the study of Riley et al.⁴¹ dissolved single crystals of PSI were used for the fluorescence measurements; therefore, the samples are similar. The comparison of the line shape of the average spectra shown in Figure 4 and the emission spectra of the ensemble (Figure 5 in ref 41) yields an almost perfect agreement. Therefore, we can conclude that the spectra derived at the single-molecule level are not biased, and the average spectra can be considered as ensemble-like data. This conclusion is advantageous, especially in the cases where no ensemble data are available, like for PSI in (frozen) buffer solution or PVA films (see Figure 4).

Evaluation of Heterogeneities in Single-Molecule Spectra of PSI. The spectra of single PSI complexes are composed of a number of contributions from different red pools.^{26,29} The shape of these contributions vary between needlelike ZPLs and broad intensity distributions (see Figure 2). Sharp ZPLs are found predominately in the region below 720 nm; based on their low integral intensity, their contribution is almost invisible in the average spectra. These ZPLs are focused to spectral diffusion on the time scale of the actual time resolution of the setup (~1 s); hence, it is possible to follow their emission in time (spectral trails) as shown in Figure 5. The spectral range >720 nm is dominated by broad intensity distributions, and indications for stable emitting ZPLs are rare. The broad intensity distributions are due to emitters that are focused to spectral diffusion with high rates ($\gg 1$ Hz) and large spectral width (>10 nm).²⁷ In this case, the detection of ZPLs becomes impossible. The contributions to the fluorescence emission spectra of single PSI complexes differ in their number, intensity, and wavelength position. Therefore, it is impossible to draw conclusions on preparation related changes based on the comparison of a small number of those spectra.

To overcome restrictions induced by intercomplex heterogeneity, we applied statistical analyses to acquire reliable and comparable parameters. Two evaluation methods named algorithms I and II (see Material and Methods) were used for this purpose taking advantages of the spectral properties of PSI in different manner as pointed out in the following:

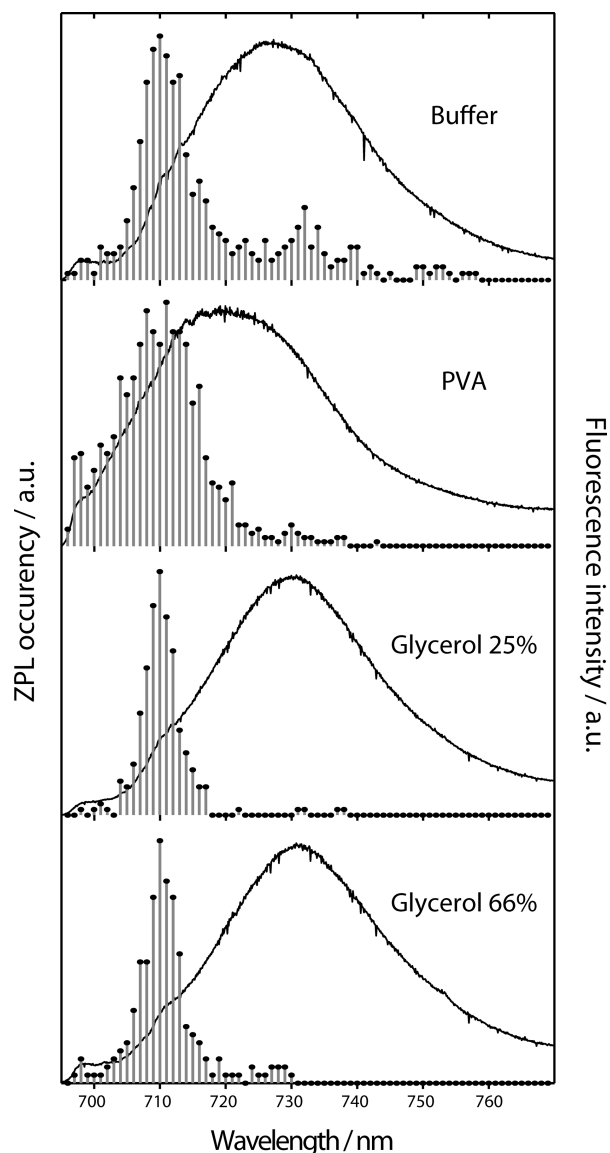


Figure 6. ZPL histograms for PSI complexes in buffer solution, glycerol/buffer 25%, glycerol/buffer 66%, and PVA film. The histograms result from algorithm II applied to time-dependent fluorescence emission spectra of single PSI complexes (for details see Material and Methods). In addition, the average spectra from the different preparations are given. The data were scaled to similar amplitude. Maximum positions and widths of the ZPL distributions are given in Table 2.

Algorithm I determines the wavelength position and width of most intense contribution in the spectra. The results for the different preparations are shown as 2D-scatter plots in Figure 3. The most intense contributions represent the end points in energy transfer within PSI, and their fluorescence intensity is a direct measure for the amount of excitation energy present. The excitation energy transfer from the initial point of photon absorption to the final trap involves a number of chlorophyll molecules distributed over the whole PSI complex. The heterogeneity of their site energies determines the heterogeneity of the energy transfer pathways. Therefore, the formation of energy transfer pathways depends sensitively on the structural heterogeneity of the whole complex. And vice versa, the most intense

contributions can be used as a measure for the structural heterogeneity of PSI.

Algorithm II determines the wavelength positions of narrow lines (ZPLs) in the spectra as shown in Figure 6. The major proportion of the ZPLs in PSI from *Th. elongatus* is centered around ~710 nm. They were assigned to chlorophylls, which absorb at 708 nm called C708.³⁵ The statistical analysis used in our previous studies was based on a manual determination of ZPLs and the wavelength range wherein the emission varies over time.⁴² A manual evaluation is advantageous in some cases (which will be not discussed here), but the comparability of results is restricted. To overcome this drawback, we used algorithm II (see Material and Methods) for the determination of the ZPL positions with exactly the same filter parameters for all data sets. Using this approach, changes in the ZPL distributions for different preparation methods can be seriously considered. Observing changes in the shape of the ZPL distribution opens the possibility to draw conclusions about the subnanoscopic environments of C708.²⁴ Therefore, C708 can be used as a local probe within the PSI complex. In summary, the two evaluation methods are valuable to visualize changes of the overall structure of PSI and changes of one specific set of chlorophylls acting as a local probe.

Sample Heterogeneity in Buffer, Glycerol/Buffer, and PVA Films. The results from the four samples shown in the ZPL histograms (Figure 6), the 2D-scatter plots (Figure 3), and the average spectra (Figure 4) can be roughly divided into two groups: glycerol and non-glycerol containing samples. If glycerol is added, the samples show a distinct homogeneity; in the other cases (buffer solution and PVA) an increased heterogeneity is observed.

First, the findings for the glycerol containing samples are discussed. Their spectra are dominated by broad intensity distributions at >720 nm. The shapes of these distributions show only a small variation in bandwidth, and therefore, their contributions to the 2D-scatter plots form one well-defined cluster (see Figure 3c, d). The ZPL histograms show single Gaussian-shaped distributions with small width, and only very few complexes give rise to ZPLs at wavelength larger than 720 nm (see Figure 6). Nevertheless, in both representations it is notable that the homogeneity is slightly more expressed for the 25% than for the 66% mixture.

The observed effects in the glycerol/buffer mixtures are in agreement with the observed suppression of heterogeneity in protein samples by glycerol, where it is often added to enhance the crystallization of proteins.¹³ It was considered that a protein will tend to minimize its surface in the presence of glycerol, which will lead to the stabilization of its structure.^{11,43} This is in line with a lowered mobility of water within the hydration layer. The reduced mobility of water may act as a constraint on the accessible conformational space of the individual proteins yielding a homogenization of proteins.^{10,12}

A glycerol induced suppression of the conformational flexibility of individual PSI complexes (intracomplex heterogeneity) as well as among different complexes (intercomplex heterogeneity) is observed. Furthermore, the suppression is observed for the structure of the whole complex (algorithm I) and for the environment of the local probe C708 (algorithm II). For the reaction center of *Heliobacterium chlorum* it was observed that the addition of glycerol has a distinct influence on the time constants of charge recombination.⁴⁴ Therefore, it remains an open question whether these homogeneous states induced by the addition of glycerol are representative for the native state of the protein or if they are just artificial states induced by glycerol.

Table 2. Wavelength Position and Width of the ZPLs Distribution Determined from the Data in Figure 6 by Fit with One Gaussian

matrix	center position (nm)	σ (nm)
buffer	710.4	4.1
PVA 1%	710.0	7.6
glycerol 25%	709.9	3.1
glycerol 66%	710.0	3.1

The group of the non-glycerol containing samples (buffer solution and PVA) shows some individual characteristics and are discussed individually. The preparation in buffer solution shows an increased spread of the contribution in 2D-scatter plot, indicating increased structural heterogeneity of PSI (see Figure 3a). Increased heterogeneity is also observed for the local probe C708; there, a broadening of the line width of the ZPL distribution compared to the glycerol/buffer mixtures is observed (see Figure 6). The average spectrum (see Figure 4) shows only minor indication of these changes; therefore, experiments at the single-molecule level are necessary to observe these properties. Reasons for the heterogeneity can be different mobility of water within the hydration layer or partial crystallization of the buffer solution during freezing. The low viscosity of water compared to glycerol mixtures might result in a larger conformational space accessible for the proteins under the given circumstances. The heterogeneity is partially maintained by the shock-freezing method used and becomes observable in the emission spectra at low temperatures. On the other hand, the freezing method is not able to vitrify the buffer solution completely and may induce the increased heterogeneity. It is probable that some water layers close to protein surface form a glassy state, but the freezing rates are too low for vitrifying bulk water. Therefore, the bulk water will be in a partially crystalline state inducing stress in its surrounding that may influence the PSI complexes.

An increased spread in the 2D-scatter plot is also observed for the PVA preparation (see Figure 3b). The mean value of the contributions is blue-shifted with respect to the other preparations. The blue-shift is also observed in the average spectra (see Figure 4 and Table 1). The ZPL histogram shows a distribution almost twice as broad as those observed for glycerol/buffer mixtures and buffer solution. Additionally, a large number of complexes show a remarkable fluorescence emission at <705 nm (see Figure 3b). This emission indicates the deactivation of higher lying chlorophyll states showing almost no emission in intact PSI. The modification of the structure of PSI by PVA interferes with the proper function of the whole complex. The increased heterogeneity of the protein might be due to a distortion of the water–protein interface introduced by the PVA chains. Zhang et al.⁴⁵ found by examining the water–protein interface that the hydration water network loosens up from the native to the molten globule states, and the protein gets locally more flexible with larger global plasticity and partial unfolding. This transition might be forced by PVA. A blue-shift induced by PVA was also reported for LH2; there also a denatured protein structure was considered.⁴⁶ The large distortions induced by PVA indicate that proteins prepared in PVA cannot be considered fully functional, and conclusions drawn from such experiments are of limited value.

Molecular Origin of Spectral Variations. The red emitters of PSI are most probable due to tightly interacting chlorophyll a

multimers (dimers and one trimer). Structural changes affect the site energy of such multimers. These changes can be roughly divided into two groups: changes affecting the site energy of the individual chromophores and changes affecting the coupling between the chromophores.

Structural changes affecting the site energy of chromophores can e.g. just rely on slight changes of the conformation of a nearby water molecule. These changes give rise to a detuning of the emission frequency ν_i of the chromophore. In the most simple approach a change of distance R between the water molecule and the chromophore is assumed. This change detunes the site energy of the chromophore by $\delta\nu_i$. Such dependencies can mostly be described by an equation $\delta\nu_i \sim n/R^{n+1}$.⁴⁷ Assuming a simple dipole–dipole interaction results in a shift of the transition energy given by $\delta\nu_i \sim |(-\mu_{\text{water}}\Delta\mu/2\pi\epsilon hc)(1/R^3)|$ with ϵ being vacuum permittivity, h being Planck's constant, c equaling the speed of light, μ_{water} representing the dipole moment of water, and $\Delta\mu$ representing the difference of the static dipole moment between the excited and ground state of the chromophore. For a water molecule close to a chromophore, $\delta\nu_i$ can easily reach the nanometer scale.¹⁹

Structural changes affecting the coupling between chromophores rely on reorientations of the involved chromophores. Those reorientations can affect the interchromophore distance or their orientations. The strength of the coupling is described by the excitonic coupling $J_{ij} \sim (\vec{a} \cdot \vec{d} - 3(\vec{a} \cdot \vec{R})(\vec{d} \cdot \vec{R}))/R_{ij}^3$, with \vec{a} and \vec{d} being unit vectors in the directions of the acceptor and donor transition dipoles and \vec{R} in the direction of the line joining the dipole centers.³¹

Both cases have in common that $\delta\nu_i$ and J_{ij} show a nonlinear dependence on distance R . Fluctuations of R by $\pm\Delta R$ have a much larger effect on $\delta\nu_i$ and J_{ij} if the coupling is already large. Consequently, an increase in the emission frequency caused by these mechanisms is accompanied by an increased spectral width induced by fluctuations. This correlation should result in a wavelength dependence of the inhomogeneous width. The discussed effect is visible in the 2D-scatter plot of the PVA preparation in Figure 3b. There, the contributions at low wavelengths show small widths and the red-most contributions show a larger width. This tendency is also visible for the preparation in buffer solution (Figure 3a), but there the tendency is covered by the reduced spectral diffusion observed in some complexes at higher wavelength. The spread of the data in the scatter plot for the preparation in glycerol/buffer mixtures is too small to evaluate this tendency.

The fluorescent states with clearly visible ZPLs show their emission maxima at ~ 710 nm (see Table 2). This value is not seriously influenced by the different preparation methods. Only the spread of the distribution over the wavelength axis differs, indicating changes in the heterogeneity of the sample. The distribution of ZPLs with the lowest value of 3.1 nm is observed for the glycerol/buffer mixtures, whereas the width is increased to 7.6 nm for PVA. A stable emission wavelength accompanied by a change in line width was also observed for cytochrome *c* in trehalose film as compared to a glycerol/buffer mixture.⁴⁷ There, the line width of the $Q_x(0-0)$ transition is increased almost by a factor of 2 from glycerol/buffer to trehalose. Later it was shown by X-ray spectroscopy that the trehalose matrix perturbs the energy landscape of cytochrome *c*, giving rise to well-resolved structural distortions close to the chromophore.⁴⁸ On the basis of these observations, it is reasonable that the nearby surrounding of the chromophores responsible for the emission at ~ 710 nm undergoes structural distortions induced by PVA.⁴⁶ But a macroscopic rearrangement of the binding pocket can be excluded

because the emission of C708 stems from chlorophyll *a* molecules that are red-shifted by almost 30 nm compared to chlorophyll *a* in solution. This red-shift is based on a highly balanced interaction between amino acid residues and chromophores in the binding pocket. Large rearrangements of the binding pocket will have drastic effect on the site energies of C708, and that is not in agreement with the data, which show a maintaining of the basic properties.

The emitters visible as broad intensity distributions show an even larger red-shift than C708. The large red-shift and spectral width covered by the diffusion process indicates the combination of a tight excitonic coupling of chromophores with high structural flexibility. The width of these distributions is maintained for the preparation in buffer and in glycerol/buffer mixtures. Some narrow lines can be observed in buffer solution, indicating lowered spectral diffusion, but their number is low. Changes induced by these preparation methods are unable to modify the properties of these chromophores seriously. Therefore, the structure of the binding pocket is not affected. The large width of the spectral diffusion is also maintained for PVA, but the center of the broad distributions and their spread are changed, as seen by a shift of up to 16 nm in the average spectra between PVA and 66% glycerol/buffer mixture (see Figure 4) and an increased scattering in the 2D-scatter plot (see Figure 3). Therefore, the structure of the chromophore assembly must have changed to decrease the value of the red-shift by more than 10 nm, but the basic properties are maintained as the emission is still remarkably red-shifted, and the spectral shape is still dominated by broad distributions indicative of high structural flexibility. Distortions must have taken place that changed the interaction between the chromophores, but the binding pocket is still able to bind the chromophores in a way that induces a large red-shift and allows a flexibility similar to other preparations.

In conclusion, the fluorescence spectra of single PSI complexes prepared in glycerol/buffer mixtures show small intra- and intercomplex heterogeneity, whereas the spectra taken in pure buffer and PVA are heterogeneous. Glycerol induces a more compact protein conformation with less structural variability, whereas PVA induces a destabilization of the protein complex.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marc.brecht@uni-tuebingen.de. Phone: +49-7071-29-76239. Fax: +49-7071-29-5490.

Funding Sources

This work was supported by Heisenberg-Programm of the Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG (BR 4102/1-1 and BR 4102/2-1).

■ ACKNOWLEDGMENT

We thank R. Bittl (FU Berlin) for his continuous support. We also thank Eberhard Schlodder for PSI samples and helpful discussions. Volker Radics and Jana Nieder are gratefully acknowledged for technical advice and assistance during the measurements.

■ ABBREVIATIONS

PSI, photosystem I; PVA, poly(vinyl alcohol); SMS, single molecule spectroscopy; ZPL, zero-phonon line; PW, phonon wing; FRET, Förster resonance energy transfer; C708, red pool of *Th. elongatus*.

REFERENCES

- (1) Tarek, M., and Tobias, D. J. (1999) Environmental dependence of the dynamics of protein hydration water. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9740–9741.
- (2) Nakagawa, H., and Kataoka, M. (2010) Percolation of hydration water as a control of protein dynamics. *J. Phys. Soc. Jpn.* **79**, 083801.
- (3) Back, J. F., Oakenfull, D., and Smith, M. B. (1979) Increased thermal-stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* **18**, 5191–5196.
- (4) Ansari, A., Jones, C. M., Henry, E. R., Hofrichter, J., and Eaton, W. A. (1992) The role of solvent viscosity in the dynamics of protein conformational-changes. *Science* **256**, 1796–1798.
- (5) Lakshmikanth, G. S., and Krishnamoorthy, G. (1999) Solvent-exposed tryptophans probe the dynamics at protein surfaces. *Biophys. J.* **77**, 1100–1106.
- (6) Timasheff, S. N. (2002) Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 9721–9726.
- (7) Zou, Q., Bennion, B. J., Daggett, V., and Murphy, K. P. (2002) The molecular mechanism of stabilization of proteins by TMAO and its ability to counteract the effects of urea. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 1192–1202.
- (8) Zinober, R. C., Brockwell, D. J., Beddard, G. S., Blake, A. W., Olmsted, P. D., Radford, S. E., and Smith, D. A. (2002) Mechanically unfolding proteins: The effect of unfolding history and the supramolecular scaffold. *Protein Sci.* **11**, 2759–2765.
- (9) Fenimore, P. W., Frauenfelder, H., McMahon, B. H., and Young, R. D. (2004) Bulk-solvent and hydration-shell fluctuations, similar to alpha- and beta-fluctuations in glasses, control protein motions and functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 14408–14413.
- (10) Liu, F. F., Ji, L., Zhang, L., Dong, X. Y., and Sun, Y. (2010) Molecular basis for polyol-induced protein stability revealed by molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **132**, 225103.
- (11) Vagenende, V., Yap, M. G. S., and Trout, B. L. (2009) Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry* **48**, 11084–11096.
- (12) Malardier-Jugroot, C., Bowron, D. T., Soper, A. K., Johnson, M. E., and Head-Gordon, T. (2010) Structure and water dynamics of aqueous peptide solutions in the presence of co-solvents. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 382–392.
- (13) Sousa, R. (1995) Use of glycerol, polyols and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization. *Acta Crystallogr. D* **51**, 271–277.
- (14) Zeng, J., Aigner, A., Czubyko, F., Kissel, T., Wendorff, J. H., and Greiner, A. (2005) Poly(vinyl alcohol) nanofibers by electrospinning as a protein delivery system and the retardation of enzyme release by additional polymer coatings. *Biomacromolecules* **6**, 1484–1488.
- (15) Raffaini, G., and Ganazzoli, F. (2006) Protein adsorption on the hydrophilic surface of a glassy polymer: a computer simulation study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**, 2765–2772.
- (16) Lu, H. P., and Xie, X. S. (1997) Single-molecule spectral fluctuations at room temperature. *Nature* **385**, 143–146.
- (17) Rutkauskas, D., Novoderezhkin, V., Cogdell, R. J., and van Grondelle, R. (2005) Fluorescence spectroscopy of conformational changes of single LH2 complexes. *Biophys. J.* **88**, 422–435.
- (18) Schleifenbaum, F., Blum, C., Subramaniam, V., and Meixner, A. J. (2009) Single-molecule spectral dynamics at room temperature. *Mol. Phys.* **107**, 1923–1942.
- (19) Shibata, Y., Ishikawa, H., Takahashi, S., and Morishima, I. (2001) Time-resolved hole-burning study on myoglobin: Fluctuation of restricted water within distal pocket. *Biophys. J.* **80**, 1013–1023.
- (20) Hofmann, C., Ketelaars, M., Matsushita, M., Michel, H., Aartsma, T. J., and Köhler, J. (2003) Single-molecule study of the electronic couplings in a circular array of molecules: Light-harvesting-2 complex from *Rhodospirillum rubrum*. *Phys. Rev. Lett.* **90**, 013004.
- (21) Huang, K., and Rhys, A. (1950) Theory of light absorption and non-radiative transitions in f-centres. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **204**, 406–423.
- (22) Pullerits, T., Monshouwer, R., van Mourik, F., and van Grondelle, R. (1995) Temperature-dependence of electron-vibronic spectra of photosynthetic systems - computer-simulations and comparison with experiment. *Chem. Phys.* **194**, 395–407.
- (23) Renge, I. (2008) Impurity spectroscopy in glasses and disordered crystals: Inhomogeneous broadening and electron phonon coupling. *J. Lumin.* **128**, 413–420.
- (24) Ratsep, M., Pajusalu, M., and Freiberg, A. (2009) Wavelength-dependent electron-phonon coupling in impurity glasses. *Chem. Phys. Lett.* **479**, 140–143.
- (25) Hofmann, C., Aartsma, T. J., Michel, H., and Köhler, J. (2003) Direct observation of tiers in the energy landscape of a chromoprotein: A single-molecule study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 15534–15538.
- (26) Brecht, M., Studier, H., Elli, A. F., Jelezko, F., and Bittl, R. (2007) Assignment of red antenna states in photosystem I from *Thermosynechococcus elongatus* by single-molecule spectroscopy. *Biochemistry* **46**, 799–806.
- (27) Brecht, M., Studier, H., Radics, V., Nieder, J. B., and Bittl, R. (2008) Spectral diffusion induced by proton dynamics in pigment-protein complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **130** (51), 17487–17493.
- (28) Krause, S., Aramendia, P. F., Tauber, D., and von Borczyskowski, C. (2011) Freezing single molecule dynamics on interfaces and in polymers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 1754–1761.
- (29) Brecht, M. (2009) Spectroscopic characterization of photosystem I at the single-molecule level. *Mol. Phys.* **107**, 1955–1974.
- (30) Scholes, G. D., Jordanides, X. J., and Fleming, G. R. (2001) Adapting the Förster theory of energy transfer for modeling dynamics in aggregated molecular assemblies. *J. Phys. Chem. B* **105**, 1640–1651.
- (31) Byrdin, M., Jordan, P., Krauss, N., Fromme, P., Stehlik, D., and Schlodder, E. (2002) Light harvesting in photosystem I: Modeling based on the 2.5-Ångström structure of photosystem I from *Synechococcus elongatus*. *Biophys. J.* **83**, 433–457.
- (32) Karapetyan, N. V., Schlodder, E., van Grondelle, R., and Dekker, J. P. (2007) in *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Golbeck, J. H., Ed.) Vol. 24, Springer, Berlin.
- (33) Gobets, B., and van Grondelle, R. (2001) Energy transfer and trapping in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 80–99.
- (34) Schlodder, E., Shubin, V. V., El-Mohsawy, E., Rogner, M., and Karapetyan, N. V. (2007) Steady-state and transient polarized absorption spectroscopy of photosystem I complexes from the cyanobacteria *Arthrospira platensis* and *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **1767** (6), 732–741.
- (35) Palsson, L. O., Dekker, J. P., Schlodder, E., Monshouwer, R., and van Grondelle, R. (1996) Polarized site-selective fluorescence spectroscopy of the long-wavelength emitting chlorophylls in isolated photosystem I particles of *Synechococcus elongatus*. *Photosynth. Res.* **48**, 239–246.
- (36) Byrdin, M., Rimke, I., Schlodder, E., Stehlik, D., and Roelofs, T. A. (2000) Decay kinetics and quantum yields of fluorescence in photosystem I from *Synechococcus elongatus* with P700 in the reduced and oxidized state: Are the kinetics of excited state decay trap-limited or transfer-limited?. *Biophys. J.* **79**, 992–1007.
- (37) Zazubovich, V., Matsuzaki, S., Johnson, T. W., Hayes, J. M., Chitnis, P. R., and Small, G. J. (2002) Red antenna states of photosystem I from cyanobacterium *Synechococcus elongatus*: a spectral hole burning study. *Chem. Phys.* **275**, 47–59.
- (38) Fromme, P., and Witt, H. T. (1998) Improved isolation and crystallization of photosystem I for structural analysis. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **1365**, 175–184.
- (39) Müh, F., and Zouni, A. (2005) Extinction coefficients and critical solubilisation concentrations of photosystems I and II from *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **1708**, 219–228.
- (40) Rutkauskas, D., Novoderezhkin, V., Gall, A., Olsen, J., Cogdell, R. J., Hunter, C. N., and van Grondelle, R. (2006) Spectral trends in the fluorescence of single bacterial light-harvesting complexes: Experiments and modified Redfield simulations. *Biophys. J.* **90**, 2475–2485.
- (41) Riley, K. J., Reintot, T., Jankowiak, R., Fromme, P., and Zazubovich, V. (2007) Red antenna states of photosystem I from

cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 and *Thermosynechococcus elongatus*: Single-complex spectroscopy and spectral hole-burning study. *J. Phys. Chem. B* 111, 286–292.

(42) Brecht, M., Radics, V., Nieder, J. B., and Bittl, R. (2009) Protein dynamics-induced variation of excitation energy transfer pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 11857–11861.

(43) Gekko, K., and Timasheff, S. N. (1981) Mechanism of protein stabilization by glycerol - preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* 20, 4667–4676.

(44) Deinum, G., Kramer, H., Aartsma, T. J., Kleinherenbrink, F. A. M., and Ames, J. (1991) Fluorescence quenching in *Heliobacterium-chlorum* by reaction centers in the charge separated state. *Biochim. Biophys. Acta* 1058, 339–344.

(45) Zhang, L. Y., Yang, Y., Kao, Y. T., Wang, L. J., and Zhong, D. P. (2009) Protein hydration dynamics and molecular mechanism of coupled water-protein fluctuations. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 10677–10691.

(46) Freiberg, A., Timpmann, K., and Trinkunas, G. (2010) Spectral fine-tuning in excitonically coupled cyclic photosynthetic antennas. *Chem. Phys. Lett.* 500, 111–115.

(47) Ponkratov, V. V., Friedrich, J., and Vanderkooi, J. M. (2002) Solvent effects on conformational dynamics of proteins: Cytochrome c in a dried trehalose film. *J. Chem. Phys.* 117, 4594–4601.

(48) Giachini, L., Francia, F., Cordone, L., Boscherini, F., and Venturoli, G. (2007) Cytochrome c in a dry trehalose matrix: Structural dynamical effects probed by X-ray absorption spectroscopy. *Biophys. J.* 92, 1350–1360.

Kapitel 5

Evidence for direct binding of glycerol to Photosystem I

In diesem Kapitel wird eine potentielle Bindung von Glycerin an die Oberfläche von PSI untersucht. Dafür wurde das Experiment aus Kapitel 4 um eine Probenpräparierung erweitert bei der die PSI-Komplexe nur kurzzeitig hoher Glycerinkonzentration von 66% w/w ausgesetzt waren und dann in reiner Pufferlösung verdünnt wurden (finale Glycerinkonzentration $< 0.02\%$). Ein Vergleich der spektralen Heterogenität und des rekonstruierten Ensemblespektrums dieser Präparierung mit der in reiner Pufferlösung und in Pufferlösung mit 66% w/w Glycerin zeigt, dass die PSI-Komplexe mit kurzzeitigem Kontakt zu Glycerin die gleichen spektralen Eigenschaften aufweisen wie die in Pufferlösung mit 66% w/w Glycerin präparierten PSI-Komplexe. Das bedeutet, dass Glycerin mindestens für die Dauer der Probenpräparierung an die Oberfläche der PSI-Komplexe gebunden bleibt. Für die Wechselwirkung von Glycerin mit PSI bedeutet dies zusätzlich, dass der stabilisierende Effekt von Glycerin überwiegend durch direkte Wechselwirkung mit der Proteinoberfläche hervorgerufen wird.



Evidence for direct binding of glycerol to photosystem I

Martin Hussels, Marc Brecht*

Universität Tübingen, IPTC, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2011

Revised 6 June 2011

Accepted 13 June 2011

Available online 25 June 2011

Edited by Miguel De la Rosa

Keywords:

Photosynthesis
Photosystem I
Red chlorophyll
Glycerol
Hydration layer

ABSTRACT

The interaction between glycerol and photosystem I (PSI) was investigated using low temperature single-molecule spectroscopy. PSI complexes were dissolved in three different solutions: in buffer solution, in 66% glycerol/buffer solution, and in 66% glycerol/buffer solution that was afterwards diluted by buffer; the final glycerol concentration was <1%. Mean fluorescence spectra and inter-complex heterogeneity of PSI complexes in 66% glycerol/buffer solution and in the re-diluted solution show high similarity, but differ from complexes in buffer solution indicating that the glycerol concentration is not the determining factor modifying the spectral properties. However, the exposure of PSI to a high glycerol concentration during sample preparation affects PSI and the effect is maintained if glycerol is removed from the solution.

© 2011 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glycerol is used in large amount for preparation and stabilization of proteins, tissues storage at low temperatures, protein crystallization as well as in cosmetics and pharmaceuticals [1,2]. It is not yet fully understood how glycerol – a polyol belonging to the class of non-ionic co-solvents – and proteins interact. There are a number of working hypotheses concerning all polyols not only glycerol. These hypotheses can be summarized into two classes: one class favors the direct interaction of the polyol with the protein surface and the other favors an indirect interaction [2–8]. For the direct interaction model a binding of the polyol to proteins via hydrogen bonds is assumed; this interaction stabilizes the native state. The direct interaction yields the creation or deletion of glycerol binding sites at the protein surface by specific reorientation of the proteins' N and O atoms favoring the formation of multiple H-bonds with glycerol. These reorientations induce specific changes in the structure of proteins [2]. The indirect interaction model, in contrast assumes an indirect action of the polyols by changing the structure and the dynamics of water molecules located close to the surface of proteins (hydration layer) [2–5,7,8]. In a recent study, the preferential hydration of the surface of proteins by a hydration layer with a thickness of ≈ 2 Å was shown. The polyols

were depleted in this region, but at a distance of ≈ 4 Å a layer with an increased density of polyols was found that show the tendency to form clusters [7]. Based on these experiments the protein together with its hydration layer seems to be encapsulated by a shell of co-solvent molecules. The encapsulation yields a more ordered structure of the water molecules within the hydration layer and accordingly proteins are more shielded from influences that tend to destabilize them. Although the depletion of co-solvent molecules from the hydration layer seems to be generally accepted, many questions concerning the effects of polyols on proteins remain.

The experiments were carried out on photosystem I (PSI) – a key member of the photosynthetic apparatus. The main function of PSI is to capture and convert sunlight into electrical energy. In one PSI monomer from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*, ~ 100 chlorophyll molecules are involved in efficient light-harvesting and excitation energy transfer leading to light-induced charge separation in the reaction center [9,10]. At low temperatures, specific chlorophyll molecules act as traps for the excitation energy, whereof a portion of this energy is released by fluorescence emission [11]. The fluorescence emission of these traps can be observed using low temperature single-molecule spectroscopy [12]. The combination of an antenna system with a highly efficient energy transfer chain terminated with fluorescent traps makes PSI a perfect system for studies with high spectral resolution at the single-molecule level. The high photo-stability of chromophores at low temperatures allows for the possibility of acquiring spectroscopic data for a large number of individual complexes. Specific properties e.g. sample heterogeneity, can be easily

Abbreviations: PSI, photosystem I

* Corresponding author. Fax: +49 7071 29 5490.

E-mail addresses: marc.brecht@uni-tuebingen.de, brecht@hydrogenase.de (M. Brecht).

accessed by reducing the amount of spectroscopic data to a low number of parameters most relevant for the actual problem. Hereby it becomes possible to compare the outcome of different sample preparations as recently shown by our group [13]. Using this approach it was possible to evaluate the heterogeneity induced by sample treatment on PSI, e.g. it turned out that PSI complexes embedded in a polyvinyl alcohol (PVA) matrix show a much larger heterogeneity than PSI complexes dissolved in glycerol/buffer mixtures [13]. Unfortunately, in our prior experiments it was not possible to judge whether or not glycerol interacts directly with PSI or not. Here we report the fluorescence emission of single PSI complexes that were exposed to a high glycerol concentration before they were highly diluted in buffer solution. Based on these results it is now possible to suggest a direct binding of glycerol to PSI.

2. Materials and methods

PSI trimers from *T. elongatus* have been isolated as described in Ref. [14]. The samples were prepared starting from a solution of re-solubilized single crystals of PSI with a chlorophyll concentration of 3 mM. The samples were diluted in buffer (containing 20 mM Tricine, 25 mM MgCl₂, 4 mM β-DM, and 5 mM sodium ascorbate) or 66% glycerol/buffer mixture (w/w) in three steps to a final PSI trimer concentration of approximately 3 pM PSI. The β-DM concentration was kept constant (4 mM) during all dilution steps to avoid aggregation of PSI. The details of the sample preparation are shown in Fig. 1. In the first step 1 μl of the protein solution was dissolved in 250 μl of buffer (c) or 66% glycerol/buffer mixture (a, b). In the next two steps 4 μl were diluted in 250 μl buffer (b, c) or 66% glycerol/buffer mixture (a). Accordingly, the glycerol concentration in the three different samples is: 66% (a – glycerol/buffer mixture), ~0.2‰ (b – re-diluted buffer) and 0% (c – buffer). Finally, 1 μl of the highly dissolved protein solution was placed between two cover slips and transferred directly into the cryostat filled with liquid helium. Sample preparation and mounting were carried out under indirect daylight. The fluorescence measurements of individual PSI complexes were carried out using a home-built confocal microscope operating at 1.3 to 1.4 K as described in Ref. [13].

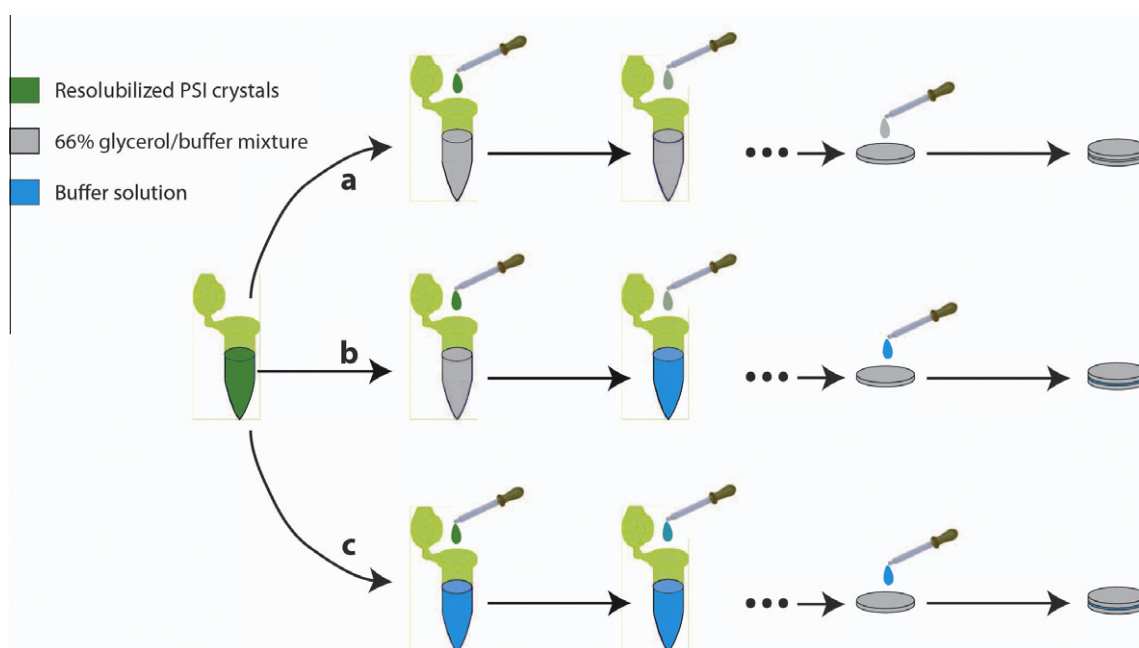


Fig. 1. Illustration of sample preparation: Three samples (a–c) were prepared starting from a solution of re-solubilized single crystals of PSI. The initial PSI solution was then diluted in buffer or 66% glycerol/buffer mixture in three steps as indicated. For details of the sample preparation see Section 2.

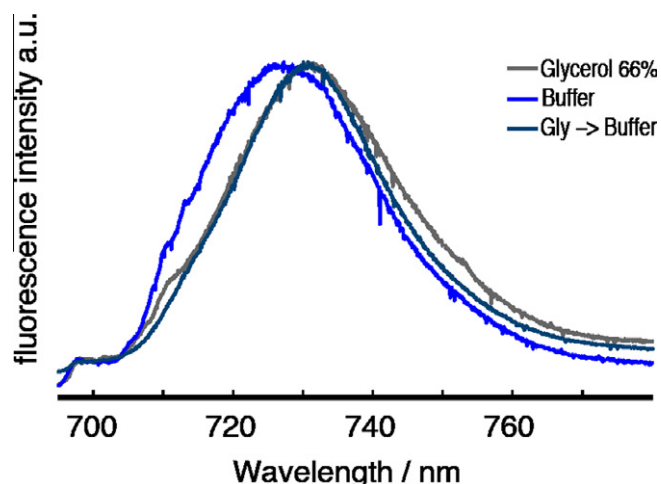


Fig. 2. Mean fluorescence emission spectra obtained by summation of all spectra collected from single PSI complexes for three different sample preparations. The spectra were scaled to similar magnitude.

3. Results

Spectral information for 137 single PSI complexes in buffer, 108 in 66% glycerol/buffer mixtures and 133 complexes in re-diluted buffer were recorded. In Fig. 2 the mean fluorescence spectra for the three samples are given. They show a single broadened band. Their maxima and respective widths (full width at half maximum – fwhm) were found at 726.5 ± 0.5 nm/ 31.8 ± 0.5 nm (buffer), 731.0 ± 0.5 nm/ 31.5 ± 0.5 nm (66% glycerol/buffer mixture), and 731.0 ± 0.5 nm/ 27.0 ± 0.5 nm (re-diluted buffer). The emission maxima reported for low temperature measurements at the ensemble level (with $\geq 50\%$ glycerol concentration) vary between 730 and 732 nm [15–17]. The ensemble values agree well with the fluorescence maximum determined for the average spectra in 66% glycerol/buffer mixture and in re-diluted buffer, whereas for buffer solution a blue-shift of several nanometers is observed, dis-

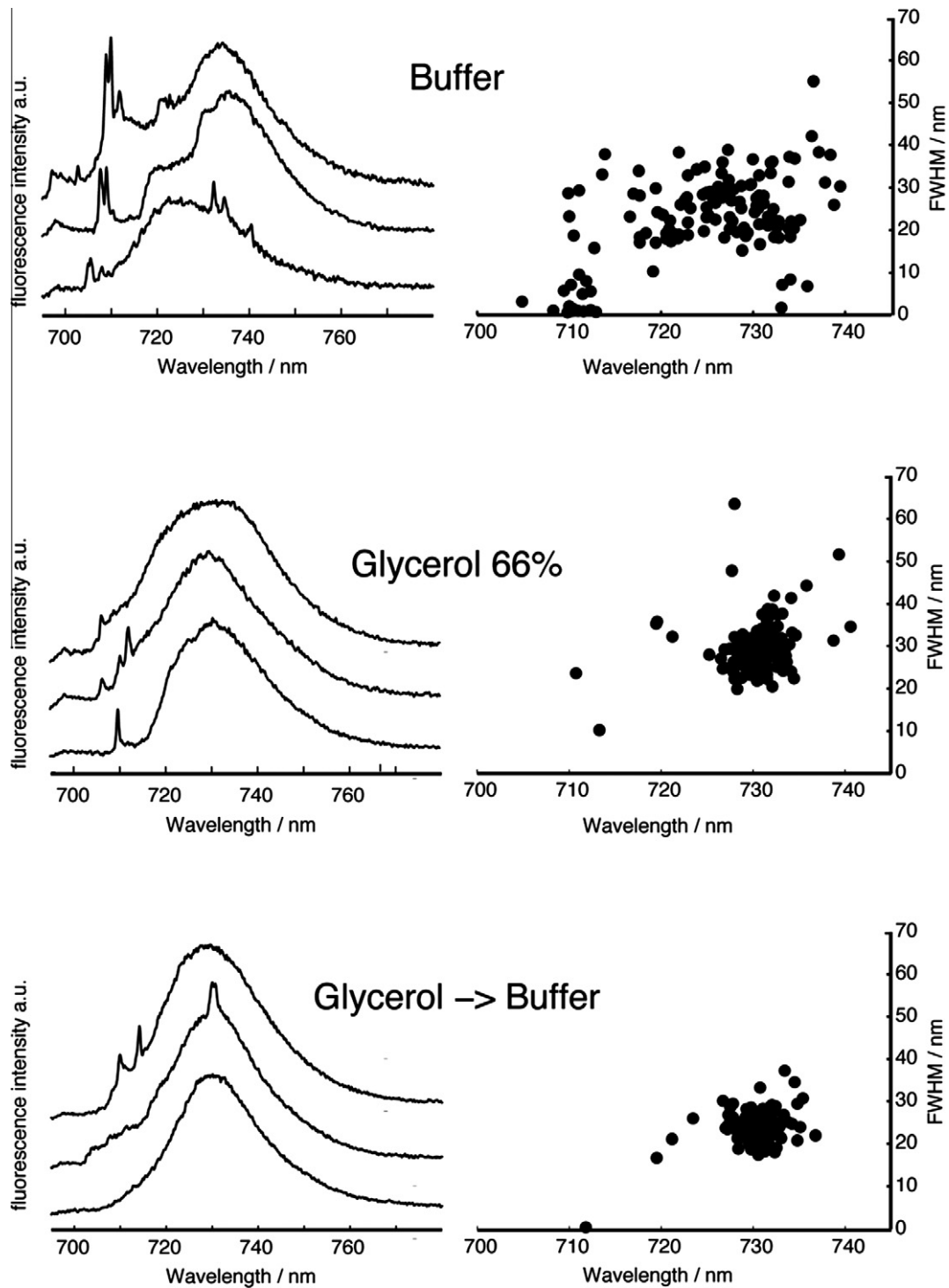


Fig. 3. Left side: Fluorescence emission spectra from three different individual complexes taken in the solutions as indicated; $\lambda_{\text{exc}} = 680 \text{ nm}$, $T = 1.4 \text{ K}$, $t_{\text{acquisition}} = 120 \text{ s}$, and $J_{\text{exc}} = 100 \mu\text{W}$. Right side: 2D-scatter plots obtained from the evaluation of the emission spectra from single PSI complexes for the different datasets. Evaluation of the wavelength position and fwhm was done with an algorithm (see text for details).

cussed in detail in Ref. [13]. In Fig. 3 on the left side, three representative spectra of single PSI complexes recorded in the different solutions are shown. The spectra are composed of two different contributions: zero-phonon lines and broad intensity distributions. In the spectra of single PSI complexes from *T. elongatus*, the zero-phonon lines are found predominately in the wavelength range $<720 \text{ nm}$. The maxima of the broad intensity distributions are located in the wavelength range $>720 \text{ nm}$ [18]. The variation of line

width of zero-phonon lines in the spectra is due to spectral diffusion [19]. The spectra recorded in buffer solution show a pronounced variation of the shape and the wavelength position of the broad intensity distributions, whereas the spectra taken in 66% glycerol/buffer solution and in re-diluted buffer show smaller variations. Aside from this, it is striking that the intensity and the number of the zero-phonon lines in 66% glycerol/buffer solution and in re-diluted buffer is lower than those seen in buffer solution.

To gain better insight into the variation of shape and intensity, we used an algorithm to determine wavelength position and full-width at half maximum of the contribution with the highest peak intensity in the spectra regardless of whether it is a zero-phonon line or a broad distribution. To accomplish this, the first 120 s of a series of fluorescence emission spectra were selected and averaged resulting in a $S/N > 60$, then a constant offset due to the CCD camera is subtracted. Starting from the maximum position within the spectra the fwhm is determined. The maximum positions and the fwhm were collected for all spectra and presented in 2D-scatter plots shown in Fig. 3 on the right side [13]. The 2D-scatter plots give insight into the intercomplex heterogeneity present between the different PSI complexes in a sample. The overall appearance of these three plots indicates similarities between the heterogeneity of PSI complexes in 66% glycerol/buffer mixture and re-diluted buffer, but not with the PSI complexes in buffer solution. In buffer solution the most intense contributions found in the spectra of single PSI complexes are predominantly within $\lambda_{\max} = 716\text{--}734$ nm and $\text{fwhm} = 11\text{--}31$ nm (the appropriate standard deviations are given). In addition, a number of narrow contributions ($\text{fwhm} \leq 10$ nm) are present at around 710 nm and 733 nm. In 66% glycerol/buffer mixture and re-diluted buffer the contributions are more clustered. For 66% glycerol/buffer mixture they are found between $\lambda_{\max} = 726\text{--}734$ nm and $\text{fwhm} = 22\text{--}34$ nm and $\lambda_{\max} = 728\text{--}733$ nm and $\text{fwhm} = 20\text{--}28$ nm for re-diluted buffer, respectively. The clustering of the contributions visualizes a decrease of the intercomplex heterogeneity. This decrease is due to a more compact and homogeneous protein conformation with less structural variability induced by glycerol [1–3,13].

4. Discussion

The spectral properties and the heterogeneity of PSI in the different samples are shown by mean fluorescence spectra (Fig. 2), fluorescence spectra of single complexes, and 2D-scatter plots (Fig. 3). Comparing these properties shows pronounced similarities between PSI in 66% glycerol/buffer mixture and in re-diluted buffer. Those similarities are not observed with the data of PSI complexes in buffer solution that serve here as control experiment where no glycerol was ever added. Although this control experiment and the re-diluted solution contain almost no glycerol – the solutions are almost chemically identical – the spectral properties of the dissolved PSI complexes deviate remarkably. This observation stands in contrast to an assumption that a certain glycerol concentration in the solution is the determining factor for the homogenization of proteins. However, the similarities observed between the PSI complexes in 66% glycerol/buffer mixture and re-diluted buffer show that glycerol must be – somehow – involved in the homogenization process. In our experiments, the only reasonable explanation for this is that the exposure of PSI to glycerol for a certain amount of time (during the sample preparation) induces the homogenization of PSI. The way in which this short-time exposure affects PSI is comparable to the effects induced by a constant, high glycerol concentration (see Fig. 3). Therefore, the reason for the observed similarities and/or the discrepancies in the different sample types seems to depend on an interaction between glycerol and PSI that is established during the exposure of PSI to a high glycerol concentration. The effect of glycerol on the protein conformation is even maintained if the initial solution containing a high glycerol concentration is diluted two times by buffer (see Fig. 1b); hence the interaction between glycerol and PSI is lasting and for at least several minutes independent from the concentration in the solution.

The collection of the presented data enables us now to discern between a direct and an in-direct interaction model of polyols with

proteins [2–5,7,8]. As mentioned before, experiments on PSI in 66% glycerol/buffer mixture show a remarkable homogenization of PSI induced by glycerol, but the high glycerol concentration can account for both models [13]. In re-diluted buffer this situation is changed. The residual amount of glycerol present in the final solution (0.2%) is too small to form stable clusters of glycerol molecules [20] that can encapsulate PSI with its hydration layer completely, which is a prerequisite for the indirect interaction model. Therefore this interaction model cannot explain the observed similarities between PSI complexes in 66% glycerol/buffer mixture and re-diluted buffer [7]. The influence of glycerol on PSI seems to rely on an interaction that is established at a high glycerol concentration between glycerol and PSI. If glycerol is removed from the solution (during the dilution steps), the interaction is maintained for at least several minutes. Consequently, a direct binding of glycerol to PSI is most probable. These observations are in agreement with the direct interaction model of polyols to the surface of proteins. Based on the model, the reduction of heterogeneity in the presented data (Fig. 3), is due to a more compact protein conformation induced by reorientations of the protein after binding of glycerol [1,2]. In addition, the presented approach opens the possibility to quantify the threshold value, at which an interaction between the proteins and glycerol is established and the appropriate time-constants.

In conclusion, single-molecule spectroscopy performed solely on PSI complexes dissolved in solutions with high glycerol concentrations show a homogenization of PSI, but proved insufficient to determine whether the direct or indirect interaction model between glycerol and the surface of proteins is valid. In combination with the spectroscopic results on re-diluted PSI complexes presented here this drawback can be overcome and a direct binding of glycerol to the surface of PSI can be visualized by the remaining homogenization of the complexes induced by glycerol.

Acknowledgements

Single-molecule experiments were carried out in the laboratory of Prof. Robert Bittl (Free University Berlin); his continuous support is gratefully acknowledged. We thank Eberhard Schlodder for PSI samples and fruitful discussions. Volker Radics and Jana Nieder are gratefully acknowledged for technical advice and assistance during the experiments. This work has been supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (BR 4102/1-1 and BR 4102/2-1).

References

- [1] Sousa, R. (1995) Use of glycerol, polyols and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization. *Acta Cryst.* D51, 271–277.
- [2] Vagenende, V., Yap, M.G.S. and Trout, B.L. (2009) Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry* 48 (46), 11084–11096.
- [3] Gekko, K. and Timasheff, S.N. (1981) Mechanism of protein stabilization by glycerol – preferential hydration in glycerol–water mixtures. *Biochemistry* 20 (16), 4667–4676.
- [4] Back, J.F., Oakenfull, D. and Smith, M.B. (1979) Increased thermal-stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* 18 (23), 5191–5196.
- [5] Lakshminanth, G.S. and Krishnamoorthy, G. (1999) Solvent-exposed tryptophans probe the dynamics at protein surfaces. *Biophys. J.* 77 (2), 1100–1106.
- [6] Timasheff, S.N. (2002) Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (15), 9721–9726.
- [7] Liu, F.F., Ji, L., Zhang, L., Dong, X.Y. and Sun, Y. (2010) Molecular basis for polyol-induced protein stability revealed by molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* 132 (22), 225103–1–9.
- [8] Malardier-Jugroot, C., Bowron, D.T., Soper, A.K., Johnson, M.E. and Head-Gordon, T. (2010) Structure and water dynamics of aqueous peptide solutions in the presence of co-solvents. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2), 382–392.
- [9] Fromme, P., Jordan, P. and Krauss, N. (2001) Structure of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1507 (1–3), 5–31.

- [10] Karapetyan, N.V., Schlodder, E., van Grondelle, R. and Dekker, J.P. (2006) *Advances in Photosynthesis and Respiration: Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase*, vol. 24, Springer.
- [11] Gobets, B. and van Grondelle, R. (2001) Energy transfer and trapping in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1507 (1–3), 80–99.
- [12] Jelezko, F., Tietz, C., Gerken, U., Wrachtrup, J. and Bittl, R. (2000) Single-molecule spectroscopy on photosystem I pigment–protein complexes. *J. Phys. Chem. B* 104 (34), 8093–8096.
- [13] Hussels, M. and Brecht, M. (2011) Effect of glycerol and PVA on the conformation of photosystem I. *Biochemistry* 50, 3628–3637.
- [14] Fromme, P. and Witt, H.T. (1998) Improved isolation and crystallization of photosystem I for structural analysis. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1365 (1–2), 175–184.
- [15] Palsson, L.O., Dekker, J.P., Schlodder, E., Monshouwer, R. and van Grondelle, R. (1996) Polarized site-selective fluorescence spectroscopy of the long-wavelength emitting chlorophylls in isolated photosystem I particles of *Synechococcus elongatus*. *Photosynth. Res.* 48 (1–2), 239–246.
- [16] Zazubovich, V., Matsuzaki, S., Johnson, T.W., Hayes, J.M., Chitnis, P.R. and Small, G.J. (2002) Red antenna states of photosystem I from cyanobacterium *Synechococcus elongatus*: A spectral hole burning study. *Chem. Phys.* 275 (1–3), 47–59.
- [17] Riley, K.J., Reinot, T., Jankowiak, R., Fromme, P. and Zazubovich, V. (2007) Red antenna states of photosystem I from cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 and *Thermosynechococcus elongatus*: Single-complex spectroscopy and spectral hole-burning study. *J. Phys. Chem. B* 111 (1), 286–292.
- [18] Brecht, M. (2009) Spectroscopic characterization of photosystem I at the single-molecule level. *Mol. Phys.* 107, 1955–1974.
- [19] Brecht, M., Studier, H., Elli, A.F., Jelezko, F. and Bittl, R. (2007) Assignment of red antenna states in photosystem I from *Thermosynechococcus elongatus* by single-molecule spectroscopy. *Biochemistry* 46 (3), 799–806.
- [20] Dashnau, J.L., Nucci, N.V., Sharp, K.A. and Vanderkooi, J.M. (2006) Hydrogen bonding and the cryoprotective properties of glycerol/water mixtures. *J. Phys. Chem. B* 110 (27), 13670–13677.

Kapitel 6

Red antenna states of Photosystem I trimers from *Arthrospira platensis* revealed by single-molecule spectroscopy

In diesem Kapitel wird die Fluoreszenzemission einzelner PSI-Komplexe aus dem Cyanobakterium *A. platensis* untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die Fluoreszenzemission von drei unterschiedlichen Emitttern ausgeht. Zwei dieser Emittter lassen sich den aus Ensemble-Experimenten bekannten Emitttern zuordnen. Ihre Emission ist durch starke Elektron-Phonon-Kopplung und schnelle spektrale Diffusion verbreitert. Darüber hinaus muss von einer nahezu senkrechten Ausrichtung der Übergangsdipolmomente zueinander ausgegangen werden, da sich trotz der räumlichen Nähe der beiden Emittter keine Hinweise auf Energietransfer vom energetisch höher liegenden zum tiefer liegenden zeigten. Der dritte Emittter wurde in dieser Studie erstmals nachgewiesen und zeichnet sich durch schmale Nullphononenlinien (*Zero-Phonon Lines* ZPL) aus. Darüber hinaus konnte durch die spektrale Charakterisierung der verschiedenen Emittter eine große Ähnlichkeit zu der Fluoreszenzemission von PSI-Komplexen aus *Thermosynechococcus elongatus* gezeigt werden, die eine strukturelle Ähnlichkeit der PSI-Komplexe nahelegt.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbabbio

Red antenna states of Photosystem I trimers from *Arthrospira platensis* revealed by single-molecule spectroscopy

Marc Brecht^{a,*}, Martin Hussels^a, Eberhard Schlodder^b, Navassard V. Karapetyan^c

^a Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen, Germany

^b Max-Volmer-Laboratorium für Biophysikalische Chemie, Technische Universität Berlin, Strasse des 17. Juni 135, 10623 Berlin, Germany

^c A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky Prospect 33, 119071 Moscow, Russia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2011

Received in revised form 21 November 2011

Accepted 23 November 2011

Available online 3 December 2011

Keywords:

Photosystem I

Single-molecule spectroscopy

Long-wavelength antenna chlorophyll

Energy transfer

Arthrospira platensis

ABSTRACT

Single-molecule fluorescence spectroscopy at 1.4 K was used to investigate the spectral properties of red (long-wavelength) chlorophylls in trimeric Photosystem I (PSI) complexes from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. Three distinct red antenna states could be identified in the fluorescence spectra of single PSI trimers from *A. platensis* in the presence of oxidized P700. Two of them are responsible for broad emission bands centered at 726 and 760 nm. These bands are similar to those found in bulk fluorescence spectra measured at cryogenic temperatures. The broad fluorescence bands at ≈ 726 and ≈ 760 nm belong to individual emitters that are broadened by strong electron–phonon coupling giving rise to a large Stokes-shift of about 20 nm and rapid spectral diffusion. An almost perpendicular orientation of the transition dipole moments of F726 and F760 has to be assumed because direct excitation energy transfer does not occur between F726 and F760. For the first time a third red state assigned to the pool absorbing around 708 nm could be detected by its zero-phonon lines. The center of the zero-phonon line distribution is found at ≈ 714 nm. The spectral properties of the three red antenna states show a high similarity to the red antenna states found in trimeric PSI of *Thermosynechococcus elongatus*. Based on these findings a similar organization of the red antenna states in PSI of these two cyanobacteria is discussed.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Photosystem I is a large pigment-protein complex embedded in the thylakoid membrane. It is one of the major protein complexes catalyzing the primary reactions of oxygenic photosynthesis. After photoexcitation, PSI transports electrons from reduced plastocyanin or cytochrome c_6 on the luminal side to ferredoxin on the stromal side of the photosynthetic membrane [1]. PSI of higher plants and algae (named PSI-200) consists of the PSICore complex and the peripheral light-harvesting complex LHC I. In cyanobacteria only the core complex exists. Even though the PSI core complex from cyanobacteria [2,3] differs in organization and polypeptide content to that of higher plants [4] and algae, the structures are very similar to each other [5]. The PSI core complex coordinates all of the redox cofactors and the core antenna of ~ 100 chlorophyll a (Chl) and ~ 20 β -carotene molecules. After absorption of light by an antenna pigment, the excitation energy is efficiently trapped within about 30 ps

via charge separation in the reaction center leading to $P700^+A_0^-$. Charge stabilization is achieved by subsequent electron transfer to the secondary acceptor A_1 , then further to F_X and finally to the terminal electron acceptors F_A and F_B .

A fascinating feature of the core antenna of cyanobacterial PSI is the presence of several Chl molecules absorbing at longer wavelength (lower energy) than P700. These red-shifted Chls are often referred to as red Chls or long-wavelength Chls (LWC) (for reviews, see Karapetyan et al. [6,7] and Gobets and van Grondelle [8]). Long-wavelength Chls of PSI from different cyanobacteria show remarkable differences concerning the number and the spectral positions (see Table 1). The spectral heterogeneity of the antenna Chls can be explained by site-energy differences arising from pigment–protein interactions and strong pigment–pigment interactions of excitonically coupled Chls. LWCs have a pronounced effect on the energy transfer within the whole antenna system. The excited states in the antenna tend to achieve a Boltzmann distribution among the different spectral forms before trapping. Excitation energy transfer processes from the bulk to LWCs occur within a few ps (see [6–8] and references therein). As a consequence, fluorescence is emitted mainly from the LWC and trapping becomes an energetically uphill process that is enabled by thermal energy of the surrounding. At physiological temperatures, thermal energy is sufficiently available and the quantum yield of photochemistry is virtually independent of the wavelength of the excitation, even at wavelengths of up to

Abbreviations: A_0 , primary electron acceptor in PSI; A_1 , secondary electron acceptor in PSI (a phylloquinone); Chl a , chlorophyll a ; Cxxx, Chl absorbing at xxx nm; FeS, iron-sulfur-cluster; F_X , F_A and F_B , three [4Fe-4S] clusters in PSI; Fxxx, fluorescence with an emission maximum at xxx nm; FWHM, full width at half maximum P700 ($P700^+$), primary electron donor of PSI in the reduced (oxidized) state; PSI (PSII), photosystem I (photosystem II); PW, phonon-wing; ZPL, zero-phonon line

* Corresponding author. Tel.: +49 7071 29 76239.

E-mail address: marc.brecht@uni-tuebingen.de (M. Brecht).

Table 1
Comparative analysis of ZPL of red Chl forms in PSI trimers from the various cyanobacteria.

Cyanobacteria	Absorbance bands (amount of Chls)	P700	P700 ⁺	ZPL
		fluorescence λ_{\max}	fluorescence λ_{\max}	distribution λ_{\max}
<i>A. platensis</i>	708 (7–8) [7,12] 740 (3) [7,12]	760 [7,37]	727 [9]	714
<i>T. elongatus</i>	708 (5–6) [7,12] 719 (4–5) [7,12]	735 [13]	731 [13]	710 [27]
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	708 (5) [7,8]		722.5 [37]	699 [38] 710 [38]
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	703 (2) [39]		714 [39]	698 [39]

760 nm [9]. At lower temperatures, however, the LWCs act as irreversible traps for excitation energy, thereby decreasing the quantum efficiency of charge separation and increasing the fluorescence yield [9].

PSI trimers of *Arthrospira platensis* contain the reddest Chl antenna state reported so far, absorbing at 740 nm (C740) and emitting at 760 nm (F760) at cryogenic temperatures [10–12]. The deconvolution of 5 K absorption spectra of trimeric PSI yields two red bands, one at 708 nm (C708) and the other at 740 nm (C740); the oscillator strength of these bands corresponds to 7–8 and 3 Chls, respectively [12]. The fluorescence intensity of the different red antenna states of trimeric PSI from *A. platensis* depends strongly on the redox state of P700. The 760 nm fluorescence (F760), that dominates the fluorescence spectrum of trimeric PSI with P700 in the reduced state (P700), is almost completely quenched in the presence of oxidized P700 (P700⁺) that acts as an efficient quencher [13].

In monomeric PSI complexes of *A. platensis* the absorption band around 740 nm is lost completely [10–13] indicating that the absorption at 740 nm can be assigned to one excitonically coupled Chl aggregate localized in the trimerization domain [14,15]. The oscillator strength of the 708 nm band is similar in monomeric and trimeric PSI [16,17]. To explain the observed oscillator strength corresponding to 7–8 Chls, more than 4 aggregates (dimers or trimers) may be required. Different putative candidates for C708 have been proposed in the literature (see [6–8] and references therein). It should be noted that for most of the candidates discussed in the literature the oscillator strength is shared between the low energy exciton transition absorbing at longer wavelength around 708 nm and the high energy exciton transition absorbing at shorter wavelengths. Therefore, the oscillator strength that is contributed, for example, by a dimer to the long-wavelength absorption band, corresponds generally to less than 2 Chls.

The emission of C708 has its maximum at 726 nm in PSI containing P700 in the oxidized state (P700⁺). Recently it was shown that an additional emitter at 731 nm is present, if P700 is in the reduced state. This emitter belongs also to one aggregate of C708 and is strongly quenched by P700⁺ [13].

The PSI complex of the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* is often used as a reference system for PSI, due to the well-resolved structural model from X-ray crystallography [2,3,18]. The absorption spectrum of trimeric PSI complexes from *T. elongatus* shows two absorption bands in the red region, one at 708 nm (C708) and a second at 719 nm (C719). Their oscillator strength corresponds to that of 5–6 and 4 Chls, respectively. Monomeric PSI complexes of *T. elongatus* show a reduced number of C719 Chls corresponding to the loss of 2 Chls. Therefore, it has been suggested – like for C740 – that some of these LWCs are located close to the trimerization domain of the complexes [9,14,15]. With hole-burning experiments it was shown that the description of the spectral properties of the absorption profile cannot sufficiently be described solely by the pools C708 and C719, therefore a third spectral form with absorption maximum at 715 nm (C715) was introduced [19]. The fluorescence spectra of PSI of *T.*

elongatus at 77 K exhibit one broad emission band [13]. The wavelength position and the integral intensity of this band are different for monomeric and trimeric PSI complexes and depend on the redox state of P700. The fluorescence spectra indicate at least three emitters with maximum emission at 730, 734 and 739 nm. The emission at 739 nm is only observable in PSI trimers containing P700 in the reduced state, because the emission of F739 is highly quenched by P700⁺. In PSI monomers F739 is not observed, therefore it can be associated with the two Chl's of C719 that are not present in monomeric PSI. An additional weak emitter close to 710 nm was found by single-molecule spectroscopy. It was assumed that this emitter belongs to the C708 pool [20,21].

With single-molecule spectroscopy it is possible to observe the fluorescence of PSI down to the level of single trimers or monomers [20]. At the single-molecule level spectral properties are accessible, which are averaged out in large ensembles [22]. The fluorescence of single PSI complexes from all species studied so far is composed of various contributions from the red pool emitters. The spectral characteristics of these different Chl aggregates vary remarkably. The variations concern – besides the emission wavelength – their intensity, electron-phonon coupling, and degree of spectral diffusion. The most striking parameters in the spectra of single PSI complexes are the rate and width of spectral diffusion acting on the different emitters. If the site energies of chromophores are little affected by fluctuations (weak spectral diffusion) and if the rate of spectral diffusion is smaller than the rate of data acquisition, the emission profile of a single emitter composed of a sharp zero-phonon line (ZPL) and its phonon-wing (PW) becomes observable in the spectra. Induced by the remaining fluctuations at low temperature, spectral jumps of these ZPLs can be observed [23].

The width of these jumps can extend up to several nanometers indicating remarkable changes in the site energy of the involved chromophores. If the rate of spectral diffusion is higher (fast spectral diffusion) than the rate of data acquisition, only broadened lines are visible [24]. If the signature of the ZPLs is lost, it is no longer obvious whether the broadened lines are due to a single or several emitters. Then additional properties like the polarization of the emission [25] must be taken into account to deduce the number of the underlying emitting states.

In this work we focus on the fluorescence of single PSI trimers of *A. platensis* with the reddest Chl antenna state absorbing at 740 nm [6,11,12]. The presented experiments reveal the spectral properties of three different emitters in PSI of *A. platensis*.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of samples

Trimeric PSI complexes have been isolated from the cyanobacterium *A. platensis* according to Ref. [12]. Purified complexes at a concentration of about 200 μ M Chl were stored in 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) and 0.08 mM (0.04% w/v) detergent n-dodecyl β -D-maltoside (Sigma) at -80 °C. This amount of detergent is adequate for a PSI trimer concentration of 1 μ M to avoid PSI aggregation [26]. For measurements of the fluorescence of single PSI complexes, the sample was diluted in buffer solution containing 20 mM Tricine (pH 7.5), 25 mM MgCl₂, 4 mM n-dodecyl β -D-maltoside, and 5 mM sodium ascorbate for pre-reduction of P700. The PSI containing solution was diluted to a PSI trimer concentration of ≈ 3 pM. Less than 1 μ l of this sample was placed between two cover slips assuring spatial separation of individual PSI trimers. Sample preparation was carried out under indirect daylight. To observe the fluorescence of single PSI complexes, a home-built confocal microscope was used. The experimental setup was described recently [27]. The sample and the microscope objective were immersed in super fluid helium, with a sample temperature of 1.4 K. The excitation power measured directly behind the beam-scanning module was 100 μ W, and the excitation

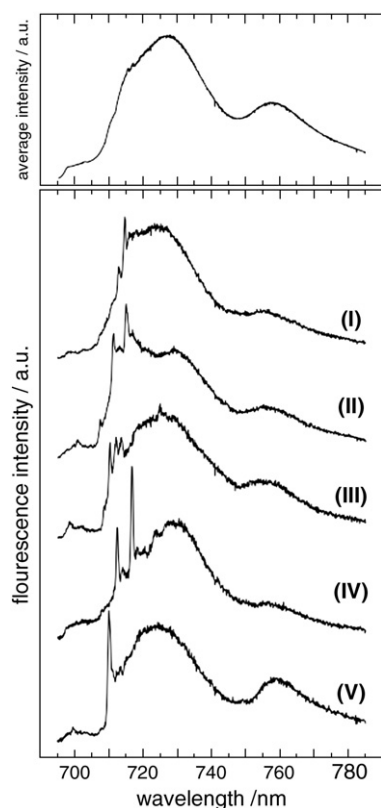


Fig. 1. (I)–(V): Single-molecule fluorescence spectra of PSI complexes of *A. platensis* (I–V). Spectra were recorded for different individual complexes with $\lambda_{exc} = 680$ nm at $T = 1.4$ K. The acquisition time was 100 s for each spectrum. Top: average of all spectra recorded (106 PSI trimers).

wavelength was 680 nm for all experiments. The stray light of the laser was suppressed by a Raman long-pass filter (AHF HQ695LP).

2.2. Data evaluation procedures

For data analysis we used the software package Matlab. The occurrence of ZPLs in a sequence of fluorescence spectra from individual PSI trimers has been evaluated using the following algorithm. It is based on three steps. First, the spectra series are smoothed in two dimensions

(wavelength and time) using a moving average filter as provided in Matlab (Curve Fitting Toolbox). In a second step, a standard Laplace 1D edge filter is applied in the wavelength domain to enhance sharp and to suppress broad structures. In a third step, all wavelength positions are collected where the intensity surpasses a certain threshold, which implies the presence of narrow lines in the spectra. Finally, the information is collected for all PSI complexes and visualized in histograms as given in the Results section.

3. Results

3.1. Emission spectra of individual PSI trimers

Single-molecule fluorescence spectroscopy at 1.4 K was used to detect the fluorescence of single PSI complexes from *A. platensis* [20]. The emission originates from LWC, which act as traps for the excitation energy [17]. A PSI trimer concentration of 3 pM was chosen for the collection of the fluorescence of single PSI complexes from *A. platensis*. At this low concentration, the spatial separation of the trimers is much larger than the width of the confocal volume. In total, we recorded spectral information for 106 individual PSI trimers. In Fig. 1 five representative examples for fluorescence spectra of single PSI trimers (denoted I–V) together with the average spectra of all complexes (on top) are given. The spectra were scaled to similar magnitude for better comparison. The spectra of almost all complexes show ZPLs in the range < 720 nm and broad intensity distributions with maxima around 725 nm and 758 nm. The broad bands can be associated with the known emission bands F726 and F760 of low temperature bulk emission spectra, therefore the respective nomenclature will be used in the following.

From all spectra of single trimers, the peak positions of F726 ($= \lambda_{F726}$) and F760 ($= \lambda_{F760}$) were derived. For this purpose, the wavelength range was divided into two regions, in which the contributions of F726 and F760 can be found: 700–740 nm and 740–780 nm. The histograms presented in Fig. 2a show the distributions of the emission band maximum wavelengths, λ_{F726} and λ_{F760} . The full width at half maximum (FWHM) of these distributions can be estimated to be about 6 nm. This indicates that the contribution of inhomogeneous broadening (inter-complex heterogeneity) to the width of the broad emission band as observed in the ensemble spectrum (see Fig. 1) is rather small. This holds even in the case of F726 where it cannot be excluded that more than one red state contributes to the emission. Furthermore, the question was examined, whether the peak positions of F726 and

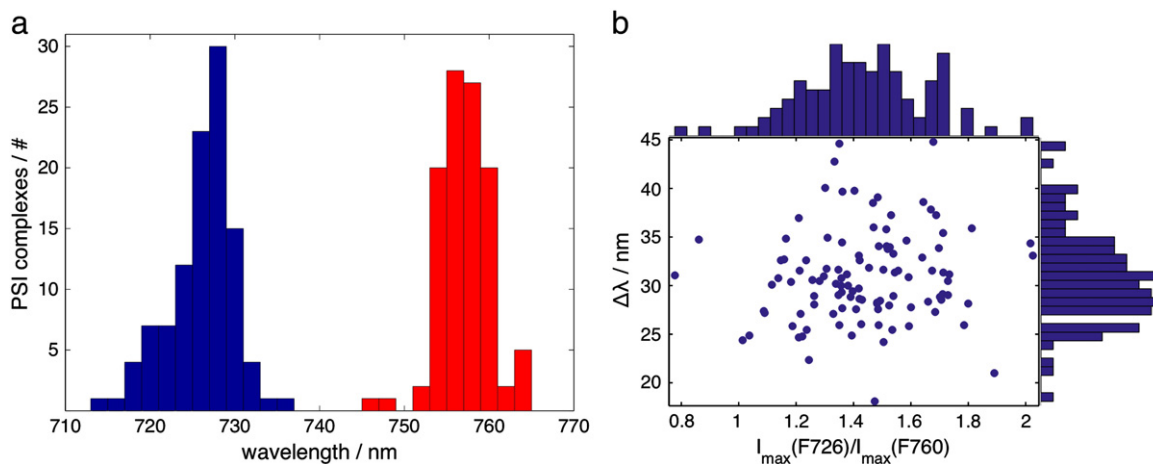


Fig. 2. (a) Distribution of the maxima positions found in the emission spectra of single PSI trimers from *A. platensis*. The wavelength range was divided into two regions: 700–740 nm where the F726 band is observed and 740–780 nm where the F760 band is observed. In each range the peak positions were determined and given as histograms (see also text). (b) 2D-scatter plot between the relative intensities of F726 and F760 (the intensities were derived at the respective position of the maxima) and the wavelength difference between these two emitters ($\Delta\lambda = \lambda_{F760} - \lambda_{F726}$). λ_{F760} and λ_{F726} are the wavelength positions of the maxima of F726 and F760 observed in the spectra of the individual PSI trimers.

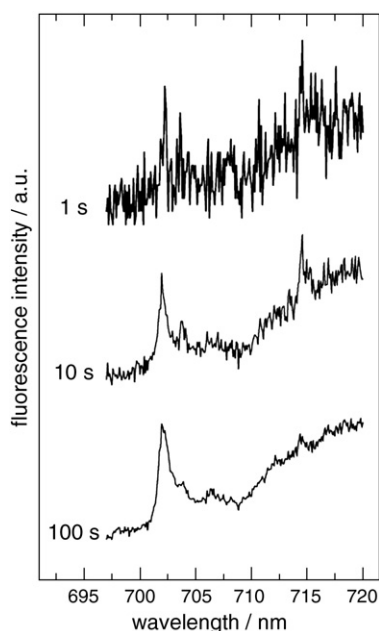


Fig. 3. Fluorescence spectra of a single PSI trimer from *A. platensis* measured with different acquisition times. The spectra were acquired on the same trimer in 1, 10, and 100 s as indicated. $\lambda_{exc} = 680$ nm, $T = 1.4$ K.

F760 in individual PSI complexes are correlated. Therefore, the peak positions λ_{F726} were plotted versus λ_{F760} in a 2D-scatter plot (data not shown). The plot did not reveal any correlation between the peak positions of the two broad emission bands.

The intensities of the broad bands F726 and F760 were determined for all complexes. Due to spectral overlap of the broad bands, it was not possible to determine reliably the integral intensities. Therefore, the maximum intensity I_{max} was used directly from the data as a measure of the intensity. The 2D-scatter plot between the ratio $I_{max}(F726)/I_{max}(F760)$ and the wavelength difference of the peak

positions ($\Delta\lambda = \lambda_{F760} - \lambda_{F726}$) in the single complex emission spectra is shown in Fig. 2b. The relative intensity $I_{max}(F726)/I_{max}(F760)$ is given on the abscissa and $\Delta\lambda$ on the ordinate. The corresponding 1D histograms are shown on the respective axes. In this representation no correlation is visible between the intensities of F726 and F760 and the energetic separation $\Delta\lambda$.

3.2. ZPL dynamics

Fluorescence spectra of single PSI complexes (see Fig. 1) were measured using various acquisition times to analyze the properties of the ZPLs. The dependence of the spectra of a single PSI trimer on the acquisition time is shown in Fig. 3 presenting spectra taken within 1, 10, and 100 s. In the spectrum taken within 1 s, two ZPLs at 702 nm and 715 nm are present. Due to their low intensity, these lines exceed hardly the noise level. Increasing the accumulation time yields an increase of the S/N ratio, but also a broadening of the ZPLs due to spectral diffusion. The ZPL at 702 nm broadens, but remains visible even after 100 s accumulation time, whereas the ZPL at 715 nm is almost completely lost. In similar manner we analyzed the widths of the two broad emission bands of F726 and F760. It turned out that the widths of these broad distributions (≈ 25 nm) remain largely unchanged when varying the acquisition time from 1 s up to 120 s (data not shown).

In order to investigate and compare the dynamics of the ZPLs in the emission spectra of single PSI trimers from *A. platensis* in more detail, sequences of fluorescence spectra were recorded for all PSI trimers. With an acquisition time of 1 s for one spectrum the S/N ratio of our setup is sufficient to monitor ZPL dynamics directly. Two examples of different dynamical behavior of ZPLs are shown in Fig. 4a, b. Sequences of 100 fluorescence spectra with an accumulation time of 1 s for each spectrum are displayed for two different single PSI trimers. The sequence in Fig. 4a shows an example for a single ZPL changing its wavelength position on the timescale of several seconds. The ZPL shows several discrete jumps of about 1 nm. In the sequence in Fig. 4b, the spectral diffusion of the ZPL is much faster. Variations of the emission wavelength occur at higher rates. The duration between two jumps is in the same order as the acquisition time. In cases where ZPLs reside on

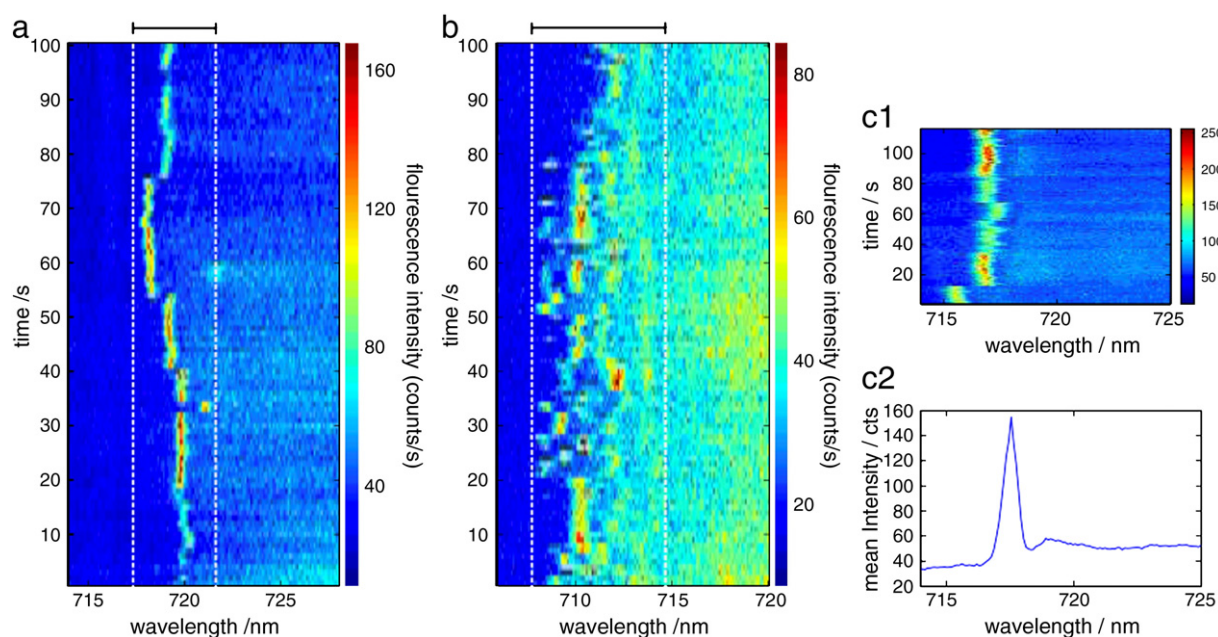


Fig. 4. (a, b) Sequence of 100 fluorescence spectra of two different single PSI trimers from *A. platensis* measured continuously with an acquisition time of 1 s for each spectrum; $\lambda_{exc} = 680$ nm, and $T = 1.4$ K. Fluorescence intensity is color-coded (see color code to the right of graphs). The spectral diffusion of the ZPLs is restricted to the wavelength range indicated by the white vertical dashed lines. (c1) Sequence of 120 fluorescence spectra of a single PSI trimer, where the ZPL resides almost on the same wavelength position. (c2) Average spectrum obtained by summation of all spectra depicted in (c1). Prior to that, each spectrum was shifted, so that the ZPL position is the same in each spectrum.

a spectral position for a shorter amount of time than the acquisition time two or more spectral positions are observed. In addition to the spectral variations, intensity changes of the ZPLs were observed. Such intensity changes are visible for both single PSI complexes (Fig. 4a and b). In Fig. 4a, after 20 s the ZPL intensity suddenly increases by factor >2 and after 76 s it decreases again. In Fig. 4b, intensity changes occur from second to second. In summary, ZPLs show dynamical variations of their spectral position and intensity. The rate and extent of these variations differ from complex to complex, but the ZPLs generally remain in confined spectral regions. For the two examples in Fig. 4a and b these regions are illustrated by white dashed lines. Although, it is possible to resolve single ZPLs in those sequences, the observation of their phonon wings (PWs) is challenging and thus the determination of the electron–phonon coupling. The determination of the shape of the PW is hindered by two points. First, the intensity of the PWs is low and therefore an averaging of the data for at least several seconds is required; second, the shape of phonon wings is often distorted by other emitters. This makes it difficult to resolve the PWs. As a consequence, the determination of the ZPL together with its PW is only possible, if the emission is stable and if the background signals can be separated. In Fig. 4c1, such type of ZPL/PW couple is shown. The emission of this ZPL is only slightly disturbed by other emitters. In such a case it is possible to determine the shape of the ZPL and its PW. For this purpose, the mean position of the ZPL in the shown data-set was determined. After that, all spectra were shifted by $\Delta\lambda$ until the ZPL position matches the mean position. Then, the shifted spectra were averaged as shown in Fig. 4c2. Note: The original wavelength scale is no longer valid after shifting the spectra. In this case it is more appropriate to give an energy scale related to the position of the ZPL. Due to the small shifts $\Delta\lambda$, the original wavelength scale was maintained for convenience. In the average spectrum shown in Fig. 4c2, the ZPL with its accompanying phonon wing is visible. The slight bending of the baseline is due to small background contributions. Based on the intensity the Huang–Rhys factor S defining the strength of the electron phonon coupling can be calculated from $e^{-S} = \frac{I_{ZPL}}{I_{ZPL} + I_{PW}}$. I_{ZPL} and I_{PW} are the intensities of the ZPL and the phonon wing, respectively. For this line profile we deduce $S = 0.30 \pm 0.05$. In a second data-set, we obtained – by the same procedure – $S = 0.35 \pm 0.05$ (data not shown). Both values indicate weak electron–phonon coupling ($S < 0.7$) for the red states characterized by the occurrence of ZPLs.

3.3. Spectral distribution of ZPLs

Spectral positions of the ZPLs were determined for all 106 individual trimers automatically with the algorithm described in Materials and methods (Section 2.2). This algorithm is specially designed to detect ZPLs within noisy spectra taken in rapid succession. It accounts for their wavelength position, their dynamics, and occurrence. The histogram (Fig. 5) shows the distribution of the spectral positions of the ZPLs together with the average spectrum from Fig. 1. Using an automated evaluation method opens the possibility to compare the ZPL distributions for different types of sample preparation as well as among different organisms [27]. In addition, observing changes in the shape of the ZPL distribution opens the possibility to draw conclusions about the environment of the involved chromophore assemblies [21,27,28].

The ZPL distribution shown in Fig. 5 reveals the occurrence of ZPLs in the wavelength range between $\lambda > 696$ nm, which corresponds to the edge of the used long-pass filter (AHF HQ695LP) and 740 nm. The contributions between 708 and 718 nm dominate the distribution of ZPLs; their maximum is found at 714 nm and its FWHM is 6 nm. With few exceptions, all PSI trimers exhibit ZPLs in this band.

3.4. Assignment of spectral components

Further details about the emitters responsible for the far-red emission of PSI from *A. platensis* are obtained from the analysis of its polarization [25]. In Fig. 6 the emission of a single PSI trimer in dependence of

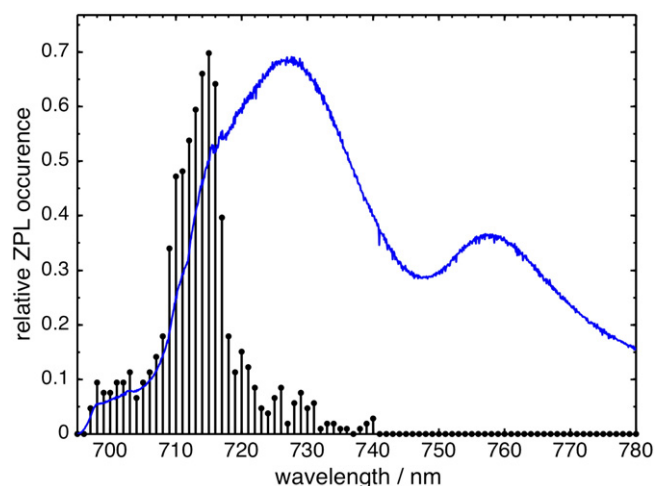


Fig. 5. ZPL histogram for PSI trimers from *A. platensis*. The histogram results from an algorithm applied to fluorescence spectra of single PSI trimers taken in rapid succession (for details see Material and methods). In addition, the average spectrum from Fig. 1 is given.

the polarizer angle in front of the spectrograph is shown. The turning angle of the polarizer is defined with respect to an arbitrary laboratory axis and is uncorrelated to the polarization of the excitation light. The data set chosen for Fig. 6 shows the emission of a particular complex in which the otherwise dominant emitter at ≈ 730 nm is in a dark state (data not shown). In that case, the remaining emission was dominated by the far-red contribution as visible in the average spectrum given on top of Fig. 6. Overall, three contributions are clearly distinguishable: one broad emission at ≈ 730 nm, one ZPL at ≈ 732 nm and a

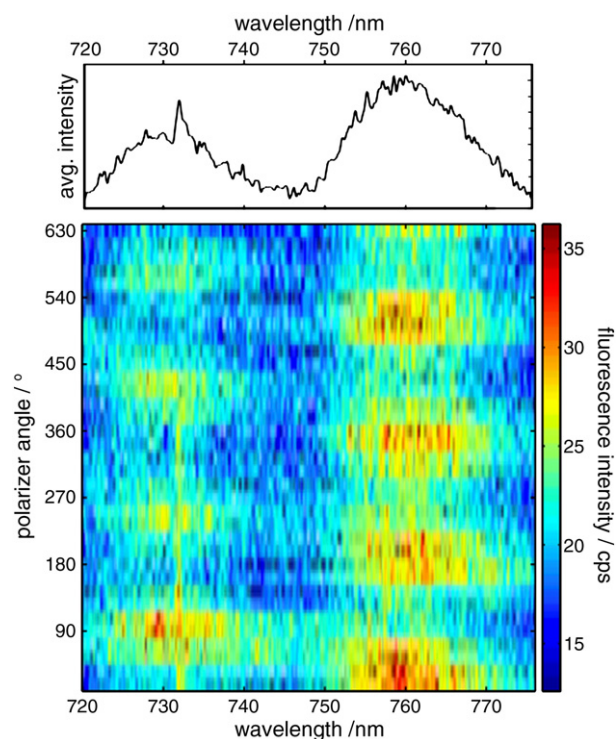


Fig. 6. Sequence of fluorescence spectra of a single PSI trimer as a function of the orientation of the polarizer in front of the spectrograph. The acquisition time was 1 s for each spectrum; $\lambda_{exc} = 680$ nm, and $T = 1.4$ K. The individual spectra were recorded while the polarizer was moving continuously with speed of $360^\circ/20$ s. The fluorescence intensity is encoded in the color scale on the right. The average fluorescence intensity is given on top. The data set chosen shows the emission of a single complex after the dominate emitters at ≈ 730 nm is in a dark state.

broad contribution at ≈ 760 nm. All contributions show modulation of their intensity in dependence of the turning of the polarizer. The intensity modulation of the broad contributions shows a clear sine waveform, whereas the intensity modulation of the ZPL is overlaid by a general intensity reduction. The fluorescence intensities of the broad contributions show a shift in phase by almost 80° . It should be noted that the obtained angle is not identical with the angle between the dipolar moments of the optical transitions of the two emitters. The value represents the angle between the projections of the transition dipole-moments into the image plane of the microscope objective.

4. Discussion

4.1. Comparison of the average spectra from single PSI trimers with ensemble data

The absorbance of PSI trimers of *A. platensis* shows two main bands in the range >700 nm, they are named C708 and C740 in accordance with their maximum positions. Both bands are broad and the numbers of Chl molecules involved are 7–8 for C708 and 3 for C740 [6–8,12]. The details of the spectral classification are summarized in Table 1.

The fluorescence emission of PSI is a superposition of contributions from several red pool emitters. For PSI from *A. platensis* three contributions with maxima at 726 nm (F726), 731 nm (F731) and 760 nm (F760) were reported. The intensities of these contributions depend on the redox state of P700. In the reduced form of P700, the fluorescence spectrum is dominated by the emission of F760 [10,13]. If P700 becomes oxidized, F760 is strongly quenched. The emission spectrum is then dominated by F726 and F760 remains as a shoulder at the low energy side. Recent experiments on monomers of PSI from *A. platensis* gave evidence that F731 contributing to the broad band around 726 nm, is also quenched by $P700^+$ [13].

The single-molecule data presented here are collected with an excitation power of 100 μ W. First, we have to account for the oxidation state of P700 during the single-molecule experiments. At low temperature, the highest rate for the recovery of the ground state of P700 is achieved in centers with prereduced iron-sulfur clusters F_A and F_B . Under these conditions, the radical pair $P700^+A_1^-$ is formed which decays by charge recombination with a half-life of 170 μ s [29]. At the excitation power used, the excitation rate is significantly higher than $(170 \mu\text{s})^{-1}$ and P700 is for $>99\%$ of the time in the oxidized state [13]. As a consequence, it should be expected that F731 and F760 are quenched by $P700^+$. In Fig. 1, the average spectrum obtained from the summation of the emission from single PSI trimers is shown. The spectrum shows a maximum at about 725 nm and a shoulder at ≈ 760 nm. The shape of the spectrum is similar to the ensemble spectra of trimeric PSI with oxidized P700. Thus, the visible contributions can be associated with the respective long-wavelength Chls F726 and F760. The polarization dependent data (Fig. 6) give additional evidence that the emission of F726 and F760 is due to individual broad emitters. The complete band associated with F760 (here 750–770 nm) undergoes a uniform modulation while turning the polarizer. The uniform modulation can be explained with a single emitter constituting F760 that is able to cover almost the whole width of the F760 emission. The behavior is similar for the emitter giving rise for the broad band around 726 nm.

At low temperatures, the presence of a ZPL is a characteristic feature for the emission of single emitters, but in the spectral range of F726 only a very small number of ZPLs are observed; and for F760 no ZPLs are observed at all. The invisibility of ZPLs is possible, if the intensity of the ZPLs falls below the noise level. The intensity of the ZPL depends on the strength of the electron–phonon coupling. If the electron–phonon coupling gets stronger, the intensity of the ZPL shrinks at the expense of its phonon wing (see Fig. 1 in Ref. [28]). A complete disappearance of the ZPLs as observed for the emission of F760 becomes only possible for very strong electron–phonon coupling or for spectral diffusion on a

time scale faster than the acquisition time or for a combination of both processes. Without broadening by spectral diffusion, a value of $S \geq 5$ is required at the S/N ratio of the spectra shown in Fig. 1 of Ref. [28]. The observed Stokes-shift of about 20 nm ($\sim 350 \text{ cm}^{-1}$) for the reddest emitter (absorption around 740 nm and emission around 760 nm) supports the assumption of a very strong electron–phonon coupling for C740/F760. Stark spectroscopy revealed very large polarizability differences and permanent dipole changes between the ground and excited state, which are about a factor of 3 to 5 larger than that of monomeric Chl [19,33] for the red-most states C740 in *A. platensis* and C719 in *T. elongatus*. These unusual spectroscopic properties provide evidence that strongly excitonically coupled Chls are responsible for the long wavelength absorption and emission, respectively. Indeed, the very large polarizability differences of the red-most states, which is similar to those of the special pair of the purple bacterial reaction center, indicates the mixing of charge transfer states into the excited excitonic state. This could explain the strong electron–phonon coupling.

In the spectral range of F726 a small number of ZPLs was observed (see Fig. 5). In this case, a combination of fast spectral diffusion with an electron–phonon coupling in the range of ≈ 2.9 is most likely the reason for the broad unstructured band similar to the results obtained with LWCs in PSI of *Synechocystis* sp. PCC 6803 [28].

In the wavelength region between 710 and 740 nm another emitter belonging to the C708 pool was observed with quite different spectral properties. This red state could be detected by its zero-phonon lines. The center of the zero-phonon line distribution is found at ≈ 714 nm, the Huang–Rhys factor has been estimated to be about 0.3. Accordingly, this red state has its absorption on the long-wavelength side of the absorption band assigned to the C708 pool.

4.2. ZPL distributions of PSI from *A. platensis* and *T. elongatus* are similar

The average spectrum given in Fig. 1 shows a slight shoulder in the region ≈ 715 nm. This shoulder is due to a weak emitter observable by prominent ZPLs (Fig. 3) in the spectra of single PSI trimers. Compared to data from ensemble spectroscopy [13], the shoulder is here more pronounced. As shown recently for PSI of *T. elongatus*, the reason for the variation of the intensity is based on the different amount of glycerol that is added during sample preparation [27]. As shown in Figs. 3 and 4, these ZPLs undergo spectral diffusion. The rates of the spectral diffusion processes vary from ZPL to ZPL as shown in Fig. 3. In many cases, the rate of the site energy changes remains below the rate of data acquisition (≈ 1 s). Then the time-dependent diffusion of those ZPLs can be observed as spectral trails (Fig. 4). The spectral diffusion properties depend on the flexibility of the chromophore bound to the protein [21,27]. The fluorescence emission of the LWCs of PSI is a perfect example. Some contributions show sharp ZPLs, some show broad intensity distributions. However, all rely on Chl aggregates with strong excitonic coupling located in different protein environments. The spectral trails observed in PSI from *A. platensis* show a high similarity with the time-dependent movement of ZPLs observed for PSI from *T. elongatus* [21,27]. Furthermore, the occurrence of ZPLs in the data of single PSI trimers from *A. platensis* and *T. elongatus* shows in both cases a distribution with well-defined maximum located at 714 nm for PSI from *A. platensis* (Fig. 5) and at 710 nm for PSI of *T. elongatus* [21,27]. The spectral diffusion properties and the wavelength position of these ZPLs are in reasonable agreement. As a consequence, it is most likely that structure and the binding situation of the Chl_a aggregate responsible for the ZPLs in *A. platensis* and in *T. elongatus* is similar.

4.3. The red states emitting at 726 and 760 nm are not connected via energy transfer at cryogenic temperatures

If fast energy transfer would lead to thermal equilibration of excitation energy in the antenna, the localization of the excited singlet

state on C740 over C708 is favored by the Boltzmann factor $\exp(-\Delta E/kT)$, where ΔE is the difference between the excitation energies of C708 and C740. This factor is about 19, even at room temperature, whereas at 1.4 K it would be a factor of about 10^{272} . Therefore, the excitation energy would be exclusively trapped on the reddest state C740. As a consequence, fluorescence would be emitted only from the long-wavelength Chl with the lowest energy between ground and excited state. Since fluorescence is observed at 1.4 K from several LWC emitters (see Fig. 1), it can be concluded that the excitation energy is trapped at different red states, which are not connected by fast energy transfer.

This conclusion is supported by Fig. 2b. The intensity ratio $I_{\max}(F726)/I_{\max}(F760)$ is plotted against the wavelength difference of the peak positions ($\Delta\lambda = \lambda_{F760} - \lambda_{F726}$) determined for all emission spectra of single PSI trimers. The spectral separation $\Delta\lambda$ varies in the range 18–44 nm. The variation of $\Delta\lambda$ should have an effect on the spectral overlap and thus also on the rate of energy transfer between these long-wavelength forms. For high energy transfer rates one would expect a low value of $I_{\max}(F726)/I_{\max}(F760)$. The emission around 760 nm (F760) can be associated with an emitter absorbing around 740 nm (C740) indicating a Stokes-shift of about 20 nm. The maximal spectral overlap between donor and emitter is expected, if the maximum of the emission of F726 and the absorption of F760 overlaps. With a Stokes-shift of 20 nm for F760, this is realized if the emission of F726 and F760 separated by about $\Delta\lambda \cong 20$ nm. Fig. 2b shows, however, that there is no correlation between the intensity ratio and the value of $\Delta\lambda$ indicating that energy transfer from F726 to F760 does not occur or more precisely that the transfer is slow compared to the intrinsic decay time of the excited singlet state of the emitter F726. A similar behavior was observed in PSI of *T. elongatus*; it was shown that Chls excited at 730 nm no longer transfer their energy to neighboring Chls [30].

According to Förster theory, the rate of energy transfer between two chromophores depends on (a) the distance between donor and acceptor, (b) the spectral overlap between the emission spectrum of the donor and the absorption spectrum of the acceptor and, (c) the orientation factor for the dipole–dipole interaction.

The absence of energy transfer from C708 to C740 can be due to the large distance between the different Chl aggregates responsible for the emission at 726 nm and 760 nm or due to an almost perpendicular orientation of their transition dipole moments. This observation can be discussed on the basis of the proposed candidates for F726 and F760. Although the structure of PSI from *A. platensis* is unknown, it is reasonable to assume a high similarity of the structural organization of PSI from *A. platensis* and *T. elongatus*. The Chl aggregate A31–A32–B7 in the trimerization domain is most likely responsible for F760 [13]. For F726 several candidates are discussed. Among others, the most likely candidates are: B37–B38, A38–A39, B18–B19, and A16–A17–A25. These Chl aggregates meet three necessary conditions: strong coupling between the chlorophylls of the aggregate (see Table 3 in Ref. [31]), orientation of the transition dipole of the low-energy exciton state parallel to the membrane plane [32] and, finally, a large distance to P700 [2]. These aggregates might be responsible for F726. The distance between A31–A32–B7 and the candidates for F726 are: $d(A31-A32-B7 - B37-B38) \cong 22$ Å, $d(A31-A32-B7 - A38-A39) \cong 57$ Å, $d(A31-A32-B7 - B18-B19) \cong 52$ Å, and $d(A31-A32-B7 - A16-A17-A25) \cong 48$ Å. These distances are all smaller than the Förster radius that defines the distance for which the rate of energy transfer becomes equal to the intrinsic rate of radiative decay. For Chls with identical Q_y transition energies, a value of $R_0 = 65$ Å [34] has been estimated. Therefore an exclusion based on the distance is not possible. Consequently, the orientation factor might be responsible for the missing transfer. Unfortunately, the orientation of the transition dipole moment of tightly coupled Chls can deviate remarkably from an estimation that is based on a simple dipole–dipole model. Therefore, the determination of the lowest exciton state and its orientation calculated from a more sophisticated theoretical approach is required for this type of analysis.

4.4. Comparison of the red states in PSI from *A. platensis* and *T. elongatus*

The absorption and the emission spectra of PSI of *A. platensis* and *T. elongatus* show remarkable differences. The most striking difference of the absorption spectra is found in the wavelength range >700 nm. For PSI of *A. platensis* two well resolved contributions at $\cong 710$ nm and $\cong 740$ nm are observed, whereas the absorption of *T. elongatus* shows only one defined maximum at $\cong 708$ nm together with a broad shoulder around 720 nm. The difference between the fluorescence emission spectra is even more striking. For PSI of *A. platensis*, two well resolved bands at $\cong 730$ nm and $\cong 760$ nm are present, whereas in *T. elongatus* just one broad band is observed. Nevertheless, recent experiments on PSI trimers and monomers of both cyanobacteria revealed remarkable similarities between the long-wavelength Chls [13]. By these experiments, it became obvious that the most-red emitter is strongly quenched by P700⁺ both in PSI of *A. platensis* (F760) and in *T. elongatus* (F739). In each case, the responsible emitters show a Stokes-shift of almost 20 nm. The absorbance (C740/C719) and the emission (F760/F739) of these red Chls is lost in PSI monomers. Thus, a localization of the aggregate in the trimerization domain is most likely and a high structural similarity between the arrangements of the maximum long-wavelength chlorophylls is obvious. A similar formation of a long-wavelength state was observed between the complexes in PSI-LHCl [35]. The only remaining difference between these reddest Chls is the difference of almost 20 nm in their absorption wavelength. The reason for this shift remains unclear. Further similarities are observed for the emission in the range of 730 nm. This part of the emission of *A. platensis* is composed of at least two independent contributions, named F726 and F731. A similar composition of contributions is found for PSI from *T. elongatus*, there the two contributions were named F730 and F734. The more red-shifted pools (F731/F734) exhibit strong quenching by P700⁺. Consequently, both emitters must be located in the vicinity of P700. The fluorescence emission of PSI with oxidized P700 is due to the remaining F726 or F731, respectively. At the single-molecule level, the fluorescence emission of these emitters shows broad intensity distributions due to a combination of spectral diffusion and increased electron–phonon coupling [36]. Based on the insensitivity of F726/F731 on the redox state of P700, their comparable wavelength position, spectral diffusion properties and electron–phonon coupling, a high similarity between the responsible Chl aggregates in PSI of *A. platensis* and *T. elongatus* can be assumed.

Besides the already discussed similarities, the observation of sharp ZPLs in the wavelength range <720 nm of single PSI trimers of both organisms is striking. Based on the similarities of these ZPLs also a high structural analogy between PSI from *A. platensis* and *T. elongatus* can be expected. As a consequence, the absorption of the contributions responsible for the ZPLs and for F726 (*A. platensis*) or F730 (*T. elongatus*) must originate from C708.

5. Conclusions

The fluorescence emission spectra of single PSI trimers from *A. platensis* are composed of sharp ZPLs and broad intensity distributions. The ZPLs distributed around 714 nm can be assigned to red states belonging to C708. The broad fluorescence bands at $\cong 726$ and $\cong 760$ nm are individual emitters that are broadened by strong electron–phonon coupling and rapid spectral diffusion. The transfer of excitation energy between Chl aggregates associated with F726 and F760 seems to be negligible, although all possible candidates are close enough for energy transfer. Therefore, an almost perpendicular orientation of the transition dipole moments of F726 and F760 can be assumed. Summarizing, the results from the single-molecule level with recent experiments at the ensemble level reveal that the different red Chl in PSI from *A. platensis* and *T. elongatus* rely on several Chl aggregates with comparable properties.

Acknowledgements

Single-molecule experiments were carried out in the laboratory of Prof. Robert Bittl (Free University Berlin); his continuous support is gratefully acknowledged. Volker Radics is gratefully acknowledged for technical advice and assistance during the measurements. Financial support from the German Research Council, DFG (SFB 498, TP A6, E.S.) and by Heisenberg-Program (BR 4102/1-1 and BR 4102/2-1), the Russian Academy of Sciences, program MCB and RFBR (Grant 11-04-00247a, to N.V.K.) is gratefully acknowledged.

References

- [1] J.H. Golbeck (Ed.), *Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin:Ferredoxin Oxidoreductase*, Springer, 2006.
- [2] P. Jordan, P. Fromme, H.T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5-Ångstrom resolution, *Nature* 411 (2001) 909–917.
- [3] P. Fromme, P. Jordan, N. Krauss, Structure of photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1507 (2001) 5–31.
- [4] A. Ben-Shem, F. Frolow, N. Nelson, Crystal structure of plant photosystem I, *Nature* 426 (2003) 630–635.
- [5] M.K. Sener, C. Jolley, A. Ben-Shem, P. Fromme, N. Nelson, R. Croce, K. Schulten, Comparison of the light-harvesting networks of plant and cyanobacterial photosystem I, *Biophys. J.* 89 (2005) 1630–1642.
- [6] N.V. Karapetyan, A.R. Holzwarth, M. Rögner, The photosystem I trimer of cyanobacteria: molecular organization, excitation dynamics and physiological significance, *FEBS Lett.* 460 (1999) 395–400.
- [7] N.V. Karapetyan, E. Schlodder, R. van Grondelle, J.P. Dekker, The long wavelength chlorophylls in photosystem I, in: J.H. Golbeck (Ed.), *The Light-Driven Plastocyanin:Ferredoxin Oxidoreductase*, *Advances in Photosynthesis and Respiration* vol. 24, Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin:Ferredoxin Oxidoreductase, Springer, 2006, pp. 177–192.
- [8] B. Gobets, R. van Grondelle, Energy transfer and trapping in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1507 (2001) 80–99.
- [9] L.O. Palsson, C. Flemming, B. Gobets, R. van Grondelle, J.P. Dekker, E. Schlodder, Energy transfer and charge separation in photosystem I: P700 oxidation upon selective excitation of the long-wavelength antenna chlorophylls of *Synechococcus elongatus*, *Biophys. J.* 74 (1998) 2611–2622.
- [10] V.V. Shubin, I.N. Bezsmertnaya, N.V. Karapetyan, Isolation from *Spirulina* membranes of two photosystem I-type complexes, one of which contains chlorophyll responsible for the 77-K fluorescence band at 760 nm, *FEBS Lett.* 309 (1992) 340–342.
- [11] V.V. Shubin, V.L. Tsuprun, I.N. Bezsmertnaya, N.V. Karapetyan, Trimeric forms of the photosystem-I reaction-center complex pre-exist in the membranes of the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *FEBS Lett.* 334 (1993) 79–82.
- [12] E. Schlodder, M. Cetin, M. Byrdin, I.V. Terekhova, N.V. Karapetyan, P700⁺- and ³P700-induced quenching of the fluorescence at 760 nm in trimeric photosystem I complexes from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*, *Biochim. Biophys. Acta* 1706 (2005) 53–67.
- [13] E. Schlodder, M. Hussels, M. Cetin, N.V. Karapetyan, M. Brecht, Fluorescence of the various red antenna states in photosystem I complexes from cyanobacteria is affected differently by the redox state of P700, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 1423–1431.
- [14] J. Kruij, N.V. Karapetyan, I.V. Terekhova, M. Rögner, In vitro oligomerization of a membrane protein complex – liposome-based reconstitution of trimeric photosystem I from isolated monomers, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 18181–18188.
- [15] N.V. Karapetyan, V.V. Shubin, R.J. Strasser, Energy exchange between the chlorophyll antennae of monomeric subunits within the Photosystem I trimeric complex of the cyanobacterium *Spirulina*, *Photosynth. Res.* 61 (1999) 291–301.
- [16] N.V. Karapetyan, D. Dorra, G. Schweitzer, I.N. Bezsmertnaya, A.R. Holzwarth, Fluorescence spectroscopy of the longwave chlorophylls in trimeric and monomeric photosystem I core complexes from the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biochemistry* 36 (1997) 13830–13837.
- [17] V.V. Shubin, I.N. Bezsmertnaya, N.V. Karapetyan, Efficient energy-transfer from the long-wavelength antenna chlorophylls to P700 in photosystem-I complexes from *Spirulina platensis*, *J. Photochem. Photobiol. B* 30 (1995) 153–160.
- [18] N. Krauss, W.D. Schubert, O. Klukas, P. Fromme, H.T. Witt, W. Saenger, Photosystem I at 4-Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction centre and core antenna system, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 965–973.
- [19] V. Zazubovich, S. Matsuzaki, T.W. Johnson, J.M. Hayes, P.R. Chitnis, G.J. Small, Red antenna states of photosystem I from cyanobacterium *Synechococcus elongatus*: a spectral hole burning study, *Chem. Phys.* 275 (2002) 47–59.
- [20] F. Jelezko, C. Tietz, U. Gerken, J. Wrachtrup, R. Bittl, Single-molecule spectroscopy on photosystem I pigment–protein complexes, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 8093–8096.
- [21] M. Brecht, H. Studier, A.F. Elli, F. Jelezko, R. Bittl, Assignment of red antenna states in photosystem I from *Thermosynechococcus elongatus* by single-molecule spectroscopy, *Biochemistry* 46 (2007) 799–806.
- [22] P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, M. Orrit, Ten years of single-molecule spectroscopy, *J. Phys. Chem. A* 104 (2000) 1–16.
- [23] C. Hofmann, T.J. Aartsma, H. Michel, J. Köhler, Direct observation of tiers in the energy landscape of a chromoprotein: a single-molecule study, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 15534–15538.
- [24] S. Krause, P.F. Aramendia, D. Tauber, C. von Borczyskowski, Freezing single molecule dynamics on interfaces and in polymers, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 1754–1761.
- [25] A.F. Elli, F. Jelezko, C. Tietz, H. Studier, M. Brecht, R. Bittl, J. Wrachtrup, Red pool chlorophylls of photosystem I of the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*: a single-molecule study, *Biochemistry* 45 (2006) 1454–1458.
- [26] F. Müh, A. Zouni, Micelle formation in the presence of photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 2298–2307.
- [27] M. Hussels, M. Brecht, Effect of glycerol and PVA on the conformation of photosystem I, *Biochemistry* 50 (2011) 3628–3637.
- [28] M. Brecht, H. Studier, V. Radics, J.B. Nieder, R. Bittl, Spectral diffusion induced by proton dynamics in pigment–protein complexes, *JACS* 130 (51) (2008) 17487–17493.
- [29] E. Schlodder, K. Falkenberg, M. Gergeleit, K. Brettel, Temperature dependence of forward and reverse electron transfer from A₁⁺, the reduced secondary electron acceptor in photosystem I, *Biochemistry* 37 (1998) 9466–9476.
- [30] L.O. Palsson, J.P. Dekker, E. Schlodder, R. Monshouwer, R. van Grondelle, Polarized site-selective fluorescence spectroscopy of the long-wavelength emitting chlorophylls in isolated photosystem I particles of *Synechococcus elongatus*, *Photosynth. Res.* 48 (1996) 239–246.
- [31] M. Byrdin, P. Jordan, N. Krauss, P. Fromme, D. Stehlik, E. Schlodder, Light harvesting in photosystem I: modeling based on the 2.5-Ångstrom structure of photosystem I from *Synechococcus elongatus*, *Biophys. J.* 83 (2002) 433–457.
- [32] E. Schlodder, V.V. Shubin, E. El-Mohsnawy, M. Rögner, N.V. Karapetyan, Steady-state and transient polarized absorption spectroscopy of photosystem I complexes from the cyanobacteria *Arthrospira platensis* and *Thermosynechococcus elongatus*, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1767 (6) (2007) 732–741.
- [33] R.N. Frese, M.A. Palacios, A. Azzizi, I.H.M. van Stokkum, J. Kruij, M. Rögner, N.V. Karapetyan, E. Schlodder, R. van Grondelle, J.P. Dekker, Electric field effects on red chlorophylls, beta-carotenes and P700 in cyanobacterial photosystem I complexes, *Biochim. Biophys. Acta* 1554 (2002) 180–191.
- [34] K. Colbow, Energy transfer in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 314 (1973) 320–327.
- [35] R.C. Jennings, G. Zucchelli, E. Engelmann, F.M. Garlaschi, The long-wavelength chlorophyll states of plant LHCl at room temperature: a comparison with PSI-LHCl, *Biophys. J.* 87 (2004) 488–497.
- [36] R. Croce, G. Zucchelli, F.M. Garlaschi, R.C. Jennings, A thermal broadening study of the antenna chlorophylls in PSI-200, LHCl, and PSI core, *Biochemistry* 37 (1998) 17355–17360.
- [37] M. Ratsep, T.W. Johnson, P.R. Chitnis, G.J. Small, The red-absorbing chlorophyll a antenna states of photosystem I: a hole-burning study of *Synechocystis* sp PCC 6803 and its mutants, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 836–847.
- [38] M. Brecht, V. Radics, J.B. Nieder, H. Studier, R. Bittl, Red antenna states of photosystem I from *Synechocystis* PCC 6803, *Biochemistry* 47 (2008) 5536–5543.
- [39] M. Brecht, J.B. Nieder, H. Studier, E. Schlodder, R. Bittl, Red antenna states of photosystem I from *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Photosynth. Res.* 95 (2008) 155–162.

Kapitel 7

Fluorescence of the various red antenna states in Photosystem I complexes from cyanobacteria is affected differently by the redox state of P700

In diesem Kapitel wird der Einfluss des Redoxzustandes des primären Elektronendonors P700 in PSI von unterschiedlichen Cyanobakterien auf die Fluoreszenzemission untersucht. Die Fluoreszenzemission von PSI wurde für PSI-Komplexe aus den Cyanobakterien *A. platensis* und *T. elongatus* jeweils in Trimer- und Monomer-Konfiguration mit oxidiertem und reduziertem P700 gemessen. Damit wurde gezeigt, dass für diese beiden Organismen die Fluoreszenzemission des energetisch tiefsten Emitters in Anwesenheit von oxidiertem P700 stark unterdrückt wird (Faktor ~ 10). Dagegen werden die höher liegenden Emitter nur wenig beeinflusst. Mit diesen Ergebnissen war es erstmals möglich diese Emitter und den Einfluss des Redoxzustandes von P700 an einzelnen PSI-Komplexen nachzuweisen.



Fluorescence of the various red antenna states in photosystem I complexes from cyanobacteria is affected differently by the redox state of P700

Eberhard Schlodder^a, Martin Hussels^c, Marianne Çetin^a, Navassard V. Karapetyan^b, Marc Brecht^{c,*}

^a Max-Volmer-Laboratorium für Biophysikalische Chemie, Technische Universität Berlin, Strasse des 17. Juni 135, 10623 Berlin, Germany

^b A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky Prospect, 33, 119071 Moscow, Russia

^c Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 May 2011

Received in revised form 27 June 2011

Accepted 29 June 2011

Available online 13 July 2011

Keywords:

Photosystem I

Fluorescence quenching

Single molecule spectroscopy

Long-wavelength antenna chlorophyll

Arthrospira platensis

Thermosynechococcus elongatus

ABSTRACT

Photosystem I of cyanobacteria contains different spectral pools of chlorophylls called red or long-wavelength chlorophylls that absorb at longer wavelengths than the primary electron donor P700. We measured the fluorescence spectra at the ensemble and the single-molecule level at low temperatures in the presence of oxidized and reduced P700. In accordance with the literature, it was observed that the fluorescence is quenched by P700⁺. However, the efficiency of the fluorescence quenching by oxidized P700⁺ was found to be extremely different for the various red states in PS I from different cyanobacteria. The emission of the longest-wavelength absorbing antenna state in PS I trimers from *Thermosynechococcus elongatus* (absorption maximum at 5 K: \approx 719 nm; emission maximum at 5 K: \approx 740 nm) was found to be strongly quenched by P700⁺ similar to the reddest state in PS I trimers from *Arthrospira platensis* emitting at 760 nm at 5 K. The fluorescence of these red states is diminished by more than a factor of 10 in the presence of oxidized P700. For the first time, the emission of the reddest states in *A. platensis* and *T. elongatus* has been monitored using single-molecule fluorescence techniques.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Photosystem I (PS I) is a pigment-protein complex located in the thylakoid membranes of cyanobacteria, algae and plants that mediates light-induced electron transfer from plastocyanin or cytochrome *c*₆ on the luminal side to ferredoxin on the stromal side (for a review see Refs. [1,2] and references therein). PS I of higher plants and algae (named PS I-200) consists of the PS I core complex and the peripheral light-harvesting complex LHC I. Cyanobacteria lacking LHC I contain only the PS I core. The PS I core complex coordinates all of the redox cofactors and the core antenna of \sim 100 chlorophyll *a* (Chl) and \sim 20 β -carotene molecules. The PS I core complexes in cyanobacteria are organized preferentially as trimers [3–5] whereas PS I in higher plants and algae is present only as a monomer [6].

A high resolution (2.5 Å) X-ray structure is available for trimeric PS I core complexes from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* [7], whereas for plant PS I a crystallographic model at 3.3 Å resolution has been reported [8]. The two large subunits, PsaA and PsaB, each consisting of 11 transmembrane helices, coordinate most of the antenna pigments and the following redox cofactors involved in the electron-transfer reactions: the primary electron donor P700 (a heterodimer of Chl *a* (eC-B1; P_B) and *a*' (eC-A1; P_A)) located on the luminal side (nomenclature of Ref. [8] is used for naming cofactors). Two branches of cofactors related by pseudo-C₂ symmetry connect P700 and the first [4Fe-4S] iron sulfur cluster F_X. Each branch is composed of two Chls (Acc-A (eC-B2) and A₀-A (eC-A3) in the A-branch and Acc-B (eC-A2) and A₀-B (eC-B3) in the B-branch) and one phylloquinone A₁ (Q_K-A and Q_K-B, respectively). The terminal electron acceptors F_A and F_B (two [4Fe-4S] iron-sulfur-clusters) are both coordinated by subunit PsaC, one of the three extrinsic subunits located on the stromal side.

After absorption of light by an antenna pigment, the excitation energy is efficiently trapped via charge separation in the reaction center leading to P700⁺A₀⁻. Charge stabilization is achieved by subsequent electron transfer to the secondary acceptor A₁, then further to F_X and finally to the terminal electron acceptors F_A and F_B. An interesting aspect of the electron transfer in PS I is the reported heterogeneity at low temperature [9,10]. In one fraction of the PS I complexes, an irreversible charge separation due to the stable formation of P700⁺F_A⁻ and P700⁺F_B⁻ takes place, whereas in the

Abbreviations: A₀, primary electron acceptor in PS I; A₁, secondary electron acceptor in PS I (a phylloquinone); AMPSO, N-(1,1-Dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropanesulfonic acid (pKa = 9.0); Chl *a*, chlorophyll *a*; Chl *a*', C-13 epimer of Chl *a*; Cxxx, Chl absorbing at xxx nm; CAPS, 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid (pKa = 10.4); β -DM, n-dodecyl- β -maltoside; FeS, iron-sulfur-cluster; F_X, F_A and F_B, three [4Fe-4S] clusters in PS I; Fxxx, fluorescence with an emission maximum at xxx nm; P700 (P700⁺), primary electron donor of PS I in the reduced (oxidized) state; PMS, phenazine methosulfate; PS I (PS II), photosystem I (photosystem II); Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine

* Corresponding author. Tel.: +49 7071 29 76239.

E-mail address: marc.brecht@uni-tuebingen.de (M. Brecht).

other fraction forward electron transfer to the terminal iron–sulfur-clusters is completely blocked at cryogenic temperatures [10]. In this fraction the charge separation is reversible at low temperature and can be attributed to the formation and decay of $P700^+A_1^-$ and $P700^+F_X^-$, respectively. Charge recombination of $P700^+A_1^-$ occurs almost independent of temperature with $t_{1/2} \sim 170 \mu\text{s}$ [10]. The charge recombination between F_X^- and $P700^+$ takes place in the ms time range at low temperature.

The function of the antenna is to harvest solar energy and to transfer this energy to the reaction center, where the excitation energy is converted into a charge separated state. One striking feature of the light-harvesting antenna of PS I is the presence of long-wavelength (also called red or low-energy) Chls (LWC) that absorb at energies lower than that of the primary electron donor P700 (for reviews see Refs. [11,12]). Higher plants contain their most-red Chls in the light-harvesting complex LHC I, which absorb around 716 nm and give rise to the emission around 735 nm at low temperature, whereas long-wavelength Chls in the PS I core of plants absorb around 705 nm and emit at 719 nm. In the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* absorption and emission of the reddest state are at ~ 701 nm and ~ 712 nm, respectively [13]. The occurrence of LWC in the core antenna, which absorb even further into the red, is unique to cyanobacteria. The content and the spectral characteristics of long-wavelength Chl *a* antenna states are species dependent. PS I trimers contain usually more red Chls than monomers (Ref. [12] and references therein). The 5 K absorption and linear dichroism spectra of PS I trimers of *T. elongatus* exhibit Chl *a* antenna states absorbing at 708 (C708) and 719 nm (C719) [14,15]. Hole-burning experiments indicate a third spectral form named C715 [16]. PS I trimers of *Synechocystis* sp. PCC 6803 contain red Chls peaking at 708 and 714 nm [17]. The most-red Chl *a* antenna state absorbing at 740 nm (C740) and emitting at 760 nm (F760) at low temperature is present in PS I trimers of *Arthrospira platensis* [18,19].

The function of the red Chls in photosynthesis may be different depending on their location in the antenna system and therefore on the distance between the red Chls and P700. At physiological temperatures, the quantum efficiency of photochemistry is virtually not affected by the long-wavelength Chls. Thermal energy of the surrounding enables efficient uphill energy transfer to bulk Chls and then to P700. Therefore the quantum yield of P700 oxidation is independent of the wavelength of the excitation, even at wavelengths of up to 760 nm [14]. At lower temperatures, however, the red Chls act as traps for excitations, thereby decreasing the quantum efficiency of charge separation and increasing the fluorescence yield [14,19]. It has been suggested that the extension of the spectral range for light harvesting to longer wavelengths increases the efficiency of the antenna system for the utilization of far-red light for photochemistry. This might be the result of the adaptation of the cyanobacteria to low light conditions [20,21]. Red Chls may also be involved in the protection of PS I complex against excess excitation light energy [12,22 and Refs. therein].

Remarkably, the fluorescence yield of PS I was found to be very similar in PS I with P700 in the reduced and oxidized state at room temperature [12,23] indicating that $P700^+$ quenches the fluorescence as efficiently as P700. $P700^+$ exhibits a broad, flat absorption band that extends into the far red beyond 800 nm [14,24] and provides spectral overlap with the emission bands of all antenna pigments, so that excitation energy transfer from the excited long-wavelength chlorophylls to $P700^+$ can occur by the inductive resonance mechanism (Förster transfer). The subsequent fast radiationless decay of ($P700^+$)* probably constitutes the quenching mechanism [23,25].

Quenching of fluorescence from long-wavelength Chls by $P700^+$ has also been observed at cryogenic temperatures. The intensity of the fluorescence at 760 nm (F760) in PS I trimers of *A. platensis* is highly dependent on the redox state of P700 at 77 K [19,27,28]. The

maximum F760 level was observed for PS I trimers if P700 was reduced [19]. The 760 nm fluorescence is diminished by more than a factor of 10 in the presence of oxidized P700 at cryogenic temperatures. In accordance with the difference in the low temperature yield of 760 nm fluorescence in PS I trimers with P700 and $P700^+$, respectively, the lifetime of the fluorescence decay at 760 nm was found to be significantly shorter in PS I trimers with P700 oxidized than that in PS I trimers with P700 reduced [28]. The Förster overlap integral between F760 and the absorption spectrum of $P700^+$ is sufficiently large (about $\sim 1/3$ of the overlap between two isoenergetic chlorophylls with a Stokes shift of 130 cm^{-1}) to explain the quenching by direct resonance energy transfer from the LWC to $P700^+$ [19]. From the decay rate of the fluorescence at 760 nm a distance between C740 and P700 of $\sim 27 \text{ \AA}$ has been estimated [19]. A decrease of the fluorescence from red Chl *a* antenna states by $P700^+$ formation was observed also for PS I trimers of *T. elongatus* at low temperature [23], but it is still an open question whether fluorescence of different red states is quenched with the same efficiency or not. At cryogenic temperatures it can be assumed that quenching by $P700^+$ is based on a direct energy transfer from the excited red states to $P700^+$ since uphill energy transfer from the low-energy Chls via bulk Chls to $P700^+$ is highly unlikely. In this case, the quenching efficiency will depend on (a) the distance between the individual red states and P700 and (b) the mutual orientation of the transition dipole moment of the low-energy exciton transition of the LWC aggregate with respect to that of $P700^+$ [29].

Because the long-wavelength chlorophylls dominate the emission spectra of PS I and because they have pronounced effects on energy transfer and trapping, the purpose of this paper is to measure fluorescence of PS I complexes from various cyanobacteria with oxidized and reduced P700. Thereby, we want to clarify whether the emission of the various red antenna states is affected differently by the redox state of P700. The positions of the most-red chlorophylls with respect to P700 are estimated and consequences of our results on single-molecule spectroscopy of PS I complexes are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of PS I complexes

Monomeric and trimeric PS I core complexes from *A. platensis* have been prepared as described before [19]. PS I trimers and monomers from *T. elongatus* have been prepared as described in [30,31].

2.2. Measurement of steady-state fluorescence spectra

Fluorescence spectra were recorded in a FluorMax 2 (Jobin Yvon) photon counting spectrofluorometer. The spectra were corrected for the spectral sensitivity based on the measurement of a calibrated light source.

For the measurements, PS I complexes were diluted to a final Chl concentration of about $5 \mu\text{M}$ with buffer (either buffer A, containing 20 mM tricine, pH 7.5, 25 mM MgCl_2 , and 0.02% (w/w) β -DM, or buffer B, containing 100 mM AMPSO or CAPS, pH 9.0–9.5, 20 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 , and 0.02% (w/w) β -DM) and glycerol (final concentration about 65% (v/v)), to obtain a transparent glass at low temperatures.

Measurements were carried out under three different redox conditions: (a) Samples with P700 in the oxidized state were prepared by the addition of 1 mM ferricyanide to oxidize P700 chemically or by freezing a sample without addition of redox mediators under illumination. In this case P700 is irreversibly oxidized by the light. The two ways of oxidizing P700 gave virtually the same results. (b) Samples with P700 in the reduced state were prepared by using buffer B (pH 9–9.5) and addition of 20 mM dithionite. In the presence of the strong reductant at basic pH values

(pH>9) the terminal iron–sulfur clusters F_A and F_B are chemically pre-reduced. The efficiency of pre-reduction can be enhanced by additional illumination during freezing. In the presence of pre-reduced terminal iron–sulfur cluster, light-induced electron transfer is limited to the formation and decay of $P700^+A_1^-$ or $P700^+F_X^-$, respectively. The charge recombination of $P700^+A_1^-$ occurs with a half-life of about 150 μ s, whereas $P700^+F_X^-$ decays in the ms time range [10]. Since the rate of charge separation induced by the excitation light in the spectrofluorometer is small compared to the decay rate of the charge separated states, P700 remains in the neutral (reduced) state during fluorescence measurements. (c) Samples frozen in the dark in the presence with 5 mM ascorbate and 5 μ M PMS contain all redox cofactors initially in the neutral ground state. However, the charge-separated states $P700^+F_A^-$ or $P700^+F_B^-$ are irreversibly formed in a fraction of the PS I complexes by the excitation light when recording the spectra, whereas in the other fraction forward electron transfer to the terminal iron–sulfur-clusters is completely blocked at cryogenic temperatures [9,10]. In the latter fraction the charge separation is reversible at low temperature and P700 is maintained in the reduced state. Therefore the sample contains a mixture of reduced and oxidized P700 during fluorescence measurements.

For low temperature measurements, the cuvette was placed in a variable temperature liquid nitrogen bath cryostat (Oxford DN1704) or an Oxford liquid helium flow cryostat (CF1204) and a home-built cryostat holder was used in the spectrofluorometer. Due to small variations in the position of the samples the reproducibility of the peak amplitudes for identical samples was about $\pm 10\%$.

2.3. Single-molecule fluorescence spectroscopy

Purified PS I trimers were at first diluted with buffer A or B and glycerol to a final Chl concentration of about 20 μ M. The concentration of detergent in the buffer was increased to 4 mM or 0.2% (w/w). This concentration was found to be adequate to avoid completely PS I aggregation. In further steps this PS I containing solution was diluted to a PS I trimer concentration of about 3 pM. Additionally, 20 mM dithionite was added to the sample diluted in buffer B to achieve pre-reduction of the terminal iron–sulfur clusters. The yield of pre-reduction was increased by additional illumination during sample preparation and mounting. Less than 1 μ l was placed between two cover slips assuring spatial separation of individual PS I trimers. To observe fluorescence emission of single molecules, a home-built confocal microscope was used. The experimental setup was described recently in Ref. [32]. For this work the setup was modified with a new tilted mirror system (PI) for beam-scanning, providing better signal-to-noise ratio. The sample and the microscope objective were immersed in superfluid He, with a sample temperature of 1.4 K. The excitation power measured directly behind the beam-scanning module was varied between 0.05 μ W and 100 μ W, and the excitation wavelength was 680 nm for all experiments.

3. Results and discussion

3.1. Photosystem I from *A. platensis*

Fig. 1 shows 77 K steady-state fluorescence spectra of isolated PS I trimers from *A. platensis* (former name *Spirulina platensis*) under different redox conditions (see Materials and methods). The excitation wavelength was 500 nm. Virtually identical fluorescence spectra were recorded at an excitation wavelength of 430 nm. The spectra are in agreement with those reported in the literature [26,27]. In the presence of reduced P700 (solid line) the emission maximum is observed at 760 nm. The emitter is most likely the LWC pool C740. A much weaker peak is located at 726 nm, which might be ascribed to

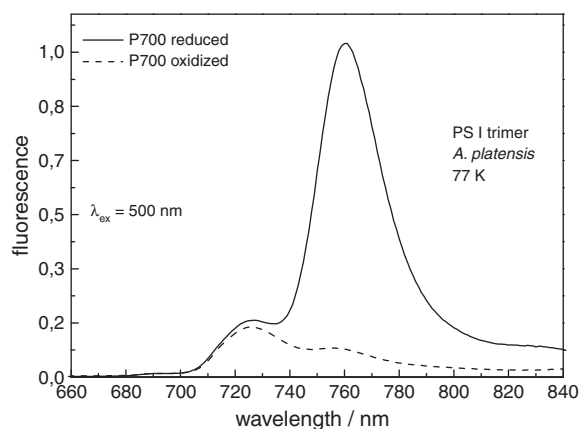


Fig. 1. 77 K fluorescence spectra of PS I trimers from *A. platensis* with P700 in the reduced (solid line) and oxidized (dashed line) state. The excitation wavelength was 500 nm.

the C708 pool. A minor fluorescence band is observed at about 690 nm which originates presumably from bulk chlorophylls.

In the presence of oxidized P700, the emission of the C740 pool is almost completely quenched and appears only as a shoulder of the 726 nm band (dashed line). The amplitude of the 726 nm peak is only slightly lower. The data confirm that oxidized P700 quenches effectively the emission of the C740 pool, whereas the emission of the C708 pool is not affected significantly [26,27].

The dipole strength of the 740 nm band in the 5 K absorption spectrum of PS I trimers corresponds to that of approximately three monomeric Chl molecules [19]. It is known that C740 arises upon trimerization of isolated monomeric PS I complexes [33] indicating that at least three Chls of each monomer are red-shifted due to structural reorganizations and/or to altered interactions induced by the trimerization. Therefore, a location of C740 close to the trimerization domain has been proposed [19,22,33]. To explain the quenching by direct resonance energy transfer from C740 to $P700^+$ the rate of energy transfer must be higher by at least a factor of 10 compared to the decay rate in the absence of energy transfer. This consideration leads to a time for energy transfer of approximately 100 ps. In PS I with oxidized P700 the decay kinetics of F760 has been reported to be dominated by a 107 ps component, whereas in samples with P700 reduced nanosecond decay components were observed predominantly [28]. Taking into account that the observed 107 ps lifetime originates from two competing processes - the intrinsic ns fluorescence decay as observed in centers with reduced P700 and direct quenching by $P700^+$ - a lifetime of about 115 ps results for the latter process. From this value a distance between C740 and P700 of ~ 28 Å has been estimated using Förster theory [19]. This distance is in reasonable agreement with the assumption that the involved Chls are located near the monomer–monomer interfaces [7,33].

PS I monomers from *A. platensis* contain only the LWC form with an absorption maximum around 708 nm. Accordingly, the 77 K fluorescence spectrum in the presence of reduced P700 (see Fig. 2, solid line) exhibits the main emission band at 727 nm and a minor fluorescence band at about 690 nm. The shoulder at longer wavelengths can be assigned to a vibronic sideband corresponding to the mirror image of the $Q_y(0 \rightarrow 1)$ absorption band of the LWC C708. With P700 in the oxidized form, the fluorescence intensity on the long-wavelength side of the main emission band is diminished (see Fig. 2, dashed line). Thereby, the maximum is shifted by 1 to 2 nm to the blue and the peak amplitude is slightly lower. The difference between both spectra (reduced – minus – oxidized) is given by the dotted line. The difference spectrum has its maximum at about 731 nm.

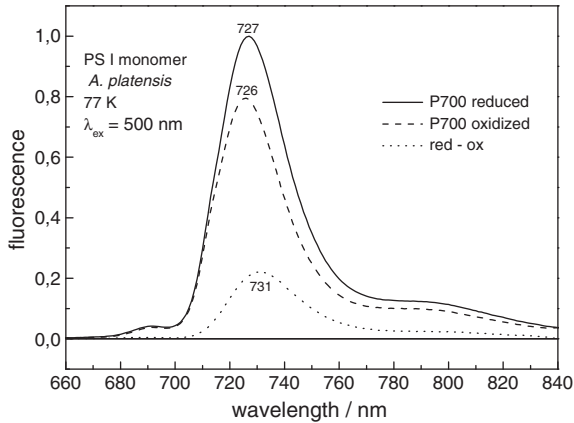


Fig. 2. 77 K fluorescence spectra of PS I monomers from *A. platensis* with P700 in the reduced (solid line) and oxidized (dashed line) state. The excitation wavelength was 500 nm. The dotted line represents the difference between both spectra.

The results show that the fluorescence intensity of the LWC contributing to the C708 pool is almost independent on the redox state of P700 except that of a slightly red-shifted emitter with an emission maximum around 731 nm. Candidates for LWC discussed in the literature are strongly coupled aggregates consisting of 2 to 3 chlorophylls [7,34]. It should be noted that more than one aggregate is required to explain the dipole strength of C708 which corresponds to the dipole strength of about 8 monomeric chlorophylls [12]. Thus different emitters contribute to the F727 band and give rise to the reported substantial inhomogeneous broadening [12 and Refs. therein].

3.2. Photosystem I from *T. elongatus*

The low temperature absorption spectra of trimeric PS I complexes of *T. elongatus* show long-wavelength absorption bands at about 708 nm and 719 nm with oscillator strengths corresponding to approximately five and four Chls, respectively [14,34]. More recently, it has been reported that PS I samples prepared by dissolving crystals of trimeric PS I complexes exhibit a much stronger absorption in the red antenna region [35]. To verify this result, we also measured the absorbance spectrum of freshly dissolved crystals of trimeric PS I complexes from *T. elongatus* at 295 K and 77 K. The spectra presented in Fig. 3 do not confirm the result of Riley et al. [35], but are virtually identical to our previously published spectra [14,34] and the estimated number of red pigments is also about the same. The reason for this discrepancy is not clear. A third LWC form with an absorption

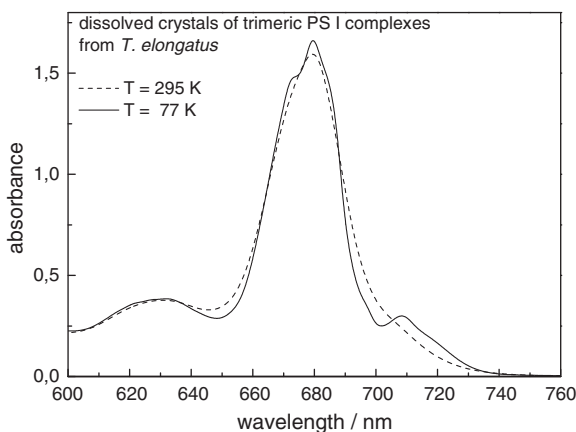


Fig. 3. Absorbance spectra of a sample with freshly dissolved crystals of trimeric PS I complexes at 295 K and 77 K.

maximum at 715 nm at low temperature has been suggested on the basis of hole-burning experiments [16]. This LWC form cannot be resolved as a separate band in the 5 K absorption spectrum due to strong overlap with the C719 absorption band. Whereas monomeric PS I complexes of *T. elongatus* contain about the same number of red Chls absorbing around 708 nm, the monomers have a lower number (2 instead of 4) of C719 chlorophylls. This means that at least two different strongly coupled aggregates contribute to the C719 pool: (a) one red antenna state that is present in both monomeric and trimeric complexes and (b) another one that emerges as a result of the trimerization [31]. The results presented below demonstrate that the fluorescence yield of the latter red state depends in a similar way on the redox state of P700 as shown above for the C740 pool in *A. platensis*.

Fig. 4 shows 77 K steady-state fluorescence spectra of isolated PS I monomers from *T. elongatus* under different redox conditions (see Materials and methods). The main emission band in the presence of reduced P700 (see Fig. 4, solid line) is located around 730 nm. As in monomeric PS I from *A. platensis*, there is a minor fluorescence band at about 690 nm and a shoulder at longer wavelengths that can be assigned to the mirror image of the $Q_Y(0 \rightarrow 1)$ absorption band of the LWC C708. In comparison to monomeric PS I from *A. platensis*, the position of the main band is shifted 3 nm to longer wavelengths. This is due to contributions from LWC C715 and/or C719 to the emission spectrum. These LWC are present in addition in PS I monomers from *T. elongatus*.

With P700 in the oxidized form, the fluorescence intensity on the long-wavelength side of the main emission band is decreased (see Fig. 4, dashed line). Thereby the maximum is shifted by 2 nm to the blue and the peak amplitude is somewhat lower. The difference between the two spectra (reduced – minus – oxidized) is given by the dotted line. The difference spectrum has its maximum at about 734 nm. Similar to monomeric PS I from *A. platensis* the total fluorescence intensity is only slightly affected by the redox state of P700 except that of this red-shifted emitter, which might be assigned to an aggregate from the C715 or C719 pool.

The situation is very different in PS I trimers from *T. elongatus*: the fluorescence intensity at low temperature was found to be strongly affected by the redox state of P700. Fig. 5 shows 77 K fluorescence spectra of PS I trimers from *T. elongatus* in the presence of reduced P700 (solid line) and oxidized P700 (dashed line). In the presence of oxidized P700 (dashed line) the fluorescence spectrum resembles that of PS I monomers from this organism (see Fig. 4). If P700 is reduced, the fluorescence emission maximum is shifted ~5 nm to the red and the total fluorescence intensity has increased by a factor of two. The reduced – minus – oxidized difference spectrum (dotted

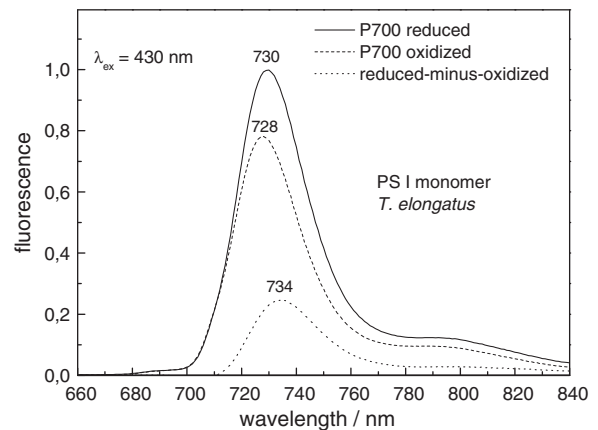


Fig. 4. 77 K fluorescence spectra of PS I monomers from *T. elongatus* with P700 in the reduced (solid line) and oxidized (dashed line) state. The excitation wavelength was 430 nm. The dotted line represents the difference between both spectra.

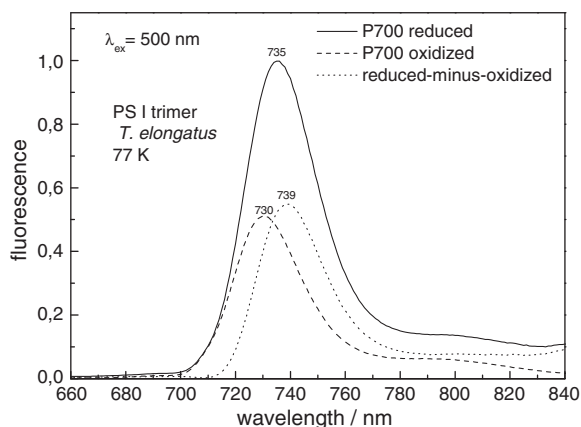


Fig. 5. 77 K fluorescence spectra of PS I trimers from *T. elongatus* with P700 in the reduced (solid line) and oxidized (dashed line) state. The excitation wavelength was 500 nm. The dotted line represents the difference between both spectra.

line) has its maximum at about 739 nm. The corresponding emitter is most likely the red state that emerges as a result of the trimerization, because this effect is not observed in PS I monomers. The PS I trimers contain this C719 long-wavelength chlorophylls additionally to those observed in monomers. In the available structural model of trimeric PS I from *T. elongatus*, the strongly coupled aggregate (A31–A32–B7 (the nomenclature of Jordan et al. [7] is used for naming chlorophylls)) is probably the best candidate for this red state. The excitonically coupled chlorophylls A31–A32–B7 are located on the luminal side close to the trimerization domain (see Fig. 6 for the chlorophyll arrangement in PS I). The transition dipole of the low-energy exciton transition is oriented almost parallel to the membrane plane matching the reported linear dichroism of trimeric PS I at 5 K in the wavelength range between 715 nm and 730 nm [15]. The energy transfer time to P700⁺ has been estimated to be approximately 110 ps [15,29] in rough agreement with spectroscopic studies. In the case of reduced P700, time-resolved fluorescence measurements reveal a decay component with a lifetime of a few nanoseconds [23,29]. Its decay-associated spectrum peaks at 745 nm at 5 K [22,28]. The lifetime decreases to a few 100 ps in the presence of P700⁺ [29, Meyer, J., Schmitt, F.J. and Schlodder, E., unpublished results] due to the efficient quenching of the emission from this red state by oxidized

P700. The similarities between this red state and C740 in trimeric PS I from *A. platensis* indicates the same structural organization or even a structural identity of the reddest antenna state in both organisms. The reason, why the absorption of the aggregate in *A. platensis* is shifted about 20 nm further to the red, remains to be clarified. The chlorophyll trimer B31–B32–B33 has often been proposed as another candidate for the C719 LWC. B31, B32 and B33 are among the most strongly coupled chlorophylls [36] and were assigned to C719 on the basis of modeling of time-resolved fluorescence data [34]. Apparently, the trimer cannot be assigned to the reddest state because of the large distance to P700 (about 50 Å). This would not be consistent with the efficient quenching of the emission by oxidized P700. It is however possible that this Chl trimer is identical with the C719 aggregate that exists in both monomeric and trimeric PS I complexes.

Interestingly, the fluorescence intensity of monomeric PS I complexes (see Figs. 2 and 4) is only slightly affected by the redox state of P700. This means that the emission of nearly all LWC is not quenched strongly by oxidized P700 except one LWC aggregate emitting around 732 nm (see Figs. 2 and 4). This indicates a large distance of nearly all LWC to P700 and to a location at the periphery of the PS I complex. Among others: B37–B38, A38–A39, B18–B19, A16–A17–A25 (see Fig. 6) are potential candidates which meet the necessary conditions: (a) strong coupling between the chlorophylls of the aggregate (see Table 3 in Ref. 33), (b) orientation of the transition dipole of the low-energy exciton state parallel to the membrane plane [15] and (c) large distance to P700 [7]. These aggregates might be responsible for C708. For B24–B25 and A26–A27, a short energy-transfer time to P700⁺ can be expected. These dimers might be involved in C715 with an emission around 734 nm that was found to be quenched by P700⁺ (see Fig. 4).

The strong influence of the reddest antenna state on the emission spectrum of trimeric PS I from *T. elongatus* is illustrated in Fig. 7. It shows fluorescence spectra measured under different redox conditions at 5 K and normalized to the respective peak maximum. With P700 in the oxidized state, the fluorescence spectrum (dashed curve) peaks at 732 nm. In the presence of reduced P700, the emission maximum at 5 K is red-shifted to 741 nm (solid curve). This red shift is due to the fact that under these conditions, the reddest antenna state contributes strongly to the fluorescence, since its emission is not quenched in the presence of reduced P700. In addition, the contribution of the long-wavelength chlorophylls, which emit at 734 nm, is larger (see Fig. 4). In the literature [12 and Refs. therein]

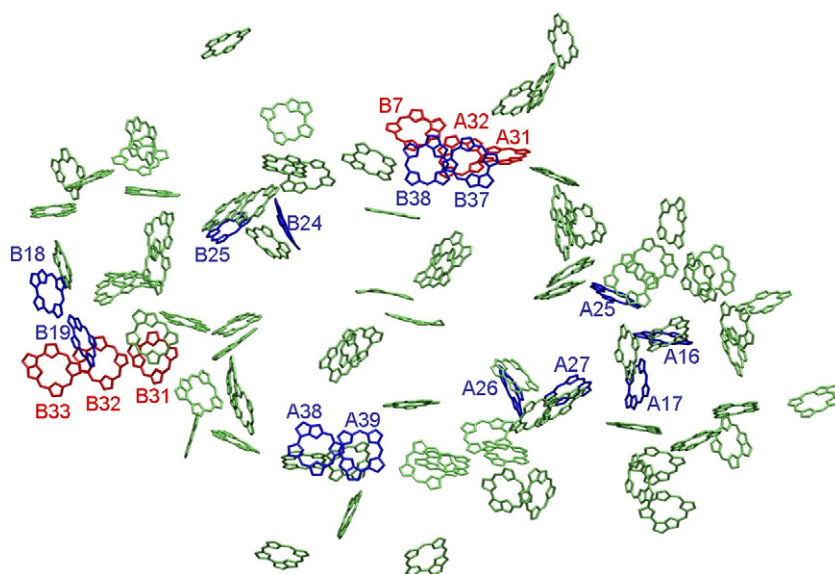


Fig. 6. Arrangement of the chlorophylls in photosystem I. The figure is produced from Protein Data Bank file 1JB0 [7] using the graphics program VMD [38].

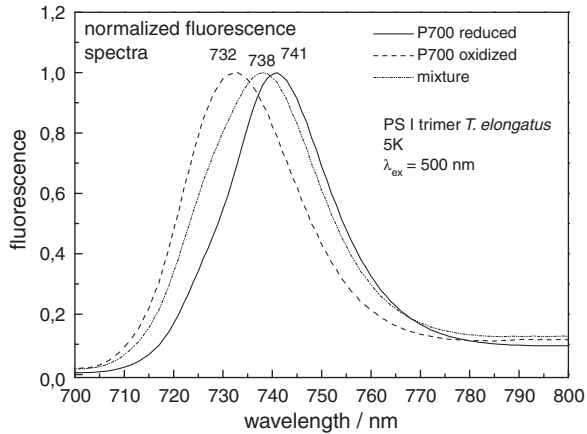


Fig. 7. 5 K fluorescence spectra of PS I trimers from *T. elongatus* with P700 in the reduced (solid line) and oxidized (dashed line) state. The spectra are normalized to their respective peak maximum. The excitation wavelength was 500 nm. The dash-dotted line shows the fluorescence spectrum of a trimeric PS I sample that was frozen in the presence of 5 mM ascorbate and 5 μ M PMS in the dark. These samples contain a mixture of reduced and oxidized P700 during fluorescence measurements (see [Materials and methods](#)).

the fluorescence maximum of trimeric PS I from *T. elongatus* is reported to be located at 732 nm indicating that most of the low temperature fluorescence studies have been performed using PS I with P700 in the oxidized state.

For samples with a mixture of reduced and oxidized P700, the fluorescence spectrum peaks at 738 nm (see [Fig. 7](#), dotted line). These samples containing ascorbate and PMS (which keeps both P700 and the acceptors in the neutral state) have been frozen in the dark. Under these conditions P700 is initially completely reduced. Illumination of such a sample at low temperature will lead to the irreversibly formed radical pair $P700^+F_{A/B}^-$ in a fraction ($\sim 50\%$ at 5 K [10]) of the photosystems, whereas in the other fraction charge recombination maintains P700 in the reduced state (see [Materials and methods](#)). Thus, it is possible to prepare samples containing a mixture of reduced and oxidized P700 due to light-induced oxidation of P700 prerduced by ascorbate at 77 K.

3.3. Single-molecule spectroscopy (SMS)

The first single-molecule spectra of PS I at cryogenic temperature have been reported by Jelezko et al. [37]. SMS offers the possibility to obtain more detailed information about the spectral characteristics of the antenna states. SMS enables the observation of the emission of single photosystems [32]. As a consequence, spectral features that are characteristic of single molecules can be revealed. At low temperatures, these are a narrow zero-phonon line (ZPL) and a broad phonon wing. The ZPL belongs to an electronic transition between the lowest-lying energy levels in the ground and excited state. The phonon wing on the low-energy side of the ZPL is related to transitions from the ground vibrational state of the excited electronic state to higher-lying vibrational levels of the electronic ground-state due to the interaction of the chromophore with its surrounding (electron-phonon coupling). SMS experiments using PS I complexes from cyanobacteria show sharp emission lines at 705–715 nm assigned to ZPLs from C708 and a broad emission band centered around 725–730 nm [32,35]. It has been proposed that the longer-wavelength antenna states are characterized by increased electron-phonon coupling and strong spectral diffusion. The rates of the spectral diffusion process are much higher than the actual acquisition rate and the wavelength range covered by these lines is in the range of more than 10 nm [32,37].

To detect the weak fluorescence of single molecules (photosystems) high excitation laser intensities of about 100 μ W at 680 nm are

often used, yielding an excitation intensity in the focus on the order of $6 \cdot 10^2$ W/cm² [32]. This corresponds to a photon flux of about $6.8 \cdot 10^{20}$ photons/(cm²·s). Because of the very large photon flux P700 is kept in the oxidized state. At low temperature, the highest rate for the recovery of the ground state of P700 is achieved in centers with prerduced iron-sulfur cluster F_A and F_B . Under these conditions the radical pair $P700^+A_1^-$ is formed which decays by charge recombination of $P700^+A_1^-$ with a half-life of 170 μ s [10] corresponding to a rate $k_d = 4.1 \cdot 10^3$ s⁻¹. The lifetime of the primary radical pair $P700^+A_0^-$ would be shorter (~ 50 ns) but it decays dominantly in the triplet state 3P700 , which decays by intersystem crossing to the singlet ground state with a significantly longer half-life of about 1 ms at low temperature. The rate of formation of $P700^+A_1^-$ is $k_{cs} = \sigma \cdot \Phi \cdot I$, where σ is the absorption cross section at 680 nm ($\sim 2 \cdot 10^{-14}$ cm²), Φ is the quantum yield of charge separation at low temperature ($\sim 50\%$ [10]) and I is the photon flux. The fraction of centers in the ground state $P700A_1$ is then given by:

$$\frac{P700A_1}{P700A_1 + P700^+A_1^-} = \frac{k_d}{\sigma \cdot \Phi \cdot I + k_d} \quad \text{with } k_d = \frac{\ln 2}{170 \mu\text{s}}$$

At a photon flux of $6.8 \cdot 10^{20}$ photons/(cm²·s) it follows that this fraction is $6.0 \cdot 10^{-4}$. That means P700 is completely in the oxidized state under these experimental conditions and fluorescence of the reddest long-wavelength chlorophylls would escape detection because their emission is largely quenched by $P700^+$. A reduction of the excitation power by a factor of about 1000 would be necessary to have at least about 40% of P700 in the neutral state.

[Fig. 8](#) shows single-molecule fluorescence emission spectra of one trimeric PS I complex from *A. platensis* at 1.4 K. The laser intensity was varied during the experiment between 100 μ W and 0.05 μ W, corresponding to an excitation intensity in the focus in the order of

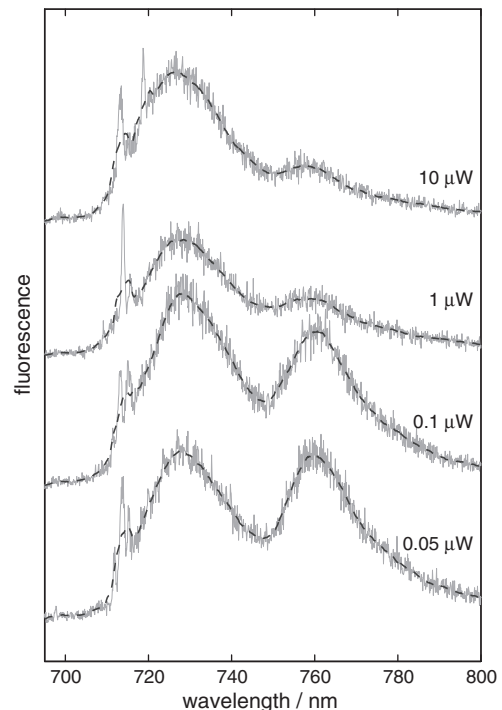


Fig. 8. Single-molecule fluorescence spectra of one trimeric PS I complex from *A. platensis*. 20 mM dithionite was added to the sample diluted in a buffer B (pH 9–9.5). The pre-illuminated sample has been frozen to 1.4 K; excitation wavelength was 680 nm. The excitation power was varied between 10 μ W (top trace) and 0.05 μ W (bottom trace). The accumulation time was chosen in each case so that a sufficient signal/noise ratio was achieved (5 s–10 min). Original data (solid curve), data smoothed by a moving average filter (dashed curve).

$6 \cdot 10^1 \text{ W/cm}^2$ to 0.3 W/cm^2 . The accumulation time was chosen in each case so that a sufficient signal-to-noise ratio was achieved.

20 mM dithionite was added to the sample diluted in buffer B (pH 9–9.5). The sample has been frozen under illumination to 1.4 K. This treatment leads to chemical prerelaxation of the terminal iron–sulfur clusters so that light-induced electron transfer is restricted to the formation and decay of the secondary radical pair $\text{P700}^+\text{A}_1^-$. At an excitation power of $100 \mu\text{W}$ (not shown), $10 \mu\text{W}$ and even $1 \mu\text{W}$ the emission of the C740 pool is almost completely quenched and appears only as a shoulder of the broad emission band around 727 nm band (see Fig. 8). If the excitation power is further decreased to $0.1 \mu\text{W}$ and $0.05 \mu\text{W}$, the emission of C740 becomes visible as a separate broad band. ZPLs are observed only in the region around 715 nm. Strong electron–phonon coupling and ZPL dynamics [32,37] are most likely the reasons that emission bands at 727 nm and 760 nm are broad and unstructured. Spectral jumps of ZPLs on a time scale much shorter than the acquisition time would lead to an increase of the line-width of ZPLs at first and then after prolonged averaging to the complete loss. The single-molecule fluorescence spectra of one trimeric PS I complex from *A. platensis* monitored with an excitation power $\geq 1 \mu\text{W}$ resemble the bulk emission spectrum in the presence of oxidized P700 (see Fig. 1, dashed line) except for the ZPLs. Below $1 \mu\text{W}$ the amplitude of the F760 band is growing. At $0.05 \mu\text{W}$ the F760/F726 ratio is about one. This indicates that a fraction of P700 is in the reduced state in accordance with our estimation above. If P700 is completely reduced, the F760/F726 ratio is about ten (see Fig. 1, solid line). A further reduction of the excitation power was, however, not possible for experimental reasons and because of the significantly decreasing signal-to-noise-ratio.

Single-molecule fluorescence spectra in dependence of the excitation power were also recorded for trimeric PS I complexes from *T. elongatus* (see Fig. 9). For an excitation power of $\geq 10 \mu\text{W}$ the maximum of the unstructured broad emission band is located at 732 nm which is typical for PS I with oxidized P700 (see Fig. 5, dashed line). If the excitation power is reduced to $0.1 \mu\text{W}$, the maximum shifts to the red up to 739 nm. Bulk emission spectra of a sample with a mixture of reduced and oxidized P700 show at 5 K the maximum at this wavelength (see Fig. 7 dotted line). The result suggests that a mixture of reduced and oxidized P700 is present at an excitation power of $0.1 \mu\text{W}$. Consistently the emission of the reddest antenna state starts to contribute to the fluorescence spectrum leading to the observed red shift of the maximum from 732 to 739 nm.

The correlation between the content of oxidized P700 and the extent of fluorescence quenching contradicts the photochemical

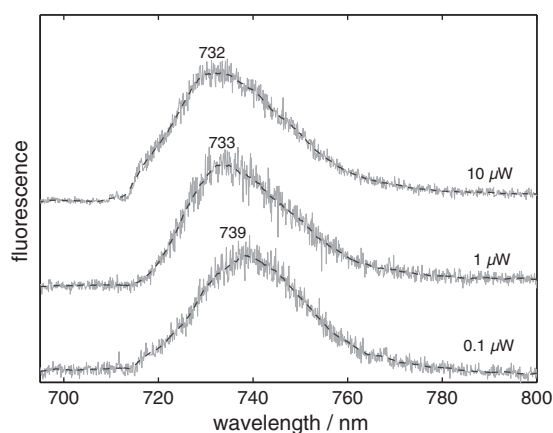


Fig. 9. Single-molecule fluorescence spectra of trimeric PS I complexes from *T. elongatus*. Spectra were recorded at 1.4 K; excitation was at 680 nm. The excitation power was varied between $10 \mu\text{W}$ (top trace) and $0.1 \mu\text{W}$ (bottom trace). The accumulation time was chosen in each case so that a sufficient signal/noise ratio was achieved (30 s–20 min). Original data (solid curve), data smoothed by a moving average filter (dashed curve).

quenching mechanism that was proposed recently [39] in order to explain that the fluorescence yield in PS I with reduced and oxidized P700 is almost the same at room temperature. In this hypothesis, it was assumed that the primary electron donor is rather the accessory chlorophyll than P700. If so, photochemistry can occur regardless of whether P700 is reduced or oxidized. If the initial charge separation forming Acc^+A_1^- in the presence of P700^+ is followed by a fast radiationless charge recombination, the quenching of the excited state would be the same but no stable photoproduct would be detectable. As a consequence of this mechanism, the fluorescence quenching would be the same regardless of the redox state of P700. At low temperature, however, PS I with oxidized P700 (also named closed PS I) quenches the fluorescence significantly better than PS I with reduced P700 (also named open PS I) (see Figs. 2 and 5). Especially fluorescence from the reddest long-wavelength Chls is strongly quenched by P700^+ at cryogenic temperatures. Since uphill energy transfer is unlikely at low temperatures, the most likely explanation for the observed quenching is that described in the Introduction. Excitation energy is transferred from the excited long-wavelength chlorophylls to P700^+ by the inductive resonance mechanism (Förster transfer) followed by the radiationless decay of $(\text{P700}^+)^*$ [23,25].

The absorption of the oxidized donor P700^+ resembles most likely that of Chl a^+ in organic solvents [40,41], which exhibits a broad and almost constant absorption between 500 nm and 850 nm. The broad absorption of the cation P700^+ provides about the same spectral overlap (about $\sim 1/3$ of the overlap between two isoenergetic chlorophylls with a Stokes shift of 130 cm^{-1}) with the emission bands of all the core-antenna pigments, so that P700^+ can effectively act as an excitation energy acceptor for bulk and long-wavelength Chls. The excitation in the antenna is removed by the decay of $(\text{P700}^+)^*$ which is expected to be extremely fast. Therefore, the distance between P700^+ and the LWC and the mutual orientation of the transition dipoles determine the rate and efficiency of the quenching. At low temperature, the LWC act as traps for the excitation. Our data indicate that most of the LWC are localized at the periphery of the PS I complex and only the reddest antenna states seem to be close enough for an efficient quenching.

At room temperature, the described quenching mechanism should also be effective. The excited state is, however, more extensively distributed between all antenna chlorophylls, because thermal energy is sufficient to enable uphill energy transfer from LWC to bulk chlorophylls. During their migration through the antenna all excitations will come close enough to reaction center to be quenched efficiently by P700^+ . Therefore, the quenching by P700^+ is sufficient to explain the fast fluorescence decay within about 30 ps in closed PS I.

To explain the surprisingly small difference between the fluorescence quenching efficiency of P700 (photochemical quenching via charge separation) and P700^+ at room temperature, various possibilities have been considered in the literature (see e.g. [23]). If, however, there would be additional photochemical quenching in the presence of P700^+ via charge separation starting from the excited accessory Chls similar to the photochemical quenching in the presence of P700, the fluorescence decay in closed PS I (P700 oxidized) should be significantly faster than that in open PS I (P700 reduced). The faster decay would result from two efficient quenching mechanisms which would be effective in the case of oxidized P700^+ . Therefore, additional photochemical quenching in the presence of P700^+ seems to be unlikely.

Our data do not allow conclusions regarding the mechanism of the primary charge separation in open PS I (P700 reduced), but we would like to note that photochemistry starts most likely from the lowest excitonic state of the reaction center. Especially at low temperatures, this must be the case, because only the lowest excited state of the reaction center chlorophylls state is populated according to Boltzmann. Therefore, the proposal in which the initial charge separation starts from the excited accessory Chl in one or both branches,

Acc-A and/or Acc-B [42], are based on the assumption that the accessory Chls contribute significantly to the lowest excitonic state, that drives the initial charge separation. The problem with this assumption is that steady-state and transient polarized absorption spectroscopy of PS I yields evidence that the lowest excitonic state of the reaction center is dominated by P700. This is in agreement with the exciton calculations [43,34]. On the other hand, a certain contribution of the accessory chlorophylls to the lowest exciton state cannot be ruled out. Additionally, the situation might be different at room temperature, because higher exciton states will be populated thermally.

4. Conclusions

This work demonstrates for the first time the emission of the reddest antenna state for single PS I complexes. Assignments of LWC aggregates to emission bands in previously published work must be re-made since the emission of the reddest antenna state escaped detection due the strong quenching by P700⁺. The data presented in this work indicate a simple rule. The emission band of the LWC is red-shifted by about 20 nm relative to the Q_Y absorption band.

The efficient fluorescence quenching, which is observed for the reddest antenna states, may represent a protective mechanism with physiological relevance [12,23]. Excess energy in the antenna will be efficiently dissipated because of the quenching by P700⁺, which is present under high light conditions. Thereby, the formation of triplet states in the antenna and subsequently the formation of harmful singlet oxygen are avoided.

Acknowledgements

The measurements at the single-molecule level were carried out in the laboratory of Prof. Robert Bittl (Free University Berlin); his continuous support is gratefully acknowledged. Financial support from the German Research Council, DFG (SFB 498, TP A6, E.S.) and (BR 4102/1-1 and BR 4102/2-1), the Russian Academy of Sciences, program MCB and RFBR (Grant 11-04-00247a, to N.V.K.) is gratefully acknowledged.

References

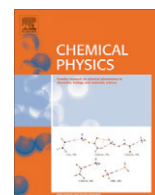
- [1] K. Brettel, Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1318 (1997) 322–373.
- [2] Photosystem I: The Light-driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase, vol. 24, *Advances in Photosynthesis and Respiration*, in: J.H. Golbeck (Ed.), Springer, 2006.
- [3] E.J. Boekema, J.P. Dekker, M.G. van Heel, M. Rögner, W. Saenger, I. Witt, H.T. Witt, Evidence for a trimeric organization of the photosystem I complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp., *FEBS Lett.* 217 (1987) 283–286.
- [4] V.V. Shubin, V.L. Tsuprun, I.N. Bezsmertnaya, N.V. Karapetyan, Trimeric forms of the photosystem I reaction center complex pre-exist in the membranes of the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *FEBS Lett.* 334 (1993) 79–82.
- [5] J. Kruij, D. Bald, E.J. Boekema, M. Rögner, Evidence for the existence of trimeric and monomeric photosystem I complexes in thylakoid membranes from cyanobacteria, *Photosynth. Res.* 40 (1994) 279–286.
- [6] E.J. Boekema, P.E. Jensen, E. Schlodder, J.F.L. van Breemen, H. van Roon, H.V. Scheller, J.P. Dekker, Green plant photosystem I binds light-harvesting complex I on one side of the complex, *Biochemistry* 40 (2001) 1029–1036.
- [7] P. Jordan, P. Fromme, H.T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature* 411 (2001) 909–917.
- [8] A. Amunts, H. Toporik, A. Borovikova, N. Nelson, Structure determination and improved model of plant photosystem I, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 3478–3486.
- [9] P. Setif, P. Mathis, T. Vänngård, Photosystem I photochemistry at low temperature—heterogeneity in pathways for electron transfer to the secondary acceptors and for recombination processes, *Biochim. Biophys. Acta* 767 (1984) 404–414.
- [10] E. Schlodder, K. Falkenberg, M. Gergeleit, K. Brettel, Temperature dependence of forward and reverse electron transfer from A₁⁺, the reduced secondary electron acceptor in photosystem I, *Biochemistry* 37 (1998) 9466–9476.
- [11] B. Gobets, R. van Grondelle, Energy transfer and trapping in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1507 (2001) 80–99.
- [12] N.V. Karapetyan, E. Schlodder, R. van Grondelle, J.P. Dekker, The Photosystem I Long Wavelength Chlorophylls, in: J.H. Golbeck (Ed.), *Photosystem I: The Light-driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase*, 24, Springer, Dordrecht, 2006, pp. 177–192.
- [13] K. Gibasiewicz, A. Szrajner, J.A. Ihalainen, M. Germano, J.P. Dekker, R. van Grondelle, Characterization of low-energy chlorophylls in the PSI-LHCI super-complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. A site-selective fluorescence study, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 21180–21186.
- [14] L.-O. Pålsson, C. Flemming, B. Gobets, R. van Grondelle, J.P. Dekker, E. Schlodder, Energy transfer and charge separation in photosystem I: P700 oxidation upon selective excitation of the long-wavelength antenna chlorophylls of *Synechococcus elongatus*, *Biophys. J.* 74 (1998) 2611–2622.
- [15] E. Schlodder, V.V. Shubin, E. El-Mohsnawy, M. Rögner, N.V. Karapetyan, Steady-state and transient polarized absorption spectroscopy of photosystem I complexes from the cyanobacteria *Arthrospira platensis* and *Thermosynechococcus elongatus*, *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007) 732–741.
- [16] V. Zazubovich, S. Matsuzaki, T.W. Johnson, J.M. Hayes, P.R. Chitnis, G.J. Small, Red antenna states of photosystem I from cyanobacterium *Synechococcus elongatus*: a spectral hole-burning study, *Chem. Physics* 275 (2002) 47–59.
- [17] B. Gobets, I.H.M. van Stokkum, M. Rögner, J. Kruij, E. Schlodder, N.V. Karapetyan, J.P. Dekker, R. van Grondelle, Time-resolved fluorescence emission measurements of photosystem I particles of various cyanobacteria: a unified compartmental model, *Biophys. J.* 81 (2001) 407–424.
- [18] V.V. Shubin, S.D.S. Murthy, N.V. Karapetyan, P. Mohanty, Origin of the 77 K variable fluorescence at 758 nm in the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biochim. Biophys. Acta* 1060 (1991) 28–36.
- [19] E. Schlodder, M. Cetin, M. Byrdin, I.V. Terekhova, N.V. Karapetyan, Karapetyan, P700⁺- and ³P700-induced quenching of the fluorescence at 760 nm in trimeric photosystem I complexes from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*, *Biochim. Biophys. Acta* 1706 (2005) 53–67.
- [20] H.-W. Trissl, Long-wavelength absorbing antenna pigments and heterogeneous absorption bands concentrate excitons and increase absorption cross-section, *Photosynth. Res.* 35 (1993) 247–263.
- [21] V.V. Shubin, I.N. Bezsmertnaya, N.V. Karapetyan, Efficient energy transfer from the long-wavelength antenna chlorophylls to P700 in photosystem I complexes from *Spirulina platensis*, *J. Photochem. Photobiol. B* 30 (1992) 153–160.
- [22] N.V. Karapetyan, Protective dissipation of excess absorbed energy by photosynthetic apparatus of cyanobacteria: role of antenna terminal emitters, *Photosynth. Res.* 97 (2008) 195–204.
- [23] M. Byrdin, I. Rimke, E. Schlodder, D. Stehlik, T.A. Roelofs, Decay kinetics and quantum yields of fluorescence in photosystem I from *Synechococcus elongatus* with P700 reduced and oxidized state: are the kinetics of excited state decay trap-limited or transfer-limited? *Biophys. J.* 79 (2000) 992–1007.
- [24] T. Hiyama, B. Ke, Difference spectra and extinction coefficients of P700, *Biochim. Biophys. Acta* 267 (1972) 160–171.
- [25] H.-W. Trissl, Determination of the quenching efficiency of the oxidized primary donor of Photosystem I, P700⁺: implications for the trapping mechanism, *Photosynth. Res.* 54 (1997) 237–240.
- [26] V.V. Shubin, I.N. Bezsmertnaya, N.V. Karapetyan, Isolation from *Spirulina* membranes of two photosystem I-type complexes, one of which contains chlorophyll responsible for the 77 K fluorescence band at 760 nm, *FEBS Lett.* 309 (1992) 340–342.
- [27] N.V. Karapetyan, D. Dorra, G. Schweitzer, I.N. Bezsmertnaya, A.R. Holzwarth, Fluorescence spectroscopy of the longwave chlorophylls in trimeric and monomeric photosystem I core complexes from the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biochemistry* 36 (1997) 13830–13837.
- [28] D. Dorra (1998) Funktionelle Organisation des Photosystems I: Picosekunden-aufgelöste Fluoreszenzuntersuchungen, Thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [29] Y. Shibata, A. Yamagishi, S. Kawamoto, T. Noji, S. Itoh, Kinetically distinct three red chlorophylls in photosystem I of *Thermosynechococcus elongatus* revealed by femtosecond time-resolved fluorescence spectroscopy at 15 K, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 2954–2963.
- [30] P. Fromme, H.T. Witt, Improved isolation and crystallization of photosystem I for structural analysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1365 (1998) 175–184.
- [31] E. El-Mohsnawy, M.J. Kopczak, E. Schlodder, M. Nowaczyk, H.E. Meyer, B. Warscheid, N.V. Karapetyan, M. Rögner, Structure and function of intact photosystem I monomers from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*, *Biochemistry* 49 (2010) 4740–4751.
- [32] M. Brecht, H. Studier, A.F. Elli, F. Jelezko, R. Bittl, Assignment of red antenna states in photosystem I from *Thermosynechococcus elongatus* by single-molecule spectroscopy, *Biochemistry* 46 (2007) 799–806.
- [33] J. Kruij, N.V. Karapetyan, I.V. Terekhova, M. Rögner, *In vitro* oligomerisation of a membrane protein complex: liposome based reconstitution of trimeric photosystem I from isolated monomers, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 18181–18188.
- [34] M. Byrdin, P. Jordan, N. Krauss, P. Fromme, D. Stehlik, E. Schlodder, Light harvesting in photosystem I: modeling based on the 2.5-Å structure of photosystem I from *Synechococcus elongatus*, *Biophys. J.* 83 (2002) 433–457.
- [35] K.J. Riley, T. Reinot, R. Jankowiak, P. Fromme, V. Zazubovich, Red antenna states of photosystem I from cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 and *Thermosynechococcus elongatus*: single-complex spectroscopy and spectral hole-burning study, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 286–292.
- [36] B. Gobets, I.H.M. van Stokkum, F. van Mourik, J.P. Dekker, R. van Grondelle, Excitation wavelength dependence of the fluorescence kinetics in photosystem I particles from *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus elongatus*, *Biophys. J.* 85 (2003) 3883–3898.

- [37] F. Jelezko, C. Tietz, U. Gerken, J. Wrachtrup, R. Bittl, Single-molecule spectroscopy on photosystem I pigment-protein complexes, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 8093–8096.
- [38] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38.
- [39] W. Giera, V.M. Ramesh, A.N. Webber, I. van Stokkum, R. van Grondelle, K. Gibasiewicz, Effect of the P700 pre-oxidation and point mutations near A_0 on the reversibility of the primary charge separation in Photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 106–112.
- [40] M.S. Davis, A. Forman, J. Fajer, Ligated chlorophyll cation radicals: their function in photosystem II of plant photosynthesis, *PNAS* 76 (1979) 4170–4174.
- [41] J.P. Chauvet, R. Viovy, R. Santus, E.J. Land, One-electron oxidation of photosynthetic pigments in micelles. Bacteriochlorophyll *a*, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and pheophytin *a*, *J. Phys. Chem.* 85 (1981) 3449–3456.
- [42] M.G. Mueller, J. Niklas, W. Lubitz, A.R. Holzwarth, Ultrafast transient absorption studies on photosystem I reaction centers from *Chlamydomonas reinhardtii*. 1. A new interpretation of the energy trapping and early electron transfer steps in photosystem I, *Biochem. J.* (2003) 3899–3922.
- [43] K. Gibasiewicz, V.M. Ramesh, S. Lin, K. Redding, N.W. Woodbury, A.N. Webber, Excitonic interactions in wild-type and mutant PSI reaction centers, *Biophys. J.* 85 (2003) 2547–2559.

Kapitel 8

Plasmonic interactions of Photosystem I with Fischer patterns made of Gold and Silver

In diesem Kapitel wird der Einfluss der plasmonischen Wechselwirkung hexagonal angeordneter Nanodreiecke (~ 120 nm Kantenlänge) aus Gold und Silber auf die Fluoreszenzemission einzelner PSI-Komplexe untersucht. Die Wechselwirkung führte dabei zu einer Verstärkung der Fluoreszenzemission, wobei die Verstärkung von der Wellenlänge abhängt. Durch die plasmonische Wechselwirkung wurden insbesondere Emitter verstärkt, die energetisch nah am primären Elektronendonator P700 liegen und unter Normalbedingungen keine oder wenig Fluoreszenz zeigen. Dies zeigt eine Störung des Energietransfers innerhalb der PSI-Komplexe, die zu einer verringerten Transfereffizienz führt und so als Veränderung der Proteinfunktion verstanden werden kann. Außerdem wurde gezeigt, dass sich die verwendeten Nanostrukturen gut für Fluoreszenzexperimente eignen, da sie selbst nur schwach lumineszieren.



Plasmonic interactions of photosystem I with Fischer patterns made of Gold and Silver

Marc Brecht^{a,*}, Martin Hussels^a, Jana B. Nieder^{b,1}, Hui Fang^b, Celine Elsässer^b

^a Universität Tübingen, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie and LISA+ Center, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen, Germany

^b Fachbereich Physik, Freie Universität Berlin, Arnimallee 14, 14195 Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 15 May 2012

Keywords:

Plasmonics
Fischer pattern
Single-molecule spectroscopy
Light-harvesting
Signal enhancement

ABSTRACT

Single-molecule spectroscopy has been used to investigate the plasmonic interaction effects of nanometer-sized hexagonal arrays of Au- and Ag-triangles on the fluorescence properties of photosystem I (PSI) – a key component of the photosynthetic apparatus. The fluorescence emission of PSI is intensified upon coupling with these nanostructures. For single PSI trimers, enhancement factors of up to 10.5 (Au) and 15 (Ag) were observed. The average enhancement is 2.2/5.7 for Au/Ag, respectively. Comparison of the emission spectra shows that the enhancement depends on the wavelength. This wavelength dependence can be explained by the multichromophore composition of PSI. Furthermore, plasmonic interaction increases the fluorescence emission of spectral components, which are barely visible under natural conditions. The metal nanostructures produced via nanosphere lithography turned out to be beneficial tools for signal enhancement due to the very low intensity of their autoluminescence signal.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Metallic nanostructures in combination with proteins connected to their surface provide one of the most adaptable architectures for design and implementation of biofunctionality at the nanoscale [1,2]. One field of research concerns the electrical field enhancement of nanostructures (surface plasmon resonance (SPR)) and its use as optical antennas for light-harvesting and signal enhancement of fluorophores. The increased sensitivity of fluorescence-based assays finds its application in identifying new medications, cellular fluorescence imaging, high-throughput screenings, and in the design of solar cells [2–8]. Such applications depend on the interaction of fluorophores with surface plasmons of the nanostructures. Using plasmonic nanostructures in biophysical applications requires exact design since the interaction between proteins and nanostructures can lead to mutual modification of their properties [9,10]: molecular adsorbates on the nanoparticle surfaces can strongly shift SPRs as they may change the dielectric constant of the surrounding [11]. Likewise, plasmonic nanostructures can influence the optical properties of proteins, including changes of the fluorescence quantum yields and lifetimes, Raman scattering cross sections, Förster radii, Förster rates, and excitation energy transfer pathways in multichromophore assemblies [3,12–15]. The interaction between fluorophores and plasmonic active particles

depends strongly on their distance from one another and their relative orientation. Fluorescence can be either enhanced or quenched depending on these sorts of geometrical conditions [16,17].

Detection of fluorophores at the single-molecule level is often limited by low signal intensities due to restricted photostability [18]. Signal enhancement by plasmonic nanostructures proves especially beneficial since the coupling to SPR reduces optical saturation and dramatically decreases fluorescence lifetimes thus improving emission rates [3].

This work presents the effects of coupling photosystem I (PSI) to ordered nanostructures consisting of periodic hexagonal patterns of Au- or Ag-nanoparticles. Such metallic nanostructures are also known as Fischer patterns and are produced by nanosphere shadow lithography [19–21]. This method allows easy tuning of the SPR frequency since all parameters determining this frequency – such as structure size and shape, lattice constant, and material composition of the Fischer patterns – are readily accessible and variable over large ranges (see Fig. 1) [22].

PSI is a biological light harvesting system that absorbs across a wide spectral range covering ~45% of the solar radiation at the Earth's surface. Light harvesting by these proteins is so efficient that a single monolayer of photosynthetic proteins is sufficient to absorb up to 20% of the incident light (for review see Ref. [23]). After absorption, the energy is transferred to the site where energy conversion into an electric gradient usable by subsequent proteins is processed. This in combination with a unique quantum yield of ≈1 for charge separation, makes PSI an attractive component in electrochemical approaches for the conversion of light energy into electrical or chemical energy [12,24–31]. Almost 100 chlorophyll

* Corresponding author. Tel.: +49 7071 29 76239; fax: +49 7071 29 5490.

E-mail address: marc.brecht@uni-tuebingen.de (M. Brecht).

¹ Present address: ICFO – Institut de Ciències Fotoniques, Av. Carl Friedrich Gauss num. 3, 08860 Castelldefels, Barcelona, Spain.

molecules per PSI monomer are involved in light harvesting, excitation energy transfer, and charge separation (Fig. 2(a)) [32–34]. The chlorophyll molecules' specific electronic transition energies depend on their binding conditions inside the protein scaffold, providing a set of states allowing for fast, robust, and efficient exciton transfer to the reaction center (P700), a chlorophyll dimer that absorbs at 700 nm [34,35]. Charge separation is initiated at P700, leading to a charge-separated state across the thylakoid membrane. Astonishingly, PSI contains a few strongly coupled chlorophyll dimers and one trimer with site energies lower than the reaction center, which can be observed as additional absorption bands at wavelengths above 700 nm (Fig. 2(d)) [35–40]. Although energy transfer via these low-energy chlorophylls requires a subsequent uphill energy transfer towards P700, they are shown to be involved in the exciton transfer [38]. Due to this extra-ordinary behavior, the so-called red chlorophylls are of great interest and their function is still under debate. Energy transfer from the red chlorophylls to P700 is blocked at low temperatures. The energy is then trapped in these states and partially relaxes through fluorescence emission [40]. This fluorescence is detectable down to the single-molecule level [41–44,18,45], there the contributions of the red chlorophylls can be resolved (Fig. 2(e)). Their emission can be used e.g. as indicators for different stages of the energy transfer in PSI [46]. The composition of the PSI emission spectra is extremely dependent upon the interplay of the protein-bound chlorophylls that determine the energy transfer pathways. These interplays can be modulated by changes on the inside or the outside of the protein complex [47]. Such changes can be as small as proton fluctuations close to chromophore binding sites [48,46].

In the described experiments, the fluorescence of the red chlorophylls of PSI deposited on plasmonic active surfaces was detected. Single-molecule fluorescence detection below the temperature of liquid helium on a reasonable number of isolated PSI complexes allows for an accurate investigation of the influence of plasmonic structures on PSI's fluorescence properties. Based on such spectroscopic results, the influence of the interaction with plasmonic surfaces on the function of PSI can be discussed.

2. Material and methods

Sample preparation: Nanostructures were produced by nanosphere shadow lithography as described in [19]. Polystyrol nanospheres (Microparticles GmbH Berlin) with a diameter of 470 nm self-assemble into a 2D hexagonally ordered crystal that was

deposited on quartz substrate (Herasil). These samples were covered with 2 nm Cr and 20 nm Au (or Ag) by vapor deposition. The polystyrol spheres were subsequently removed.

Solution of isolated and purified PSI trimers from *Th. elongatus* (procedure described in Ref. [49]) were diluted in buffer solution (pH 7.5) containing 20 mM Tricine, 25 mM MgCl₂, and 0.4 mM β -DM as detergent, to obtain a chlorophyll *a* concentration of \sim 20 μ M. This amount of detergent is adequate for the critical solubilization concentration for a PSI trimer concentration of 0.5 μ M to avoid PSI aggregation [50]. To obtain a concentration suitable for single-molecule experiments, the samples were further diluted with a buffer solution containing 20 mM Tricine, 25 mM MgCl₂, 0.4 mM β -DM, and 5 mM sodium ascorbate in milli-Q water. The sodium ascorbate was added for pre-reduction of P700. After step-wise dilution, the final PSI trimer concentration was \sim 3 pM. Less than 1 μ L of this solution was placed on bare quartz or nanostructured surfaces, after which a coverslip was placed on top.

Spectroscopic measurements: Experiments were carried out using a home-built confocal microscope operating at 1.3 to 1.4 K. A piezo tip tilt module (Physik Instrumente PI S-334.2SL) was used to deflect the beam for the imaging of single molecules. The excitation source was a diode laser (680 nm, Schäfter and Kirchhoff). The fluorescence emission was detected using either an avalanche photodiode (Perkin-Elmer SPCM-AQR-15, <50 dark counts/s) for fast integral fluorescence detection or an Acton Research 300 mm spectrograph (Acton SpectraPro308) equipped with a back-illuminated CCD camera (Roper Scientific Spec-10:100BR/LN) for recording fluorescence spectra. Stray laser light was blocked by a Raman long-pass filter (AHF HQ695LP). The microscope objective (60 \times , N.A. 0.8 JIS, Edmund Optics) was immersed in liquid helium (cryostat, Janis Research) for illumination and collection. A laser intensity of \sim 100 μ W measured behind the scanning module was used for excitation. The usual exposure time for each spectrum was 1 s in a sequence of spectra resulting in a typical S/N-Ration of >6 for single PSI trimers on bare quartz at the given excitation power.

The absorption spectra of the nanostructures were captured on a home-built spectrometer using a standard lock-in technique with intensity modulation; an empty substrate was used as reference.

3. Results

Fig. 1(a) shows an AFM image of Ag-nanostructures as used for the described experiments. Fig. 1(b) presents a height profile

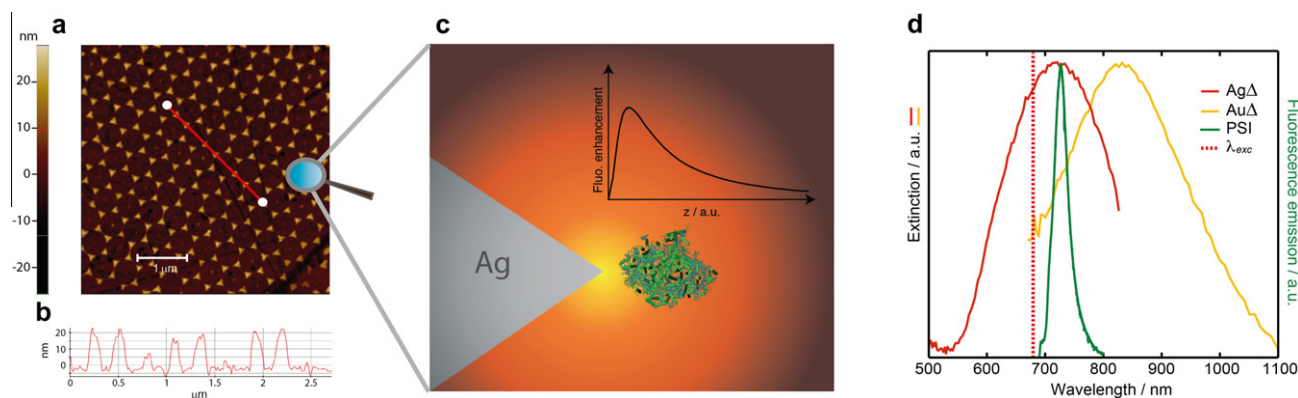


Fig. 1. (a) AFM image of an Ag Δ Fischer pattern. (b) Cross section along the red line as indicated in the AFM image above. (c) Scheme of a single PSI complex in the electric field produced by an Ag Δ . The region of the electric field enhancement produced by a nanoparticle depends on its shape and the material. In general, however, the penetration depth of these fields is larger than the dimension of a PSI complex [60], but the enhancement factor for the fluorescence emission varies remarkably over the dimension of a single PSI complex [17]. (d) The extinction spectra of the Fischer patterns used (data were scaled to similar magnitude). The low temperature fluorescence of PSI is also shown in green. The dotted red line is the wavelength position of the excitation source used for the fluorescence excitation in the following experiments. The wavelength is close to the maximum absorption of PSI (see also Fig. 2(d)). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

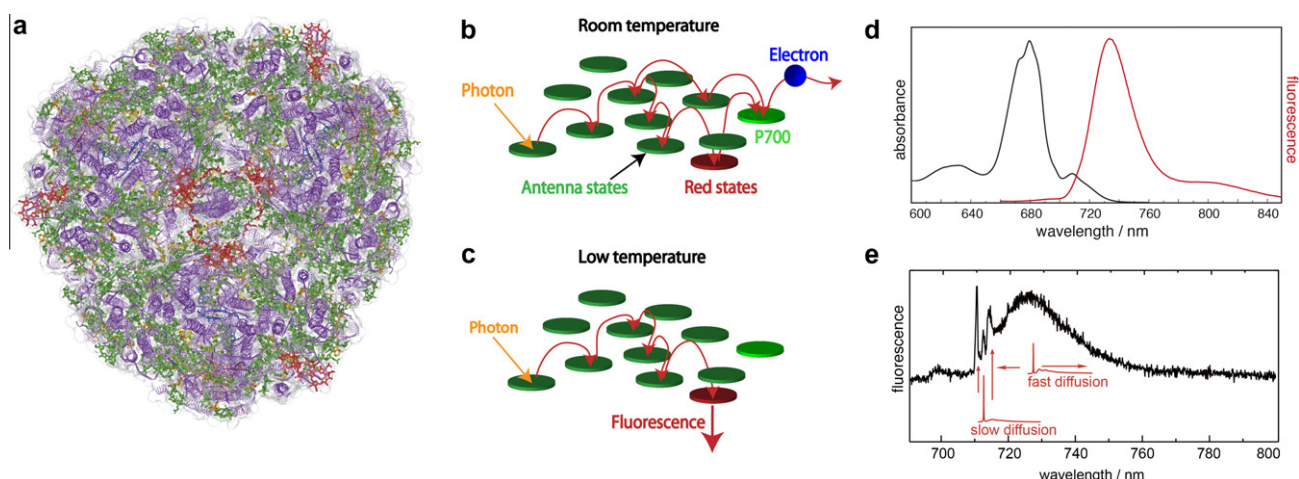


Fig. 2. Photosystem I from oxygenic photosynthesis. (a) Top view of trimeric PSI from cyanobacteria (protein data bank (PDB) entry: 1JB0) [32]. In each monomer about 100 chlorophyll molecules (green) absorb excitation energy and transfer it to a chlorophyll dimer (blue) in the reaction center absorbing at 700 nm (P700). The protein backbone is shown in violet. (b) Illustration of excitation-energy transfer pathways at ambient temperatures. A charge-separated state across the membrane is formed upon excitation of P700. The red chlorophyll states (red) are involved in energy transfer. (c) The transfer towards P700 is partially blocked and the red chlorophyll states become fluorescent at low temperatures. (d) Low temperature (77 K) ensemble absorption and emission spectra of PSI of *Th. elongatus* in the oxidized state adapted from Ref. [40]. (e) A typical PSI fluorescence emission spectrum of a single PSI trimer of *Th. elongatus* showing contributions from different red chlorophylls. The theoretical line shapes of emitters (without spectral diffusion are given in red). These shapes were simulated by using the expressions and parameters in Refs. [61,62]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

showing the variation in heights along the red line indicated in Fig. 1(a). The shape of the nanoparticles resemble that of triangles, thus the abbreviation Au Δ and Ag Δ for the nanostructures are used in the following. The edge length of the Au Δ and Ag Δ is \sim 140 nm. Fig. 1(d) shows a comparison of the extinction spectra of Au Δ and Ag Δ with the fluorescence emission spectrum of PSI. Both nanostructures have identical geometric parameters, thus the differences in their extinction spectra are solely due to the different metals.

The concentration of PSI trimers in the solution – deposited on Au Δ and Ag Δ as well as on bare quartz – was \sim 3 pM to ensure a spatial separation of individual PSI trimers much larger than the width of the focus of the excitation beam. Fig. 3 shows fluorescence intensity scans taken on samples where PSI was deposited on Au Δ and Ag Δ (3(a) and (b); abbreviated as PSI-Ag Δ and PSI-Au Δ in the following) as well as scans of bare Au Δ and Ag Δ (3(c)–(e)). The scans in Fig. 3(a)–(d) are shown with identical color scaling. The scaling for Fig. 3(e) was downscaled by a factor of 12. The deviation of the spots from a circular shape can be attributed to the low imaging quality of the microscope objective used at low temperatures. Intense spots were observed within the entire imaged range for PSI-Ag Δ /PSI-Au Δ . Spots with very low intensity are observed for bare Au Δ . These spots are barely observable even with an intensity color code downscaled by a factor of 12 as shown in Fig. 3(e). Intense spots can be observed for Ag Δ , but the intensity of the spots are lower than those observed for PSI-Ag Δ . The spectral characteristics of Ag Δ intrinsic luminescence is shown in Fig. 3(f). Two spectra were recorded at positions associated with the most intense spots observable in the fluorescence images of Ag Δ . The spectra are characterized by one broad featureless spectral band covering the entire spectral detection window from 690 to 800 nm. This spectral shape is representative for the typical luminescence contributions detected on Ag Δ .

Fluorescence emission spectra were taken at the positions of the spots visible in the scans taken for PSI-Ag Δ and PSI-Au Δ samples. All spectra show the spectral characteristics of single PSI trimers. Overall, 147 fluorescence emission spectra for PSI trimers on bare quartz, 162 for PSI-Au Δ , and 118 for PSI-Ag Δ were recorded.

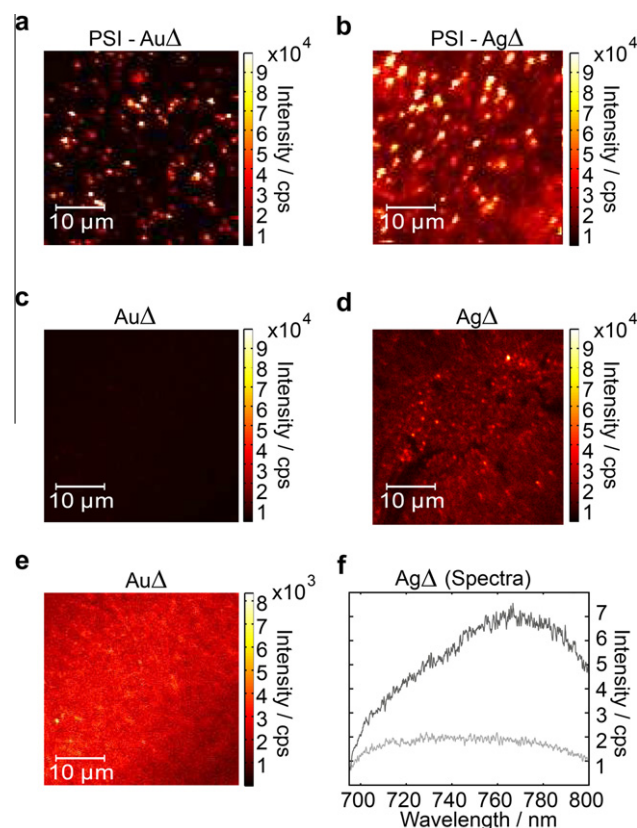


Fig. 3. Fluorescence intensity scans of PSI-Au Δ (a), PSI-Ag Δ (b), and bare Au Δ and Ag Δ (c) and (d). The fluorescence intensity scans were acquired with an integration time of 2 ms per pixel. Two representative luminescence spectra (f) taken at intense spots of scan (d), acquisition time 30 s.

The enhancement factors for the individual PSI trimers were calculated based on the recorded spectra. For this purpose, the signal in the wavelength region between 695 and 780 nm acquired during the first 120s of observation was integrated after a constant

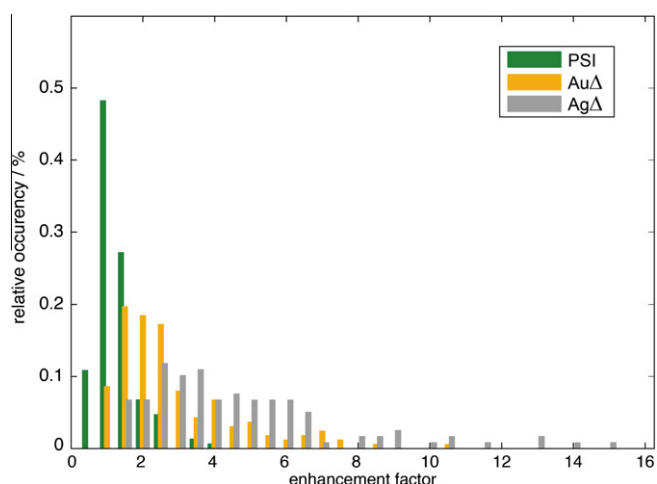


Fig. 4. Intensity histograms of PSI on bare quartz (green), PSI-Au Δ (orange), and PSI-Ag Δ (grey). The intensities of the individual trimers were obtained from spectrally resolved data. The counts detected in the wavelength interval from 695 nm to 780 nm were integrated after subtraction of a constant background to eliminate dark counts and stray light. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

background subtraction. These intensity values were taken as a measure of the intensity of the individual complexes. The time-dependent data sets ensured the experiment's sensitivity to single complexes because the typical spectral dynamics for single complexes matched the signals detected (data not shown). The distribution of the intensity values for individual PSI trimers with and without coupling to Au Δ /Ag Δ are presented separately in histograms in Fig. 4: the x-axis is normalized to the mean intensity of individual PSI trimers on bare quartz, thus defining the enhancement factor. The intensity distribution (green) of PSI on bare quartz shows a narrow distribution, while the distributions for PSI-Au Δ (orange) and PSI-Ag Δ (gray) are broad, largely extending to the high-intensity side. The maximum intensity for an individual PSI-Au Δ is 10.5 times and for a PSI-Ag Δ 15 times larger than the average intensity of a PSI trimer on bare quartz. On average, single PSI trimers have a 2.2 and 5.7 times higher intensity when coupled to Au Δ and Ag Δ respectively.

Fig. 5(a) shows the average spectra of all spectra from single PSI, PSI-Ag Δ , and PSI-Au Δ . The maxima are found at 729.9 ± 0.5 nm for PSI, at 729.5 ± 0.5 nm for PSI-Au Δ , and at 731.3 ± 0.5 nm for PSI-Ag Δ . The full width at half maximum (fwhm) of the average spectra are 27.6 ± 0.5 nm for PSI, 33.3 ± 0.5 nm for PSI-Au Δ , and 38.7 ± 0.5 nm for PSI-Ag Δ . Fig. 5(b) shows the same spectra given in (a) scaled to the same maximum value. Differences in the emission profiles of PSI, PSI-Ag Δ , and PSI-Au Δ are observable in this representation, e.g. the emission of PSI-Ag Δ and PSI-Au Δ shows a much stronger enhancement at the blue side of the profile than in its center part.

The wavelength-dependent enhancement factor is obtained by dividing the average spectra for PSI-Au Δ and PSI-Ag Δ by that of PSI on bare quartz. The resulting enhancement curves are shown in Fig. 5(c). It must be noted that the procedure chosen here crucially depends on the elimination of background contributions and, consequently, the error for the determination of the enhancement factor becomes larger in spectral regions with low intensities. The error in the wavelength range between 698–770 nm is estimated to be ± 0.5 . The emission intensity of PSI at >770 nm becomes smaller and the error caused by the background signals becomes much larger (these data are not shown). The fluorescence emission in the range 698–710 nm shows the largest relative enhancements for both structures. The maximum value is ~ 7.2 for PSI-Au Δ and ~ 15.4 for PSI-Ag Δ . The enhancement induced by Ag Δ in the wave-

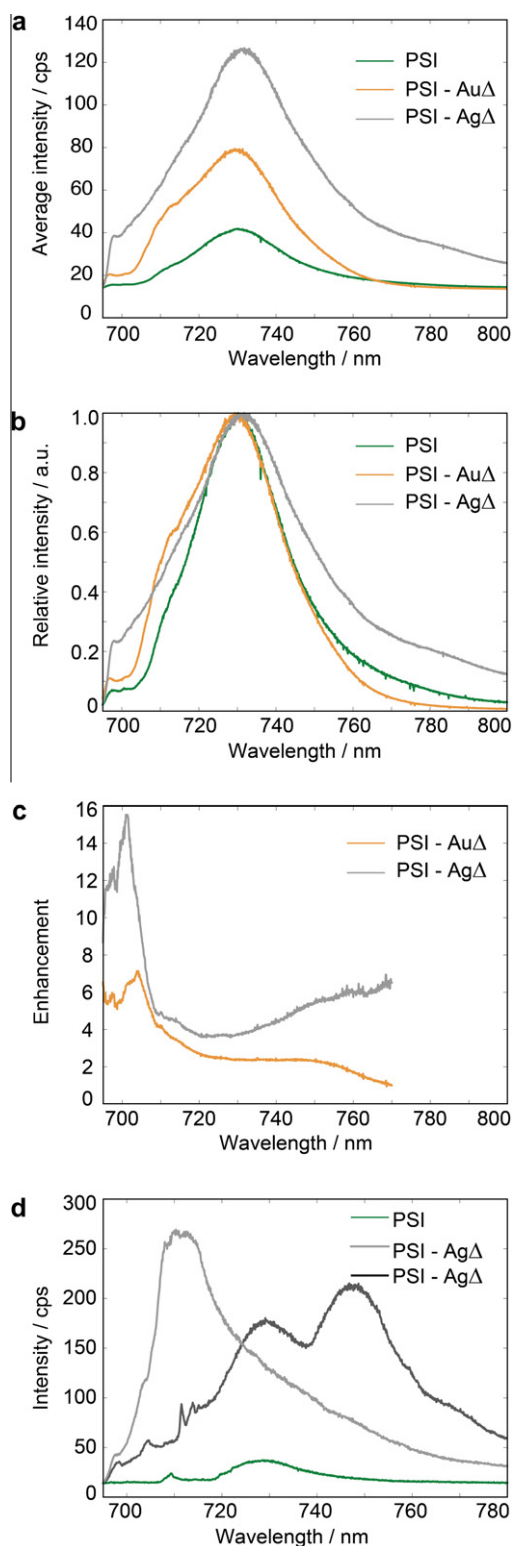


Fig. 5. (a) Averaged spectra obtained from summation of all spectra of single PSI trimers (from *Th. elongatus*) for PSI on bare quartz, PSI-Au Δ , and PSI-Ag Δ (before baseline correction). (b) Spectra from (a) after baseline correction scaled to similar maximum values. In (c), the average spectra for PSI-Au Δ and PSI-Ag Δ were divided by the average spectrum for PSI on bare quartz to show the wavelength dependence of the enhancement. In (d), three examples for spectra of single PSI trimers taken with identical experimental settings are shown: PSI on bare quartz (green) and PSI-Ag Δ (grey, black). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

length region from 710–735 nm remains larger than that of Au Δ . The influence of Au Δ and Ag Δ on the average spectrum of PSI

begins to differ qualitatively at >735 nm. A positive slope was observed for PSI-Ag Δ while the slope was negative for Au Δ . For PSI-Ag Δ , an enhancement of the emission over PSI's entire emission spectrum was observed, whereas for PSI-Au Δ a change from enhancement to quenching took place in the far-red region.

Fig. 5(d) shows the emission spectra of one PSI trimer on bare quartz (green line) and two individual trimers of PSI-Ag Δ sample (gray and black lines). The spectra of the PSI-Ag Δ sample represent extreme cases of wavelength-dependent enhancement. For one case, a high enhancement in the region around 710 nm (gray) was observed while a strong enhancement at the red edge of the emission (black) was observed for the other. The enhancement factor reaches ~ 100 in these regions compared to the average value of PSI on bare quartz.

4. Discussion

Both plasmonic nanostructures (Au Δ and Ag Δ) increase the fluorescence emission of PSI trimers deposited on their surface (Fig. 3, 4, 5). The intensity scans (Fig. 3) show an enhancement of PSI's signal intensity induced by Au Δ and Ag Δ , whereas the background signals of the nanostructures are almost negligible. As a consequence, analysis to distinguish between contributions stemming from PSI or from the nanostructures are not necessary. This provides an advantage as compared to the strong background signals observed for spherical Au-nanoparticles and SIFs [15]. The arrays of Au Δ and Ag Δ therefore have ideal properties to be used as a plasmonic enhancement device. The integral fluorescence intensity of PSI-Au Δ is 2.2-times higher than that of PSI on average; in the case of PSI-Ag Δ the average enhancement is 5.7. The enhancement factor for PSI-Ag Δ is comparable to other fluorophore-metal nanostructure assemblies, whereas that for PSI-Au Δ is considerably smaller [12,15,16,51–55]. The main reason for the difference in the enhancement is the spectral overlap between the extinction spectra of Ag Δ and Au Δ (Fig. 1(d)) and the absorption of PSI at the excitation wavelength ($\lambda_{exc} = 680$ nm) [5]. For Ag Δ , the extinction value is approximately three times higher than for Au Δ (the spectra in Fig. 1(d)) are scaled to similar intensity).

Plasmonic interaction generally depends on the spectral resonance conditions between chromophores and the surface plasmons, their intersystem distance, and their relative orientations. The electric field close to the triangles in hexagonal Fischer pattern is highly heterogeneous [56,17]. Aside from hot-spot positions on the tips (apex) of the triangles with very high field enhancements, positions with vanishing field enhancements are also found on the edges of the triangles [56]. These properties are in line with the observed broadness of the distribution of the enhancement values shown in Fig. 4.

The fluorescence enhancement of fluorophores close to Au-nanoparticles was investigated by Anger et al. [16]. They found quenching of the fluorescence at distances shorter than approximately 2 nm, maximum enhancement at approximately 5 nm, and exponential decay at longer distances (visualized in Fig. 1(c)). As a consequence, the PSI trimers must be within a certain range to undergo fluorescence enhancement.

Assuming a homogeneous distribution of the PSI trimers over the surface of the nanostructures results in a large fraction of PSI trimers that are too far away from Au Δ /Ag Δ for enhancement. In the observed samples (PSI-Au Δ and PSI-Ag Δ), however, almost all PSI trimers were enhanced, indicating a location close to the metal surfaces. The distance distribution of light-harvesting system II (LH2) deposited on top of a surface with Au-nanoparticles was recently investigated by Beyer et al. [5]. They also found clear deviation from a homogeneous distribution of the LH2 complexes over the surface and concluded that LH2 tends to stick on the surface of the Au-nanoparticles [5].

The distribution of the chlorophylls in PSI must be considered to understand the changes in the optical properties induced by the interaction with Au Δ /Ag Δ . The shape of a PSI trimer can be approximated by a cylinder measuring about 20 nm in diameter and approximately 5 nm in height (see Fig. 2(a)). Assuming a similar distance-dependent enhancement for Au Δ /Ag Δ as observed for a fluorophore coupled to a spherical Au-nanoparticle, some chlorophylls that are very close to the metal surface are quenched, whereas others are in the distance range for maximum enhancement. As a consequence, the emission of certain chlorophylls within one PSI trimer is switched off, whereas the emission of other chlorophylls is enhanced. Consequently, the shape of the emission spectrum of a PSI trimer close to Au Δ /Ag Δ can deviate remarkably from the shape of uncoupled PSI (Fig. 5(d)).

The PSI trimers in the investigated samples are not specifically oriented with respect to the plasmonic structures. Averaging over a huge number of spectra of randomly oriented complexes results in uniform enhancement as long as the pigments within a multichromophoric system are assumed to be non-interacting. A strong deviation from linear enhancement was observed in the average spectra of PSI-Au Δ and PSI-Ag Δ (Fig. 5(a)–(c)). Such deviations stand in contrast to observations for single chromophores, two-chromophore FRET-coupled systems, and the peridinin-chlorophyll protein close to plasmonic structures [3,12]. A similar type of deviation from uniform enhancement of fluorescence emission was recently observed for PSI close to spherical Au-nanoparticles and to heterogeneous SIFs [15]. The extinction spectra of the nanostructures used show only a weak variation ($\sim 20\%$) over the emission profile of PSI (Fig. 1(d)) [17]. The observed emission profile changes cannot be explained by simple convolution of PSI emission with the plasmon spectra (plasmonic shaping). Thus the reason for the deviation from the uniform enhancement must be due to the couplings between the chromophores in PSI [15].

The chromophores in photosynthetic pigment proteins are coupled to ensure fast and efficient energy transfer to the reaction centers of the excitation energy captured by the antenna system [35]. The energy transfer efficiency depends on the spectral overlap, spatial separation, and orientation of the involved chromophores [57]. The specific coupling conditions between the chromophores lead to a characteristic set of transition rates and thus to preferred energy transfer pathways [46,57]. The interaction between coupled chromophores and plasmonic structures alters Förster-interaction distances between chromophores [58]. In one donor-acceptor pair, the Förster radius increases from 8.3 to 13 nm as a result of plasmonic interaction [58]. Assuming this type of effect for PSI, the couplings between most of the 100 PSI-bound chromophores will change. It is thereby most likely that additional energy transfer pathways will be formed involving chromophores that do not participate in the native state. Consequently, chromophores which were previously almost non-fluorescent can become fluorescent (see Fig. 5(d)). The strong enhancement of the short-wavelength region indicates an enhanced fluorescence deactivation of the higher energy antenna pigments which show virtually no fluorescence emission in the absence of plasmonic structures. Their deactivation by fluorescence emission indicates a reduced efficiency of energy transfer in the antenna system of PSI.

A second strong deviation of the emission spectra of PSI coupled to Ag Δ concerns the red edge of the spectrum (>730 nm). Emission in this spectral region is due to the emission of PSI's far-red chlorophylls [39]. Their emission is enhanced by Ag Δ (Fig. 5(a)–(c)). These chlorophylls should be completely quenched by P700⁺ in PSI under these experimental conditions [40,59]. The states therefore escaped detection in PSI for a long time [40]. As recently shown by Schlodder et al. [40], a reduction of the excitation power (100 μ W resulting in $\sim 6.8 \cdot 10^{20}$ photons/(cm²s)) by a factor of about 1000 is necessary to have at least approximately 40% of

P700 in the neutral state showing no quenching effect on the emission [40]. Contributions of the far-red chlorophylls then become visible in the emission spectrum. The spectrum of a single PSI trimer deposited on Ag Δ (Fig. 5(d) – black line) shows the contribution of far-red chlorophylls at \sim 750 nm dominating the spectrum. The enhancement of this contribution is \sim 100 compared to PSI on bare quartz. The high intensity of this contribution can only be explained by a dramatic change in the deactivation processes, like fluorescence quenching by P700⁺ or fluorescence lifetime reduction. Both processes have to be considered as strong perturbations of the energy transfer in the antenna system of PSI.

5. Conclusion

In conclusion, our experiments showed an increased fluorescence of PSI upon interaction with hexagonally arranged arrays of Au Δ and Ag Δ . Both arrays show low autoluminescence making them ideal for signal enhancement. Aside from an integral enhancement of the fluorescence emission, we observed a wavelength-dependent enhancement indicating a pronounced deactivation of excitation energy by antenna states with site energies close to that of the reaction center, as well as an enhancement of the long-wavelength chlorophylls. The deactivation of excitation energy by fluorescence emission reduces the efficiency of energy transfer towards the reaction center (P700) and must be considered as a modification of the protein function.

Furthermore, the wavelength dependence of the fluorescence enhancement caused by the interaction with the metal nanostructures offers the opportunity to observe chlorophyll states that are almost non-fluorescent in native PSI.

Acknowledgements

Single-molecule experiments were carried out in the laboratory of Prof. Robert Bittl (Free University Berlin); his continuous support is gratefully acknowledged. Nanostructures were prepared in the laboratory of Prof. Paul Fumagalli (Free University Berlin); his continuous support is gratefully acknowledged. The AFM images were taken in the group of Prof. J.I. Pascual; his support is gratefully acknowledged. We thank Eberhard Schlodder for PSI samples and fruitful discussions. This work is supported by the Free University Berlin initiative –“Nanoscale: Nanoskalige Funktionsmaterialien”, the Cluster of Excellence: “Unifying Concepts in Catalysis”, and the Heisenberg Program of the DFG (BR4102/1-1, BR4102/2-1).

References

- [1] K. Aslan, I. Gryczynski, J. Malicka, E. Matveeva, J.R. Lakowicz, C.D. Geddes, *Current Opinion Biotech.* 16 (2005) 55.
- [2] J.N. Anker, W.P. Hall, O. Lyandres, N.C. Shah, J. Zhao, R.P. Van Duyne, *Nature Mater.* 7 (2008) 442.
- [3] J.R. Lakowicz, K. Ray, M. Chowdhury, H. Szmanski, Y. Fu, J. Zhang, K. Nowaczyk, *Analyst* 133 (2008) 1308.
- [4] I. Carmeli, I. Lieberman, L. Kravetsky, Z. Fan, A.O. Govorov, G. Markovich, S. Richter, *Nano Lett.* 10 (2010) 2069.
- [5] S.R. Beyer, S. Ullrich, S. Kudera, A.T. Gardiner, R.J. Cogdell, J. Koehler, *Nano Lett.* 11 (2011) 4897.
- [6] H.A. Atwater, A. Polman, *Nature Mater.* 9 (2010) 205.
- [7] T. Qiu, J. Jiang, W. Zhang, X. Lang, X. Yu, P.K. Chu, *Acs Appl. Mater. Interf.* 2 (2010) 2465.
- [8] V.E. Ferry, J.N. Munday, H.A. Atwater, *Adv. Mater.* 22 (2010) 4794.
- [9] A. Chizhik, F. Schleifenbaum, R. Gutbrod, A. Chizhik, D. Khoptyar, A.J. Meixner, *J. Enderlein, Phys. Rev. Lett.* 102 (2009) 073002.
- [10] A. Sivanesan, H.K. Ly, J. Kozuch, M. Sezer, U. Kuhlmann, A. Fischer, I.M. Weidinger, *Chem. Commun.* 47 (2011) 3553.
- [11] L. Shang, Y.Z. Wang, J.G. Jiang, S.J. Dong, *Langmuir* 23 (2007) 2714.
- [12] S. Mackowski, S. Wormke, A.J. Maier, T.H.P. Brotsudarmo, H. Harutyunyan, A. Hartschuh, A.O. Govorov, H. Scheer, C. Brauchle, *Nano Lett.* 8 (2008) 558.
- [13] J.B. Jackson, N.J. Halas, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 17930.
- [14] N.T. Fofang, T.H. Park, O. Neumann, N.A. Mirin, P. Nordlander, N.J. Halas, *Nano Lett.* 8 (2008) 3481.
- [15] J.B. Nieder, R. Bittl, M. Brecht, *Angewandte Chemie-Int. Ed.* 49 (2010) 10217.
- [16] P. Anger, P. Bharadwaj, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* 96 (2006) 113002.
- [17] B.C. Galarreta, E. Harte, N. Marquestaut, P.R. Norton, F. Lagugne-Labarthe, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 6810.
- [18] C. Hofmann, R. Kulzer, F. Zondervan, J. Köhler, M. Orrit, *Single biomolecules at cryogenic temperatures: from structure to dynamics*, Springer Series in Biophysics, 2008.
- [19] A. Kosiorek, W. Kandulski, P. Chudzinski, K. Kempa, M. Giersig, *Nano Lett.* 4 (2004) 1359.
- [20] J.C. Hulteen, R.P. van Duyne, *J. Vacuum Sci. Tech. A – Vacuum Surf. Films* 13 (1995) 1553.
- [21] U.C. Fischer, H.P. Zingsheim, *J. Vacuum Sci. Tech.* 19 (1981) 881.
- [22] P. Patoka, M. Giersig, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 16783.
- [23] G.D. Scholes, G.R. Fleming, A. Olaya-Castro, R. van Grondelle, *Nature Chem.* 3 (2011) 763.
- [24] R.A. Grimme, C.E. Lubner, D.A. Bryant, J.H. Golbeck, *JACS* 130 (2008) 6308.
- [25] A.O. Govorov, I. Carmeli, *Nano Lett.* 7 (2007) 620.
- [26] R. Das, P.J. Kiley, M. Segal, J. Norville, A.A. Yu, L.Y. Wang, S.A. Trammell, L.E. Reddick, R. Kumar, F. Stellacci, N. Lebedev, J. Schnur, B.D. Bruce, S.G. Zhang, M. Baldo, *Nano Lett.* 4 (2004) 1079.
- [27] L. Frolov, Y. Rosenwaks, C. Carmeli, I. Carmeli, *Adv. Mater.* 17 (2005) 2434.
- [28] A.O. Govorov, *Adv. Mater.* 20 (2008) 4330.
- [29] N. Terasaki, N. Yamamoto, T. Hiraga, Y. Yamanoi, T. Yonezawa, H. Nishihara, T. Ohmori, M. Sakai, M. Fujii, A. Tohri, M. Iwai, Y. Inoue, S. Yoneyama, M. Minakata, I. Enami, *Angewandte Chemie-Int. Ed.* 48 (2009) 1585.
- [30] C.E. Lubner, R. Grimme, D.A. Bryant, J.H. Golbeck, *Biochemistry* 49 (2010) 404.
- [31] H. Krassen, A. Schwarze, B. Friedrich, K. Ataka, O. Lenz, J. Heberle, *Acs Nano* 3 (2009) 4055.
- [32] P. Fromme, P. Jordan, N. Krauss, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1507 (2001) 5.
- [33] P. Jordan, P. Fromme, H.T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, *Nature* 411 (2001) 909.
- [34] J.H. Golbeck (Ed.), *Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin:Ferredoxin Oxidoreductase*, Springer, 2006.
- [35] B. Gobets, R. van Grondelle, *Biochim. et Biophys. Acta* 1507 (2001) 80.
- [36] M. Byrdin, I. Rimke, E. Schlodder, D. Stehlik, T.A. Roelofs, *Biophys. J.* 79 (2000) 992.
- [37] L.O. Palsson, J.P. Dekker, E. Schlodder, R. Monshouwer, R. van Grondelle, *Photosynthesis Res.* 48 (1996) 239.
- [38] A.N. Melkozernov, *Photosynthesis Res.* 70 (2001) 129.
- [39] N.V. Karapetyan, E. Schlodder, R. van Grondelle, J.P. Dekker, *Advances in Photosynthesis and Respiration, Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin:Ferredoxin Oxidoreductase*, 24, Springer, 2006.
- [40] E. Schlodder, M. Hussels, M. Cetin, N.V. Karapetyan, M. Brecht, *Biochim. et Biophys. Acta* 1807 (2011) 1423.
- [41] P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, M. Orrit, *J. Phys. Chem. A* 104 (2000) 1.
- [42] F. Jelezko, C. Tietz, U. Gerken, J. Wrachtrup, R. Bittl, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 8093.
- [43] A.F. Elli, F. Jelezko, C. Tietz, H. Studier, M. Brecht, R. Bittl, J. Wrachtrup, *Biochemistry* 45 (2006) 1454.
- [44] M. Brecht, H. Studier, A.F. Elli, F. Jelezko, R. Bittl, *Biochemistry* 46 (2007) 799.
- [45] M. Brecht, *Molecular Phys.* 107 (2009) 1955.
- [46] M. Brecht, V. Radics, J.B. Nieder, R. Bittl, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (2009) (1861) 11857.
- [47] M. Hussels, M. Brecht, *Febs Lett.* 585 (2011) 2445.
- [48] M. Brecht, H. Studier, V. Radics, J.B. Nieder, R. Bittl, *JACS* 130 (51) (2008) 17487.
- [49] P. Fromme, H.T. Witt, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1365 (1998) 175.
- [50] F. Müh, A. Zouni, *Biochim. et Biophys. Acta Bioenerg.* 1708 (2005) 219.
- [51] Y. Chen, K. Munekchika, D.S. Ginger, *Nano Lett.* 7 (2007) 690.
- [52] S. Kuhn, U. Hakanson, L. Rogobete, V. Sandoghdar, *Phys. Rev. Lett.* 97 (2006) 017402.
- [53] J. Enderlein, *Biophys. J.* 78 (2000) 2151.
- [54] P.F. Pompa, L. Martiradonna, A. Della Torre, F. Della Sala, L. Manna, M. De Vittorio, F. Calabi, R. Cingolani, R. Rinaldi, *Nature Nanotech.* 1 (2006) 126.
- [55] S. Vukovic, S. Corni, B. Mennucci, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 121.
- [56] B.C. Galarreta, P.R. Norton, F. Lagugne-Labarthe, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 19952.
- [57] M. Byrdin, P. Jordan, N. Krauss, P. Fromme, D. Stehlik, E. Schlodder, *Biophys. J.* 83 (2002) 433.
- [58] J. Zhang, Y. Fu, M.H. Chowdhury, J.R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 11784.
- [59] E. Schlodder, K. Falkenberg, M. Gergeleit, K. Brettel, *Biochemistry* 37 (1998) 9466.
- [60] J. Zhang, Y. Fu, M.H. Chowdhury, J.R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 18.
- [61] J. Pieper, J. Voigt, G. Renger, G.J. Small, *Chem. Phys. Lett.* 310 (1999) 296.
- [62] M. Ratsep, T.W. Johnson, P.R. Chitnis, G.J. Small, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 836.

Kapitel 9

Interactions of Photosystem I with plasmonic nanostructures

In diesem Kapitel wird der Einfluss verschiedener plasmonischer Nanostrukturen auf die Fluoreszenzemission einzelner PSI-Komplexe untersucht. Die verwendeten Nanostrukturen waren Goldnanokugeln, Silberinseln (SIF) und hexagonal angeordnete Nanodreiecke (~ 120 nm Kantenlänge) aus Gold und aus Silber. Alle diese Nanostrukturen bewirkten durch ihre plasmonischen Eigenschaften eine Verstärkung der Fluoreszenzemission von Photosystem I. Die Verstärkung war dabei in allen Fällen stark von der Wellenlänge abhängig. Besonders zu kürzeren Wellenlängen hin wurde Fluoreszenzemission von Emittern beobachtet, die ohne Kopplung mit Nanostrukturen nur sehr geringe Fluoreszenz zeigen. Außerdem wurde das Fluoreszenzspektrum einzelner PSI-Komplexe durch die Kopplung mit den Nanostrukturen unterschiedlich stark verändert, weil durch die Größe der PSI-Komplexe die Verstärkung der einzelnen Emitter abhängig von der Orientierung des Komplexes zu den Nanostrukturen und dem dadurch veränderten Abstand variiert. Zusätzlich zeigte ein Vergleich der Eigenschaften der verschiedenen Nanostrukturen, dass die auch als Fischer-Pattern bekannten hexagonal angeordneten Nanodreiecke besonders gut für Fluoreszenzexperimente geeignet sind, da sie selbst nur schwach lumineszieren und daher die Fluoreszenzemission der untersuchten Moleküle kaum überlagern.

Proceedings of the WELCOME Scientific Meeting on Hybrid Nanostructures, Toruń, Poland, August 28–31, 2011

Interactions of Photosystem I with Plasmonic nanostructures

M. HUSSELS^a, J.B. NIEDER^{b,*}, C. ELSÄSSER^b AND M. BRECHT^{a,†}

^aUniversität Tübingen, IPTC and Lisa+ Center, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen, Germany

^bFachbereich Physik, Freie Universität Berlin, Arnimallee 14, 14195 Berlin, Germany

The plasmonic interaction effects of various nanostructures on the fluorescence properties of photosystem I as found by single-molecule spectroscopy are summarized. The used nanostructures are spherical Au nanoparticles, silver island films as well as hexagonal arrays of nanometer-sized Au- and Ag-triangles (the Fischer patterns). The fluorescence emission of photosystem I is intensified due to coupling with these nanostructures. For single photosystem I complexes, enhancement factors of up to 37 were observed. The average enhancements vary between 2.2 for Au Fischer pattern and 9 for spherical Au nanoparticles. The enhancement of the fluorescence of photosystem I demonstrates in all cases a strong wavelength dependence. This wavelength dependence can be explained by the spatially largely extended multichromophore composition of photosystem I complexes. From the viewpoint of the usability of these nanostructures for spectroscopic signal enhancement, the Fischer patterns are beneficial, due to their very low autoluminescence.

PACS: 73.20.Mf, 87.64.kv, 87.80.Nj

1. Introduction

Metallic nanostructures in combination with proteins connected to their surface (bio-nanohybrids) provide one of the most adaptable architecture for design and implementation of bio-functionality at the nanoscale [1, 2]. The broadness of the field of applications relies on the malleable characteristics of nanostructures combined with the vast diversity of protein functions [2]. One field of research deals with improving the applicability of plasmonic nanostructures for absorption/emission enhancement of fluorophores [3]: this is useful for e.g. increasing sensitivity of fluorescence-based assays in drug discovery and high throughput screenings.

Biophysical applications using nanostructures must be carefully designed because the interaction between proteins and metal nanostructures can lead to modifications of both interaction partners. While molecular adsorbates on the surfaces of nanoparticles can modify the surface plasmon resonances [4], the plasmonic interaction can also affect protein function [5]. As a consequence, a deep understanding of the fundamental interaction mechanisms between metal nanostructures and proteins is necessary for the design of hybrids with tailored properties.

An advantage for all techniques using the absorption/emission properties of the chromophores is that chromophores close to metal nanoparticles are less prone to optical saturation and thus have a higher maximum emission rate and show dramatically decreased fluorescence

lifetimes [6]. Thus nanoparticles can be utilized to enhance the signal of chromophores in a simple way, a beneficial effect especially for single-molecule techniques, where the detection of fluorophores is often limited by low signal intensities.

In this work, we compare the effects of the coupling of photosystem I (PSI) to ordered and unordered nanoparticle assemblies. The unordered assemblies are: silver island films (SIF) and colloidal solutions of spherical Au nanoparticles (AuNP); and the ordered nanostructures are periodic patterns of hexagonal arranged Au- (Au Δ) or Ag-triangles (Ag Δ).

The Ag nanostructures of the SIF are of various widths and heights as can be seen in the atomic force microscopy (AFM) scan of the surface (see Fig. 1a). The colloidal gold nanospheres show a more uniform size with a diameter of 100 nm and are randomly distributed in the sample. The hexagonal arranged Au Δ or Ag Δ are also known as Fischer patterns, an AFM image of such type of structures is shown in Fig. 1b [7]. Such patterns can be produced by nanosphere lithography [8, 9]; an inexpensive, inherently parallel, high-throughput nanofabrication technique capable of producing well-ordered 2D periodic nanostructure arrays from all different kinds of vaporizable materials [8, 9]. The size of the nanostructures can be tuned by varying the basis length of the structuring nanospheres and their thickness can be controlled by the metal's evaporation conditions.

The experiments described here were carried out on spatially separated single PSI trimers. Hybrids made of PSI and metal nanoparticles serve as a potential building block of hybrid solar cells. The capability of PSI hybrids for the production of biofuels such as H₂ was shown by Grimme et al. in Ref. [10]. In addition, PSI serves as a model system for biological light harvesting and charge separation processes. PSI's main function is to capture and convert solar energy into electrical energy. Almost 100 chlorophylls per PSI monomer are involved in light

* Present address: ICFO — Institut de Ciències Fotòniques, Av. Carl Friedrich Gauss num. 3, 08860 Castelldefels, Barcelona, Spain.

† corresponding author

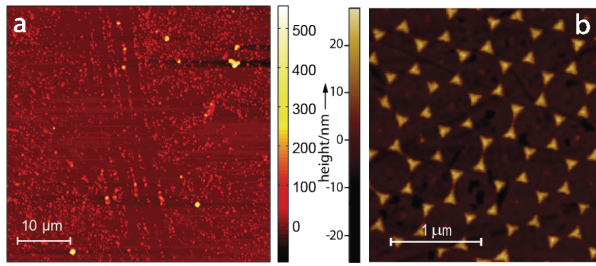


Fig. 1. AFM images of SIF (a) and Au Δ (b) taken with modifications from Refs. [5, 32].

harvesting, excitation energy transfer and charge separation [11–13]. PSI can be regarded as a natural solar cell absorbing across a wide spectral range covering $\approx 45\%$ of the solar radiation at Earth’s surface. The unique quantum yield of ≈ 1 for charge separation contributes to the attraction of PSI for electrochemical approaches for the conversion of light energy into electrical [14–18] or chemical energy [10, 19, 20]. Among the 100 chlorophylls some chlorophyll dimers and trimers with lower site energies than the reaction center with its main absorbance at 700 nm (P700) were found [21–26]. Although activation energy for the uphill energy transfer towards P700 is required, these low energy chlorophylls are nevertheless involved in the excitation energy transfer towards the reaction centers. Due to these astonishing properties, the so-called red chlorophylls are of great interest and their function is still under debate [25, 26]. The transfer from the different red states to P700 is blocked at low temperatures and the energy is partially released as fluorescence emission detectable down to the single-molecule level [27–29]. Several of these red chlorophylls contribute to the fluorescence spectrum of single PSI trimers. They differ in their site energies, intensities and susceptibility for spectral diffusion. Therefore, sharp stable lines as well as broad intensity distributions are present in the spectra of single PSI complexes. The sharp lines represent chlorophylls that are affected by spectral diffusion with low rates. The probability of observing those sharp lines stable in wavelength is high in the wavelength region between 700 and 715 nm. The broad intensity distributions are due to chlorophylls that are affected by spectral diffusion with much higher rates. These distributions dominate the spectra at longer wavelength [29, 30].

2. Material and methods

Isolated and purified PSI trimers from *Th. elongatus* (procedure described in Ref. [31]) were diluted in buffer solution for single-molecule measurements as described in Refs. [5, 32]. The experiments on PSI trimers are comprised of two different experiments. One experiment was performed starting with a PSI solution obtained from the resolubilization of PSI crystals [5] and the other with a PSI solution where glycerol was added for storage at cryogenic temperatures [32]. To couple PSI to AuNP (PSI–

AuNP) an excess of colloidal gold nanospheres of approximately 100 nm diameter (BBInternational) was added to the PSI buffer solution (AuNP:PSI ratio *ca.* 12:1). To couple PSI to the nanostructures (SIF, Au Δ and Ag Δ) the diluted PSI solution was placed on top of these surfaces, a detailed description is given in Refs. [5, 32]. The preparation of SIF was performed as described in paper of Chowdhury et al. [33].

Figure 1a shows an AFM image of a SIF structure as used for the described experiments. The Fischer patterns were produced by nanosphere lithography as described in Refs. [8, 32].

Figure 1b shows an AFM image of an Ag Δ structure as used for the described experiments. Experiments were carried out using a home-built confocal microscope operating at 1.3 to 1.4 K as recently described in Ref. [34]. The usual exposure time for each spectrum was 1 s in a sequence of spectra resulting in a typical S/N-ratio of > 6 for single uncoupled PSI complexes at an excitation power of 100 μ W.

3. Results and discussion

Figure 2 shows a collection of fluorescence intensity scans taken for the various PSI containing samples as well as for the bare nanostructures. All scans are taken under identical experimental conditions and shown with an identical intensity color scale. The scans in the first row 2a–e are recorded on a sample of pure PSI and on the hybrid samples composed of highly diluted PSI and the respective nanoassembly, they are referred as: uncoupled PSI, PSI–AuNP, PSI–Au Δ , PSI–SIF, and PSI–Ag Δ respectively [5, 32]. A qualitative increase of the intensity from the sample solely containing PSI to the PSI-hybrids is obvious. In the second row 2f–i intensity scans taken on the bare nanostructures are shown [5, 32]. The Au Δ show minor intensity contributions, barely observable with the given intensity scale (Fig. 2g). For AuNP, Ag Δ , and SIF intense spots can be observed even without the presence of PSI complexes. The spots of Ag Δ are lower in intensity than those observed in the scan of PSI–Ag Δ and the contributions are uniformly distributed over the whole scanned area. The signal intensities of the SIF and AuNP are comparable with those detected for PSI containing samples, but the number of spots per sample area is comparatively small.

The spectral analysis of these luminescence contributions shows that the signals from the nanostructures are well distinguishable from PSI fluorescence emission, see Refs. [5, 32]. To study the influence of the nanostructures on the fluorescence emission properties of PSI, spectra from intense spots in the pure and in the hybrid samples were collected, sorted out if associated to nanostructure luminescence, and compared. All spectra taken on various intensity spots of the PSI–Au Δ as well as on the PSI–Ag Δ show PSI fluorescence emission characteristics and thus sorting was not necessary for these hybrid structures.

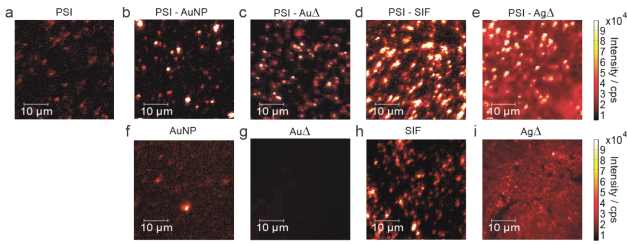


Fig. 2. Fluorescence intensity scans of PSI/PSI-nanohybrids (first row) and of the nanoassemblies without PSI (second row): scans of PSI on bare quartz (a), PSI-AuNP (b), PSI-Au Δ (c), PSI-SIF (d), and PSI-Ag Δ (e), AuNP (f), Au Δ (g), SIF (h), and Ag Δ (i). The fluorescence intensity scans were acquired with an integration time of 2 ms per pixel. An identical color-scale range was chosen for all data sets. Images are taken from Refs. [5, 32].

Overall, 162 sequences for PSI-Au Δ , 158 for PSI-AuNP, 118 sequences for PSI-Ag Δ , 72 for PSI-SIF, and 295 for PSI in buffer were recorded. The sequences for PSI in buffer are based on two different sample preparations (see Sect. 2). For each preparation 148 and 147 sequences were taken as described in Refs. [5, 32].

The distribution of enhancement factors was determined by comparing the intensities of single PSI complexes in the respective hybrid sample to the average intensity in the uncoupled configuration. For this procedure, an average intensity for uncoupled PSI must be determined.

The collection of the intensities of uncoupled PSI complexes shows a nearly Gaussian shaped distribution as shown in the histogram in Fig. 3. The maximum of this distribution corresponds to the mean intensity of uncoupled PSI (Fig. 3) and can be equalized with an enhance-

ment factor of 1. The x -axis of the histogram is normalized to this mean, thus defining the enhancement factor. Figure 3 shows the distribution of enhancement factors for PSI-Au Δ and PSI-Ag Δ . The appropriate distributions for PSI-AuNP and PSI-SIF can be found in Fig. 3 in Ref. [5]. The distributions for PSI-Au Δ (blue) and PSI-Ag Δ (lilac) — as well as for PSI AuNP and PSI-SIF [5] — are asymmetric, largely extending to the high-intensity sides. The maximum intensity found for an individual PSI-Au Δ /PSI-Ag Δ measures 10.5/15 times the average intensity of uncoupled PSI. The average enhancement factor based on the histograms is 2.2 for PSI-Au Δ and 5.7 for PSI-Au Δ . For PSI-SIF and PSI-AuNP, the maximum observed enhancements are 36 and 37; and the average enhancements are 7 and 9, respectively. The different enhancement values are collected in Table.

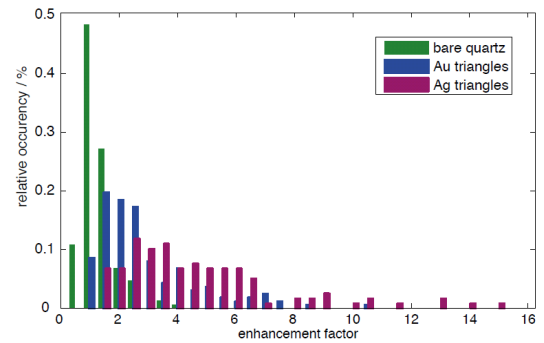


Fig. 3. Intensity histograms of PSI signals (green), PSI-Au Δ (blue), and PSI-Ag Δ (lilac). The intensities of the individual complexes were obtained from spectrally resolved data. The counts detected in the wavelength region 695–780 nm were integrated after subtraction of a constant background to eliminate dark counts and stray light. Finally, these values were summarized for the first 120 s of the sequences. The figure is taken with modifications from Ref. [32].

TABLE

The deviations* of the maximum values are due to differences in the PSI preparation, see Sect. 2 and Refs. [5, 32].

Sample	PSI	PSI-Au Δ	PSI-AuNP	PSI-Ag Δ	PSI-SIF
emission maximum	729.9/727*	729.5	732	731.3	719
FWHM	27.6/33*	33.3	52	38.7	37
average enhancement	–	2.2	9	5.7	7
max. enhancement	–	10.5	37	15	36

Plasmonic interaction generally depends on the spectral resonance condition between chromophores and surface plasmons, their intersystem distance and their relative orientations. The electric field close to the nanostructures shows a strong spatial variation [35, 36]. For triangles in hexagonal Fischer patterns very high field enhancements are observed at positions on the tips (apex) of the triangles, whereas at the edges of vanishing field en-

hancements are found [35, 36]. Anger et al. [37] observed the following distance dependence for fluorescence emission enhancement for a fluorophore in resonant coupling conditions to a spherical AuNP: quenching of the fluorescence at distances shorter than approximately 2 nm, maximum enhancement at approximately 5 nm, and exponential decay at longer distances leading to vanishing enhancements at around 80 nm distance. In the investi-

gated samples, the PSI complexes are randomly oriented with respect to the plasmonic structures. As a consequence, PSI complexes will be present in regions with both low as well as high field enhancement, resulting in the broad distribution of enhancement factors observed (Fig. 3). The enhancement factors observed for PSI-SIF and PSI-AuNP are comparable with the reported values for other fluorophore-metal nanostructure assemblies, whereas the enhancement factors for PSI-Au Δ and PSI-Ag Δ are smaller in magnitude [5, 6, 37–42].

All plasmonic nanostructures lead to increased emission of the deposited PSI complexes. The evaluation of data for PSI-SIF and PSI-AuNP is more demanding, because in these cases the background signals of the nanostructures are not negligible. An analysis to distinguish between contributions stemming from PSI and that from the nanostructures proved unnecessary for PSI-Au Δ and PSI-Ag Δ . This provides an advantage as compared to the strong background signals observed for spherical AuNP and SIFs [5]. Although, the arrays of Au Δ and Ag Δ show smaller enhancement values as compared to AuNP and SIF, the low autoluminescence makes these nanostructures preferential tools for spectroscopy.

Figure 4 shows the average spectra of all spectra taken on individual uncoupled PSI, PSI-AuNP, PSI-SIF, PSI-Ag Δ , and PSI-Au Δ . The spectra were scaled to similar magnitude. The maxima positions and the full width at half maximum (FWHM) are given in Table. Modifications of the emission profiles induced by interaction with the nanostructures are clearly visible. These modifications depend on the wavelength e.g. the emission at the blue side of the profile shows much stronger enhancement than that found in the red part of the spectrum.

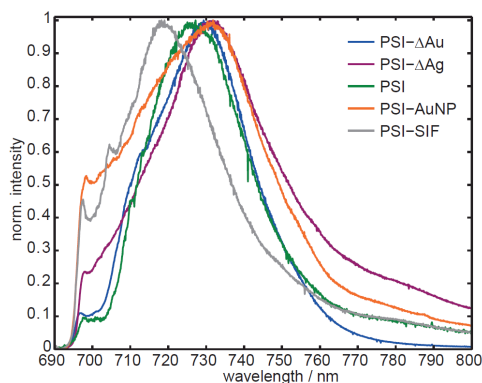


Fig. 4. Averaged spectra obtained from summation of spectra from all single PSI complexes (from *Th. elongatus*) obtained for uncoupled PSI, PSI-AuNP, PSI-SIF, PSI-Au Δ , and PSI-Ag Δ . The spectra were scaled to similar maximum values.

The wavelength-dependence of the enhancement can be obtained by dividing the average spectra of the different hybrids by that of uncoupled PSI. The resulting curves for the enhancement are shown in Fig. 5. It should be noted that the procedure chosen here depends cru-

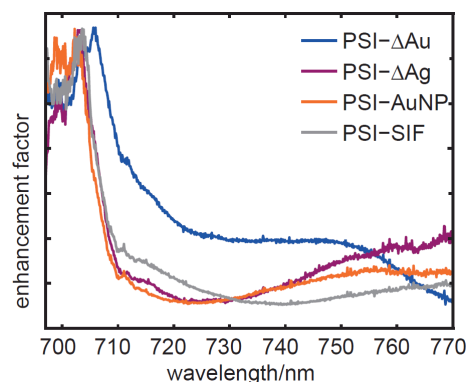


Fig. 5. Wavelength dependence of the fluorescence enhancement. For this representation the average spectra of PSI-AuNP, PSI-SIF, PSI-Au Δ , and PSI-Ag Δ were divided by the average spectrum of uncoupled PSI. The data were scaled to similar amplitude.

cially on the elimination of background contributions and consequently the error for the determination of the enhancement factor becomes larger in the spectral region with low intensity. For better comparability the curves are scaled to similar maximum/minimum values in the given wavelength range. The fluorescence emission in the range 698–712 nm shows large relative enhancements for all structures. Compared to that, the wavelength region > 712 nm remains rather featureless.

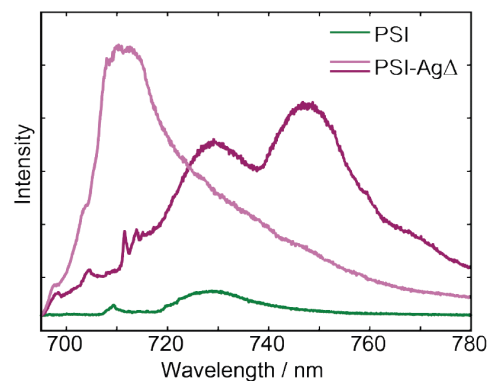


Fig. 6. Three spectra of single PSI complexes taken with identical experimental settings are shown: uncoupled PSI (green) and PSI-Ag Δ (lilac). Taken with modifications from Refs. [32].

Figure 6 shows the emission spectra of one uncoupled PSI complex (green line) and two single PSI complexes coupled to Ag Δ (light and dark lilac). The spectra of these PSI-Ag Δ represent extreme cases of wavelength-dependent enhancement. One spectrum (light lilac) is highly enhanced in the region around 710 nm. Compared with the average value of uncoupled PSI, this region is enhanced by a factor of ≈ 100 . The strong enhancement of the short-wavelength region indicates an enhanced fluorescence deactivation of the higher energy antenna pig-

ments, which show virtually no fluorescence in absence of plasmonic structures. The other spectrum (black) shows an example for strong enhancement at the red edge of the PSI emission. The emission in the red spectral region is due to the emission of far-red chlorophylls. The fluorescence of these chlorophylls is completely quenched if the reaction center is in the oxidized form ($P700^+$). The oxidized form is in almost all cases present in the uncoupled PSI, because the high excitation rates used during the experiments are much higher than the rate of charge recombination [26]. Under these experimental conditions the emission of the far red states is quenched by $P700^+$ and escapes the detection in uncoupled PSI [26]. The high intensity of this contribution can only be explained by a dramatic change of the time scales involved in the quenching processes, e.g. the fluorescence lifetime of the far-red chlorophylls, energy transfer to the quenching site or charge recombination ($P700^+ \rightarrow P700$).

The shape of the emission spectra of the PSI-nanoparticle hybrids shows clear deviations from linear enhancement. Such deviations stand in contrast to observations for single chromophores and two-chromophore FRET-coupled systems as the peridinin-chlorophyll protein close to plasmonic structures [3, 6].

The extinction spectra of the used nanostructures show only a weak variation ($\approx 20\%$) [2, 36, 43] over the emission range of PSI. This variation is much smaller than the variation of the enhancement factor observed for the PSI-nanohybrids (Fig. 5). Therefore we assume that the observed emission profile changes cannot be explained by simple convolution of PSI emission with the plasmon spectra (plasmonic shaping). The deviations from the linear enhancement must rather be rationalized by intrinsic properties of PSI, as they are: a large lateral extension of the molecular complex and the specific couplings of the chromophores within the complex.

The shape of a PSI trimer can be approximated by a cylinder measuring around 20 nm in diameter and approximately 5 nm in height.

Figure 7 shows a scheme where the extension of PSI is compared to an enhancement curve as measured for spherical AuNP in resonant coupling conditions with a fluorophore according to Ref. [37]. If the PSI complex is located close to the surface of the nanoparticle, some chlorophylls are in the quenching regime, whereas others are in conditions for maximum enhancement.

Therefore, the shape of the emission spectrum of an individual PSI complexes close to a nanostructure can deviate remarkably from the shape of uncoupled PSI (Fig. 6). The chromophores in light harvesting systems are coupled to ensure fast and efficient energy transfer to the reaction centers [21]. The energy transfer efficiency depends on the spectral overlap, spatial separation, and orientation of the involved chromophores [44]. The specific coupling conditions between the chromophores lead to a characteristic set of transition rates and thus to preferred energy transfer pathways [44, 45]. The interaction between coupled chromophores and plasmonic struc-

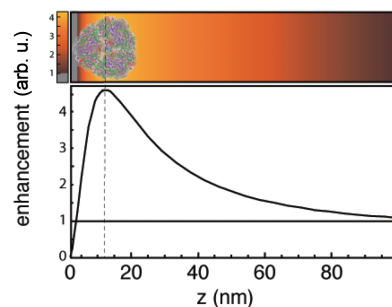


Fig. 7. Illustration of the distance dependence of the enhancement factor. On top, the enhancement factor depends on the distance between chromophores in PSI and the surface of the metal nanoparticle. The structure of a PSI trimers is given and the region of quenching and enhancement are color coded as given. The curve given below visualizes the slope of the enhancement in more detail; the curve is adapted from Ref. [37].

tures alters Förster-interaction distances between chromophores [46]. The exciton distribution on the chromophores of PSI most probably gets largely changed as a result of these plasmonic interaction effects. Additional energy transfer pathways will be formed and chlorophylls that do not participate in the native/uncoupled state could be involved. In addition, chromophores, which were almost non-fluorescent before become fluorescent. Particularly, we observed such an enhanced fluorescence emission from energetically higher lying chlorophyll states, indicating an overall reduced excitation feeding of the reaction center.

4. Conclusion

In conclusion, the investigated PSI-nanohybrids (AuNP, Au Δ , SIF, and Ag Δ) show increased fluorescence compared to uncoupled PSI. The average enhancement varies between 2.2 and 9. For all PSI-nanohybrids the enhancement depends strongly on the wavelength. The alteration of the shapes of the fluorescence spectra upon plasmonic interaction of PSI with the nanostructures can be explained by the spatial extension of the chromophore system in PSI together with the coupling between the chromophores. Especially, we observe additional spectral contributions on the short wavelength side of the fluorescence emission spectrum of PSI, indicating fluorescence emission from energetically higher lying states, which are almost non-fluorescent in uncoupled PSI.

Acknowledgments

Single-molecule experiments were carried out in the laboratory of Prof. Robert Bittl (Free University Berlin); his continuous support is gratefully acknowledged. Nanostructures were prepared in the laboratory of Prof. Paul Fumagalli (Free University Berlin); his continuous support is gratefully acknowledged. The AFM images were taken in the group of Prof. J.I. Pascual and Prof. S. Reich, their support is gratefully acknowledged. We

thank Eberhard Schlodder for PSI samples and fruitful discussions. This work is supported by Free University Berlin initiative — “Nanoscale: Nanoskalige Funktionsmaterialien”, the Cluster of Excellence: “Unifying Concepts in Catalysis” and the Heisenberg Program of the DFG (BR4102/1-1, BR4102/2-1).

References

- [1] K. Aslan, I. Gryczynski, J. Malicka, E. Matveeva, J.R. Lakowicz, C.D. Geddes, *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 55 (2008).
- [2] J.N. Anker, W.P. Hall, O. Lyandres, N.C. Shah, J. Zhao, R.P. Van Duyne, *Nature Mater.* **7**, 442 (2008).
- [3] J.R. Lakowicz, K. Ray, M. Chowdhury, H. Szmajcinski, Y. Fu, J. Zhang, K. Nowaczyk, *Analyst* **133**, 1308 (2008).
- [4] L. Shang, Y.Z. Wang, J.G. Jiang, S.J. Dong, *Langmuir* **23**, 2714 (2007).
- [5] J.B. Nieder, R. Bittl, M. Brecht, *Angew. Chem.-Int. Ed.* **49**, 10217 (2010).
- [6] S. Mackowski, S. Wormke, A.J. Maier, T.H.P. Brotsudarmo, H. Harutyunyan, A. Hartschuh, A.O. Govorov, H. Scheer, C. Bräuchle, *Nano Lett.* **8**, 558 (2008).
- [7] U.C. Fischer, H.P. Zingsheim, *J. Vac. Sci. Technol.* **19**, 881 (1981).
- [8] A. Kosiorek, W. Kandulski, P. Chudzinski, K. Kempa, M. Giersig, *Nano Lett.* **4**, 1359 (2004).
- [9] J.C. Hulthen, R.P. van Duyne, *J. Vac. Sci. Technol. A-Vac. Surf. Films* **13**, 1553 (1995).
- [10] R.A. Grimme, C.E. Lubner, D.A. Bryant, J.H. Golbeck, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6308 (2008).
- [11] P. Fromme, P. Jordan, N. Krauss, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1507**, 5 (2001).
- [12] P. Jordan, P. Fromme, H.T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, *Nature* **411**, 909 (2001).
- [13] *Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin:Ferredoxin Oxidoreductase*, Ed. J.H. Golbeck, Springer, Berlin 2006.
- [14] A.O. Govorov, I. Carmeli, *Nano Lett.* **7**, 620 (2007).
- [15] R. Das, P.J. Kiley, M. Segal, J. Norville, A.A. Yu, L.Y. Wang, S.A. Trammell, L.E. Reddick, R. Kumar, F. Stellacci, N. Lebedev, J. Schnur, B.D. Bruce, S.G. Zhang, M. Baldo, *Nano Lett.* **4**, 1079 (2004).
- [16] L. Frolov, Y. Rosenwaks, C. Carmeli, I. Carmeli, *Adv. Mater.* **17**, 2434 (2005).
- [17] A.O. Govorov, *Adv. Mater.* **20**, 4330 (2008).
- [18] N. Terasaki, N. Yamamoto, T. Hiraga, Y. Yamanoi, T. Yonezawa, H. Nishihara, T. Ohmori, M. Sakai, M. Fujii, A. Tohri, M. Iwai, Y. Inoue, S. Yoneyama, M. Minakata, I. Enami, *Angew. Chem.-Int. Ed.* **48**, 1585 (2009).
- [19] C.E. Lubner, R. Grimme, D.A. Bryant, J.H. Golbeck, *Biochemistry* **49**, 404 (2010).
- [20] H. Krassen, A. Schwarze, B. Friedrich, K. Ataka, O. Lenz, J. Heberle, *ACS Nano* **3**, 4055 (2009).
- [21] B. Gobets, R. van Grondelle, *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 80 (2001).
- [22] M. Byrdin, I. Rimke, E. Schlodder, D. Stehlik, T.A. Roelofs, *Biophys. J.* **79**, 992 (2000).
- [23] L.O. Palsson, J.P. Dekker, E. Schlodder, R. Monshouer, R. van Grondelle, *Photosynth. Res.* **48**, 239 (1996).
- [24] A.N. Melkozernov, *Photosynth. Res.* **70**, 129 (2001).
- [25] N.V. Karapetyan, E. Schlodder, R. van Grondelle, J.P. Dekker, in: *Advances in Photosynthesis and Respiration, vol. 24, Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin:Ferredoxin Oxidoreductase*, Ed. J.H. Golbeck, Springer, Berlin 2006.
- [26] E. Schlodder, M. Hussels, M. Cetin, N.V. Karapetyan, M. Brecht, *BBA — Bioenergetics* **1807**, 1423 (2011).
- [27] F. Jelezko, C. Tietz, U. Gerken, J. Wrachtrup, R. Bittl, *J. Phys. Chem. B* **104**, 8093 (2000).
- [28] A.F. Elli, F. Jelezko, C. Tietz, H. Studier, M. Brecht, R. Bittl, J. Wrachtrup, *Biochemistry* **45**, 1454 (2006).
- [29] M. Brecht, H. Studier, A.F. Elli, F. Jelezko, R. Bittl, *Biochemistry* **46**, 799 (2007).
- [30] M. Brecht, *Mol. Phys.* **107**, 1955 (2009).
- [31] P. Fromme, H.T. Witt, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1365**, 175 (1998).
- [32] M. Brecht, M. Hussels, J.B. Nieder, C. Elsässer, *Chem. Phys.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphys.2012.05.005> (2012).
- [33] M.H. Chowdhury, K. Ray, K. Aslan, J.R. Lakowicz, C.D. Geddes, *J. Phys. Chem. C* **111**, 18856 (2007).
- [34] M. Hussels, M. Brecht, *Biochemistry* **50**, 3628 (2011).
- [35] B.C. Galarreta, P.R. Norton, F. Lagugne-Labarthet, *J. Phys. Chem. C* **114**, 19952 (2010).
- [36] B.C. Galarreta, E. Harte, N. Marquestaut, P.R. Norton, F. Lagugne-Labarthet, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 6810 (2010).
- [37] P. Anger, P. Bharadwaj, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 113002 (2006).
- [38] Y. Chen, K. Munechika, D.S. Ginger, *Nano Lett.* **7**, 690 (2007).
- [39] S. Kuhn, U. Hakanson, L. Rogobete, V. Sandoghdar, *Phys. Rev. Lett.* **97**, 017402 (2006).
- [40] J. Enderlein, *Biophys. J.* **78**, 2151 (2000).
- [41] P.P. Pompa, L. Martiradonna, A. Della Torre, F. Della Sala, L. Manna, M. De Vittorio, F. Calabi, R. Cingolani, R. Rinaldi, *Nature Nanotechnol.* **1**, 126 (2006).
- [42] S. Vukovic, S. Corni, B. Mennucci, *J. Phys. Chem. C* **113**, 121 (2009).
- [43] J.R. Lakowicz, Y.B. Shen, S. D'Auria, J. Malicka, J.Y. Fang, Z. Gryczynski, I. Gryczynski, *Anal. Biochem.* **301**, 261 (2002).
- [44] M. Byrdin, P. Jordan, N. Krauss, P. Fromme, D. Stehlik, E. Schlodder, *Biophys. J.* **83**, 433 (2002).
- [45] M. Brecht, V. Radics, J.B. Nieder, R. Bittl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 11857 (2009).
- [46] J. Zhang, Y. Fu, M.H. Chowdhury, J.R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. C* **111**, 11784 (2007).

Kapitel 10

Confocal sample-scanning microscope for single-molecule spectroscopy and microscopy with fast sample exchange at cryogenic temperatures

In diesem Kapitel wird der Aufbau eines konfokalen Mikroskops mit Probenscanning und der Möglichkeit zum schnellen Probentausch bei tiefer Temperatur beschrieben. Mit dem hier beschriebenen Aufbau kann Einzelmolekülspektroskopie und Mikroskopie bei Temperaturen zwischen 1,4 K und 300 K durchgeführt werden. Der Aufbau zeichnet sich durch die Verwendung von Piezoscannern zur Rasterung der Probe in Kombination mit einem magnetischen Probenwechselsystem für tiefe Temperaturen aus. Diese Kombination ist eine wesentliche Weiterentwicklung und war bisher nicht verfügbar. Der Transfer einer Probe in das Mikroskop ist so in wenigen Sekunden möglich, so dass sogar bereits gefrorene Proben verwendet werden können. Die Rasterung der Probe mittels eines Piezoscanners, auf dem diese montiert ist, hat gegenüber dem häufig in der Tieftemperaturmikroskopie verwendeten Laserscanning den Vorteil, dass die Abbildungsqualität des Objektivs wenig Einfluss auf das Rasterbild hat und die volle Apertur des Mikroskopobjektivs ausgenutzt werden kann.

Confocal sample-scanning microscope for single-molecule spectroscopy and microscopy with fast sample exchange at cryogenic temperatures

Martin Hussels, Alexander Konrad, and Marc Brecht^{a)}

Universität Tübingen, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie and LISA+ Center, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen, Germany

(Received 28 June 2012; accepted 19 November 2012; published online 12 December 2012)

The construction of a microscope with fast sample transfer system for single-molecule spectroscopy and microscopy at low temperatures using 2D/3D sample-scanning is reported. The presented construction enables the insertion of a sample from the outside (room temperature) into the cooled (4.2 K) cryostat within seconds. We describe the mechanical and optical design and present data from individual Photosystem I complexes. With the described setup numerous samples can be investigated within one cooling cycle. It opens the possibility to investigate biological samples (i) without artifacts introduced by prolonged cooling procedures and (ii) samples that require preparation steps like plunge-freezing or specific illumination procedures prior to the insertion into the cryostat. © 2012 American Institute of Physics. [<http://dx.doi.org/10.1063/1.4769996>]

I. INTRODUCTION

The spectroscopy of individual molecules, nanoparticles, or proteins requires optical setups with the ability to separate single particles or molecules from their surrounding, suppress the background sufficiently, and collect the luminescence with high efficiency. One option to manage this is using the confocal principle.^{1,2} Two main principles to scan the laser focus over the sample are used typically. One is to move the laser focus while the sample is fixed; this approach is often referred to as confocal laser scanning microscopy (CLSM). The second is to move the sample (sample scanning) while the position of the laser focus is fixed. Both scanning approaches are available at room and low temperatures. In the following, we focus on low temperature experiments.

At cryogenic temperatures, one has to face challenges due to the reduced imaging quality of available microscope objectives (MOs) and several limitations for using movable parts inside the cryostat. For CLSM, the beam is deflected by movable mirrors or lenses, which can be positioned outside the cryostat. The excitation laser focus is moved over the sample by the motion of these mirrors or lenses. As a consequence, no movable parts have to be placed inside the cryostat for 2D imaging of a sample making the construction of the probe-head easier. Therefore, this approach is quite often used for low temperature experiments.^{3,4} In CLSM, the focus point is moved within the focal plane of the MO to acquire an image. The quality of the resulting image depends directly on the quality of the MO. Poor quality of commercially available MOs is a long-standing hurdle in low temperature microscopy. During the last years various approaches were reported using different types of MOs like mirror optics, gradient-index (GRIN) lenses or solid immersion lenses to overcome this drawback.^{1,5-7} Unfortunately, none of these approaches yield an image quality comparable to that available at room temperature. This influence of the MO on the

optical quality of the image can be reduced by using sample scanning instead of laser scanning. Therefore, the sample has to be mounted on a desk that can be moved for scanning. Then the fixed laser-beam can be aligned directly along the optical axis of the MO. In this approach, the off-axis performance of the MO is not important for the image quality. The desk moving the sample has to be implemented inside the cryostat, which implies technical difficulties in the probe-head design. The first setup using piezoelectric sliders and scanners with large range for single-molecule imaging and spectroscopy at low temperature was built by Segura *et al.* in 2000.⁸ Today, dynamic piezoelectric sliders and scanners for implementation of sample scanning at low temperature providing lateral and vertical translations of the desk are commercially available,⁹ and an extension to 3D scanning is also possible.

For sample scanning, the sample has to be mounted on the scanning desk. In the already described systems using sample scanning at low temperatures, the sample is mounted on the desk before insertion of the probehead into the cryostat and then cooled down. With this approach exchanging the sample during one cooling cycle, which usually lasts several days, is not possible. Samples mounted inside the cryostat from beginning of the cooling cycle are exposed for long time to a dry helium atmosphere. This exposure causes artifacts if the sample is sensitive to drying up like proteins and other biological samples. With the aim to avoid such artifacts, proteins are often embedded in polyvinyl alcohol (PVA) matrices instead of water-based buffer solutions. Unfortunately, PVA induces large changes into the structure of proteins; therefore this type of sample preparation is not able to produce valuable results as recently shown by us.¹⁰ To avoid this, biological samples should be introduced into the pre-cooled cryostat hampering drying and enabling the observation in aqueous solution.

In this article, we report the construction of a fast transfer system for single-molecule spectroscopy and microscopy at low temperatures that enables the insertion of a sample

^{a)}Telephone: +49-7071-29-76239. Fax: +49-7071-29-5490. E-mail: marc.brecht@uni-tuebingen.de.

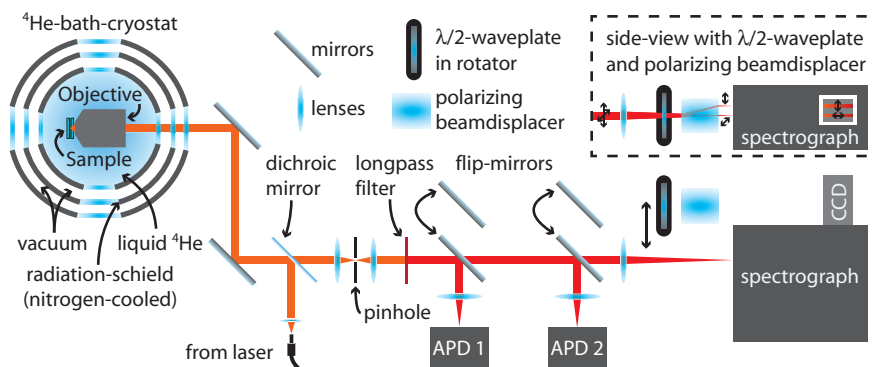


FIG. 1. Scheme of the setup for low temperature confocal imaging and spectroscopy. For details see Sec. II A.

from the outside onto the scanning desk in the cooled (4.2 K) cryostat. We report results of first experiments showing single-molecule data of Photosystem I protein complexes. With the described setup numerous samples can be investigated within one cooling cycle. Additionally, it opens the possibility to investigate biological samples very close to their native state.

II. DESCRIPTION OF THE SETUP

A. Design of the confocal microscope

Figure 1 shows the setup of our home-built confocal microscope. The microscope is mounted on a damped optical table. During measurement the sample and the MO (Mikrothek, $60\times$ NA = 0.85) are immersed in liquid Helium inside a bath-cryostat (SVT-200, Janis). Temperatures below 4.2 K are generated by pumping the Helium gas with a Edwards TwoStage E2M80 combined with a Edwards EH250 booster pump. The temperature is measured close to the sample by a LakeShore Model 336 temperature controller equipped with a Cernox sensor (CX-1030-SD-HT 0.3L).

For excitation we use a fiber-coupled 665 nm *cw* diode-laser (iBEAM-660-3V2, TOPTICA Photonics). The laser is coupled into the setup using a dichroic mirror (ZQ670RDC, AHF Analysentechnik). The excitation light is then aligned along the optical axis of the MO to get an optimal focus. The emitted light passes the dichroic mirror, a 50 μm pinhole, and a longpass filter (HQ 695 LP, AHF Analysentechnik), and then it can be detected by two different avalanche photodiodes (APDs) and a CCD-camera mounted on a spectrograph. The different detectors for the emission light are selected by computer-controlled flip mirrors. The first APD (APD 1, COUNT-100C, Laser Components) is used for imaging of the sample and has a dark count rate <20 c/s. The second APD (APD 2, PD1CTC, Micro Photon Devices) is used for time correlated single photon counting (TCSPC) and fluorescence-lifetime imaging (FLIM) measurements and has pulse rise time <50 ps to gain good time resolution. For data acquisition of the APD signals a National Instruments NI6601 counter board and a Becker & Hickl TCSPC-module (SPC-130) are used. For TCSPC/FLIM-measurements a 670 nm pulsed diode laser (LDH-P-670, PicoQuant) is used for excitation instead of the *cw*-laser. For spectroscopy we use an An-

dor Newton back illuminated deep depleted CCD (DU920P-PR-DD) mounted on a Shamrock 500 spectrograph with 200 lines/mm and 400 lines/mm gratings. For polarization measurements a combination of a $\lambda/2$ -waveplate (10RP52-2, Newport) on a motorized rotator (PRM1/MZ8, Thorlabs) and a polarizing beam displacer (BD27, Thorlabs) can be driven into the optical path in front of the spectrograph.

The polarizing beam displacer splits the light into two beams with perpendicular polarization, which can be acquired individually by the CCD-camera. In combination with the rotating $\lambda/2$ -waveplate it is possible to measure the polarization spectrally resolved.

The whole setup is controlled by a self-developed LabVIEW software. The software controls all components described above. The special aim of the software is to simplify the acquisition of high resolution spectroscopic data on >100 individual molecules/proteins within several hours. To obtain such high numbers of different measurements the software provides different standard data acquisition types: 2D/3D intensity scan, time correlated single photon counting, single spectrum, spectra series, single spectrum with polarization splitting, and spectra series with polarization splitting and rotating $\lambda/2$ -waveplate. The data are automatically saved in XML-format with current timestamp and all parameters set in the instrument (e.g., exposure time, CCD-parameters, sample name, etc.). The datasets are visualized and analyzed in a self-developed toolbox written in MATLAB. The toolbox provides a graphical user interface for displaying and statistical analysis of datasets.

B. Mechanical design of the probehead

The inner sample chamber of the cryostat has a diameter of 2.44 in. (~ 62 mm) and a height of 40 in. (~ 102 cm). The design of the whole probehead must fit these constraints resulting in a very compact arrangement of the required components. In addition, the construction should allow an easy positioning of the sample and a quick sample exchange.

The probehead is divided into two parts. The upper part is not described in detail here. This part is needed to launch the probehead into the cryostat, guide the cables from the scanners and the temperature sensor to the top flange, hold the baffles, and guide the transfer rod from the top flange to

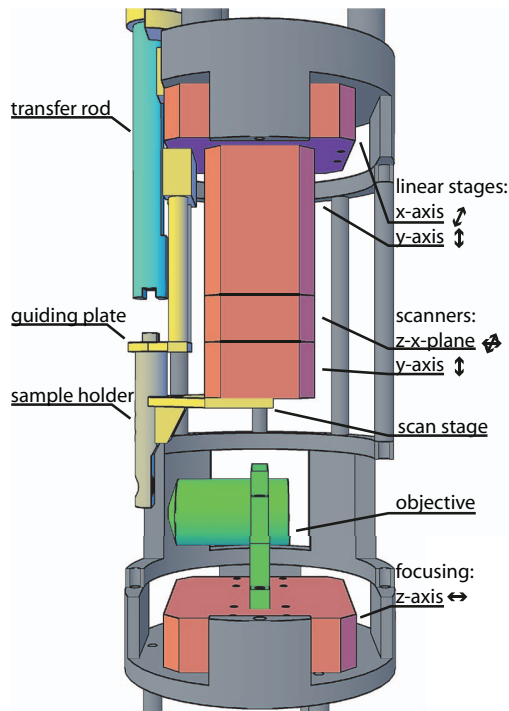


FIG. 2. Mechanical design of the lower part of the probehead used for low temperature microscopy. The dimension of the probehead must fulfill the constraints of inner sample chamber of the cryostat (diameter 2.44 in. (~ 62 mm)). The whole arrangement is fitted together by a cage (grey) made of stainless steel. In the cage different types of piezo modules (red) are mounted to move the sample during sample transfer and sample scanning. One stage is mounted on the bottom of the cage carrying the MO (green). The sample holder (light grey) is mounted magnetically to the scan stage (yellow). The sample holder can be inserted or removed by a transfer rod (light green). The attachment of the sample holder to the transfer rod is realized by magnets that are fitted in the end of the holder and the rod (for detail see text).

the opening in the lower part. The lower part of the probehead is shown in Fig. 2. The whole arrangement of linear stages, scanners, the sample holder, and the mounting plate is housed in a cage (dark grey) made of stainless steel. The MO is mounted on a linear stage ANPx320 (attocube systems) for focusing (red) with the optical axis aligned parallel to the optical table. The laser beam can pass from the outside

of the cryostat through the optical window into the opening at the backside of the MO. This position of the MO simplifies the arrangement of the optical path remarkably. The sample is mounted on a sample holder (light grey), which is magnetically mounted on the scan stage (yellow). Scanning and positioning of the sample are done using attocube systems linear stages and scanners (red). The linear stages are an ANPx320 (x-axis) and an ANPz101eXT (y-axis). These stages have a travel range of 12 mm with <100 nm precision allowing accurate positioning over large ranges. The scanners are an ANSxy100lr (z- and x-axis) and an ANSz100lr (y-axis). These scanners allow scanning of $30 \times 30 \times 30 \mu\text{m}^3$ at low temperature and $50 \times 50 \times 50 \mu\text{m}^3$ at room temperature. The motion control for both types of stages and scanners is done by an ANC350 controller. The combination of linear stages and scanners allows highly precise scanning of the sample besides large travel ranges. Precise scanning is the prerequisite for confocal imaging and the large travel ranges are necessary for the quick and easy sample transfer mechanism described below.

C. Sample transfer mechanism

The realization of the sample transfer system at low temperature is shown in Fig. 3. Three elements are essential for the mechanism introduced here; they are: transfer rod (light green), sample holder (light grey), and scan stage (yellow/red). The transfer rod has a diameter of 8 mm and a length of 120 cm. The upper part of the transfer rod is made of epoxy fiber glass reinforcement (HGW2375, Hesselmann). The lower part is made of stainless steel. At the bottom end of the transfer rod a groove of 3 mm fitting to the ridge of the sample holder is milled to avoid rotation of the sample holder during transfer. Two permanent magnets (NdFeB, magnets4you) with 3 mm diameter and height are fitted in this groove and in the bottom of the ridge of the sample holder to attach the sample holder to the transfer rod with a mounting force of ~ 5 N. The whole transfer rod is inserted into the cryostat via an O-ring compression seal at the top flange. After insertion, the transfer rod is pushed down to the opening in the guiding plate (Figs. 2 and 3). The sample holder itself is made of a cylinder with 36 mm height and 7 mm diameter

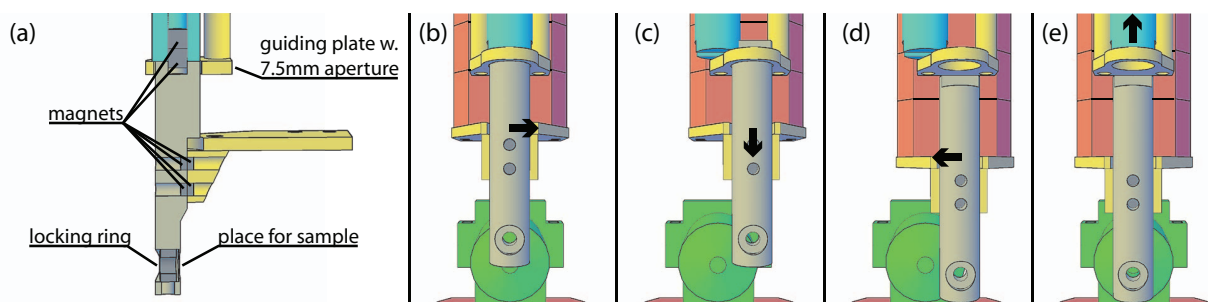


FIG. 3. Sample transfer system for low temperatures. (a) The mechanism consists of a transfer rod (light green), a sample holder (light grey), a guiding plate and the mounting at the scan stage (yellow). The transfer mechanism is based on magnets that are fitted at the connection of the sample holder with the transfer rod and the sample holder with the guiding plate. (b) and (c) Several movements are necessary to separate the sample holder from the transfer rod. The guiding plate is necessary to reduce the force acting on the piezo scanners during the cleavage of the magnets in the groove of the transfer rod and the sample holder. After the cleavage of these magnets, the sample holder can be driven out of the guiding plate and then it can be driven to the position required to perform the experiments.

(1 mm smaller than the transfer rod) to easily pass through the O-ring compression seal at the top flange. On the lower side the sample holder is milled along the center axis to get a plane that assures a stable attachment of the holder to the scan stage (see Fig. 3(a)). The sample is mounted on the back in a 5 mm diameter hole. To hold the sample in place a locking ring secured with a screw is mounted behind the sample. Two magnets (NdFeB, magnets4you) of 2 mm diameter and 1 mm height are fitted in the sample holder to attach it on the scanning stage (yellow). The magnets are arranged parallel to the sample plane to provide a stable mounting of the sample holder on the scan stage. On the opposite side, two magnets with 2 mm diameter and 1 mm height are fitted in the mounting element at the scan stage to get tight attachment of the sample holder with a mounting force of ~ 2.5 N. The mounting element at the scan stage is made of two parts: a 2 mm stainless steel plate and a wedge whereon the sample holder is attached. The weights of the mounting elements and the sample holder are minimized to avoid an unwanted load on the scanners that increases their hysteresis during fast scanning.

D. Transfer of the sample holder

In the beginning of the transfer sequence, the sample holder is mounted on the transfer rod outside of the cryostat. Then the transfer rod is inserted into the cryostat through the O-ring compression seal at the top flange. To minimize the amount of air entering the inner chamber of the cryostat the O-ring compression seal is mounted on top of a ball valve, which is closed while inserting the transfer rod. After insertion of the holder to this position, the ball valve is opened and the transfer rod can be pushed easily into the cryostat until it reaches the final position at the guiding plate shown in Fig. 3(a). In this position all magnets of the sample holder are in contact with the corresponding magnets in the transfer rod and the scan stage. The force of the magnets in the scan stage is not sufficient to release the sample holder from the transfer rod by simple pulling back the transfer rod. The problem can be solved by moving the whole scan stage with the guiding plate along the groove of the transfer rod using the x-axis linear stage as shown in (b). The force required for cleavage of the magnets in this way is much smaller (~ 1.2 N) than the force required for cleavage by pulling on the transfer rod (~ 5 N). After the cleavage at position (c) the corresponding magnets in the transfer rod and in the sample holder show only weak contact. The guiding plate is necessary to hold the sample holder in upright position and to protect the scan piezo against the forces that occur during the process. After losing contact, the scan stage with the sample holder is moved along the y-axis (6 mm). Then the sample can be driven into the focal plane of the MO, the transfer rod can be pulled away, and the required experiments can be performed (c)–(e).

After finishing the experiments, the sample holder can be easily removed by driving the scanners into the starting position (b) and subsequent insertion of the transfer rod. When the transfer rod approaches the sample holder, it is pulled automatically into the mounting groove of the transfer rod by the strong attraction of the two magnets (their attraction is

stronger than the attraction of the magnets at the mounting element). Then the sample holder can be pulled away.

III. RESULTS

A. Measurements on single pre-illuminated photosystem I complexes

The sample transfer mechanism introduced above enables the preparation and freezing of samples outside of the cryostat. Then, the frozen sample is inserted into the cryostat filled with liquid helium. In the following, we present results of an experiment performed on single protein complexes of photosystem I that were frozen in liquid nitrogen under white light illumination outside of the cryostat. Afterwards, the sample was transferred to the scanning desk. Figure 4(a) shows two emission spectra of a single photosystem I complex recorded under different excitation intensities. The upper trace is collected in 4 s with an excitation intensity of $300 \mu\text{W}$ whereas the lower trace is recorded in 600 s with an excitation

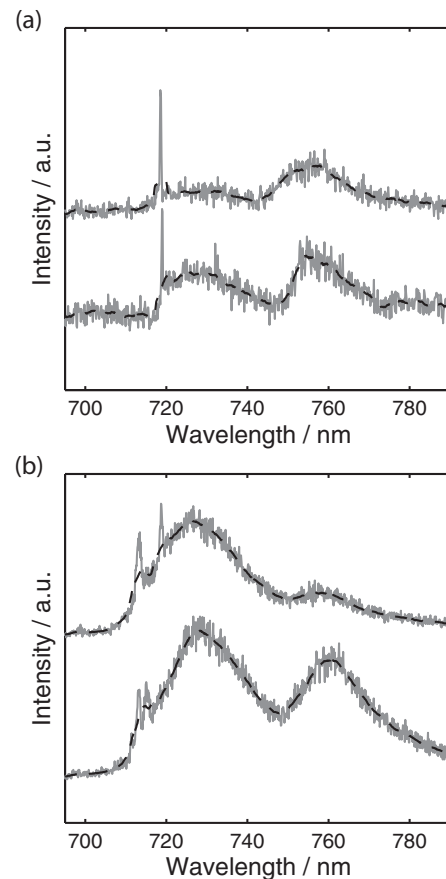


FIG. 4. Single-molecule fluorescence spectra of individual trimeric photosystem I complexes from *A. platensis*. (a) Spectra of one trimeric photosystem I complex of a sample frozen to 77 K under strong illumination with white light outside of the cryostat; excitation wavelength was 665 nm. The excitation power was varied between $300 \mu\text{W}$ (top trace) and $1 \mu\text{W}$ (bottom trace). (b) Spectra of one trimeric photosystem I complex taken from Ref. 11. The excitation power has been varied in a comparable way as in (a). For experimental details see Ref. 11. The accumulation time was chosen in each case so that a sufficient signal/noise ratio was achieved (2 s–10 min). Original data (solid curve), data smoothed by a moving average filter (dashed curve).

intensity of $1 \mu\text{W}$. Emission spectra of several photosystem I complexes were investigated by the same variation of the illumination strength. Figure 4(b) shows two spectra, which were recorded in a comparable way but the sample was not frozen under illumination.¹¹

The first single-molecule spectra of photosystem I at cryogenic temperature have been reported by Jelezko *et al.*¹² The fluorescence emission of photosystem I is due to several chlorophyll *a* molecules showing a remarkable redshift (for review see Refs. 13 and 14). Single-molecule spectroscopy offers the possibility to obtain more detailed information about the spectral characteristics of these redshifted antenna states.¹⁵ Experiments on a large number of individual photosystem I complexes of *A. platensis* revealed sharp emission lines around 715 nm and two broad emission bands centered around 728 nm and 760 nm.¹⁶ Indications for all of these emitters can be found in the spectra in Fig. 4. High excitation laser intensities of about $100 \mu\text{W}$ at 680 nm are often used to detect the weak fluorescence of single molecules (photosystems). Then, the excitation intensity in the focus is on the order of $6 \times 10^2 \text{ W/cm}^2$.¹⁷ This corresponds to a photon flux of about 6.8×10^{20} photons/(cm^2s). Because of the very large photon flux, most of the time P700 is in the oxidized state, for further details see Ref. 11. The most red-emitting state is very sensitive to the oxidation state of P700. In case of reduced P700, the emission of these states is intense, whereas in the oxidized state the fluorescence of the most red-emitting state is quenched.¹⁸ As shown recently in Ref. 11 the quenching can be influenced by variation of the illumination strength due to the balance between oxidized and reduced state of P700. Strong illumination during freezing (without strong reductive like dithionite in the buffer solution) increases the probability of P700 to become oxidized. Then the variation of the excitation intensity should not affect the intensity distribution in the fluorescence emission dramatically. The intensity of the different emitters that contribute to the emission spectra of photosystem I complexes frozen under high illumination should show only a weak variation in their relative intensity distribution as seen in Fig. 4(a) as well as in all other photosystem I complexes that were recorded (data not shown). Without the illumination during freezing a variation of the relative intensity distribution as seen in Fig. 4(b) is expected.

IV. CONCLUSION

The described mechanical design of a fast transfer system is based on a simple mechanism. The setup enables experiments on samples that are prepared outside of a cryostat,

afterwards they are transferred to the scanning desk in the already cold (4.2 K) cryostat. Transfer and launch of samples from the outside to the inside requires only some seconds. Removal of the sample takes the same time. This mechanism opens the possibility to investigate many samples within one cooling cycle as well as biological samples in almost native (vitrified) matrices at low temperatures.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Klaus Schaupp (head of the machine shop) for very helpful discussions concerning the design of the probehead. The great work of his team in manufacturing the parts of the probehead is gratefully acknowledged. The Brecht GmbH (<http://www.brecht-brt.de>) is gratefully acknowledged for manufacturing of parts of the probehead. We thank Alfred J. Meixner for fruitful discussions and his continuous support. The samples were provided by Eberhard Schlodder, his continuous support is gratefully acknowledged. This work has been supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (BR 4102/1-1 and BR 4102/2-1).

- ¹P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, and M. Orrit, *J. Phys. Chem. A* **104**, 1 (2000).
- ²Y. Berlin, A. Burin, J. Friedrich, and J. Köhler, *Phys. Life Rev.* **4**, 64 (2007).
- ³F. Grazioso, B. R. Patton, and J. M. Smith, *Rev. Sci. Instrum.* **81**, 093705 (2010).
- ⁴V. Hirschfeld and C. G. Huebner, *Rev. Sci. Instrum.* **81**, 113705 (2010).
- ⁵J. Jasny, J. Sepiol, T. Irngartinger, M. Traber, A. Renn, and U. P. Wild, *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 1425 (1996).
- ⁶M. Vacha, H. Yokoyama, T. Tokizaki, M. Furuki, and T. Tani, *Rev. Sci. Instrum.* **70**, 2041 (1999).
- ⁷S. Marcet, C. Ouellet-Plamondon, and S. Francoeur, *Rev. Sci. Instrum.* **80**, 063101 (2009).
- ⁸J. M. Segura, A. Renn, and B. Hecht, *Rev. Sci. Instrum.* **71**, 1706 (2000).
- ⁹A. Hoge, S. Seidl, M. Kroner, K. Karrai, C. Schulhauser, O. Sqalli, J. Scrimgeour, and R. J. Warburton, *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 023709 (2008).
- ¹⁰M. Hussels and M. Brecht, *Biochemistry* **50**, 3628 (2011).
- ¹¹E. Schlodder, M. Hussels, M. Cetin, N. V. Karapetyan, and M. Brecht, *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 1423 (2011).
- ¹²F. Jelezko, C. Tietz, U. Gerken, J. Wrachtrup, and R. Bittl, *J. Phys. Chem. B* **104**, 8093 (2000).
- ¹³N. V. Karapetyan, E. Schlodder, R. van Grondelle, and J. P. Dekker, *Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin:ferredoxin Oxidoreductase*, Advances in Photosynthesis and Respiration Vol. 24, edited by J. H. Golbeck (Springer, 2006).
- ¹⁴B. Gobets and R. van Grondelle, *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 80 (2001).
- ¹⁵M. Brecht, V. Radics, J. B. Nieder, and R. Bittl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 11857 (2009).
- ¹⁶M. Brecht, M. Hussels, E. Schlodder, and N. V. Karapetyan, *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 445 (2012).
- ¹⁷M. Brecht, H. Studier, A. F. Elli, F. Jelezko, and R. Bittl, *Biochemistry* **46**, 799 (2007).
- ¹⁸V. V. Shubin, I. N. Bezsmertnaya, and N. V. Karapetyan, *J. Photochem. Photobiol., B* **30**, 153 (1995).

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. platensis</i>	<i>Arthrospira platensis</i>
APD	<i>Avalanche</i> -Photodiode, Lawinenphotodiode
ATP	Adenosintriphosphat
FWHM	<i>Full width at half maximum</i> (Halbwertsbreite)
MEF	<i>metal-enhanced fluorescence</i> Fluoreszenzverstärkung durch metallische Nanopartikel
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
SIF	Silberinselfilm (<i>Silver island film</i>)
<i>T. elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> , vorher <i>Synechococcus elongatus</i>
TCSPC	<i>time correlated single photon counting</i> zeitkorrelierte Einzelphotonendetektion
TLS	<i>two-level system</i> , Zweilevelsystem

Literaturverzeichnis

- [1] Govindjee and D. Krogmann. Discoveries in oxygenic photosynthesis (1727-2003): a perspective. *Photosynthesis Research*, 80:15–57, 2004.
- [2] P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, and N. Krauss. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, 411:909–917, 2001.
- [3] Y. Umena, K. Kawakami, J. R. Shen, and N. Kamiya. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 473:55–60, 2011.
- [4] A. Amunts, H. Toporik, A. Borovikova, and N. Nelson. Structure determination and improved model of plant photosystem I. *Journal of Biological Chemistry*, 285:3478–3486, 2010.
- [5] Govindjee and D. W. Krogmann. A list of personal perspectives with selected quotations, along with lists of tributes, historical notes, Nobel and Kettering awards related to photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 73:11–20, 2002.
- [6] G. S. Engel, T. R. Calhoun, E. L. Read, T. K. Ahn, T. Mancal, Y. C. Cheng, R. E. Blankenship, and G. R. Fleming. Evidence for wavelike energy transfer through quantum coherence in photosynthetic systems. *Nature*, 446:782–786, 2007.
- [7] G. D. Scholes, G. R. Fleming, A. Olaya-Castro, and R. van Grondelle. Lessons from nature about solar light harvesting. *Nature Chemistry*, 3:763–774, 2011.
- [8] P. Ball. The dawn of quantum biology. *Nature*, 474:272–274, 2011.

- [9] H. Toporik, I. Carmeli, I. Volotsenko, M. Molotskii, Y. Rosenwaks, C. Carmeli, and N. Nelson. Large Photovoltages Generated by Plant Photosystem I Crystals. *Advanced Materials*, 24:2988–2991, 2012.
- [10] A. Mershin, K. Matsumoto, L. Kaiser, D. Yu, M. Vaughn, Md. K. Nazeeruddin, Barry D. Bruce, Michael Graetzel, and Shuguang Zhang. Self-assembled photosystem-I biophotovoltaics on nanostructured TiO₂ and ZnO. *Scientific Reports*, 2:234, 2012.
- [11] G. LeBlanc, G. Chen, E. A. Gizzie, G. K. Jennings, and D. E. Cliffel. Enhanced Photocurrents of Photosystem I Films on p-Doped Silicon. *Advanced Materials*, 2012.
- [12] C. E. Lubner, R. Grimme, D. A. Bryant, and J. H. Golbeck. Wiring Photosystem I for Direct Solar Hydrogen Production. *Biochemistry*, 49:404–414, 2010.
- [13] L. M. Utschig, S. C. Silver, K. L. Mulfort, and D. M. Tiede. Nature-Driven Photochemistry for Catalytic Solar Hydrogen Production: A Photosystem I-Transition Metal Catalyst Hybrid. *Journal of the American Chemical Society*, 133:16334–16337, 2011.
- [14] H. Krassen, A. Schwarze, B. Friedrich, K. Ataka, O. Lenz, and J. Heberle. Photosynthetic Hydrogen Production by a Hybrid Complex of Photosystem I and [NiFe]-Hydrogenase. *Acs Nano*, 3:4055–4061, 2009.
- [15] H. Frauenfelder, S. G. Sliar, and P. G. Wolynes. The Energy Landscapes and Motions of Proteins. *Science*, 254:1598–1603, 1991.
- [16] R. G. Smock and L. M. Gierasch. Sending Signals Dynamically. *Science*, 324:198–203, 2009.
- [17] M. Brecht, H. Studier, V. Radics, J. B. Nieder, and R. Bittl. Spectral diffusion induced by proton dynamics in pigment–protein complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 130:17487–17493, 2008.
- [18] J. Baier, M. F. Richter, R. J. Cogdell, S. Oellerich, and J. R. Kohler. Determination of the spectral diffusion kernel of a protein by single-molecule spectroscopy. *Physical Review Letters*, 1:018108, 2008.

- [19] M. Brecht, V. Radics, J. B. Nieder, and R. Bittl. Protein dynamics-induced variation of excitation energy transfer pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:11857–11861, 2009.
- [20] J. M. Olson. Photosynthesis in the Archean Era. *Photosynthesis Research*, 88:109–117, 2006.
- [21] R. Buick. When did oxygenic photosynthesis evolve? *Philosophical Transactions of the Royal Society B–Biological Sciences*, 363:2731–2743, 2008.
- [22] Heinrich D. Holland. The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B–Biological Sciences*, 361:903–915, 2006.
- [23] L. V. Berkner and L. C. Marshall. The Origin and Rise of Oxygen Concentration in the Earth’s Atmosphere. *Journal of the Atmospheric Sciences*, May:225–260, 1965.
- [24] P. K. Pufahl and E. E. Hiatt. Oxygenation of the earth’s atmosphere-ocean system: A review of physical and chemical sedimentologic responses. *Marine and Petroleum Geology*, 32:1–20, 2012.
- [25] Yikrazuul. de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Thylakoid_membrane.svg, April 2010. downloaded on July 4th 2012.
- [26] V. V. Shubin, V. L. Tsuprun, I. N. Bezsmertnaya, and N. V. Karapertyan. Trimeric forms of the photosystem I reaction-center complex pre-exist in the membranes of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *FEBS Letters*, 334:79–82, 1993.
- [27] E. J. Boekema, P. E. Jensen, E. Schlodder, J. F. L. van Breemen, H. van Roon, H. V. Scheller, and J. P. Dekker. Green plant photosystem I binds light-harvesting complex I on one side of the complex. *Biochemistry*, 40:1029–1036, 2001.
- [28] E. Schlodder, K. Falkenberg, M. Gergeleit, and K. Brettel. Temperature dependence of forward and reverse electron transfer from a_1^- , the reduced secondary electron acceptor in photosystem I. *Biochemistry*, 37:9466–9476, 1998.
- [29] G. S. Beddaer and G. Porter. Concentration quenching in chlorophyll. *Nature*, 260:366–367, 1976.

- [30] E. Schlodder. Introduction to optical methods in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 101:93–104, 2009.
- [31] B. Gobets and R. van Grondelle. Energy transfer and trapping in photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1507:80–99, 2001.
- [32] V. V. Shubin, I. N. Bezsmertnaya, and N. V. Karapetyan. Efficient energy-transfer from the long-wavelength antenna chlorophylls to P700 in photosystem-I complexes from *Spirulina platensis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B–Biology*, 30:153–160, 1995.
- [33] G. D. Scholes, X. J. Jordanides, and G. R. Fleming. Adapting the Förster theory of energy transfer for modeling dynamics in aggregated molecular assemblies. *Journal of Physical Chemistry B*, 105:1640–1651, 2001.
- [34] M. Yang, A. Damjanovic, H. M. Vaswani, and G. R. Fleming. Energy transfer in photosystem I of cyanobacteria *Synechococcus elongatus*: Model study with structure-based semi-empirical hamiltonian and experimental spectral density. *Biophysical Journal*, 85:140–158, 2003.
- [35] A. N. Melkozernov, S. Lin, and R. E. Blankenship. Excitation dynamics and heterogeneity of energy equilibration in the core antenna of photosystem I from the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Biochemistry*, 39:1489–1498, 2000.
- [36] A. N. Melkozernov, S. Lin, R. E. Blankenship, and L. Valkunas. Spectral inhomogeneity of photosystem I and its influence on excitation equilibration and trapping in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC6803 at 77 K. *Biophysical Journal*, 81:1144–1154, 2001.
- [37] B. Gobets, I. H. M. van Stokkum, M. Rogner, J. Kruip, E. Schlodder, N. V. Karapetyan, J. P. Dekker, and R. van Grondelle. Time-resolved fluorescence emission measurements of photosystem I particles of various cyanobacteria: A unified compartmental model. *Biophysical Journal*, 81:407–424, 2001.
- [38] L. O. Palsson, J. P. Dekker, E. Schlodder, R. Monshouwer, and R. van Grondelle. Polarized site-selective fluorescence spectroscopy of the long-wavelength emitting

- chlorophylls in isolated photosystem I particles of *Synechococcus elongatus*. *Photosynthesis Research*, 48:239–246, 1996.
- [39] M. Byrdin, I. Rimke, E. Schlodder, D. Stehlik, and T. A. Roelofs. Decay kinetics and quantum yields of fluorescence in photosystem I from *Synechococcus elongatus* with P700 in the reduced and oxidized state: Are the kinetics of excited state decay trap-limited or transfer-limited? *Biophysical Journal*, 79:992–1007, 2000.
- [40] F. Jelezko, C. Tietz, U. Gerken, J. Wrachtrup, and R. Bittl. Single-molecule spectroscopy on photosystem I pigment-protein complexes. *Journal of Physical Chemistry B*, 104:8093–8096, 2000.
- [41] M. Brecht. Spectroscopic characterization of photosystem I at the single-molecule level. *Molecular Physics*, 107:1955–1974, 2009.
- [42] John C. H. Spence. *High-Resolution Electron Microscopy*. Oxford University Press, third edition, 2008.
- [43] G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, and E. Weibel. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Physical Review Letters*, 49:57–61, 1982.
- [44] G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, and E. Weibel. 7×7 Reconstruction on Si(111) Resolved in Real Space. *Physical Review Letters*, 50:120–123, 1983.
- [45] T. Hirschfeld. Optical microscopic observation of single small molecules. *Applied optics*, 15:2965–2966, 1976.
- [46] Dinh C. Nguyen, Richard A. Keller, James H. Jett, and John C. Martin. Detection of single molecules of phycoerythrin in hydrodynamically focused flows by laser-induced fluorescence. *Analytical Chemistry*, 59:2158–2161, 1987.
- [47] E. Brooks Shera, Newton K. Seitzinger, Lloyd M. Davis, Richard A. Keller, and Steven A. Soper. Detection of single fluorescent molecules. *Chemical Physics Letters*, 174:553–557, 1990.
- [48] W. E. Moerner and L. Kador. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Physical Review Letters*, 62:2535–2538, 1989.

- [49] M. Orrit and J. Bernard. Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a para-terphenyl crystal. *Physical Review Letters*, 65:2716–2719, 1990.
- [50] W. E. Moerner, W. E. and L. Kador. Finding A Single Molecule In A Haystack - Optical-detection and Spectroscopy of Single Absorbers In Solids. *Analytical Chemistry*, 61:A1217–A1223, 1989.
- [51] Germain Salvato-Vallverdu. <http://www.texample.net/tikz/examples/the-perrin-jablonski-diagram>, June 2009.
- [52] R. Jankowiak, J. M. Hayes, and G. J. Small. Spectral hole-burning spectroscopy in amorphous molecular-solids and proteins. *Chemical Reviews*, 93:1471–1502, 1993.
- [53] J. M. Hayes, P. A. Lyle, and G. J. Small. A theory for the temperature dependence of hole-burned spectra. *The Journal of Physical Chemistry*, 98:7337–7341, 1994.
- [54] J. Pieper, J. Voigt, G. Renger, and G. J. Small. Analysis of phonon structure in line-narrowed optical spectra. *Chemical Physics Letters*, 310:296–302, 1999.
- [55] T. Pullerits, R. Monshouwer, F. van Mourik, and R. van Grondelle. Temperature-dependence of electron-vibronic spectra of photosynthetic systems - computer-simulations and comparison with experiment. *Chemical Physics*, 194:395–407, 1995.
- [56] R. van Grondelle. Excitation-energy transfer, trapping and annihilation in photosynthetic systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 811:147–195, 1985.
- [57] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science+Business Media, LLC, 2006.
- [58] K. Aslan, I. Gryczynski, J. Malicka, E. Matveeva, J. R. Lakowicz, and C. D. Geddes. Metal-enhanced fluorescence: An emerging tool in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 16:55–62, 2005.
- [59] D. L. Dexter. A theory of sensitized luminescence in solids. *Journal of Chemical Physics*, 21:836–850, 1953.

- [60] F. S. Steinbacher, R. Krause, A. Hunze, and A. Winnacker. Triplet exciton transfer mechanism between phosphorescent organic dye molecules. *Physica status solidi A—Applications and materials science*, 209:340–346, 2012.
- [61] N. J. Fraser, H. Hashimoto, and R. J. Cogdell. Carotenoids and bacterial photosynthesis: The story so far ... *Photosynthesis Research*, 70:249–256, 2001.
- [62] T. Förster. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften*, 33:166–175, 1946.
- [63] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 2:55–75, 1948.
- [64] R. van Grondelle, J. P. Dekker, T. Gillbro, and V. Sundstrom. Energy-transfer and trapping in photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1187:1–65, 1994.
- [65] J. Adolphs, F. Muh, M. E. A. Madjet, M. S. A. Busch, and T. Renger. Structure-Based Calculations of Optical Spectra of Photosystem I Suggest an Asymmetric Light-Harvesting Process. *Journal of the American Chemical Society*, 132:3331–3343, 2010.
- [66] P. Zijlstra and M. Orrit. Single metal nanoparticles: optical detection, spectroscopy and applications. *Reports on Progress in Physics*, 74:106401, 2011.
- [67] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B*, 107:668–677, 2003.
- [68] C. D. Geddes and J. R. Lakowicz. Metal-enhanced fluorescence. *Journal of Fluorescence*, 12:121–129, 2002.
- [69] K. Aslan, Z. Leonenko, J. R. Lakowicz, and C. D. Geddes. Annealed silver-island films for applications in metal-enhanced fluorescence: Interpretation in terms of radiating plasmons. *Journal of Fluorescence*, 15:643–654, 2005.
- [70] P. Anger, P. Bharadwaj, and L. Novotny. Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence. *Physical Review Letters*, 96:113002, 2006.

- [71] P. Andrew and W. L. Barnes. Energy transfer across a metal film mediated by surface plasmon polaritons. *Science*, 306:1002–1005, 2004.
- [72] J. Zhang, Y. Fu, M. H. Chowdhury, and J. R. Lakowicz. Enhanced Förster resonance energy transfer on single metal particle. 2. Dependence on donor-acceptor separation distance, particle size, and distance from metal surface. *Journal of Physical Chemistry C*, 111:11784–11792, 2007.
- [73] Lei Zhao, Tian Ming, Lei Shao, Huanjun Chen, and Jianfang Wang. Plasmon-controlled förster resonance energy transfer. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116:8287–8296, 2012.
- [74] F. Schotte, M. H. Lim, T. A. Jackson, A. V. Smirnov, J. Soman, J. S. Olson, G. N. Phillips, M. Wulff, and P. A. Anfinrud. Watching a protein as it functions with 150-ps time-resolved X-ray crystallography. *Science*, 300:1944–1947, 2003.
- [75] H. Frauenfelder, G. A. Petsko, and D. Tsernoglou. Temperature-Dependent X-Ray-Diffraction as a Probe of Protein Structural Dynamics. *Nature*, 280:558–563, 1979.
- [76] H. Frauenfelder, B. H. McMahon, R. H. Austin, K. Chu, and J. T. Groves. The role of structure, energy landscape, dynamics, and allostery in the enzymatic function of myoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98:2370–2374, 2001.
- [77] C. Hofmann, T. J. Aartsma, H. Michel, and J. Köhler. Direct observation of tiers in the energy landscape of a chromoprotein: A single-molecule study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:15534–15538, 2003.
- [78] C. Hofmann, H. Michel, M. van Heel, and J. Köhler. Multivariate analysis of single-molecule spectra: Surpassing spectral diffusion. *Physical Review Letters*, 94:195501, 2005.
- [79] W. P. F. de Ruijter, J. M. Segura, R. J. Cogdell, A. T. Gardiner, S. Oellerich, and T. J. Aartsma. Fluorescence-emission spectroscopy of individual LH2 and LH3 complexes. *Chemical Physics*, 341:320–325, 2007.

- [80] H. Studier. *Einzelmolekül-Spektroskopie am Photosystem I*. PhD thesis, Freie Universität Berlin, Germany, 2007.
- [81] M. Brecht, J. B. Nieder, H. Studier, E. Schlodder, and R. Bittl. Red antenna states of photosystem I from *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Photosynthesis Research*, 95:155–162, 2008.
- [82] J. B. Nieder. *Single-Molecule Spectroscopy on Pigment-Protein Complexes*. PhD thesis, Freie Universität Berlin, Germany, 2011.
- [83] J. Zeng, A. Aigner, F. Czubayko, T. Kissel, J. H. Wendorff, and A. Greiner. Poly(vinyl alcohol) nanofibers by electrospinning as a protein delivery system and the retardation of enzyme release by additional polymer coatings. *Biomacromolecules*, 6:1484–1488, 2005.
- [84] R. Sousa. Use of glycerol, polyols and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization. *Acta Crystallographica*, D51:271–277, 1995.
- [85] M. Brecht, H. Studier, A. F. Elli, F. Jelezko, and R. Bittl. Assignment of red antenna states in photosystem I from *Thermosynechococcus elongatus* by single-molecule spectroscopy. *Biochemistry*, 46:799–806, 2007.
- [86] V. Vagenende, M. G. S. Yap, and B. L. Trout. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*, 48:11084–11096, 2009.
- [87] K. Gekko and S. N. Timasheff. Mechanism of protein stabilization by glycerol - preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*, 20:4667–4676, 1981.
- [88] S. N. Timasheff. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:9721–9726, 2002.
- [89] V. V. Shubin, S. D. S. Murthy, N. V. Karapetyan, and P. Mohanty. Origin of The 77 K Variable Fluorescence at 758 nm in the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1060:28–36, 1991.

- [90] N. V. Karapetyan, D. Dorra, G. Schweitzer, I. N. Bezmertnaya, and A. R. Holzwarth. Fluorescence spectroscopy of the longwave chlorophylls in trimeric and monomeric photosystem I core complexes from the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biochemistry*, 36:13830–13837, 1997.
- [91] E. Schlodder, V. V. Shubin, E. El-Mohsnwy, M. Rogner, and N. V. Karapetyan. Steady-state and transient polarized absorption spectroscopy of photosystem I complexes from the cyanobacteria *Arthrospira platensis* and *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1767:732–741, 2007.
- [92] S. Mackowski, S. Wörmke, A. J. Maier, T. H. P. Brotosudarmo, H. Harutyunyan, A. Hartschuh, A. O. Govorov, H. Scheer, and C. Bräuchle. Metal-enhanced fluorescence of chlorophylls in single light-harvesting complexes. *Nano Letters*, 8:558–564, 2008.
- [93] J. B. Nieder, R. Bittl, and M. Brecht. Plasmonic interactions affect protein function. *Angewandte Chemie International Edition*, 49:10217–10220, 2010.
- [94] A. Kosiorek, W. Kandulski, P. Chudzinski, K. Kempa, and M. Giersig. Shadow nanosphere lithography: Simulation and experiment. *Nano Letters*, 4:1359–1363, 2004.
- [95] A. Kosiorek, W. Kandulski, H. Glaczynska, and M. Giersig. Fabrication of nanoscale rings, dots, and rods by combining shadow nanosphere lithography and annealed polystyrene nanosphere masks. *Small*, 1:439–444, 2005.

Publikationsliste

1. Martin Hussels, Marc Brecht. Effect of Glycerol and PVA on the Conformation of Photosystem I. *Biochemistry*, 50(18):3628–3637, 2011.
2. Martin Hussels, Marc Brecht. Evidence for direct binding of glycerol to photosystem I. *Febs Letters*, 585(15):2445–2449, 2011.
3. Eberhard Schlodder, Martin Hussels, Marianne Cetin, Navassard V. Karapetyan, Marc Brecht. Fluorescence of the various red antenna states in photosystem I complexes from cyanobacteria is affected differently by the redox state of P700. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1807(11):1423–1431, 2011.
4. Marc Brecht, Martin Hussels, Eberhard Schlodder, Navassard V. Karapetyan. Red antenna states of Photosystem I trimers from *Arthrospira platensis* revealed by single-molecule spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1817(3):445–452, 2012.
5. Marc Brecht, Martin Hussels, Jana B. Nieder, Fang Hui, Celine Elsässer. Plasmonic interactions of photosystem I with Fischer patterns made of Gold and Silver. *Chemical Physics*, 406:15–20, 2012.
6. Martin Hussels, Jana B. Nieder, Celine Elsässer, Marc Brecht. Interactions of Photosystem I with Plasmonic Nanostructures. *Acta Physica Polonica*, 122(2):269–274, 2012.
7. Martin Hussels, Alexander Konrad, Marc Brecht. Confocal sample-scanning microscope for single-molecule spectroscopy and microscopy with fast sample exchange at cryogenic temperatures. *Review of Scientific Instruments*, 83:123706, 2012.

Anhang A

Steuerungssoftware

Im Folgenden wird der Aufbau der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Software zur Steuerung des konfokalen Tieftemperaturmikroskops beschrieben. Die gesamte Software basiert auf LabVIEW und wurde in Zusammenarbeit mit Alexander Konrad (Universität Tübingen) implementiert. Die Hauptanforderung an die Software bestand darin, alle für Messungen relevanten Geräte wie z. B. Detektoren, Klappspiegel und Piezoaktuatoren steuern zu können, und Messdaten zusammen mit verschiedenen experimentellen Parametern (z. B. Temperatur, Laserintensität, Belichtungszeit) automatisch zu speichern.

A.1 Funktionsumfang und grafische Oberfläche

Die Software dient der Steuerung aller Abläufe während eines Experiments. So kann zwischen den unterschiedlichen Detektoren über Steuerung elektrischer Klappspiegel umgeschaltet und die Probenpositionierung gesteuert werden. Außerdem werden auch alle Messdaten erfasst und gespeichert. Dafür wurden verschiedene Messroutinen entwickelt, die über die grafische Oberfläche konfiguriert und ausgeführt werden können. Die Messroutinen wurden so konzipiert, dass möglichst viele Messungen innerhalb kurzer Zeit durchgeführt werden können. Daher wurde u.a. das Speichern der Daten automatisiert, so dass dafür keine Eingabe vom Nutzer notwendig ist. So werden am Ende jeder Messung die Messdaten zusammen mit verschiedenen Parametern des Experiments automatisch nach Datum sortiert im Dateisystem abgelegt und nach Art

der Messung mit Zeitstempel benannt. Zur Sicherheit werden auch bei Abbruch einer Messung die bereits erfassten Daten gespeichert.

Hauptfenster

Um die unterschiedlichen Funktionen zur Steuerung des Mikroskops und zum Erfassen der Daten voneinander abzugrenzen, wurde die grafische Oberfläche in ein Hauptfenster zur Steuerung des Mikroskops und mehrere Unterfenster aufgeteilt. Dabei dienen einige der Konfiguration und Ausführung der Messungen und andere der Konfiguration des Lasers und Steuerung der Probenpositionierung.

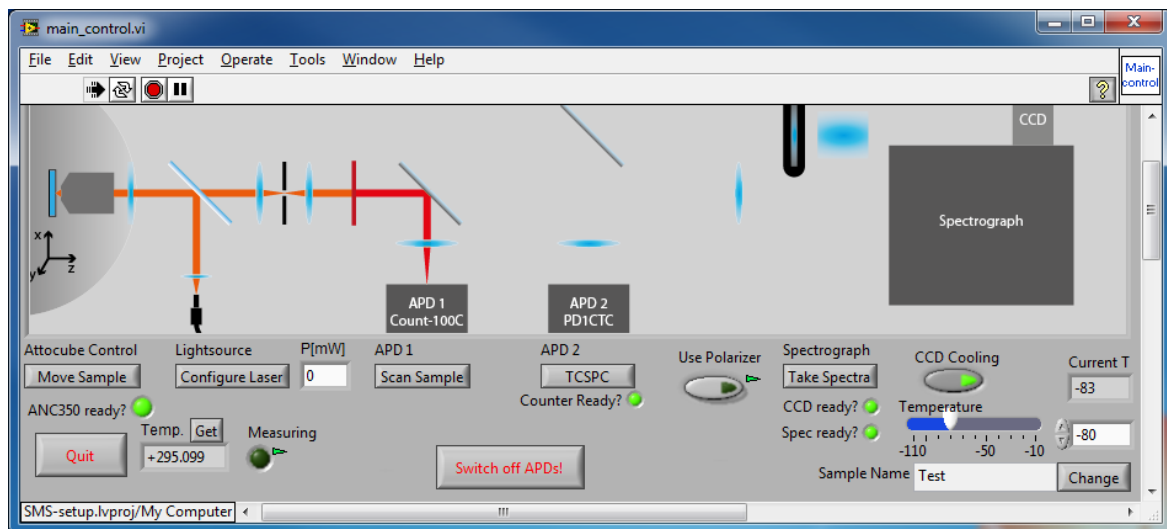


Abbildung A.1: Bildschirmfoto des Hauptfensters der Steuerungssoftware. Die obere Hälfte zeigt ein Schema des Mikroskops mit der aktuellen Stellung der Spiegel und dem dazugehörigen Strahlengang. Unterhalb der Grafik sind verschiedene Knöpfe zum Öffnen der Unterfenster zur Probenpositionierung, Konfiguration des Lasers, Durchführung von Intensitätsscans, Durchführung von TCSPC-Messungen (in der Entwicklung) und Durchführung spektraler Messungen mit der CCD-Kamera angeordnet.

Abbildung A.1 zeigt das Hauptfenster der Steuerungssoftware. In der oberen Hälfte wird in einer Schemazeichnung des Mikroskops die aktuelle Stellung mit dem dazugehörigen Strahlengang angezeigt. So kann leicht der aktuelle Zustand des Mikroskops erfasst werden. Direkt unterhalb der Schemazeichnung sind Knöpfe zum Öffnen von Unterfenstern entsprechend der Elemente in der Schemazeichnung angeordnet. Die Knöpfe „Move Sample“ und „Configure Laser“ öffnen entsprechend die Fenster zur

Probenpositionierung und zur Konfiguration des Lasers. Die Knöpfe „Scan Sample“, „TCSPC“ und „Take Spectra“ dienen dagegen neben dem Öffnen der Unterfenster zu den einzelnen Detektoren zusätzlich der Steuerung der Klappspiegel in die zum Detektor passende Position. Der Knopf „Use Polarizer“ steuert das Fahren der Polarisationsoptik in den Strahlengang hinein bzw. aus dem Strahlengang heraus und öffnet außerdem ein Fenster zur Steuerung des Rotors zum Drehen der $\lambda/2$ -Platte. Am rechten Rand sind Bedienelemente zum Einschalten der Kamerakühlung und Einstellen der Temperatur inklusive Anzeige der aktuellen Temperatur platziert.

Unterhalb dieser Elemente am unteren Rand des Fensters wird der Probenname angezeigt, der als Parameter in die Dateien mit den Messdaten geschrieben wird. Ebenso werden die Werte aus dem neben dem Knopf „Configure Laser“ liegenden Feld „P[mW]“, in dem die Intensität des Lasers in Milliwatt angegeben werden kann, und aus dem Feld „Temp.“, das die Temperatur im Kryostaten anzeigt, als Parameter gespeichert. Die Temperatur wird am Ende jeder Messung ausgelesen und kann alternativ durch den Knopf „Get“ aktualisiert werden. Mit den Knöpfen „Switch off APDs“ und „Quit“ kann die Verstärkerspannung der APDs ausgeschaltet (Schutz bei hoher Lichtintensität) bzw. das gesamte Programm beendet werden.

Zusätzlich zu den Bedienelementen wurden die Indikatoren „ANC350 ready?“, „Counter Ready?“, „CCD ready?“ und „Spec ready?“ an den zum Schema passenden Stellen im Fenster platziert. Sie zeigen an, ob die entsprechenden Geräte während des Starts der Software korrekt initialisiert wurden und bereit zur Messung sind, dabei steht Grün für bereit und Rot für Fehler. Der Indikator „Measuring“ zeigt an, dass gerade eine Messung läuft, wenn er Grün leuchtet. Dann unterdrückt dieser Indikator das Umschalten der Klappspiegel auf einen anderen Detektor und das Starten einer anderen Messung, so dass eine laufende Messung nicht gestört wird.

Unterfenster

Im Folgenden werden beispielhaft die beiden Unterfenster für Intensitätsscans und für spektrale Messungen mit der CCD-Kamera beschrieben. Geöffnet werden diese Fenster durch die Knöpfe „Scan Sample“ und „Take Spectra“. Das Fenster für TCSPC-Messungen wird hier nicht beschrieben, da sich dieser Teil noch in der Entwicklung befindet. Ebenso werden die Unterfenster zur Probenpositionierung, Steuerung des

Lasers und Steuerung des Rotors der Polarisationsoptik nicht beschrieben.

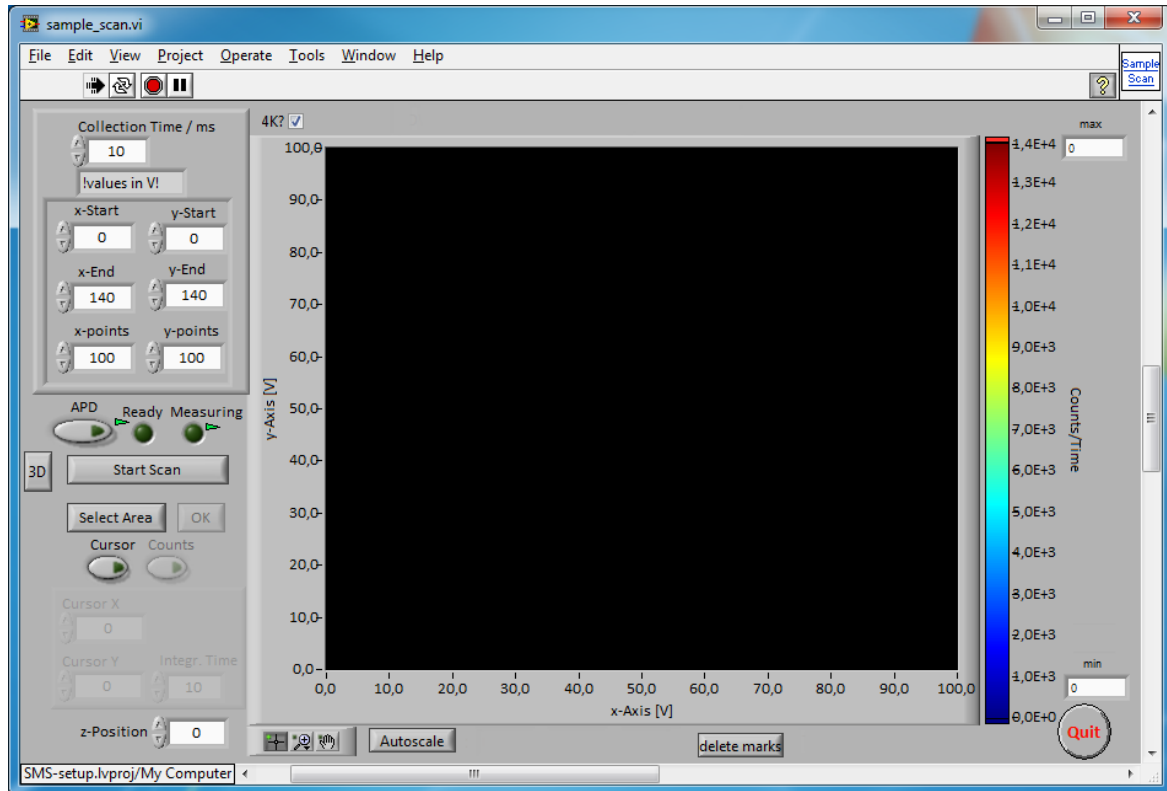


Abbildung A.2: Bildschirmfoto des Fensters zur Messung von Intensitätsscans. Der größte Bereich des Fensters wird durch die grafische Darstellung des Intensitätsscans eingenommen. Links oben befinden sich die Eingabefelder zur Steuerung der Integrationszeit pro Punkt, der Scangröße und Auflösung in x- und y-Richtung. Darunter befinden sich Bedienelemente zum Ein-/Ausschalten der APD, starten des Scanalgorithmus' und zum Umschalten in den Cursormodus zur Auswahl einer Position im Scanbereich.

Abbildung A.2 zeigt das Fenster zur Messung von Intensitätsscans, das zusätzlich einen Cursormodus beinhaltet, mit dem eine Position im Scanbereich angefahren werden kann, um TCSPC oder spektrale Messungen durchzuführen. Ein großer Teil des Fensters wird zur Darstellung des aktuellen Intensitätsscans verwendet. Auf der rechten Seite befindet sich die Farbskala nebst zwei Eingabefeldern zur Änderung der Minimal- (unten) und Maximalwerte (oben) der Farbskala. Auf der linken Seite sind oben Eingabefelder zum Einstellen der Integrationszeit (in ms) pro Punkt des Scans, des Scanbereiches mit Minimal- und Maximalwerten (in Volt) für x- und y-Achse und der Auflösung des Scans in Punkten pro Zeile und pro Spalte angeordnet.

Darunter befindet sich ein Knopf zum Ein-/Ausschalten der APD, ein Indikator zur Anzeige der Bereitschaft der Zählerkarte zur Messung und ein Indikator zur Anzeige, ob eine Messung läuft. Mit dem Knopf „Start Scan“ wird der Scanalgorithmus gestartet oder, wenn dieser bereits läuft, abgebrochen. Mit dem daneben platzierten Knopf „3D“ kann in den 3D-Scanmodus umgeschaltet werden, bei dem die Eingabefelder oben um eine weitere Spalte mit Eingabefeldern für die z-Achse erweitert werden. Die Darstellung eines 3D-Scans ist jedoch problematisch, daher werden Ebenen mit konstanten z-Werten angezeigt. Während des Scans wird die aktuelle Ebene angezeigt, und nach Abschluss des Scans kann mit dem am unteren Rand des Fensters angebrachten Eingabefeld „z-Position“ zwischen den Ebenen umgeschaltet werden. Dabei wird auch die Spannung am z-Scanner auf den entsprechenden Wert gestellt. Im 2D-Scanmodus kann mit diesem Eingabefeld ebenfalls die Spannung des z-Scanners eingestellt werden, was z. B. zur genauen Einstellung der Fokusebene genutzt werden kann. Der Knopf „Select Area“ blendet nach Aktivierung in die Scandarstellung zwei Cursorkreuze ein, mit denen ein Teilbereich des Scans ausgewählt werden kann. Dieser kann mit dem nebenliegenden OK-Knopf in die Scanparameter übernommen werden.

Der Knopf „Cursor“ dient der Umschaltung in den Cursormodus, in dem in der Darstellung des Scans ein Cursor eingeblendet wird, der sich mit der Maus verschieben lässt. Die Spannung der Scannerachsen wird in diesem Modus auf die der Cursorposition entsprechenden Werte eingestellt. Die Position des Cursors wird in den Feldern „Cursor X“ und „Cursor Y“ angezeigt und kann über diese auch durch Tastatureingabe verändert werden. Auf diese Weise können Positionen ausgewählt werden, an denen TCSPC- oder spektrale Messungen vorgenommen werden sollen. Stellen, an denen eine Messung durchgeführt wurde, werden daraufhin mit einem Marker versehen. Mit dem Knopf „Counts“ wird ein weiteres Fenster aktiviert, das die mit der APD gemessene Intensität in einer Zeitspur anzeigt, um so z. B. die Cursorposition anhand der Intensität zu optimieren. Die Integrationszeit für die einzelnen Punkte dieser Zeitspur wird im Feld „Integ. Time“ (in ms) eingestellt.

Am unteren Rand des Fensters befinden sich außerdem die Knöpfe „Autoscale“ und „delete marks“. Der erste aktiviert oder deaktiviert die automatische Skalierung der Darstellung und der zweite löscht alle Markierungen von Messungen in der Darstellung. Das Markierungsfeld „4K?“ am oberen Rand des Fensters dient zum Freischalten des maximalen Spannungsbereiches der Piezoscanner, der nur bei tiefen Temperaturen

verwendet werden darf.

Abbildung A.3 zeigt das Fenster für spektrale Messungen. Ebenso wie bei dem Fenster für Intensitätsscans wird ein großer Teil für die grafische Darstellung der zuletzt gemessenen Daten verwendet. Oberhalb dieses Bereiches befinden sich links Bedienelemente zur Steuerung und Konfiguration von Messungen. Mit den drei Eingabefeldern „Exposure Time [s]“, „n_spectra“ und „step size [°]“ können die Belichtungszeit pro Aufnahme, die Anzahl der Spektren einer Spektrenserie und der Winkel, um den der Rotor der Polarisationsoptik pro Spektrum einer polarisationsabhängigen Spektrenserie gedreht wird, eingestellt werden. Der Knopf „Show Preview“ startet einen Vorschaumodus, in dem ständig Spektren mit der CCD-Kamera aufgenommen und dargestellt werden, ohne sie zu speichern, um so die Einstellungen der Kamera und des Spektrographen testen zu können.

Die Knöpfe „Take Spectrum“, „Take Image“, „Take Series“ und „Take Video“ starten jeweils Messungen, deren Daten nach Abschluss wie vorher beschrieben automatisch gespeichert werden. Mit „Take Spectrum“ und „Take Image“ wird ein Spektrum bzw. ein Bild des gesamten CCD-Chips erfasst. Die Knöpfe „Take Series“ und „Take Video“ starten die Aufnahme von Spektrenserien. Dabei wird bei ersterem die Aufnahme nach der in „n_spectra“ angegebenen Anzahl Spektren oder durch erneutes Drücken des Knopfes beendet, während bei „Take Video“ die Aufnahme dagegen durch erneutes Drücken des Knopfes beendet werden muss. Zur Darstellung der Spektrenserien wird außerdem ein zusätzliches Fenster verwendet, in dem die Serien wie bei Intensitätsscans zweidimensional mit einer Farbskala für die Intensität dargestellt werden. Hervorzuheben ist noch der Knopf „Adjustment Modus“, der ein zusätzliches Fenster öffnet, das zur Erleichterung der Justage des Strahlenganges durch den Spektrographen auf die CCD-Kamera verschiedene Funktionen, wie z. B. die Stellung des Spektrographen auf die 0.-Ordnung, bereitstellt.

Im mittleren Bereich befinden sich oben Eingabefelder zur Steuerung des Gitterspektrographen und unten Bedienelemente zur Konfiguration der CCD-Kamera. Für den Spektrographen kann im Feld „Grating“ ein Gitter aus einer Auswahlliste gewählt und im Feld „center wavelength“ die Mittenposition in Nanometern des auf den CCD-Chip der Kamera abgebildeten Spektralbereichs eingestellt werden. Die Änderungen werden erst nach Aktivierung des Knopfes „Apply“ durchgeführt. Dabei werden gleichzeitig die Grenzen des auf der CCD-Kamera sichtbaren Wellenlängenbereichs berechnet

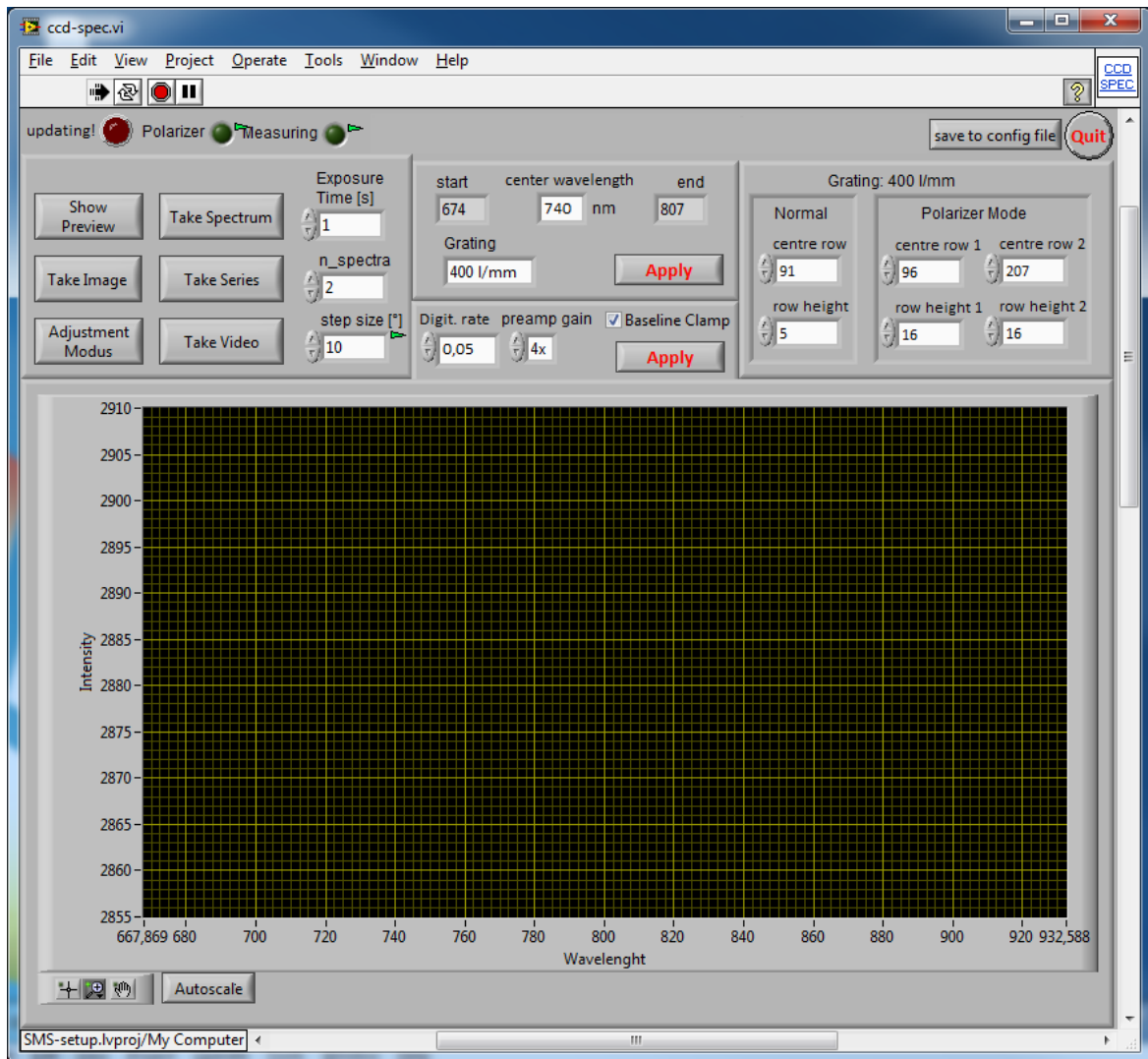


Abbildung A.3: Bildschirmfoto des Fensters zur Steuerung von Messungen mit der CCD-Kamera. Im unteren Teil werden die aktuellen Daten angezeigt. Links oben befinden sich Knöpfe zum Ausführen verschiedener Messungen und Eingabefelder für wichtige Parameter. In der Mitte wurden Eingabefelder zur Konfiguration des Spektrographen und der CCD-Kamera platziert. Auf der rechten Seite können abhängig vom Gitter die Bereiche vom CCD-Chip ausgewählt werden, die bei einer Messung mit oder ohne Polarisationsoptik ausgelesen werden sollen.

und in die Felder „start“ und „end“ eingetragen. Für die CCD-Kamera können in den Auswahllisten „Digit. rate“ und „preamp gain“ die Digitalisierungsrate des Digital-Analog-Wandlers in Megahertz und der Verstärkungsfaktor des Signalvorverstärkers gewählt werden. Mit dem Auswahlfeld „Baseline Clamp“ kann eine spezielle Funktion der CCD-Kamera ein-/ausgeschaltet werden, die bei schneller Aufnahme mehrerer Spektren nacheinander mögliches Driften des Signaloffsets, das durch Aufheizen des CCD-Chips entsteht, minimiert. Wie bei der Steuerung des Spektrographen werden auch hier Änderungen erst durch Aktivierung des Knopfes „Apply“ übernommen.

Auf der rechten Seite werden in mehreren Eingabefeldern abhängig vom gewählten Gitter und der Verwendung der Polarisationsoptik Bereiche des CCD-Chips angegeben, die während der Messung ausgelesen werden sollen. So kann der während der Messungen ausgelesene Bereich auf den belichteten Teil des Chips eingeschränkt und damit zusätzliches Rauschen durch Auslesen nicht belichteter Teile minimiert werden. Die Auswahl eines Bereiches erfolgt über die Angabe einer Pixelreihe in der Mitte des Bereichs und der Höhe in Pixeln. Auf diese Weise werden ausgewählte Zeilen des CCD-Chips auf der vollen Breite ausgelesen. Für Messungen ohne Polarisationsoptik muss für jedes Gitter ein Bereich angegeben werden, und für Messungen mit der Polarisationsoptik müssen wegen der Aufspaltung des Lichts in senkrecht aufeinander stehende Polarisationsrichtungen für jedes Gitter jeweils zwei Bereiche angegeben werden. Die eingegebenen Bereiche können nach einer Änderung durch Drücken des am oberen Rand des Fensters angebrachten Knopfes „save to config file“ in einer Konfigurationsdatei gespeichert werden, aus der sie bei einem späteren Start der Software wieder gelesen werden.

Ebenfalls am oberen Rand des Fensters befinden sich drei Indikatoren. Der Indikator „updating!“ leuchtet auf, während der Spktrograph die Gitterposition oder zu einem anderen Gitter wechselt, und der Indikator „Polarizer“ zeigt an, ob die Polarisationsoptik verwendet wird. Wie im Hauptfenster und im Fenster für Intensitätsscans leuchtet „Measuring“ auf, wenn eine Messung läuft. Am unteren Rand des Fensters befindet sich außerdem der Knopf „Autoscale“ mit dem die automatische Skalierung der grafischen Darstellung ein- bzw. ausgeschaltet werden kann.

Anhang B

Auswertungssoftware

Im Folgenden wird der Aufbau und die Funktionalität der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Auswertungssoftware beschrieben. Die Software befindet sich in beständiger Weiterentwicklung, daher wird hier der bisher implementierte Teil beschrieben. Die Implementierung wurde dabei gemeinsam mit Caroline Arnold (Universität Tübingen) durchgeführt, wobei sie überwiegend die graphische Oberfläche implementiert hat und die Algorithmen zum Laden, Analysieren und Darstellen der Daten von mir entwickelt wurden. Die Motivation zur Entwicklung der Software bestand darin, Messdaten einfach sichten und einmal entwickelte Algorithmen zur Datenanalyse auf weitere Datensätze anwenden zu können.

B.1 Aufbau der Software

Die Funktionsweise der Software basiert auf der Unterteilung der Messdaten in unterschiedliche Datentypen. Diese repräsentieren dabei die unterschiedlichen Arten der Messung, die in der Steuerungssoftware implementiert sind. Die Datentypen wurden als Objekte in MATLAB implementiert, d.h. neben den Daten stellen sie verschiedene Funktionen z. B. zur Darstellung und Analyse bereit. Diese Umsetzung hat den Vorteil, dass für jeden Datentyp z. B. jeweils die Funktion zur Darstellung angepasst werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf diese Weise Datentypen für Einzelspektren und Spektrenserien jeweils mit und ohne Polarisationsaufteilung und für 2D-Intensitätsscans implementiert. Diesen Datentypen gemeinsam sind dabei Funktionen

zum Laden und Speichern, Auswahl von Teilbereichen und Darstellung. Für die einzelnen Datentypen wurden außerdem jeweils spezielle Darstellungsfunktionen wie z. B. die Darstellung einzelner Spektren oder des Durchschnittsspektrums einer Spektrenserie hinzugefügt. Auch Funktionen für statistische Auswertungen wurden entsprechend hinzugefügt, so dass alle Funktionen, die direkt auf Daten zugreifen müssen im jeweiligen Objekt implementiert sind. So konnte die grafische Oberfläche mit einer strikten Trennung zu den Daten entwickelt werden indem diese nur die verschiedenen Funktionen der Datenobjekte aufruft. Auf diese Weise können Änderungen am Datenformat an zentraler Stelle vorgenommen werden ohne das die Funktionalität der grafischen Oberfläche davon beeinflusst wird.

B.2 Grafische Oberfläche

Die grafische Oberfläche besteht aus einem Hauptfenster und mehreren Unterfenstern, die vom Hauptfenster aus geöffnet werden können. Das Hauptfenster dient der Verwaltung (laden, auswählen, speichern, usw.) der Datensätze für die unterschiedlichen Datentypen und der Auswahl verschiedener Analysemethoden. Zur Unterscheidung zwischen den Datentypen wurde das Fenster in mehrere Tabs für jeweils einen Datentyp unterteilt. Die Tabs sind dabei ähnlich strukturiert, enthalten aber auch spezifische Anpassungen an den jeweiligen Datentyp.

Abbildung B.1 zeigt beispielhaft das Hauptfenster mit dem Tab für Spektrenserien. Im Bereich 1 am oberen Ende des Fensters werden die Reiter zur Auswahl der Tabs angezeigt. Der Bereich darunter ist in allen Tabs ähnlich strukturiert und wird zum überwiegenden Teil zur Darstellung des ausgewählten Datensatzes verwendet. Links neben der Darstellung befindet sich im Bereich 2 eine Liste der geladenen Datensätze für den aktiven Tab über die der aktuell angezeigte Datensatz ausgewählt wird. Unterhalb dieser Liste befinden sich in allen Tabs die Knöpfe „Backward“ und „Forward“ zum schrittweisen Durchlaufen der Liste, „Remove“ zum Löschen des ausgewählten Datensatzes aus der Liste und „Assign“ um alle Datensätze aus der Liste unter einem Variablennamen zu speichern und so in der Textkonsole von MATLAB zugänglich zu machen. Die weiteren Knöpfe in diesem Bereich sind spezifisch für den jeweiligen Datentyp. So werden in diesem Fall mit „Browse“, „Average“, „Trace“ und „SCS“ jeweils Fenster zur Anzeige der Einzelspektren der Serie, des Durchschnittsspektrums,

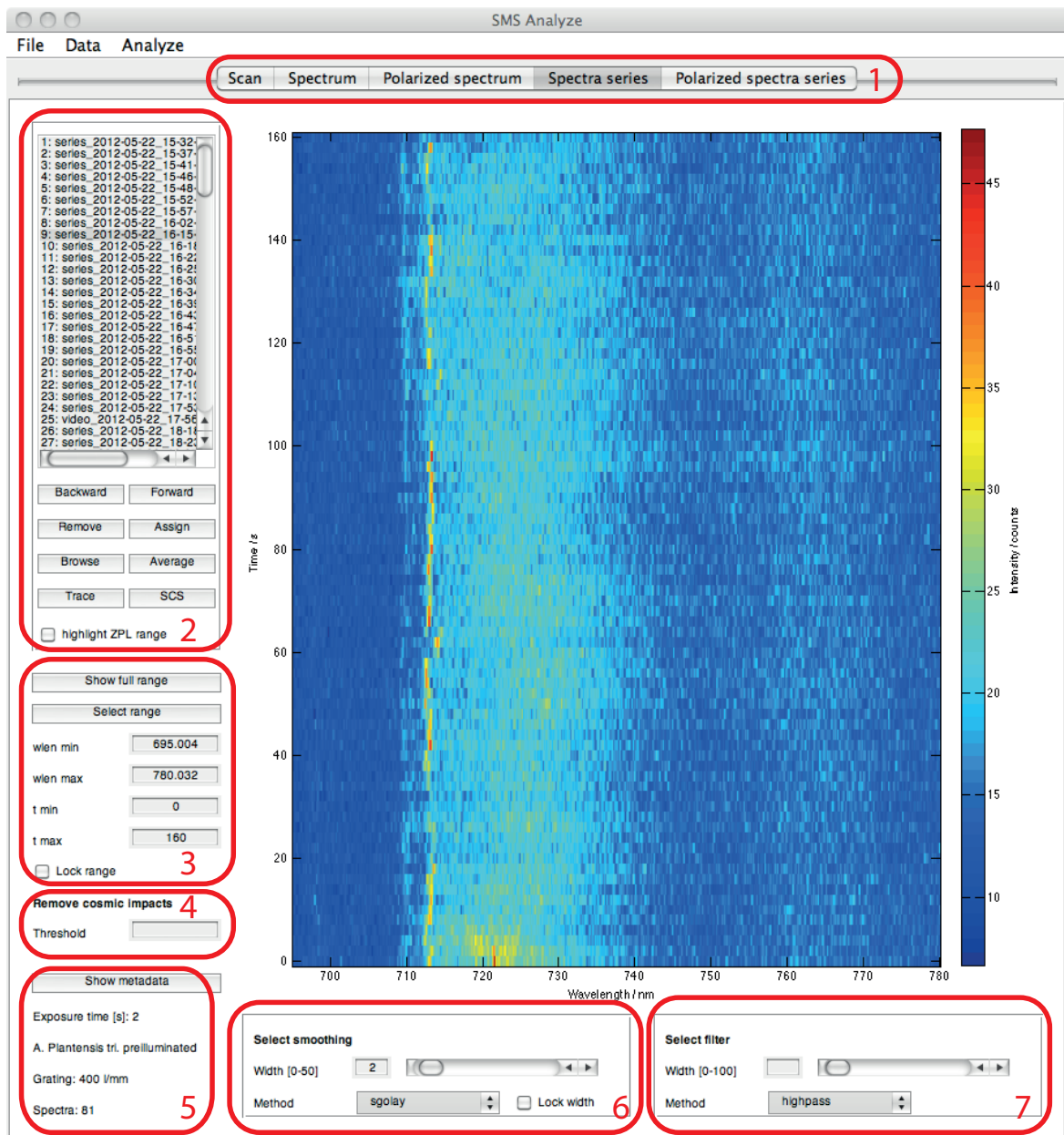


Abbildung B.1: Bildschirmfoto des Hauptfensters der Auswertungssoftware. Der größte Teil des Fensters wird zur Darstellung des aktuellen Datensatzes verwendet. Um diesen Bereich angeordnet sind: 1. Reiter zum Wechsel zwischen verschiedenen Datentypen; 2. Liste der geladenen Datensätze des ausgewählten Datentyps und Knöpfe zur Navigation und zum Öffnen von Unterfenstern zur weiteren Analyse; 3. Knöpfe und Eingabefelder zur Auswahl des Datenbereichs; 4. Eingabefeld für den Schwellwert zur Erkennung der Signale von Einschlägen kosmischer Teilchen (nur für Spektren und Spektrenserien); 5. Anzeige wichtiger Parameter des aktuellen Datensatzes und ein Knopf zur Anzeige weiterer Parameter; 6. Steuerung und Auswahl verschiedener Glättungsfilter; 7. Steuerung und Auswahl weiterer Filter z.B. Hochpassfilter zur Kantenerkennung

der Zeitspur für einzelne Wellenlängen oder Wellenlängenbereiche und der synchronen Korrelationsmatrix geöffnet. Mit dem Markierungsfeld „highlight ZPL range“ können außerdem die Bereiche in der Darstellung des ausgewählten Datensatzes hervorgehoben werden, in denen ZPLs zuvor durch einen speziellen Algorithmus erkannt wurden.

Mit den Eingabefeldern und Knöpfen im Bereich 3 kann der angezeigte Datenbereich eingestellt werden. Mit dem Knopf „Show full range“ lässt sich der vollständige Datenbereich des ausgewählten Datensatzes auswählen, während entweder über den Knopf „Select range“ mithilfe der Maus oder über die Eingabe von Werten in die vier darunter liegenden Felder Teilbereiche gewählt werden können. Die Anzahl der Eingabefelder hängt dabei vom Datentyp ab, so kann z. B. bei einem Spektrum nur der Wellenlängenbereich (2 Eingabefelder) ausgewählt werden, während bei einer Spektrenserie zusätzlich der Zeitraum ausgewählt werden kann (4 Eingabefelder). Mit dem Markierungsfeld „Lock range“ kann der ausgewählte Bereich fixiert werden, so dass bei einem Wechsel zu einem anderen Datensatz ebenfalls der gleiche Bereich angezeigt wird.

Das Eingabefeld im Bereich 4 ist spezifisch für Daten, die mit der CCD-Kamera aufgenommen wurden, wird also nicht bei Intensitätsscans angezeigt. Durch Eingabe eines Wertes in dieses Feld wird ein Algorithmus ausgelöst, der im ausgewählten Datensatz intensive Signale, die durch Einschläge kosmischer Teilchen auf den CCD-Chip der Kamera verursacht werden, zu erkennen und zu entfernen. Dafür wird der eingegebene Wert als Schwellwert verwendet, so dass alle Punkte im Datensatz, die über diesem Schwellwert liegen, durch Werte aus der linearen Interpolation zwischen den benachbarten Punkten genähert werden.

Der Bereich 5 dient der Anzeige wichtiger Parameter des ausgewählten Datensatzes aus der Messung, wie z. B. Probenname und Belichtungszeit. Die Anzahl der Parameter variiert dabei zwischen den Datentypen. Zusätzlich können über den Knopf „Show metadata“ weitere Parameter der Messung angezeigt werden.

Die benachbarten Bereiche 6 und 7 dienen der Anwendung verschiedener Filter auf den aktuell ausgewählten Datensatz, wobei im Bereich 6 verschiedene Glättungsfilter ausgewählt werden können, während im Bereich 7 zwischen zwei Filtern zur Kantenkennung gewählt werden kann. Die Einstellung der Filter erfolgt in beiden Fällen analog. So kann die Filtermethode aus einer Auswahlliste gewählt und die Filterweite entweder über ein Eingabefeld oder einen Schieberegler eingestellt werden. Als Filter-

methoden für den Glättungsfilter können gleitender Mittelwert, Savitsky-Golay und mehrere Regressionsfilter gewählt werden. Zur Kantenerkennung stehen Hochpass und Laplacefilter zur Verfügung. Diese wurden aber nicht für Intensitätsscans implementiert, weshalb der Bereich 7 bei diesem Tab fehlt. Die Einstellungen für den Glättungsfilter können analog zur Fixierung des Datenbereiches ebenfalls über die Aktivierung eines Markierungsfeldes („Lock width“) fixiert werden.

Zusätzlich zu den Steuerungselementen in den Tabs befindet sich am oberen Rand des Fensters eine Menüleiste mit den Untermenüs: „File“, „Data“ und „Analyze“. Über das Untermenü „File“ können Daten aus verschiedenen Quellen geladen werden oder alle Datensätze aller Tabs bzw. des aktuellen Tabs in einer Datei gespeichert werden. Die Einträge im Untermenü „Data“ dagegen wirken nur auf die Datensätze des aktuellen Tabs und bieten Funktionen wie z. B. zurücksetzen der Datensätze auf den Ursprungszustand (Rohdaten). Mit dem letzten Untermenü „Analyze“ können verschiedene Analysemethoden aufgerufen werden, die alle Datensätze des aktuellen Tabs verwenden. So kann z. B. das Durchschnittsspektrum aller Datensätze im Tab angezeigt werden. Es stehen aber auch die beiden in Kapitel 4 beschriebenen Algorithmen zur Bestimmung der Position des Fluoreszenzmaximums und der Halbwertsbreite oder zur automatischen Erkennung von ZPLs in Spektrenserien zur Verfügung. Für alle diese Analysemethoden werden nach der Aktivierung Unterfenster geöffnet, die meistens eine grafische Darstellung der Ergebnisse und Steuerelemente zur Veränderung der Darstellung oder Beeinflussung der Analyse enthalten.

In Abbildung B.2 sind beispielhaft vier Unterfenster zur Analyse der Daten dargestellt. Die ersten drei Fenster (a,b und c) können über die entsprechenden Knöpfe „Browse“, „Average“ und „Trace“ geöffnet werden. Sie zeigen für die im Hauptfenster ausgewählte Spektrenserie Einzelspektren (a), die Zeitspur (b) und das Durchschnittsspektrum (c). Das Fenster zur Anzeige der Einzelspektren enthält neben der grafischen Darstellung des Spektrums einen Schieberegler und ein Eingabefeld zur Auswahl des Einzelspektrums aus der Serie. Die Auswahl erfolgt über die Angabe der Zeit nach Start der Messung. Möchte man außerdem zwei Einzelspektren einer Serie, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommen wurden, gegenüberstellen, kann man einen zweiten Schieberegler zusammen mit Eingabefeld aktivieren und so unabhängig ein zweites Spektrum auswählen. Die beiden Spektren werden dann in unterschiedlichen Farben im nebenliegenden Diagramm dargestellt.

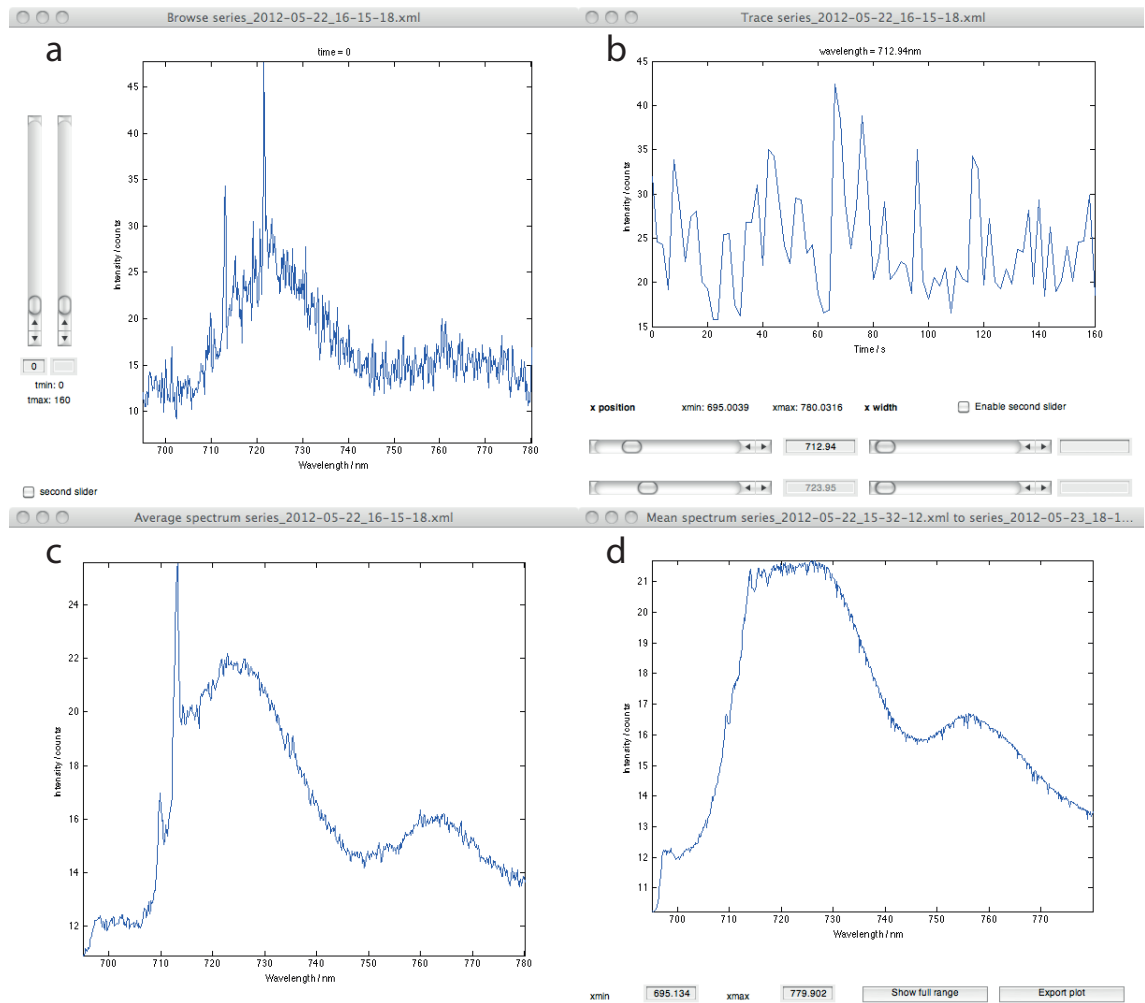


Abbildung B.2: Bildschirmfotos von vier Unterfenstern der Auswertungssoftware. **a:** Anzeige von Einzelspektren aus einer Spektrenserie; **b:** Anzeige des zeitlichen Verlaufs der Intensität in einer Spektrenserie für eine einstellbare Wellenlängenposition oder einen einstellbaren Wellenlängenbereich; **c:** Anzeige des Durchschnittsspektrums einer Spektrenserie; **d:** Anzeige des Durchschnittsspektrums aller geladenen Spektrenserien.

Sehr ähnlich ist auch die Funktionalität des Fensters zur Anzeige von Zeitspuren (b). Dort können über ein bzw., wenn zwei Zeitspuren angezeigt werden sollen, zwei Eingabefelder und Schieberegler Wellenlängenpositionen ausgewählt werden für die die Zeitspur dargestellt werden soll. Wie bei der Anzeige einzelner Spektren werden die Zeitspuren in unterschiedlichen Farben dargestellt. Zusätzlich kann mit weiteren Schiebereglern und Eingabefeldern die Breite in Nanometern angegeben werden, über die Werte entlang der Wellenlängenchse gemittelt werden sollen, dabei liegt die gewählte Wellenlängenposition in der Mitte des Bereiches. So kann auch der Intensitätsverlauf für Wellenlängenbereiche angezeigt werden.

Das Durchschnittsspektrum des ausgewählten Datensatzes wird in einem Fenster ohne zusätzliche Bedienelemente angezeigt (c), da zur Berechnung der im Hauptfenster angezeigte Ausschnitt des ausgewählten Datensatzes verwendet wird. Daher wird sowohl der Wellenlängenbereich als auch der zeitliche Ausschnitt zur Berechnung über das Hauptfenster gesteuert.

Das in Teil (d) abgebildete Fenster zeigt das Durchschnittsspektrum aller geladenen Spektrenserien zusammen mit Eingabefeldern zur Einstellung des angezeigten Wellenlängenbereiches. Geöffnet werden kann dieses Fenster über das Untermenü „Analyse“, steht dabei aber nur für Spektren und Spektrenserien zur Verfügung. Mit dem Knopf „Show full range“ kann außerdem der Wellenlängenbereich auf den maximal aus den Daten verfügbaren Bereich gesetzt werden. Zusätzlich kann in diesem Fenster mit dem Knopf „Export plot“ die grafische Darstellung in ein PDF-Dokument exportiert werden.

Außer diesen beispielhaft gezeigten Fenstern stehen noch weitere zur Analyse der ZPL-Häufigkeit in Spektrenserien, Darstellung der Fluoreszenzmaxima gegen die Halbwertsbreite für Spektren und Spektrenserien und Darstellung der synchronen Korrelationsmatrix für Spektrenserien zur Verfügung. Zusätzlich befindet sich ein Analysewerkzeug zur Bestimmung der Winkeldifferenz verschiedener Emitter in polarisationsabhängigen Spektrenserien in der Entwicklung.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

- Marc Brecht für das persönliche Vertrauensverhältnis, das sich über die Jahre entwickelt und die tolle Zusammenarbeit erst ermöglicht hat. Er hat mir mit seiner offenen und ehrlichen Art, seiner Geduld und seiner Hartnäckigkeit dieses sehr komplexe Thema näher gebracht und war bei jeder Art von Problemen sehr hilfsbereit, daher wäre ohne ihn die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Auch außerhalb der Wissenschaft habe ich in vielen Gesprächen und Diskussionen sehr viel von ihm gelernt, was meinen Horizont an so mancher Stelle erweitert hat.
- Alfred Meixner für die herzliche Aufnahme in Tübingen und dafür, diese Arbeit mit zu betreuen. Außerdem möchte ich mich für viele hochinteressante Diskussionen bedanken, bei denen ich vieles dazu gelernt und besser verstanden habe.
- Robert Bittl für seine große Hilfsbereitschaft und die Unterstützung in der Zeit in Berlin als Mitglied seiner Arbeitsgruppe und darüber hinaus nach dem Umzug nach Tübingen.
- Eberhard Schlodder für sehr interessante Diskussionen, in denen er mir sehr komplexe Fragestellungen näher gebracht hat. Er hat sich immer Zeit genommen, meine Fragen zu beantworten, und so entscheidend zu meinem Verständnis des Themas und damit dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders hervorheben möchte ich auch seine große Hilfsbereitschaft und die tolle Atmosphäre bei den gemeinsamen Messungen.
- Till Biskup für seine große Hilfsbereitschaft, seine fröhliche offene und direkte Art und die Freundschaft, die uns verbindet. Er stand mir immer bei Problemen

und Fragen zur Seite und hat durch seine Hilfestellungen u.a. für L^AT_EX und insbesondere in sprachlichen Fragen die Arbeit an vielen Stellen vorangebracht.

- Alexander Konrad für die sehr angenehme Zusammenarbeit, seine Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bei jeglicher Laborarbeit.
- allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Brecht für eine tolle Arbeitsatmosphäre, die mir immer viel Spaß gemacht hat.
- meinen ehemaligen Kollegen Axel Luchterhand, Jana Nieder und Volker Radics aus der Einzelmolekülspektroskopieuntergruppe in Berlin für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Unterstützung im Labor. Insbesondere möchte ich Axel Luchterhand für seine Unterstützung und die Freundschaft, die uns verbindet, danken.
- Celine Elsäßer für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung unter schwierigen Bedingungen während meiner Zeit in Berlin.
- allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Meixner für die herzliche Aufnahme in Tübingen und tolle gemeinsame Aktivitäten.
- allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bittl für die wunderbare Zeit in Berlin und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.
- ganz besonders meiner gesamten Familie für ihre bedingungslose Unterstützung!