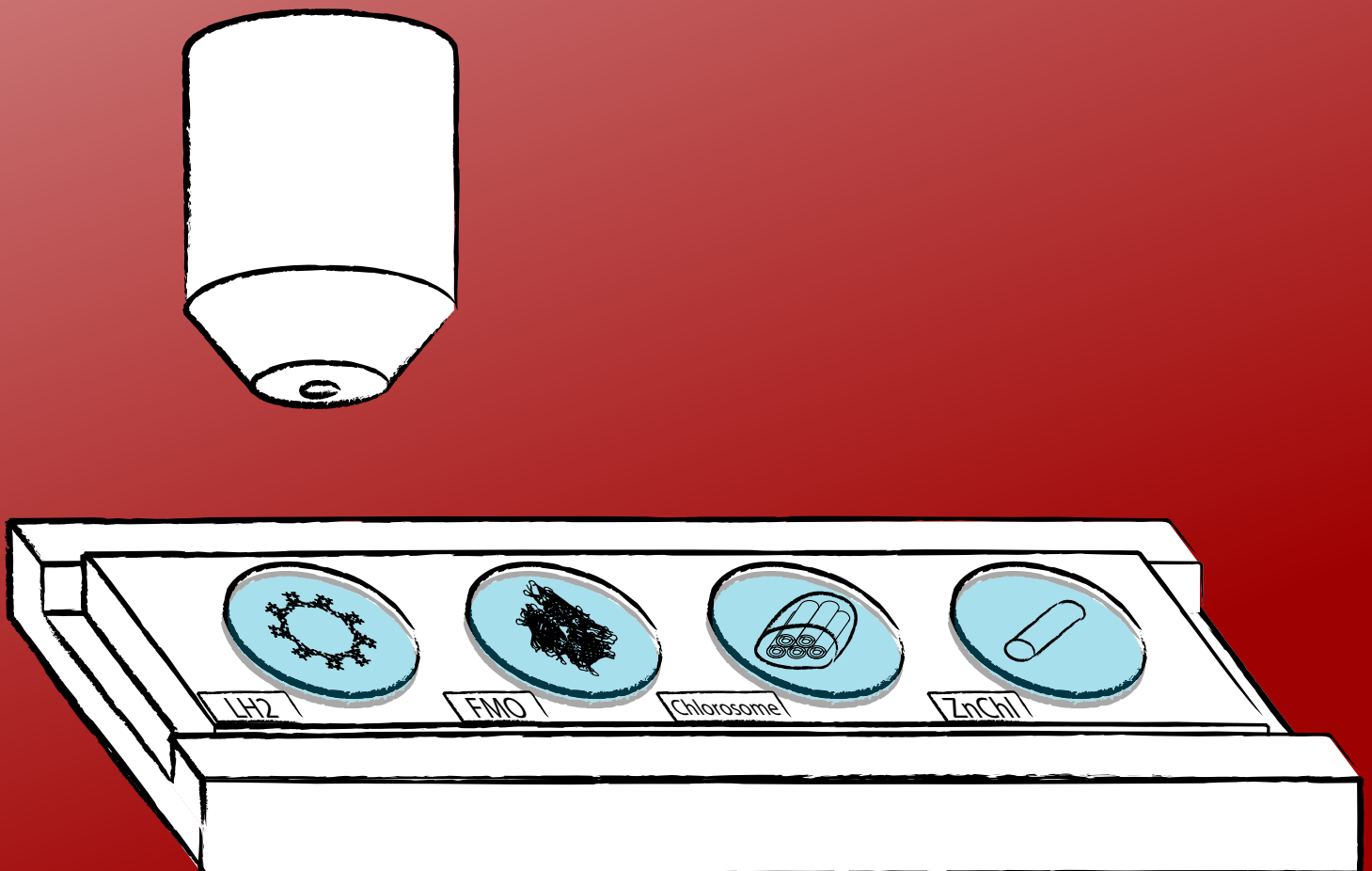


Dissertation  
Alexander Christian Löhner

# Untersuchung von molekularen Aggregaten natürlicher und künstlicher Lichtsammelsysteme mittels Einzelmolekül-Spektroskopie



**Untersuchung von molekularen Aggregaten  
natürlicher und künstlicher Lichtsammelsysteme  
mittels Einzelmolekül-Spektroskopie**

*Von der Universität Bayreuth  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung*

*von  
Alexander Christian Löhner  
aus Hof*

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Köhler
2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Weiss

Tag der Einreichung: 12. April 2018

Tag des Kolloquiums: 25. Juli 2018



---

## Übersicht bisheriger Publikationen

### *für die vorliegende Arbeit verwendet*

- P1** LÖHNER, A.; CAREY, A.-M.; HACKING, K.; PICKEN, N.; KELLY, S.; COGDELL, R. J.; KÖHLER, J. (2015): *The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from Allochromatium vinosum*. In: Photosynth. Res. **123** (1), S. 23–31.\*
- P2** LÖHNER, A.; ASHRAF, K.; COGDELL, R. J.; KÖHLER, J. (2016): *Fluorescence-excitation and Emission Spectroscopy on Single FMO Complexes*. In: Sci. Rep. **6**, Nr. 31875.
- P3** GÜNTHER, L. M.\*\*; LÖHNER, A.\*\*; BLOEMSMA, E. A.; TANK, M.; BRYANT, D. A.; KNOESTER, J.; KÖHLER, J.: *Structural variations in chlorosomes from wild-type and a bchQR mutant of Chlorobaculum tepidum revealed by single-molecule spectroscopy*. Zur Publikation eingereicht bei: J. Phys. Chem. B.

### *weitere*

LÖHNER, A.; COGDELL, R. J.; KÖHLER, J. (2018): *Contribution of single-molecule techniques to structural issues of pigment-protein complexes from photosynthetic purple bacteria*. In: J. R. Soc. Interface **15** (138), Nr. 20170680.

---

\* Die in dieser Publikation gezeigten Einzelmolekül-Experimente entstanden bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit, die weiteren Experimente, zugehörigen Simulationen und Interpretationen entstanden während des Promotionsvorhabens.

\*\* Gleicher Beitrag der beiden Autoren





## Zusammenfassung

Die Nutzung der Solarenergie bietet eine umweltfreundliche Möglichkeit, den weltweit steigenden Energiebedarf zu decken. Eine Alternative zu den herkömmlichen Silizium-basierten Solarzellen sind organische Solarzellen, die günstig herzustellen, leicht und flexibel sind. Der Wirkungsgrad dieser organischen Solarzellen bleibt bislang allerdings deutlich hinter dem der Halbleitersolarzellen zurück. Währenddessen finden sich in der Natur Organismen, deren hocheffiziente Photosyntheseapparate es ihnen erlauben, auch bei geringsten Lichtströmen photoautotroph zu leben. Ein besseres Verständnis dieser natürlichen Photosyntheseapparate auf molekularer Ebene kann dazu beitragen, Solarenergie für die Energieversorgung der Menschheit effizienter nutzbar zu machen.

In der Natur wird in spezialisierten Komplexen, den sogenannten Reaktionszentren, mit der Energie zuvor absorbierter Photonen ein ladungsgetrennter Zustand herbeigeführt, der die weiteren Photosyntheseprozesse antreibt. Zur Steigerung der zeitlichen Auslastung dieser Reaktionszentren und zur Erweiterung des spektralen Absorptionsbereichs bilden alle photosynthesetreibenden Organismen Antennenkomplexe, die einfallende Photonen absorbieren und deren Energie über das Antennen Netzwerk zu den Reaktionszentren weiterleiten.

Die Ausformung dieser Antennenkomplexe wird von verschiedenen photosynthesetreibenden Organismen auf unterschiedlichste Art und Weise gestaltet: Pflanzen und Cyanobakterien bilden sogenannte LHC-Komplexe, Purpurbakterien besitzen LH-Komplexe und Grüne Schwefelbakterien verwenden sogenannte Chlorosome und FMO-Komplexe für ihre Antennensysteme. Der räumliche Aufbau einiger weniger Komplexe konnte in der Vergangenheit mit Hilfe hochauflösender Methoden, wie zum Beispiel Röntgenstreuexperimenten, bestimmt werden, während für die meisten dieser Antennenkomplexe keine oder nur ungenaue strukturelle Informationen vorliegen. In vielen Fällen ist die direkte Strukturbestimmung nicht möglich, da die für Röntgen-

streuexperimente nötige Kristallisation scheitert, oder weil die Komplexe durch die nötige Probenpräparation zerstört werden.

Neben der direkten Strukturbestimmung bietet die optische Spektroskopie einen indirekten Zugang zum Aufbau der Komplexe: Aus spektroskopischen Experimenten lässt sich die elektronische Struktur bestimmen, die wiederum durch die räumliche Anordnung der Bausteine festgelegt wird. Durch die Kombination spektroskopischer Informationen mit theoretischen Simulationen kann so ein räumliches Modell des untersuchten Komplexes entwickelt werden, indem versucht wird die beobachteten spektralen Eigenheiten mit dem simulierten Modell zu reproduzieren.

In dieser Dissertation wurden drei unterschiedliche Komplexe bakterieller Photosyntheseapparate, sowie eine semi-synthetische Nachbildung eines Antennenkomplexes mit Hilfe von Einzelmolekül-Spektroskopie bei 1,2 K untersucht, um Informationen zur elektronischen und räumlichen Struktur zu erhalten:

- In **P1** wurde das ungewöhnliche Absorptionsverhalten der LH2-Komplexe des Bakteriums *Allochromatium vinosum* untersucht. „Standard“-LH2-Komplexe der Spezies *Rhodoblastus acidophilus* und *Phaeospirillum molischianum*, deren Aufbau mit einer Genauigkeit von bis zu 2,0 Å bekannt ist, zeigen im nahen Infrarot je eine Absorptionsbande bei etwa 800 nm und 850 nm. Die 800 nm-Absorptionsbande der in dieser Arbeit untersuchten LH2-Komplexe dagegen spaltet bei tiefen Temperaturen in zwei Unterbanden auf. Durch die Kombination von Experimenten und Simulationen konnte eine räumliche Struktur für diese Lichtsammelkomplexe vorgeschlagen werden und so der bis dato unbekannt Ursprung der Aufspaltung der 800 nm-Absorptionsbande erklärt werden.
- Bei Experimenten an FMO-Komplexen der Grünen Schwefelbakterien *Chlorobaculum tepidum* wurden die Grenzen der Einzelmolekül-Spektroskopie deutlich (**P2**). Mit den Messungen sollten detailliertere Informationen über die energetischen Zustände in FMO-Komplexen erlangt werden, als dies aus Ensemblemessungen möglich ist: Durch die Umgehung der Interkomplex-Heterogenität wurde erwartet, Spektren mit deutlich geringeren

---

Linienbreiten zu messen, aus denen die lokalen Übergangsenergien der Zustände abgeleitet werden sollten. Damit ließen sich einerseits die spektralen Banden bestimmten Molekülen zuordnen und andererseits experimentell Informationen über die Kopplung der BChl *a*-Moleküle gewinnen, die bislang lediglich aus theoretischen Betrachtungen abgeschätzt werden konnten. Die spektralen Fluktuationen dieser Komplexe sind jedoch auch bei kryogener Temperatur so schnell, dass sich die Spektren einzelner Komplexe kaum vom Ensemble-Spektrum unterscheiden und sich auf der experimentell zugänglichen Zeitskala ergodisch verhalten.

- In **P3** wurden die spektralen Eigenschaften von einzelnen Chlorosomen von *Chlorobaculum tepidum* untersucht, um einen Beitrag zur Klärung der seit Jahren andauernden Kontroverse über deren innere Struktur zu leisten. Dazu wurden Fluoreszenz-Anregungsspektren von wildtypischen sowie genetisch modifizierten Bakterien bei 1,2 K gemessen und miteinander verglichen. Die ähnlichen spektralen Eigenschaften legen eine gleichartige räumliche Anordnung der Chromophore in den wildtypischen und genetisch veränderten Bakterien nahe: Für beide kann ein (identisches) aus NMR-Messungen gewonnenes Gitter zu Zylindern verschiedener Radien aufgerollt werden. Etwa ein Viertel der betrachteten Chlorosome des Wildtyps zeigt jedoch spektrale Signaturen, die bei den Mutanten nicht auftreten: Das Polarisationsverhalten einer Absorptionsbande weicht vom „üblichen“ Verhalten ab und lässt sich nicht mit der Theorie zylinderförmiger Aggregate erklären. Theoretische Überlegungen legen nahe, dass bei dieser Gruppe von Komplexen innerhalb eines einzigen Chlorosomes neben den zu Zylindern gerollten Gittern auch lamellenartige Gitterstrukturen auftreten.
- In **Kapitel 5** wurden Aggregate untersucht, deren Monomere aus natürlichen Chlorophyllmolekülen synthetisiert wurden und die in wässriger Lösung homogene, monolagige, zylinderförmige Strukturen ausbilden. Auffällig bei den Einzelmolekül-Experimenten an diesen Strukturen ist, dass sich die polarisationsaufgelösten Spektren verschiedener Komplexe

deutlich voneinander unterscheiden, obwohl die Komplexe auf Grund der kontrollierten chemischen Synthese als recht homogen eingeschätzt wurden. Mit Hilfe von Computersimulationen in Punkt-Dipol-Näherung konnte ein Modell entwickelt werden, das die unterschiedlichen, experimentell gewonnenen Spektren reproduziert, indem drei strukturelle Parameter innerhalb eines kleinen Bereichs variiert werden. Mit diesem Modell konnte gezeigt werden wie bereits geringfügige Änderungen der Monomer-Anordnung die Spektren des Aggregats beeinflussen.

## Abstract

Solar-energy provides an environmentally friendly solution to cover the increasing worldwide energy consumption. An alternative to conventional silicon-based solar-cells are organic solar-cells, which are light, flexible, and cheap to produce. However, the efficiency of those cells falls short compared to their semiconductor-counterparts. At the same time Nature has brought forth organisms, whose photosynthetic apparatus are that efficient that they can make up their living photoautotrophically with merest light fluxes. A better understanding of these natural processes of photosynthesis on a molecular level could help to make solar-energy useable more efficiently for the energy supply of humankind.

In natural systems the energy of absorbed photons is used to create a charge separated state, which drives the subsequent photosynthetic processes. This charge separation is created by specialised complexes, the so-called reaction centres. To increase the temporal utilization of these reaction centres and to expand the spectral absorption range, all photosynthetic organisms build antenna complexes. Their task is, to absorb photons and transfer their energy to the reaction centres.

In Nature different organisms form a huge variety of antenna systems: Plants and cyanobacteria build so-called LHC-complexes, purple bacteria own LH-complexes and green sulfur bacteria use so-called chlorosomes and FMO-complexes for their antenna systems. Using high-resolution methods, like X-ray scattering, the structure of a small fraction of these complexes could be resolved in the past. But for most antenna complexes the structure remains unclear, as the direct determination of the structure is prevented by a failing crystallisation of the complexes or by destruction of the complexes during sample preparation.

Besides direct determination of the structure optical spectroscopy provides an indirect approach to the spatial configuration of the complexes: From spectroscopic experiments the electronic structure can be determined, which in turn is defined by the spatial arrangement of the building blocks. Thus, through combining spectroscopic in-

formation with theoretical simulations one can develop a spatial model by trying to reproduce the observed spectral features with the simulated model.

In this dissertation three different complexes of bacterial photosynthetic apparatus and one semi-artificial reproduction of an antenna complex is investigated with single-molecule spectroscopy at 1.2 K to gain information about their electronic and spatial structure:

- In **P1** the unusual absorption behaviour of the LH2-complexes of the purple bacteria species *Allochromatium vinosum* was investigated. “Standard”-LH2-complexes of the species *Rhodoblastus acidophilus* and *Phaeospirillum molischanum*, where high-resolution X-ray structures are available, show one absorption band each at about 800 nm and 850 nm in the near infrared. For the LH2-complexes studied in this work, the 800 nm band splits up into two sub-bands at low temperatures. By combination of experiments with numerical simulations a possible structure for the LH2-complexes of this species was proposed, that explains the origin of the splitting of the 800 nm band unknown up to date.
- Experiments on FMO complexes of the green sulfur bacteria species *Chlorobaculum tepidum* showed up the limits of single-molecule spectroscopy (**P2**). These measurements should yield more detailed information about the energetic states than ensemble measurements provide. The expectation for the single-molecule experiment was to obtain spectra with narrower linewidth, as the inter-complex heterogeneity is circumvented. From these spectra the local site-energies should be deduced and the spectral bands should be assigned to certain pigments. On the other hand experimental information about the excitonic coupling of the BChl *a*-molecules should be obtained, which up to now only were estimated by theoretical calculations. However, even at cryogenic temperatures the spectral fluctuations of these complexes are so fast, that the spectra of single complexes barely differ from ensemble spectra. Thus, the FMO complexes show ergodic behaviour on the experimental time resolution.

- In **P3** the spectral properties of single chlorosomes of *Chlorobaculum tepidum* were analysed to give a contribution to the long-standing contentious debate about their inner structure. Therefore fluorescence-excitation spectra from wild-type and mutant bacteria were recorded at 1.2 K and compared to each other. The similar spectral properties suggest an equal spatial arrangement of the chromophores both in the wild-type and mutant bacteria: In both cases an (identical) grid, obtained from NMR-measurements, can be rolled up to cylinders with varying radii. Astonishingly, about one quarter of the wild-type chlorosomes show spectral features, that do not occur for mutant chlorosomes: The polarisation behaviour of one absorption band differs from the “usual” manner and cannot be explained by the theory of cylindrical aggregates. Theoretical considerations suggest, that this group of complexes not only contain grids rolled up to cylinders, but also lamellar grids.
- In **chapter 5** aggregates were studied, whose monomers were synthesised from natural chlorophyll molecules and which form homogeneous, monolayered cylindrical structures in aqueous solution. In the single-molecule experiments it is noticeable, that the polarisation resolved spectra of various complexes clearly differ from each other, although the complexes were expected to be quite homogeneous because of their chemical synthesis. With the help of computer simulations in point-dipole-approximation a model was developed, that reproduces the different, experimentally obtained spectra by varying three structural parameters within a small range. With this model we were able to show, how even smallest changes in the arrangement of monomers influence the spectra of the aggregate.





# Inhaltsverzeichnis

Übersicht bisheriger Publikationen	III
Zusammenfassung	V
Abstract	IX
Abbildungsverzeichnis	XVII
Tabellenverzeichnis	XIX
Abkürzungsverzeichnis	XXI
<b>TEIL A</b>	
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>2 Photosynthetische Apparate</b>	<b>9</b>
2.1 Photosynthese im Allgemeinen.....	9
2.2 Bakterielle Photosynthese.....	12
2.2.1 Bakteriochlorophyll.....	12
2.2.2 Photosynthese der Purpurbakterien.....	15
2.2.2.1 Ablauf der Photosynthese.....	15
2.2.2.2 LH2-Komplexe.....	16
2.2.2.3 LH1-Komplexe.....	19
2.2.2.4 Exziton-Energie-Transfer der Purpurbakterien.....	20
2.2.2.5 Varianten der LH2-Komplexe.....	21
2.2.2.6 <i>Allochromatium vinosum</i> .....	23
2.2.3 Photosynthese Grüner Schwefelbakterien.....	25
2.2.3.1 Ablauf der Photosynthese.....	25
2.2.3.2 Chlorosome.....	26
2.2.3.3 FMO-Komplexe.....	30

---

2.2.3.4	Exziton-Energie-Transfer der Grünen Schwefelbakterien.....	32
2.2.3.5	<i>Chlorobaculum tepidum</i> .....	34
2.3	Künstliche Lichtsammelsysteme.....	36
<b>3</b>	<b>Wechselwirkung von Licht mit organischer Materie</b>	<b>39</b>
3.1	Absorption und Emission organischer Moleküle.....	39
3.2	Pigment-Pigment-Wechselwirkung.....	40
3.2.1	Inhomogenes Dimer, schwache Wechselwirkung.....	42
3.2.2	Homogenes Dimer, starke Wechselwirkung.....	43
3.2.3	Homogener Ring.....	45
3.2.4	Homogener Zylinder.....	46
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>49</b>
4.1	Experimenteller Aufbau.....	49
4.2	Probenpräparation.....	52
4.3	Verwendete Chemikalien, Filter und Geräte.....	57
4.4	Simulationen.....	58
4.4.1	LH2-Komplexe.....	59
4.4.2	ZnChl-Aggregate.....	62
<b>5</b>	<b>Experimente und Simulationen an ZnChl-Aggregaten</b>	<b>63</b>
5.1	Experimentelle Ergebnisse.....	64
5.2	Diskussion.....	70
5.3	Simulationen.....	71
	<b>Anhang: Überblick spektraler Eigenschaften von Chlorosomen</b>	<b>77</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>95</b>

---

**TEIL B**

<b>Übersicht über die Publikationen</b>	<b>99</b>
P1: The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from <i>Allochromatium vinosum</i> .....	105
P2: Fluorescence-excitation and Emission Spectroscopy on Single FMO Complexes.....	121
P3: Structural variations in chlorosomes from wild-type and a <i>bchQR</i> mutant of <i>Chlorobaculum tepidum</i> revealed by single-molecule spectroscopy.....	131



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematischer Ablauf der Photosynthese.....	10
Abbildung 2:	Chemische Strukturformel und Absorptionsspektren von Bakteriochlorophyll.....	13
Abbildung 3:	Schemazeichnung des Photosyntheseapparates der Purpurbakterien.....	15
Abbildung 4:	3D-Darstellung eines LH2-Komplexes mit Absorptionsspektrum.....	18
Abbildung 5:	Schematische Skizze des Energietransferwegs im Photosynthesystem der Purpurbakterien.....	20
Abbildung 6:	Raumtemperatur-Absorptionsspektren der $Q_y$ -Bande von LH2-Komplexen unterschiedlicher Bakterienspezies.....	22
Abbildung 7:	Taxonomische Einordnung der Purpurbakterien <i>Alc. vinosum</i> .....	23
Abbildung 8:	Schemazeichnung des Photosyntheseapparates der Grünen Schwefelbakterien.....	25
Abbildung 9:	Überblick über die Seitengruppen der Bakteriochlorophylle in wildtypischen und genetisch veränderten <i>Cba. tepidum</i> -Bakterien....	28
Abbildung 10:	3D-Struktur des FMO-Komplexes von <i>Cba. tepidum</i> mit Ensemble-Absorptions- und Fluoreszenz-Anregungsspektren.....	31
Abbildung 11:	Schematische Skizze des Energietransferwegs im Photosynthesystem der Grünen Schwefelbakterien.....	33
Abbildung 12:	Taxonomische Einordnung der Grünen Schwefelbakterien <i>Cba. tepidum</i> .....	34
Abbildung 13:	Chemische Struktur der in Kapitel 5 verwendeten Zink-Chlorine.....	36
Abbildung 14:	Schematische Darstellung der Energieniveaus zweier Moleküle mit schwacher und starker Wechselwirkung.....	42
Abbildung 15:	Geometrische Betrachtung der resultierenden Übergangsdipolmomente bei nicht-paralleler Anordnung gleichartiger Monomere....	44
Abbildung 16:	Anordnung von Dipolen auf einer zylindrischen Struktur.....	46

---

Abbildung 17: Schematische Skizze des verwendeten konfokalen Mikroskops.....	49
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Präparation von Einzelkomplex- Proben für Tieftemperaturmessungen.....	54
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Anordnung von Dipolen auf einer zylindrischen Struktur.....	58
Abbildung 20: Skizze der Anordnung von Übergangsdipolmomenten auf vier Einzelringen für die Simulation von LH2-Komplexen.....	59
Abbildung 21: Stapel von 160 nacheinander aufgenommenen Fluoreszenz-Anre- gungsspektren eines einzelnen ZnChl-Aggregats mit globalem Fit.....	65
Abbildung 22: Beispiele polarisationsaufgelöster Spektren von vier verschiedenen ZnChl-Aggregaten in 2D-Darstellung.....	66
Abbildung 23: Statistische Verteilungen der spektralen Parameter für 51 ein- zelne ZnChl-Aggregate.....	67
Abbildung 24: Skizze zur Veranschaulichung der Lage zylinderförmiger Aggre- gate auf der Probenoberfläche, relativ zum Objektiv.....	69
Abbildung 25: Statistische Verteilung des Winkels $\beta$ .....	70
Abbildung 26: Simulierte, polarisationsaufgelöste Fluoreszenz-Anregungs- spektren der in Abbildung 22 gezeigten Komplexe.....	73

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen der in Abbildung 23 gezeigten Histogramme.....	68
Tabelle 2: Zusammenfassung der fixen Parameter für die Simulation der homogenen Aggregate.....	72
Tabelle 3: Zusammenfassung der variablen Parameter für die in Abbildung 26 gezeigten vier Beispiel-Komplexe.....	73
Tabelle 4: Zusammenfassung der spektralen Parameter $\Delta E$ und $O_1/O_2$ aus experimentellen und simulierten Daten für die vier Beispielaggregate.....	74
Tabelle 5: Zusammenfassung der Eigenschaften der Absorptionsbanden natürlicher, genetisch veränderter und künstlicher Chlorosome.....	77





---

## Abkürzungsverzeichnis

2D/3D	zwei-/dreidimensional
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. „atomic force microscopy“)
Alc.	Allochromatium
APD	Avalanche-Photodiode
ATP	Adenosintriphosphat
BChl	Bakteriochlorophyll
BP	Bandpass
bzw.	beziehungsweise
Cba.	Chlorobaculum
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (engl. „charge-coupled device“)
cw	zeitlich konstante Wellenform (engl. „continuous waveform“)
DDM	Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
engl.	englisch
FMO	Fenna-Matthews-Olson-Komplex
FWHM	Halbwertsbreite (engl. „full width at half maximum“)
HL	hohe Lichtintensität (engl. „high-light“)
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie (engl. „International Union of Pure and Applied Chemistry“)
LDAO	Lauryldimethylamin N-Oxid
LH	Lichtsammel(komplex) (engl. „light-harvesting“)
LL	geringe Lichtintensität (engl. „low-light“)
LP	Langpass
NA	Numerische Apertur
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
ND:YVO <sub>4</sub>	Neodym-dotiertes Yttrium-Orthovanadat

OD	Optische Dichte
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (engl. „Organisation for Economic Co-operation and Development“)
OPEC	Organisation erdölexportierender Länder (engl. „Organization of the Petroleum Exporting Countries“)
PDB	Protein-Datenbank
Phs.	Phaeospirillum
PVA	Polyvinylalkohol
Rbl.	Rhodoblastus
RC	Reaktionszentrum (engl. „reaction centre“)
SP	Kurzpass (engl. „short pass“)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
Ti:Sa	Titan-dotiertes Korund (=“Saphir“)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜDM	Übergangsdipolmoment
vgl.	vergleiche
WF	Weitfeld
WT	Wildtyp
ZnChl	Zink-Chlorin
Ø	Durchmesser

## **TEIL A**

*Einführung*



# 1 Einleitung

Der weltweite Energiekonsum steigt kontinuierlich an (BP EUROPA 2017), während die fossilen Energieträger, wie Kohle oder Erdöl, beständig zur Neige gehen. Von den in den vergangenen 500 Millionen Jahren entstandenen Ölvorräten (BERNER 2003) werden weltweit pro Jahr über zwei Prozent verbraucht (OPEC 2017). Um eine nachhaltige und umweltfreundliche Energieversorgung ohne radioaktive Gefährdung zu gewährleisten ist ein Umstieg auf erneuerbare Energien, wie zum Beispiel Solarenergie, notwendig. Die Strahlungsleistung der Sonne, die auf die Erde trifft (in Mitteleuropa ca.  $0,7 \text{ kW/m}^2$ , STÖCKER 2004), ist dabei mehr als ausreichend, um den aktuellen Strombedarf zu decken: Innerhalb von zwei Stunden wird an einem sonnigen Tag auf die Fläche Deutschlands ( $357\,580 \text{ km}^2$ , STATISTISCHES BUNDESAMT 2017) etwa genauso viel Energie eingestrahlt, wie an elektrischer Energie bundesweit pro Jahr verbraucht wird (rund  $5 \times 10^{14} \text{ Wh}$ , BUNDESNETZAGENTUR 2018).

Die Absorption und Umwandlung dieser Strahlungsleistung in nutzbare elektrische Energie ist derzeit allerdings noch nicht optimal: Silizium-basierte Solarzellen besitzen zwar eine Energieeffizienz von bis zu 17 % (kommerziell verfügbar) bzw. 46 % (im Labor) (FRAUNHOFER INSTITUTE FOR SOLAR ENERGY 2017), sind jedoch teuer und aufwändig herzustellen. Eine Alternative sind organische Solarzellen, die leicht und flexibel sind und die verhältnismäßig günstig hergestellt werden können. Der Wirkungsgrad dieser organischen Solarzellen bleibt bislang allerdings deutlich hinter dem der Halbleitersolarzellen zurück – selbst im Labor werden maximal 12 % Energieeffizienz erreicht (FRAUNHOFER INSTITUTE FOR SOLAR ENERGY 2017). Währenddessen finden sich in der Natur Organismen, deren hocheffiziente Photosyntheseapparate es ihnen erlauben, auch bei geringsten Lichtströmen photoautotroph zu leben. Grünen Schwefelbakterien beispielsweise genügt eine Lichtintensität, die lediglich 1 % des Vollmondlichtes entspricht ( $10^9 \text{ Photonen}/(\text{s} \cdot \text{cm}^2)$ ), um phototroph zu wachsen (BEATTY ET AL. 2005). Zur Verbesserung der organischen Solarzellen liegt es daher nahe, den Prozess der natürlichen Photosynthese besser zu verstehen, um deren Mechanismen zu kopieren.

Bereits vor etwa 240 Jahren wurde erstmals methodisch nachgewiesen, dass Pflanzen unter Lichteinstrahlung Sauerstoff<sup>1</sup> erzeugen und in Dunkelheit ebendiesen wieder verbrauchen (INGEN-HOUZ 1779). Etwa 150 Jahre später konnte gezeigt werden, dass sich der Photosyntheseprozess in eine Hell- und Dunkelreaktion trennen lässt (EMERSON UND ARNOLD 1932), noch bevor VAN NIEL diesen Vorgang als Redox-Prozess beschrieb (1941) und damit den Grundstein legte für die Beschreibung der Photosynthese wie wir sie heute kennen. EMERSON UND ARNOLD stellten in ihrer Veröffentlichung weiterhin bereits fest, dass teilweise mehrere hundert Chlorophylle an der Bildung eines einzigen Sauerstoff-Moleküls beteiligt sind. Dennoch sollte es noch über zwanzig Jahre dauern, bis sich die Idee durchsetzte, dass innerhalb einer photosynthetischen Einheit Energietransfer von Chlorophyll zu Chlorophyll stattfindet (DUYSENS 1952; ARNOLD UND MEEK 1956). Mit dieser Erkenntnis bildete sich langsam die Vorstellung, dass photosynthesetreibende Organismen ihre Fähigkeit mit geringsten Lichtströmen leben zu können, einem Netzwerk von Komplexen verdanken, die ausschließlich auf die Absorption von Licht spezialisiert sind („Lichtsammelkomplexe“) und die die absorbierte Energie zu sogenannten Reaktionszentren weiterleiten, wo der für die Photosynthese nötige Prozess der Ladungstrennung stattfindet.

Diese Anordnung ist nötig, um die Reaktionszentren effizient zu nutzen: Während der Ladungstrennungsprozess von einem Reaktionszentrum etwa tausend Mal pro Sekunde wiederholt werden kann (HOFF UND DEISENHOFER 1997), wird ein solcher Komplex mit einem Absorptionsquerschnitt von  $60 \text{ \AA}^2$  (KOLBER ET AL. 2000) selbst bei voller Sonneneinstrahlung mit einer Leistung von  $0,7 \text{ kW/m}^2$  (STÖCKER 2004) nur von rund 800 Photonen pro Sekunde getroffen – verteilt über den gesamten von der Sonne emittierten Spektralbereich, von dem nur ein kleiner Teil durch die Reaktionszentren absorbiert wird. Um die Effizienz des Photosyntheseapparates zu verbessern, ist es daher nicht sinnvoll, die Zahl der Reaktionszentren zu erhöhen, stattdessen kann durch die Verwendung von Antennenkomplexen die zeitliche Auslastung der Reaktionszentren gesteigert und gleichzeitig der spektrale Absorptionsbereich der photosynthetischen Einheit erweitert werden.

---

1 „Sauerstoff“ war zu dieser Zeit als solcher nicht bekannt, John Ingen-Houz bezeichnet ihn als „common air“ oder „breath of live“.

---

Die Ausformung dieser Antennenkomplexe wird von den verschiedenen photosynthesetreibenden Organismen auf unterschiedlichste Art und Weise gestaltet: Pflanzen und Cyanobakterien bilden sogenannte LHC-Komplexe, Purpurbakterien besitzen LH-Komplexe und Grüne Schwefelbakterien verwenden sogenannte Chlorosome und FMO-Komplexe als Antennensysteme (eine gute Übersicht über diese und weitere Komplexe geben GREEN UND PARSON 2003, BRYANT UND CANNIFFE 2017 sowie SAER UND BLANKENSHIP 2017).

Von den vielen Variationen der Antennenkomplexe sind die LH-Komplexe der Purpurbakterien die am besten erforschten: Für einige dieser Komplexe konnte in der Vergangenheit mit Hilfe von Röntgenstreuexperimenten der räumliche Aufbau mit einer Genauigkeit von bis zu 2,0 Å bestimmt werden (DEISENHOFER ET AL. 1985; McDERMOTT ET AL. 1995; KÖPKE ET AL. 1996; McLUSKEY ET AL. 2001), während für die meisten Antennenkomplexe (auch von anderen Bakterienspezies) keine oder nur ungenaue strukturelle Informationen vorliegen. Häufig liegt dies darin begründet, dass eine Kristallisation der entsprechenden Komplexe schwierig ist und daher Röntgenstreuexperimente keine verlässlichen Ergebnisse liefern, während das Auflösungsvermögen anderer Methoden oft nicht genügt (persönliche Kommunikation mit RICHARD COGDELL, 2012).

Neben der direkten Bestimmung der Struktur bietet die optische Spektroskopie einen indirekten Zugang zum Aufbau der Komplexe: Aus spektroskopischen Experimenten lassen sich in der Regel Rückschlüsse auf die elektronische Struktur ziehen, die wiederum durch die räumliche Anordnung der einzelnen Bausteine bestimmt ist. Insbesondere spektroskopische Experimente an einzelnen, isolierten Komplexen *in vitro* sind hier von großer Bedeutung, da hierdurch spektrale Feinheiten detektiert werden können, die bei Ensemble- oder *in situ*-Experimenten häufig nicht aufgelöst werden können, wenn kleinste biologische Variationen oder Wechselwirkungen mit der Umgebung die gemessenen Spektren verbreitern. Daher kann Einzelmolekül-Spektroskopie einen besonders wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Funktion – und damit des räumlichen Aufbaus – biologischer Strukturen liefern (MOERNER 2010), indem mit den Ergebnissen der spektroskopischen Untersuchungen bereits vorhandene Vermu-



tungen über die räumliche Struktur gestützt oder falsifiziert werden. In Verbindung mit theoretischen Simulationen kann weiterhin versucht werden, experimentell gewonnene Daten zu reproduzieren und so verschiedene strukturelle Modelle auf ihre Plausibilität zu testen.

In dieser Arbeit wurden Einzelmolekül-Emissions- und Fluoreszenz-Anregungsspektren von drei an der bakteriellen Photosynthese beteiligten Pigment-Komplexen, sowie einer semi-synthetischen Nachbildung eines Antennenkomplexes bei 1,2 K aufgezeichnet, um Rückschlüsse auf die elektronische und räumliche Struktur der Komplexe zu ziehen:

- Zum einen konnte mit Experimenten und Simulationen im Rahmen dieser Dissertation eine räumliche Struktur für die Lichtsammelkomplexe der Purpurbakterien-Spezies *Allochromatium vinosum* vorgeschlagen werden, die den bis dato ungeklärten Ursprung bestimmter spektraler Eigenschaften erklärt (**P1**).
- Zum anderen betrachtet eine weitere Veröffentlichung (**P2**) den FMO-Komplex des Grünen Schwefelbakteriums *Chlorobaculum tepidum*, der dem unidirektionalen Energietransfer von den Chlorosomen zu den Reaktionszentren dient. Hier werden die Grenzen der Einzelmolekül-Spektroskopie deutlich, da die spektralen Fluktuationen dieser Komplexe auch bei 1,2 K schneller sind als die Zeitauflösung des Experiments und so keine bedeutenden Unterschiede zu den Ensemble-Spektren bestehen.
- Die Experimente in **P3** leisten einen Beitrag zur jahrelangen Diskussion über den Aufbau von Chlorosomen von *Chlorobaculum tepidum*, indem innerhalb eines einzigen Chlorosomes unterschiedlich geartete molekulare Aggregate nachgewiesen werden konnten.
- Weiterhin wurden Experimente und Simulationen an zylinderförmigen Aggregaten semi-synthetischer Chlorophyll-Derivate durchgeführt (**Kapitel 5**), die als Modellsystem für natürliche Chlorosome dienen können. Mit diesen wurde gezeigt, wie sich kleinste Variationen der Monomer-Anordnung auf die spektralen Eigenschaften eines Aggregates auswirken.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile, wobei **TEIL A** die Hinführung zu den in **TEIL B** aufgeführten Publikationen beinhaltet. Im ersten Teil wird zunächst in **Kapitel 2** der Ablauf der Photosynthese allgemeingültig für Pflanzen und Bakterien umrissen, bevor der Aufbau der photosynthetischen Apparate von Purpurbakterien und Grünen Schwefelbakterien beschrieben wird. Dabei liegt das besondere Augenmerk auf der Beschreibung von Funktion und Aufbau der in den Publikationen untersuchten LH2- und FMO-Komplexe, sowie der Chlorosome und künstlichen Chlorosom-Nachbildungen. **Kapitel 3** liefert die nötigen theoretischen Betrachtungen für die Wechselwirkung von organischer Materie mit Licht, sowie eine quantenmechanische Beschreibung der Wechselwirkung mehrerer Pigmente. In **Kapitel 4** wird der experimentelle Aufbau, die Probenpräparation sowie die Details zur Durchführung der Simulationen beschrieben. Das **5. Kapitel** ergänzt die Publikationen in **TEIL B** um Messungen und Simulationen an künstlichen Chlorosom-Modellsystemen. Die spektralen Eigenschaften dieser künstlichen, sowie natürlicher und genetisch mutierter Chlorosome ist schließlich in einer Tabelle im **Anhang** zusammengestellt.

In **TEIL B** wird zunächst eine Darstellung meines Arbeitsbeitrags zu den Veröffentlichungen sowie eine Inhaltszusammenfassung gegeben, bevor die Publikationen **P1 – P3** abgedruckt sind.



---

## 2 Photosynthetische Apparate

### 2.1 Photosynthese im Allgemeinen

Photosynthese ist der wichtigste auf der Erde stattfindende Prozess: Nahezu die gesamte vorhandene organische Substanz sowie der atmosphärische Sauerstoff sind auf diesen, seit über drei Milliarden Jahren stattfindenden, Vorgang zurückzuführen (WEILER ET AL. 2008). Der Begriff ist eine Wortneuschöpfung aus dem Altgriechischen  $\phi\acute{\omega}\varsigma$  (phōs, „Licht“) und  $\acute{\sigma}\acute{\upsilon}\nu\theta\epsilon\sigma\iota\varsigma$  (sýnthesis, „Zusammensetzung“) und bezeichnete zunächst „die Synthese komplexer Kohlenstoffverbindungen aus Kohlensäure unter der Einwirkung von Licht, in Anwesenheit von Chlorophyll“ (BARNES 1893). Heute ist diese Definition weiter gefasst, sodass beispielsweise auch die anaerobe, bakterielle Photosynthese erfasst wird. Demnach handelt es sich bei Photosynthese um „eine Serie von Vorgängen bei denen elektromagnetische Energie in chemische Energie umgewandelt wird, die für die Biosynthese organischen Zellmaterials verwendet wird“ (GEST 2002).

Unabhängig davon, ob es sich um bakterielle oder pflanzliche Photosynthese handelt, lässt sich der Prozess in zwei Abschnitte unterteilen: Zum einen in die sogenannte *Lichtreaktion*, bei der die notwendigen reduzierten Co-Substrate und chemische Energie bereitgestellt werden; zum anderen in die sogenannte *Dunkelreaktion*, bei der organische Verbindungen, unter Verwendung der Produkte der Lichtreaktion, aufgebaut werden (MUNK 2008; WEILER ET AL. 2008). Letztere ist nicht direkt von eingestrahlttem Licht abhängig, sondern nur vom Vorhandensein der Lichtreaktionsprodukte – das heißt sie würde prinzipiell im Dunkeln ablaufen, *in vivo* ist dies aber nur der Fall, wenn auch Licht vom Organismus absorbiert wird (WEILER ET AL. 2008).

Abbildung 1 zeigt stark vereinfacht den generellen Ablauf der Photosynthese der sowohl für Pflanzen als auch die meisten Bakterien gilt, wobei sich bei letzteren viele unterschiedliche Varianten evolviert haben. Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal ist dabei, ob oxygene oder anoxygene Photosynthese betrieben wird, wobei nur bei er-

sterer molekularer Sauerstoff freigesetzt wird (MUNK 2008). Allen Photosyntheseapparaten haben gemeinsam, dass für die Lichtreaktion eine Membran benötigt wird, an der ein Konzentrationsgradient gebildet werden kann (graue Linie in Abbildung 1). Im Fall der Pflanzen und Cyanobakterien, die beide oxygene Photosynthese betreiben, handelt es sich um die Thylakoidmembran, die in den Chloroplasten das Thylakoidlumen vom umgebenden Stroma abgrenzt, während es sich bei den Grünen Schwefel(freien) Bakterien und Purpurbakterien um die Cytoplasmamembran handelt, die Cytoplasma und Periplasma voneinander trennt (vgl. auch später Abbildung 3 und 8).

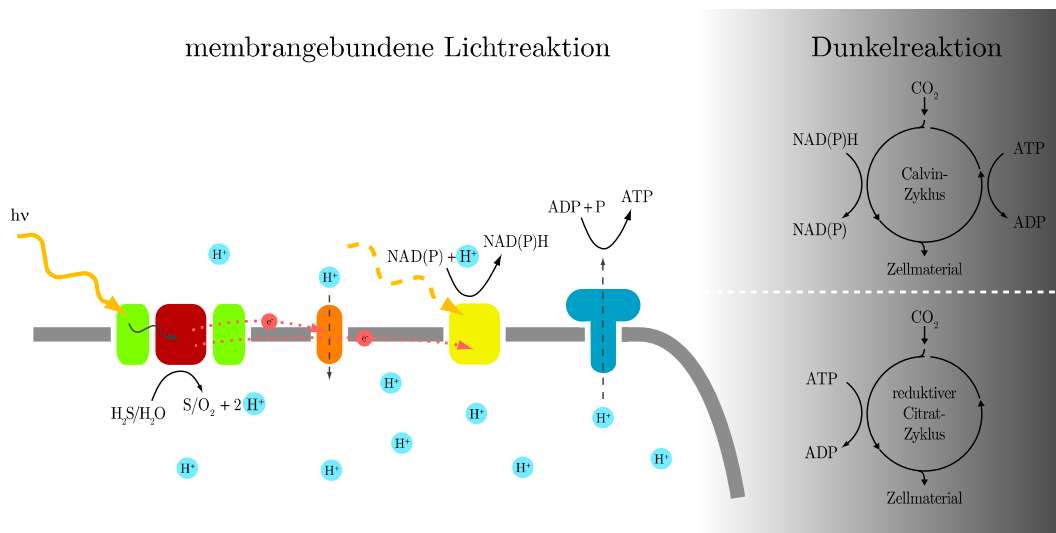


Abbildung 1: Schematischer Ablauf der Photosynthese; links: an der Lichtreaktion beteiligte Komplexe, in eine Membran (grau) eingebunden: Antennenkomplex zur Lichtabsorption (hellgrün), Reaktionszentrum (dunkelrot), Cytochrom-Komplex (orange), Komplex zur Synthese von NAD(P)H (gelb) und ATP-Synthase (blau), Details siehe Text; rechts: schematische Skizze der beiden wichtigsten Dunkelreaktionskreisläufe.

In diese Membran sind verschiedene Komplexe eingebettet und angegliedert, die je nach Organismus unterschiedlich aufgebaut sind, aber stets ähnliche Funktionen erfüllen: Einfallendes Licht wird von Antennenkomplexen (hellgrün, Details siehe später) absorbiert und die Anregungsenergie auf ein Reaktionszentrum (dunkelrot) übertragen, wo mit Hilfe dieser Energie eine Redox-Reaktion abläuft. Diese spaltet  $H_2O$  (im Fall von Pflanzen und Cyanobakterien) oder  $H_2S$  (bei Schwefelbakterien) auf und lie-

fert als Produkt molekularen Sauerstoff bzw. elementaren Schwefel, sowie Protonen<sup>2</sup>  $H^+$  und Elektronen  $e^-$ . Die Protonen werden auf der Lumenseite der intrazellulären Membranvesikel bzw. im periplasmatischen Raum angereichert („unterhalb“ der Membran in Abbildung 1), während die Elektronen innerhalb der Membran zu weiteren Komplexen weitergeleitet werden. Sie werden von einem Cytochrom-Komplex (orange in Abbildung 1) dazu genutzt, um den Protonengradient durch entsprechenden  $H^+$ -Transport durch die Membran weiter zu verstärken und speisen außerdem einen Komplex zur NAD(P)H-Synthese (gelb in Abbildung 1). Bei Pflanzen und Cyanobakterien handelt es sich bei diesem Komplex um das sogenannte „Photosystem I“ (MUNK 2009), Bakterien mit anoxygener Photosynthese haben für diesen Prozess in der Regel einen speziellen Oxidoreduktase-Komplex. In allen Fällen synthetisiert dieser Komplex  $NAD(P)^+$  zu  $NAD(P)H$ , wobei nur bei der oxygenen Photosynthese unter Lichtabsorption durch das Photosystem I die phosphorylierte Form verwendet wird. Bei der anoxygenen Photosynthese dagegen wird  $NAD^+$  zu  $NADH$  umgesetzt, wobei durch den Oxidoreduktase-Komplex keine weitere Lichtabsorption stattfindet (MUNK 2009; WEILER ET AL. 2008).

Die durch die vorangegangenen Schritte aufgebaute elektrochemische Energie des Protonengradienten wird von der sogenannten ATP-Synthase (blau in Abbildung 1) dazu verwendet, aus ADP und anorganischem Phosphat, ATP zu synthetisieren. Die ATP-Synthase besteht aus einem in der Membran verankerten Teil und einem Kopf auf der Cytoplasma- bzw. Stroma-Seite. Durch den Komplex hindurch können Protonen die Membran passieren und so den  $H^+$ -Gradienten ausgleichen, wobei pro Proton eine  $30^\circ$ -Drehung des Kopfteils initiiert wird. Diese Drehung bewirkt Konformationsänderungen der Kopf-Untereinheiten, die während einer vollständigen Kopfumdrehung drei Zustände durchlaufen: Zunächst wird ADP und Phosphat an ein katalytisches Zentrum gebunden, bevor dieses einen hydrophoben Charakter erhält, der die Reaktion zum ATP begünstigt und im letzten Schritt das ATP nach einer weiteren Teildrehung freigesetzt wird (WEILER ET AL. 2008).

---

2 Obwohl Protonen in Lösung nicht frei vorliegen, sondern als  $H_3O^+$ -Ionen an Wasser gebunden sind, hat sich die Schreibweise  $H^+$  etabliert (MUNK 2009).

Die beiden Stoffe NAD(P)H und ATP sind die Hauptprodukte der Lichtreaktionen, die vom Organismus in der photosynthetischen Dunkelreaktion dazu verwendet werden Kohlenhydrate aus CO<sub>2</sub> zu synthetisieren (MUNK 2009), vgl. rechte Seite der Abbildung 1. Diese sogenannte CO<sub>2</sub>-Fixierung wird von Pflanzen, Cyano- und Purpurbakterien mit Hilfe des Calvin-Zyklus realisiert, von Grünen Schwefelbakterien dagegen mit Hilfe des reduktiven Citrat-Zyklus (WEILER ET AL. 2008).

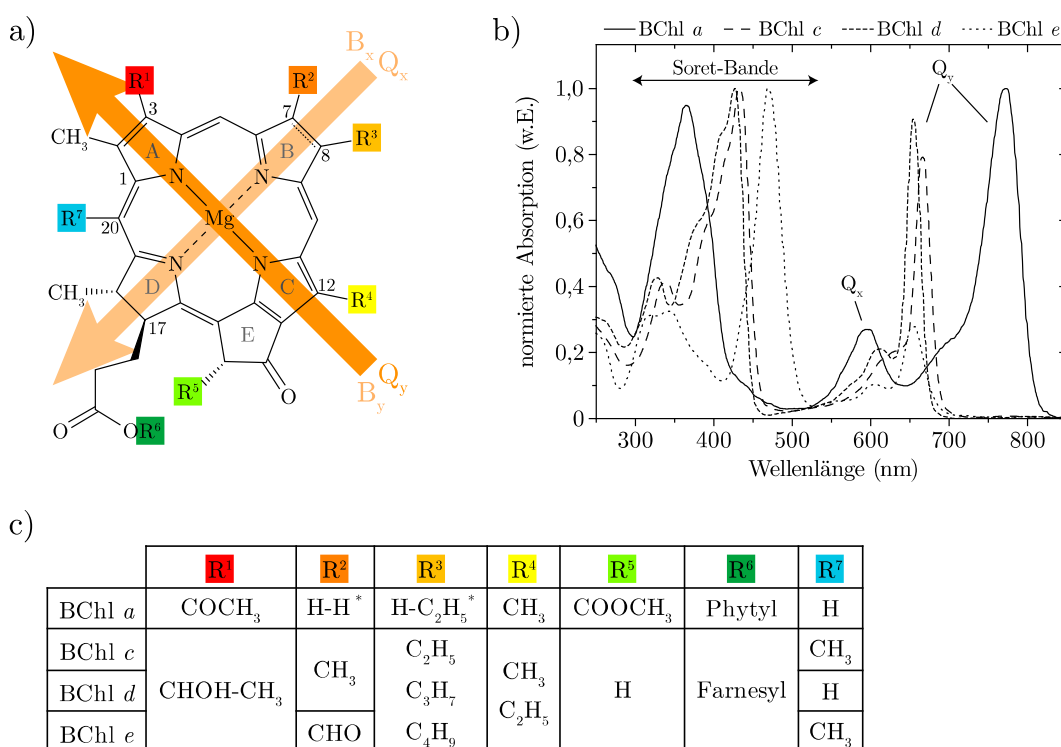
## 2.2 Bakterielle Photosynthese

Die in den Publikationen dieser Arbeit untersuchten Komplexe stammen aus den Photosyntheseapparaten der Purpurbakterien und der Grünen Schwefelbakterien. Insbesondere handelt es sich bei den Komplexen um die Antennenkomplexe der beiden Bakterienspezies bzw. um das Verbindungsglied der Antennen zum Reaktionszentrum. Der Übersichtlichkeit halber konzentrieren sich die nachfolgenden Ausführungen auf diese Bakterien und deren Komplexe.

### 2.2.1 Bakteriochlorophyll

Bakterielle Antennenkomplexe enthalten als Licht-absorbierendes Molekül stets Bakteriochlorophyll (BChl), das in verschiedenen chemischen Formen vorliegen kann, wodurch die spektralen Eigenschaften beeinflusst werden. Alle Bakteriochlorophyll-Moleküle sind Derivate eines Porphyrin-Rings mit einem zentralen Magnesiumion, sowie einem zusätzlichen Cyclopentanon-Ring an Ring C (vgl. Abbildung 2a, Nummerierung nach IUPAC 1976 und IUPAC 1987). Sie unterscheiden sich in ihren Seitenketten R<sup>1...7</sup> und werden je nach Kombination mit BChl *a*, ..., *f* bezeichnet (CHEW UND BRYANT 2007). Für die Publikationen **P1-3** in **TEIL B** sind nur die BChl *a*, *c*, *d* und *e* relevant, daher beschränkt sich die folgende Erläuterung sowie Abbildung 2 auf diese Moleküle.

Die Moleküle der BChl *c*, *d* und *e* sind recht ähnlich und unterscheiden sich jeweils lediglich in der Seitengruppe R<sup>2</sup> oder R<sup>7</sup>, wobei innerhalb eines BChl-Typs nicht immer alle Seitengruppen determiniert sind, sondern für R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> im Rahmen der jeweils angegebenen Alkylgruppen variieren können (vgl. Abbildung 2c). Die Seitengruppen der BChl *a*-Moleküle dagegen weichen deutlich von denen der BChl *c*,



\* Keine Doppelbindung zwischen C-7 und C-8, stattdessen: zusätzliche H-Atome

Abbildung 2: a) Chemische Strukturformel von Bakteriochlorophyll, nach MUNK 2008 und MADIGAN ET AL. 2009; b) Absorptionsspektren bestimmter BChl in Methanol, reproduziert aus FRIGAARD ET AL. 1996; c) Tabelle der Seitengruppen für BChl a, c, d und e, nach HARTZLER ET AL. 2014.

*d* und *e* ab: Die längste Seitenkette R<sup>6</sup> ist hier eine Phytyl-Kette anstelle einer Farnesyl-Gruppe und R<sup>5</sup> wird durch eine Acetat-Gruppe anstelle eines H-Atoms besetzt. Die beiden Stellen R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> besitzen bei BChl *a* je ein zusätzliches H-Atom, wodurch die Bindung zwischen den Atomen C-7 und C-8 gesättigt wird und die in Abbildung 2a gestrichelt dargestellte Doppelbindung in Ring B wegfällt.

Die optischen Eigenschaften der BChl-Moleküle werden durch die beiden Übergangsdipolmomente (kurz: ÜDM) B<sub>x</sub> und B<sub>y</sub> für kurze Wellenlängen (sog. „Soret-bande“, ca. 300-530 nm), sowie Q<sub>x</sub> und Q<sub>y</sub> für größere Wellenlängen (550-830 nm) bestimmt (vgl. Abbildung 2b). Geometrisch betrachtet liegen die ÜDM diagonal durch das Molekül, entlang der Achsen die die Stickstoffatome der Ringe B&D bzw. A&C verbinden (HARTZLER ET AL. 2014), wobei die Q-Banden zunächst optisch verboten sind. Jedoch wird die für Porphyrin-Ringe typische Symmetrie der konjugierten π-Bindung beim Bakteriochlorophyll durch die gesättigte Bindung zwischen den Atomen



men C-17 und C-18 unterbrochen (LIU UND BRYANT 2012). Durch diese Symmetriebrechung werden auch Übergänge der Q-Bande optisch erlaubt und die Absorptionsenergie der Q<sub>y</sub>-Bande ( $\lambda \sim 670$  nm) verringert sich im Vergleich zur Q<sub>x</sub>-Bande ( $\lambda \sim 610$  nm). Im Fall von BChl *a* wird durch die oben beschriebene, zusätzliche Symmetriebrechung (verursacht durch die Sättigung der Bindung zwischen den Atomen C-7 und C-8) die spektrale Rotverschiebung der Q<sub>y</sub>-Bande verstärkt ( $\lambda \sim 770$  nm) und eine weitere Umverteilung der Oszillatorenstärke herbeigeführt (WEISS 1972).

Betrachtet man die Spektren der in Methanol gelösten BChl *c*, *d* und *e* in Abbildung 2b, so wird deutlich, dass bereits die Änderung einer Seitenkette R<sup>2</sup> oder R<sup>7</sup> maßgeblichen Einfluss auf die Position und Höhe der Absorptionsbanden hat: Ausgehend von BChl *c*, dessen B<sub>y</sub>-Bande bei 434 nm liegt, bewirkt die fehlende Methylierung an C-20 beim BChl *d* eine Blauverschiebung der Bande zu 427 nm, während die Ersetzung der Methylgruppe an C-7 durch eine Aldehyd-Gruppe beim BChl *e* zu einer Rotverschiebung der B<sub>y</sub>-Bande zu 469 nm führt. Gleichzeitig wird durch diese beiden Änderungen die Q<sub>y</sub>-Bande von 666 nm bei BChl *c* zu 655 nm (BChl *d*) bzw. 654 nm (BChl *e*) blauverschoben. Die Aufspaltung zwischen B<sub>y</sub>- und Q<sub>y</sub>-Bande beträgt bei BChl *c* etwa 230 nm, was durch die fehlende Methylierung an C-20 bei BChl *d* durch die gleichmäßige Blauverschiebung beider Banden nahezu unverändert bleibt. Die Aldehyd-Gruppe an C-7 dagegen verringert offenbar diese Aufspaltung bei BChl *e* auf 185 nm. Ebenso wird das Verhältnis der Höhen der Absorptionsbanden von der C-20-Methylierung kaum beeinflusst: Bei BChl *c* und *d* beträgt die Höhe der Q<sub>y</sub>-Bande etwa 90 % bzw. 80 % der B<sub>y</sub>-Bande. Die Veränderung der R<sup>2</sup>-Gruppe dagegen sorgt dafür, dass bei BChl *e* die Höhe der Q<sub>y</sub>-Bande nur knapp unter 30 % der Höhe der B<sub>y</sub>-Bande liegt (Zahlenwerte aus FRIGAARD ET AL. 1996).

Im Folgenden wird die Bedeutung der verschiedenen Bakteriochlorophyll-Moleküle für die bakterielle Photosynthese und der Aufbau der Antennensysteme der Purpur- und der Grünen Schwefelbakterien aus diesen BChl näher beschrieben.

## 2.2.2 Photosynthese der Purpurbakterien

### 2.2.2.1 Ablauf der Photosynthese

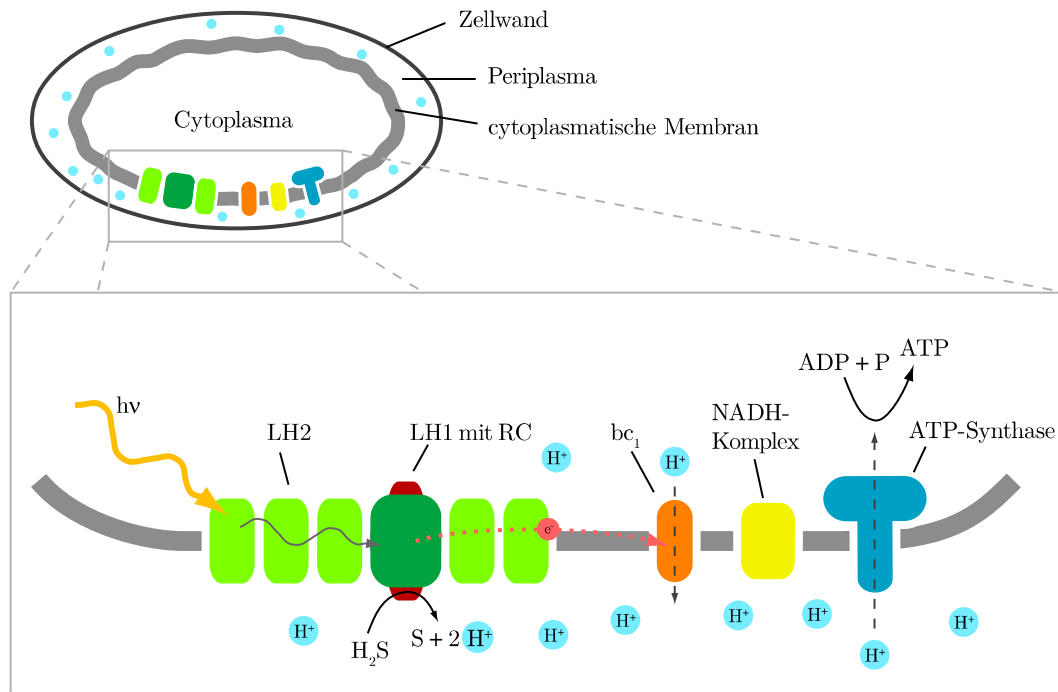


Abbildung 3: Schemazeichnung des Photosyntheseapparates der Purpurbakterien; oben: Position des Photosyntheseapparates in einer Purpurbakterien-Zelle mit angedeuteten Einstülpungen der cytoplasmatischen Membran (hellgrau); unten: Photosynthetische Antennenkomplexe LH2 und LH1 (hell- und dunkelgrün) mit Reaktionszentrum (RC, rot), sowie Cytochrom  $bc_1$ -Komplex (orange), NADH-Komplex (gelb) und ATP-Synthase (blau), eingebettet in die cytoplasmatische Membran; Details siehe Text.

Die Gruppe der Purpurbakterien ist polyphyletisch, das heißt ihre Vertreter lassen sich evolutionsbiologisch nicht einem bestimmten Strang zuordnen, sondern gehören zu unterschiedlichen Klassen und werden lediglich auf Grund ihrer purpur- bis braunfarbenen Erscheinungsform zu einer künstlichen Gruppe zusammengefasst (MADIGAN ET AL. 2009). Diese Färbung wird verursacht durch das Absorptionsspektrum der BChl  $a$ -haltigen Antennenkomplexe, von denen bei nahezu allen phototrophen Purpurbakterien zwei Sorten auftreten:

- Periphere Lichtsammelkomplexe (auch LH2-Komplexe genannt, engl. *light-harvesting complex*, hellgrün in Abbildung 3), die für die hauptsächliche Absorption des einfallenden Lichts verantwortlich sind

- LH1-Komplexe (dunkelgrün in Abbildung 3), in die das Reaktionszentrum P870 (engl. *reaction centre*, RC, dunkelrot in Abbildung 3) eingebettet ist, dessen Aufgabe darin besteht, mit der von den LH2-Komplexen absorbierten Energie einen ladungstrennten Zustand zu erzeugen

Das Verhältnis der Anzahl LH2/RC-LH1 kann je nach Wachstumsbedingungen variieren (SCHEURING UND STURGIS 2005), wobei unter natürlichen Bedingungen auf einen RC-LH1-Komplex etwa 40 LH2-Komplexe kommen (HOFF UND DEISENHOFER 1997). Diese Komplexe bilden ein dicht gepacktes Netzwerk, das große Teile der Membranoberfläche des Bakteriums bedeckt und so die Absorptionswahrscheinlichkeit für ein einfallendes Photon erhöht. Zur Vergrößerung der Membranoberfläche besitzt die cytoplasmatische Membran der Purpurbakterien je nach Art zusätzlich unterschiedlich geformte Einstülpungen, wie zum Beispiel tubuläre, lamellare oder sphärische Vesikel (DREWS 2015, angedeutet durch die unebene Membranoberfläche in Abbildung 3).

Die von einem Komplex absorbierte Energie wird von den peripheren Antennenkomplexen innerhalb des Netzwerks durch resonanten Energietransfer (vgl. Kapitel 3.2) zu den LH1-Komplexen und dem darin befindlichen RC geleitet (FREIBERG ET AL. 2013).<sup>3</sup> Im Reaktionszentrum wird schließlich mit Hilfe der absorbierten Energie H<sub>2</sub>S zu elementarem Schwefel umgesetzt, der intra- oder extrazellulär abgelagert wird. Die überschüssigen Protonen bauen den in 2.1 beschriebenen Protonengradienten zwischen den beiden Seiten der cytoplasmatischen Membran auf, während die Elektronen mit Hilfe in dieser Membran frei beweglicher Chinonen (engl. *quinon*) zum Cytochrom bc<sub>1</sub>-Komplex (orange in Abbildung 3) transportiert werden (MUNK 2008).

### 2.2.2.2 LH2-Komplexe

Die peripheren Lichtsammelkomplexe der unterschiedlichen Purpurbakterien-Spezies sind in ihrem grundsätzlichen Aufbau ähnlich, unterscheiden sich jedoch in den Details (PAPIZ ET AL. 2003; KÖPKE ET AL. 1996; MCLUSKEY ET AL. 2001; KEREÏCHE ET AL. 2008). Allen gemeinsam ist – im Gegensatz zu den Lichtsammelkomplexen der Pflan-

---

<sup>3</sup> Der detaillierte Ablauf dieses Energietransfers ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt und in Kapitel 2.2.2.3 unter Berücksichtigung des in 2.2.2.2 geschilderten Aufbaus der LH2-Komplex ausführlich beschrieben.

zen oder Cyanobakterien – ihr modularer Aufbau aus einzelnen Bausteinen. Der erste membrangebundene, chlorophyllhaltige Lichtsammelkomplex dessen Struktur mit Hilfe von Röntgenstreuexperimenten (McDERMOTT ET AL. 1995) zuverlässig bestimmt werden konnte, stammt von der Purpurbakterien-Art *Rhodoblastus (Rbl.) acidophilus* (vormals: *Rhodopseudomonas acidophila*, IMHOFF 2001). Seither dient dieser Komplex als Standard-LH2-Komplex für weitere Experimente und Simulationen (siehe bspw. Referenzen in COGDELL ET AL. 2006) und die Auflösung seiner Struktur konnte 2003 von PAPIZ ET AL. auf 2.0 Å verbessert werden. Aus der Vielzahl der photosynthesetreibenden Purpurbakterien konnte bisher, neben der oben genannten Spezies, nur für die LH2-Komplexe der Bakterienart *Phaeospirillum (Phs.) molischianum* (vormals *Rhodospirillum molischianum*, IMHOFF ET AL. 1998) eine hochauflösende räumliche Struktur (2,4 Å) bestimmt werden (KÖPKE ET AL. 1996). Über den Aufbau der Lichtsammelkomplexe anderer Arten liegen keine, oder nur sehr ungenaue, Informationen vor. Die generelle Beschreibung des LH2-Aufbaus in diesem Kapitel erfolgt daher auf Grund der umfangreichen Erkenntnisse am Beispiel der *Rbl. acidophilus*-Komplexe:

LH2-Komplexe bestehen aus mehreren Untereinheiten von Polypeptid-Paaren (graue Spiralen in Abbildung 4a), an die drei BChl *a* Moleküle (rot und gelb in Abbildung 4a) und ein Carotinoid-Molekül (cyan in in Abbildung 4a) nicht-kovalent gebunden sind (GALL ET AL. 2006). Dabei können die Polypeptid-Paare und die Anordnung der Komponenten identisch sein („homogene Apoproteinstruktur“), oder innerhalb eines Komplexes variieren („heterogene Apoproteinstruktur“, BRODOSUDARMO ET AL. 2009). LH2-Komplexe der Spezies *Rbl. acidophilus* besitzen eine homogene Apoproteinstruktur und es lagern sich hier neun identische Untereinheiten zu ringförmigen Komplexen (Ø: 6,8 nm, GABRIELSEN ET AL. 2009) zusammen, in denen die BChl *a* Moleküle unterschiedlich nah beieinander liegen und so unterschiedlich stark miteinander wechselwirken. Die verschieden starke Wechselwirkung beeinflusst die Absorptionswellenlänge der ringförmigen BChl-Aggregate (vgl. Kapitel 3.2), die sich in zwei Gruppen einteilen lassen: Die Moleküle der ersten Gruppe haben untereinander einen Abstand von etwa 21,3 Å und absorbieren bei einer Wellenlänge um 800 nm, weshalb dieser Ring als B800-Ring bezeichnet wird (gelb in Abbildung 4). Die BChl

der zweiten Gruppe treten pro Untereinheit paarweise auf und haben einen Abstand von  $9,5 \text{ \AA}$  innerhalb einer Untereinheit und einen Abstand von  $8,8 \text{ \AA}$  zum nächstgelegenen BChl der Nachbareinheit (COGDELL ET AL. 2006). Auf Grund des geringeren Abstands und der damit größeren Dipol-Dipol-Wechselwirkung ist die Absorption dieses Ringes zu größeren Wellenlängen verschoben und liegt bei etwa  $850 \text{ nm}$ , nach der dieser Ring als B850-Ring benannt wird (rot in Abbildung 4).

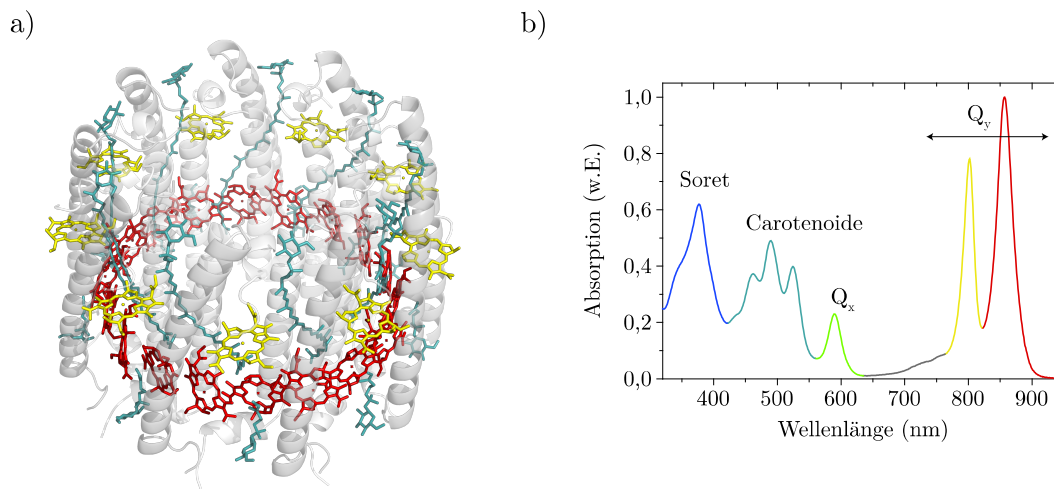


Abbildung 4: a) 3D-Darstellung eines LH2-Komplexes der Spezies *Rbl. acidophilus* (PDB-ID: 1NKZ, PAPIZ ET AL. 2003, erstellt mit PyMOL (SCHRÖDINGER)) mit den BChl a-Molekülen des B850- (rot) und B800-Ringes (gelb), sowie der Carotenoide (cyan) und den ange deuteten Polypeptiden (grau). Die Phytyl-Ketten der BChl-Moleküle sind der Übersicht halber nicht dargestellt. b) Absorptionsspektrum von LH2-Komplexen derselben Spezies in wässriger Lösung bei Raumtemperatur mit farblich markierten Absorptionsbanden: Soret- ( $B_x$ ,  $B_y$ -)Bande (blau), Carotinoid- (cyan),  $Q_x$ - (grün) und  $Q_y$ -Bande. Aufteilung der  $Q_y$ -Bande in B800- (gelb) und B850-Bande (rot).

Die Porphyrin-Ringe der B800-Moleküle liegen parallel zur cytoplasmatischen Membran, während die turbinenartig angeordneten Ringe der B850-Moleküle senkrecht dazu im Komplex orientiert sind. Die nicht-kovalente Bindung der Moleküle erfolgt dabei durch Bindung des zentralen  $Mg^{2+}$ -Ions der Bakteriochlorophylle an einen Histidinrest (B850) bzw. an eine carboxylierte Stelle des benachbarten Polypeptids (B800), sowie durch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen (PAPIZ ET AL. 2003; PRINCE ET AL. 1997). Die Carotenoide verlaufen längs durch den Transmembran-Komplex und dienen zum einen zu dessen Stabilisation (LANG UND HUNTER 1994) und ab-

sorbieren zum anderen in einem für die BChl unzugänglichen Wellenlängenbereich zusätzliches Licht (vgl. Abbildung 4b), dessen Energie innerhalb von etwa 100 fs auf die BChl übertragen werden kann (FRANK UND POLÍVKA 2009) und so für den Photosyntheseprozess zur Verfügung steht. Eine weitere, wichtige Funktion dieser Moleküle ist der Schutz der LH-Komplexe vor Photooxidation, indem die Energie eventuell auftretender Triplettzustände der BChl auf das Carotenoid übertragen wird. Diese Triplettzustände könnten den Komplex schädigen, indem ein Elektron aus dem angeregten Triplettzustand auf ein O<sub>2</sub>-Molekül übertragen wird und so ein hochreaktives O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Radikal entsteht, das durch Oxidation den LH-Komplex zerstören kann. Geht die Triplettenergie stattdessen auf den energetisch niedrig liegenden Triplettzustand des Carotenoids über, kann diese Radikalbildung verhindert werden (SCHEER 2003).

### **2.2.2.3 LH1-Komplexe**

Während die LH2-Komplexe, wie oben angedeutet, ein Netzwerk zur Absorption von Photonen und der Weiterleitung der Lichtenergie bilden, findet die für die Photosynthese nötige Ladungstrennung in den Reaktionszentren der LH1-Komplexe statt. Der Aufbau dieser LH1-Komplexe unterscheidet sich je nach Purpurbakterien-Spezies und kann monomer oder dimer sein. Monomere LH1-Komplexe sind kreisförmig/elliptisch und enthalten ein Reaktionszentrum (vgl. Abbildung 5 rechts), während dimere Komplexe '8'-förmig sind und zwei Reaktionszentren enthalten. In beiden Fällen werden die RC von BChl *a* umgeben, die ähnlich zum B850-Ring der LH2-Komplexe angeordnet sind und bei Wellenlängen  $\lambda > 875$  nm absorbieren (für eine ausführliche Darstellung siehe COGDELL ET AL. 2006). Im Folgenden wird der Weg vom absorbierten Photon zum ladungsgetreunten Zustand näher beleuchtet, unter Berücksichtigung der räumlichen Strukturen der Lichtsammelkomplexe.

### 2.2.2.4 Exziton-Energie-Transfer der Purpurbakterien

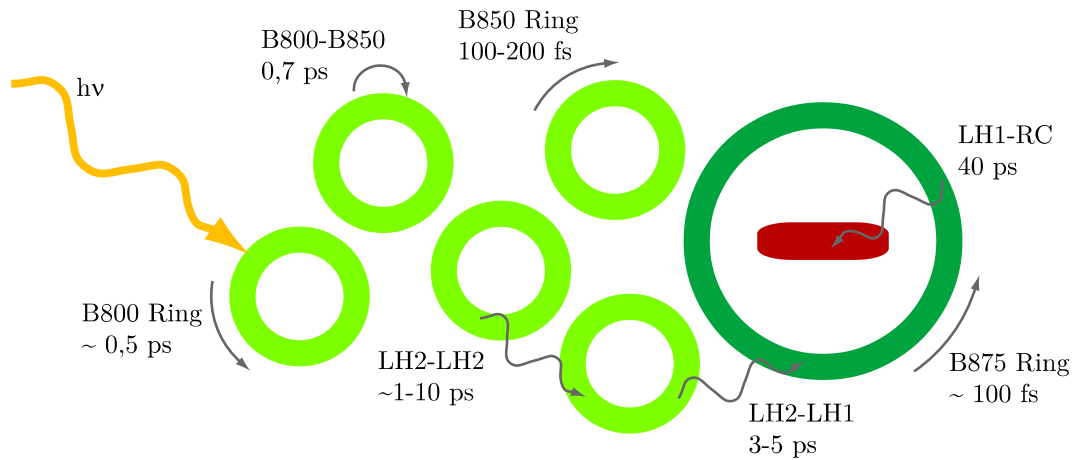


Abbildung 5: Schematische Skizze des Energietransferwegs im Photosynthesystem der Purpurbakterien mit Zeitskalen; Farbcode identisch zu vorherigen Abbildungen: LH2-Komplex hellgrün, LH1-Komplex dunkelgrün und Reaktionszentrum dunkelrot.

Auf Grund der hohen Anzahl an peripheren Komplexen wird ein einfallendes Photon in der Regel zunächst von einem LH2-Komplex absorbiert. Je nach Wellenlänge erfolgt die Absorption durch ein Carotinoid-Molekül oder durch die BChl *a*-Moleküle des B800- oder B850-Ringes. Im Fall der Absorption durch ein Carotenoid wird die Energie innerhalb von etwa 100 fs auf die BChl desselben Komplexes übertragen, wobei die Wahrscheinlichkeit für einen Übertrag auf den B850-Ring dabei etwa doppelt so hoch ist wie für Energietransfer in den B800-Ring (für eine ausführliche Darstellung siehe FRANK UND POLÍVKA 2009). Wird das Photon vom B800-Ring absorbiert, so kann – trotz des großen Abstands der BChl zueinander – auch innerhalb des B800-Rings Energie von einem Chromophor zum anderen übertragen werden, wobei die Geschwindigkeit dieses Prozesses abhängig ist von der Temperatur und der Bakterienpezies. Bei Raumtemperatur findet dieser Prozess auf einer Zeitskala von ca. 0,5 ps statt (ROBERT ET AL. 2003). Aus dem B800-Ring wird die Anregung in etwa 0,7 ps in den B850-Ring geleitet (HESS ET AL. 1993), wo der Energietransfer von einem BChl-Molekül zum anderen auf Grund des geringeren Abstands, und damit verbunden der höheren Kopplung, in ca. 100-200 fs vonstatten geht. Mit dem Übertrag auf den B850-Ring wird die Energie in eine Ebene auf der Innenseite der Membran transferiert, die sie anschließend nicht mehr verlässt, da sowohl die BChl *a* der LH1-Kom-



plexe, als auch der Elektronendonator des Reaktionszentrums in dieser Ebene liegt (ROBERT ET AL. 2003). *In vivo* wird die Anregungsenergie von einem LH2-Komplex zum nächsten innerhalb einiger (weniger) Picosekunden übertragen (TIMPMANN ET AL. 2000; PFLOCK ET AL. 2011) und der Übertrag auf von einem LH2-Komplex auf einen benachbarten LH1-Komplex dauert etwa 3-5 ps (HESS ET AL. 1995). Im LH1-Ring läuft der Exzitonentransfer innerhalb von etwa 100 fs ab, wobei durch die inhomogene Verbreiterung der Absorptionsbande die Anregungsenergie mit jedem Schritt geringer wird (ROBERT ET AL. 2003).

Im letzten Energietransferschritt schließlich wird die Energie im LH1-Komplex vom äußeren Ring auf das – ebenfalls hauptsächlich aus BChl *a* bestehende – Reaktionszentrum übertragen, das in einem offenen (neutralen) oder geschlossenen (oxidierten) Zustand vorliegen kann. Der Übertrag zum offenen RC erfolgt innerhalb von etwa 40 ps und zum geschlossene RC innerhalb von ca. 200 ps (BEYER ET AL. 2015). Im Reaktionszentrum wird das sogenannte *special pair* angeregt, das im angeregten Zustand als starkes Reduktionsmittel agiert und unter Elektronenabgabe zu einem kationischen Radikal reagiert und so einen ladungstrennten Zustand initiiert (für eine ausführliche Beschreibung siehe ZINTH UND WACHTVEITL 2005 oder BLANKENSHIP 2008).

Für den Fall, dass das Reaktionszentrum im offenen Zustand vorliegt, beträgt die Gesamtzeit von der Absorption eines Photons bis zur „Ankunft“ der absorbierten Energie im Reaktionszentrum etwa 100 ps, wobei die Quanteneffizienz Werte von bis zu 95 % erreicht (PULLERITS UND SUNDSTRÖM 1996). Für den effizienten Energietransfer zwischen den Komplexen ist neben großer spektraler Überlappung auch eine hohe Inter-Komplex-Wechselwirkung  $J$  nötig, die durch Inter-Pigment-Abstände kleiner als der Förster-Radius erreicht wird (SENER ET AL. 2011). Innerhalb des LH1-Komplexes jedoch ist ein verhältnismäßig großer Abstand des RC zu den umgebenden Pigmenten nötig (sogenannte „no-fly zone“), um eine Rekombination der durch Ladungstrennung erzeugten Elektronen zu verhindern (SENER UND SCHULTEN 2009).

### 2.2.2.5 Varianten der LH2-Komplexe

Wie oben beschrieben basiert die Gruppierung der Purpurbakterien nicht auf einem gemeinsamen evolutionsbiologischen Vorfahren, sodass sich auch die Lichtsammelsys-



teme nicht vollkommen einheitlich entwickelt haben, sondern in der Natur eine Vielzahl an Variationen zu finden sind. So besitzen LH2-Komplexe der Spezies *Phs. molischianum* eine achtfache Symmetrie (KÖPKE ET AL. 1996) und Komplexe der Spezies *Rhodopseudomonas (Rps.) palustris* zum Beispiel weisen eine heterogene Apoproteinstruktur auf (BROTOSUDARMO ET AL. 2009). Diese Abwandlungen führen zu einer unterschiedlichen Wechselwirkung der BChl innerhalb der Komplexe und damit zu verschiedenen Absorptionsspektren (vgl. Abbildung 6).

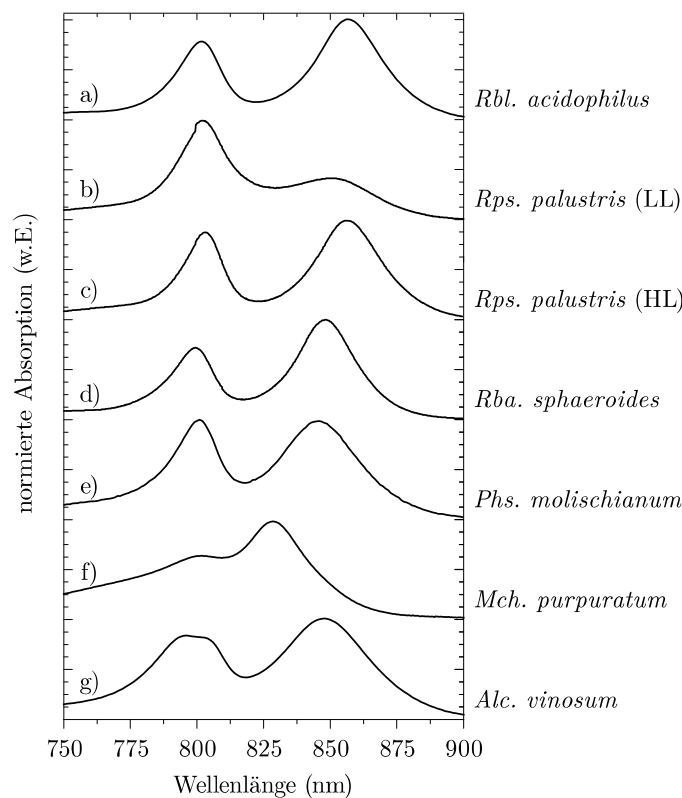


Abbildung 6: Raumtemperatur-Absorptionsspektren der  $Q_y$ -Bande von LH2-Komplexen unterschiedlicher Bakterienspezies (in wässrigerem 20mM Tris-Puffer mit jeweils angegebenem Detergens zur Stabilisation der Komplexe): a) *Rbl. acidophilus*, b,c) *Rps. palustris* (gezüchtet bei niedriger (b) bzw. hoher (c) Lichtintensität), d) *Rba. sphaeroides*, e) *Phs. molischianum*, f) *Mch. purpuratum* (jeweils mit 0,1 % LDAO (w/v) als Detergens), g) *Alc. vinosum* (mit 0,02 % DDM (w/v)). b,c,d) aus COGDELL ET AL. 2006, e) gemessen von CLEMENS HOFMANN.

Man erkennt bei allen diesen Absorptionsspektren die unterschiedlich stark ausgeprägte B800-Bande sowie die B850-Bande, die bei *Rps. palustris* (LL) nur schwach auftritt und bei *Mch. purpuratum* zu kleineren Wellenlängen verschoben ist. Ersteres

wird vermutlich unter anderem durch ein zusätzliches BChl  $a$ -Molekül pro Apoprotein-Paar verursacht (HARTIGAN ET AL. 2002), während die Ursache der Verschiebung der B850-Bande bei *Mch. purpuratum* noch ungeklärt ist. Weiterhin auffällig ist die verhältnismäßig große Breite der B800-Bande der LH2-Komplexe von *Allochromatium (Alc.) vinosum* (Abbildung 6g), deren Ursprung bislang ebenfalls ungeklärt war.

### 2.2.2.6 *Allochromatium vinosum*

Die Bakterien dieser Spezies *Alc. vinosum* aus der die in **P1** untersuchten Antennensysteme stammen, gehören zur Klasse der *Gamma-Proteobacteria* (vgl. Abbildung 7, MADIGAN ET AL. 2009).

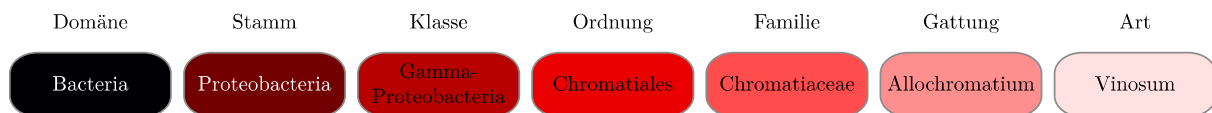


Abbildung 7: Taxonomische Einordnung der Purpurbakterien-Art *Alc. vinosum*.

Die stäbchenförmigen, etwa  $2 \times 2,5-6 \mu\text{m}$  großen Bakterien leben in den verschiedensten sulfidhaltigen Gewässern und Sedimenten wie zum Beispiel in Seen, ruhenden Stellen im Abwassersystem oder im Brackwasser, wenn genügend Licht für die Photosynthese vorhanden ist (WEISSGERBER ET AL. 2011). Dort treten sie oft als dichte Ansammlungen auf und bilden auffallende Wolken und Teppiche im Wasser und auf Oberflächen. Häufig findet man *Alc. vinosum* als dominante Art im Sediment in der Gezeitenzone, wo sich die Umgebungsbedingungen (wie Redox-Bedingungen, Temperatur und Lichtintensität) innerhalb weniger Stunden ändern. Um an diese schnellen Veränderungen angepasst zu sein, besitzt das Bakterium eine hohe metabolische Vielseitigkeit und kann eine Vielzahl an verschiedenen peripheren Lichtsammelkomplexen ausbilden, die je nach Temperatur und Lichtintensität unterschiedliche Absorptionsspektren zeigen und an die entsprechende Umgebung adaptiert sind (MECHLER UND OELZE 1978; CAREY ET AL. 2014). Typisch für das Absorptionsspektrum aller Varianten dieser LH2-Komplexe bei Raumtemperatur ist die breite B800-Bande, die bei tiefen Temperaturen zu einer Doppel-Bande aufspaltet (vgl. Figure 1, **P1**)<sup>4</sup>.

<sup>4</sup> Zur Unterscheidung der Abbildungen dieser Arbeit und der Originalpublikationen wird auf die Abbildungen der englischsprachigen Publikationen mit „Figure“ verwiesen.

Wie oben geschildert, war die Ursache dieser Verbreiterung/Aufspaltung sowie die Struktur dieser Komplexe bislang ungeklärt: Es war selbst fraglich, ob die Komplexe eine homogene oder eine heterogene Apoprotein-Struktur aufweisen. Im ersten Fall wäre ein einzelner Komplex, ähnlich wie LH2-Komplexe der Spezies *Rbl. acidophilus*, aus identischen Bausteinen aufgebaut. Die doppelte B800-Bande würde hier von zwei unterschiedlichen Typen von LH2-Komplexen innerhalb eines Bakterium herrühren, was auf Grund der Möglichkeit, je nach Umweltbedingungen verschiedene Komplexe zu bilden (CAREY ET AL. 2014), naheliegend wäre. Im zweiten Fall könnte ein Komplex, wie bei LH2-Komplexen von *Rps. palustris*, aus zwei (oder mehr) unterschiedlichen Bausteinen gebildet werden, die entweder unterschiedliches Absorptionsverhalten um  $\lambda = 800$  nm zeigen, oder die durch eine Dimerisierung der B800-Moleküle eine Aufspaltung der Absorptionsbande verursachen. Mit Hilfe von Einzelmolekül-Experimenten und Simulationen konnte in **P1** diese Dimerisierung der B800-Moleküle als Ursache für die Aufspaltung der B800-Absorptionsbande identifiziert und ein strukturelles Modell dieser Komplexe entwickelt werden.

## 2.2.3 Photosynthese Grüner Schwefelbakterien

### 2.2.3.1 Ablauf der Photosynthese

Grüne Schwefelbakterien benötigen, ebenso wie Purpurbakterien, BChl-haltige Antennenkomplexe um ihr Reaktionszentrum effizient zu nutzen. Der Photosyntheseapparat dieser Bakterien weicht aber in einigen Punkten von dem der Purpurbakterien ab: Anstelle zwei verschiedener Antennenkomplexe besitzen Grüne Schwefelbakterien lediglich einen Antennen-Typ, die sogenannten Chlorosome. Diese sind nicht in die Membran eingebettet, sondern werden von einer Monolipidschicht (hellgrau in Abbildung 8) umgeben und liegen im Cytoplasma an der Cytoplasmamembran innen auf (WEILER ET AL. 2008). Am Verbindungspunkt finden sich zusätzliche Pigment-Pro-

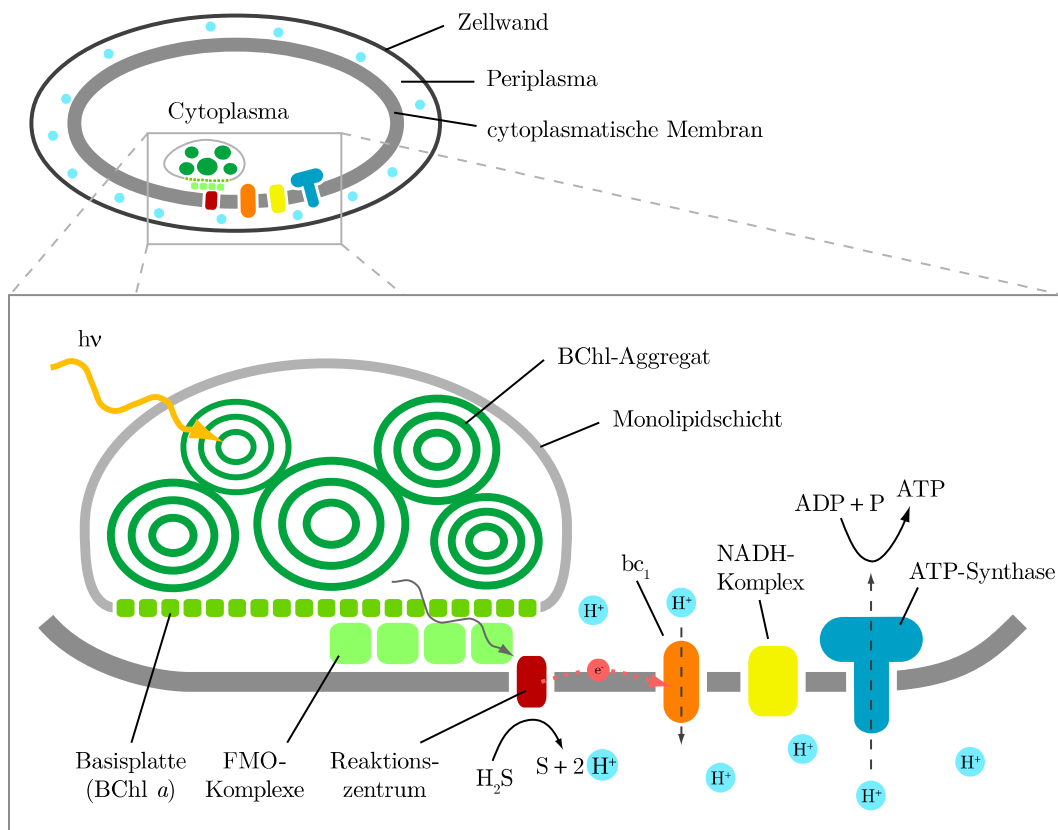


Abbildung 8: Photosyntheseapparat der Grünen Schwefelbakterien; oben: Veranschaulichung der Lage innerhalb des Bakteriums; unten: Chlorosom (begrenzt von einer Monolipidschicht (hellgrau) und der Basisplatte (mittelgrün)), das über FMO-Komplexe (hellgrün) an die cytoplasmatische Membran (dunkelgrau) angeheftet ist, in die das Reaktionszentrum (dunkelrot) und die weiteren Komplexe eingebettet sind.

tein-Komplexe, die sogenannten Fenna-Matthews-Olson-Komplexe (kurz: FMO, hellgrün in Abbildung 8), die von den Chlorosomen absorbierte Energie unidirektional an das Reaktionszentrum (dunkelrot in Abbildung 8) weiterleiten.<sup>5</sup> Das RC ist, anders als bei den Purpurbakterien, direkt in die doppellagige cytoplasmatische Membran eingebettet, wo mit Hilfe der absorbierten Energie unter Aufspaltung von H<sub>2</sub>S Ladungstrennung stattfindet. Der hierbei entstehende, elementare Schwefel wird bei diesen Bakterien stets extrazellulär gelagert (MUNK 2008). Durch diese Reaktion wird, wie in 2.1 beschrieben, ein Protonengradient im Periplasma aufgebaut und die Elektronen werden von einem Cytochrom bc<sub>1</sub>-Komplex genutzt, um diesen Gradienten zu verstärken. Die weiteren Photosyntheseschritte verlaufen wie in Kapitel 2.1 geschildert, wobei anzumerken ist, dass die Synthese von NADH bei Grünen Schwefelbakterien mit Hilfe eines linearen Elektronentransportwegs (im Gegensatz zum zyklischen Elektronentransport bei Pflanzen und Purpurbakterien) vonstatten geht und dass die Umsetzung von CO<sub>2</sub> zu organischem Material bei der Dunkelreaktion hier über den reduktiven Citratzyklus erfolgt (WEILER ET AL. 2008, vgl. Abbildung 1 rechts).

### 2.2.3.2 Chlorosome

Die für die Lichtabsorption verantwortlichen Chlorosome sind längliche „Beutel“ von etwa 100 bis 200 nm Länge und 40 bis 60 nm Durchmesser (OOSTERGETEL ET AL. 2010), die hunderttausende von BChl *c/d/e* Molekülen enthalten. Diese Bakteriochlorophylle im Inneren aggregieren zu länglichen, stabförmigen Strukturen, ohne Stabilisierung durch Proteine, wobei gewöhnlich jede Bakterienspezies nur einen BChl-Typ im Chlorosom exprimiert, wenngleich selten auch BChl *c* und *d* gleichzeitig auftreten (FRIGAARD UND BRYANT 2006). Die Hülle der Chlorosome wird von einer Monolipidschicht gebildet, deren hydrophobe Seite nach innen weist (STAEHELIN ET AL. 1980). An der Verbindungsstelle zur cytoplasmatischen Membran ist in die Monolipidschicht ein Protein integriert (CsmA), das gemeinsam mit BChl *a* Molekülen die sogenannte Basisplatte (engl. *baseplate*) bildet, die Energietransfer aus dem Inneren des Chlorosoms zu den benachbarten FMO-Komplexen erlaubt (BRYANT ET AL. 2002).

---

<sup>5</sup> Die ausführliche Beschreibung dieses Energietransferprozesses findet sich in Kapitel 2.2.3.4.

Die in **P3** untersuchten Chlorosome stammen von den Grünen Schwefelbakterien *Chlorobaculum (Cba.) tepidum* (vormals: *Chlorobium tepidum*, IMHOFF 2003), die sich zum Modellorganismus zur Erforschung der Chlorosome etabliert haben (OOSTERGETEL ET AL. 2010). Die Aggregate in den Chlorosomen dieser Spezies bestehen aus BChl *c*-Molekülen, die, wie in 2.2.1 beschrieben, unterschiedliche Seitengruppen sowie unterschiedliche Chiralität am C-3<sup>1</sup>-Atom besitzen können (GANAPATHY ET AL. 2009a). Auf Grund dieser Heterogenität ist bis dato keine Strukturanalyse mit kristallographischen Methoden möglich und der detaillierte Aufbau der Aggregate ist nicht zweifelsfrei geklärt. Unstrittig ist, dass sich die Aggregate über die volle Länge des Chlorosoms erstrecken (STAEHELIN ET AL. 1980), während unklar ist, ob sie sich zu Lamellen (PŠENČÍK ET AL. 2004), Spiralen (OOSTERGETEL ET AL. 2007) oder Zylindern (OOSTERGETEL ET AL. 2010) anordnen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Aggregatsquerschnitts zeigen deutlich multilamellare Röhren (Ø: 10 bis 30 nm) mit einigen nicht-tubulären, schwach gekrümmten Lamellen dazwischen. Werden die Elektronenmikroskopiebilder der röhrenförmigen Aggregate über verschiedene Drehwinkel gemittelt, zeigt sich, dass sich die BChl sehr wahrscheinlich zu geschlossenen Zylindern (und nicht zu Spiralen) anordnen (OOSTERGETEL ET AL. 2010). Die hydrophoben Farnesylketten der BChl liegen dabei auf der Außenseite des Zylinders (STEENSGAARD ET AL. 2000) und können so mit den Fettsäureketten der Monolipidschicht des Chlorosomumschlags wechselwirken (BRYANT ET AL. 2002).

### ***Chlorosome des genetisch veränderten Bakteriums***

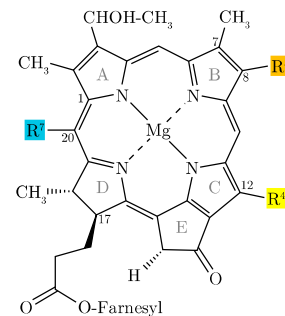
Die oben und in 2.2.1 beschriebene Heterogenität der BChl-Moleküle innerhalb eines Chlorosomes erschwert nicht nur die Kristallisation der Aggregate (was *in vivo* von Vorteil ist), sondern verbreitert auch die Absorptionsbanden, wodurch bei Experimenten charakteristische Merkmale verborgen bleiben können. Durch Deaktivierung verschiedener Gensequenzen ist es möglich, Mutanten des Bakteriums *Cba. tepidum* zu züchten, bei denen diese Heterogenität eingeschränkt ist. Wird in ein Gen eine zusätzliche Sequenz (z. B. das *aadA* Gen für Resistenz gegen bestimmte Antibiotika) eingefügt, werden die im Gen gespeicherten Informationen nicht korrekt ausgelesen und die entsprechenden Proteine werden bei der Translation der mRNA nicht mehr expri-

miert. Indem das sogenannte *bchU* Gen auf diese Weise deaktiviert wird, wird eine Methyltransferase nicht mehr hergestellt, die für die Methylierung des C-20-Atoms verantwortlich ist (MARESCA ET AL. 2004), wodurch an dieser Stelle als  $R^7$  lediglich ein H-Atom anstelle einer  $CH_3$ -Gruppe gebunden ist (vgl. letzte Spalte in Abbildung 9a). Durch ähnliche Eingriffe ins Genom können auch die sogenannten *bchQ* und *bchR* Gene deaktiviert werden, die für die Erzeugung der Methyltransferasen zur Methylierung der C-8<sup>2</sup>- bzw. C-12<sup>1</sup>-Atome verantwortlich sind (CHEW ET AL. 2007). Hierdurch wird die Seitengruppe  $R^3$  auf eine  $C_2H_5$ -Gruppe bzw. die Seitengruppe  $R^4$  auf eine  $CH_3$ -Gruppe festgelegt.

a)

Mutant	$R^3$	$R^4$	$R^7$
WT	$C_2H_5/C_3H_7/C_4H_9$	$CH_3/C_2H_5$	$CH_3$
<i>U</i>	$C_2H_5/C_3H_7/C_4H_9$	$CH_3/C_2H_5$	H
<i>Q</i>	$C_2H_5$	$CH_3/C_2H_5$	$CH_3$
<i>R</i>	$C_2H_5/C_3H_7/C_4H_9$	$CH_3$	$CH_3$
<i>QR</i>	$C_2H_5$	$CH_3$	$CH_3$
<i>QRU</i>	$C_2H_5$	$CH_3$	H

b)



c)

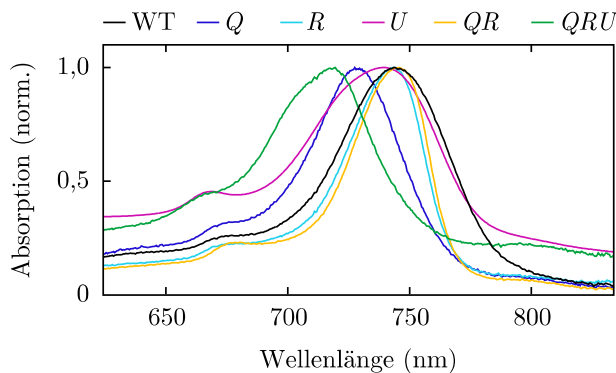


Abbildung 9: Überblick über die Seitengruppen der Bakteriochlorophylle in wildtypischen und genetisch veränderten *Cba. tepidum*-Bakterien. a) Tabelle der möglichen Seitengruppen; b) chemische Strukturformel der BChl mit entsprechenden Seitengruppen; c) Raumtemperatur-Absorptionsspektren der Chlorosome (Daten aus REIHER 2013).

Durch Kombination der Gendeaktivierungen können unterschiedliche Kombinationen von Seitengruppen erzeugt werden (vgl. Abbildung 9a,b), wobei die veränderten Bakterien zum Beispiel als *bchQ bchR*-Mutanten bezeichnet werden. Auf Grund der besseren Lesbarkeit wird häufig, wie auch in dieser Arbeit, die Schreibweise  $(bch)QR$ -

Mutant verwendet, während das unveränderte Bakterium als Wildtyp (WT) gekennzeichnet wird. Die Auswirkung der Veränderung der Seitengruppen auf das Absorptionsverhalten ist in Abbildung 9c dargestellt: Die spektrale Position des Absorptionsmaximums bleibt beim *bchR* und *bchQR*-Mutanten (743 nm bzw. 745 nm) im Vergleich zum wildtypischen Chlorosom (745 nm) nahezu unverändert, während die Bande durch die *bchU*, *bchQ* und *bchQRU*-Mutationen zu 739 nm, 729 nm bzw. 719 nm blauverschoben wird<sup>6</sup>. Die Halbwertsbreite der  $Q_y$ -Absorptionsbande bei wildtypischen Chlorosomen beträgt  $980\text{ cm}^{-1}$ , und wird durch die *bchQ*- oder *bchR*-Mutation zu  $890\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $700\text{ cm}^{-1}$  verschmälert. Die *bchU*-Mutation, die nur eine Substitution der C-20-Gruppe zur Folge hat, verbreitert dagegen das Spektrum auf  $1100\text{ cm}^{-1}$  – auch in Kombination mit den verschmälernenden *bchQ* *bchR*-Mutationen: Die Chlorosomen dieses Triple-Mutanten *bchQRU* weisen eine Absorptionsbande mit einer Halbwertsbreite von  $1030\text{ cm}^{-1}$  auf, während der *bchQR*-Doppel-Mutant eine „schmale“ Bande von  $690\text{ cm}^{-1}$  besitzt.

Zusammenfassend zeigt sich also, dass die *bchQ*- und *bchR*-Mutationen, die beide eine Einschränkung der Seitengruppen-Heterogenität der einzelnen Bakteriochlorophyll-Moleküle bewirken, schmalere Absorptionsspektren verursachen. Dies ist im Einklang mit den in 2.2.1 gezeigten Spektren der verschiedenen BChl-Moleküle, deren Absorptionsverhalten abhängig von den Seitenketten  $R^{1...7}$  ist. Treten in einem Chlorosom verschiedene Seitenketten an einer Stelle der BChl auf, so verbreitert sich das Gesamtspektrum des Chlorosoms durch Überlagerung der BChl-Einzelspektren. Wird diese Variabilität durch Verhinderung der Methylierung von C-8<sup>2</sup> bzw. C-12<sup>1</sup> eingeschränkt, so erhält man schmalere Spektren. Die *bchU*-Mutation dagegen, die keine Einschränkung der Seitengruppen-Heterogenität bewirkt, sondern lediglich den Methylrest an C-20 substituiert, führt zu einer Verbreiterung des Spektrums. Dies ist wahrscheinlich auf die Stereochemie der BChl-Moleküle zurückzuführen: Die Methylgruppe an C-20 führt zu einer Verbiegung des Porphyrin-Rings, sodass sich mehrere

---

6 Die Chlorosome des *bchQRU*-Mutanten könnten möglicherweise in der Lösung aggregiert sein, was Einfluss auf das Absorptionsspektrum hätte (persönliche Kommunikation mit DONALD A. BRYANT, 2018). Auf Grund der geringen Relevanz dieser Mutanten für diese Arbeit und der nur begrenzt vorhandenen Probenmenge wurde dies nicht weiter untersucht.



BChl-Moleküle löffelartig zusammenlagern können, während das Fehlen dieser Methylgruppe zu planaren BChl-Molekülen führt. Letztere lagern sich vermutlich zu weniger homogenen Aggregaten zusammen, was die statische Verbreiterung der Spektren der *bch(QR)U*-Mutanten erklären kann (persönliche Kommunikation mit DONALD A. BRYANT, 2018). Experimente zur Wachstumsgeschwindigkeit zeigen, dass die Absorptionsbanden-verschmälernden Mutationen *bchQ* und *bchR* dafür sorgen, dass die Bakterien – insbesondere bei geringer Lichtintensität – um bis zu 47 % langsamer wachsen als wildtypische Bakterien (CHEW ET AL. 2007). Die zusätzliche Variabilität der Methylgruppen sorgt offenbar für eine bessere Anpassung der Absorptionseigenschaften an das verfügbare Licht, damit zu einer erhöhten Absorptionswahrscheinlichkeit und so zu verbesserten Wachstumsbedingungen für das gesamte Bakterium.

Umgekehrt können die Mutationen dazu verwendet werden, Chlorosome mit weniger stark inhomogen verbreiterten Spektren zu züchten, die präziser analysiert und mit Hilfe theoretischer Simulationen einfacher reproduziert werden können. GÜNTHER ET AL. (2016) konnten so durch Kombination von Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie, Elektronenmikroskopie und theoretischer Modellierung einen detaillierten Aufbau der Chlorosome des *bchR*-Mutanten vorschlagen. In **P3** wird an diese Ergebnisse angeknüpft und spektroskopische Experimente an Chlorosomen des Wildtyps mit Messungen an Chlorosomen des *bchQR*-Mutanten verglichen, deren Seitengruppen vollständig determiniert sind, um den Einfluss der Seitengruppenheterogenität weiter zu untersuchen.

### 2.2.3.3 FMO-Komplexe

Der 1962 von OLSON UND ROMANO entdeckte, wasserlösliche Fenna-Matthews-Olson-Komplex war das erste chlorophyllhaltige Protein, dessen Struktur mit atomarer Auflösung bestimmt wurde – zunächst für Bakterien der Spezies *Chlorobium limicola* (FENNA UND MATTHEWS 1975), später auch für die Spezies *Prosthecochloris aestuarii* (MATTHEWS ET AL. 1979; TRONRUD ET AL. 1986) und für die in **P2** untersuchten Komplexe der Spezies *Cba. tepidum* (LI ET AL. 1997). *In vivo* treten FMO-Komplexe häufig in Vierergruppen auf, die in engem Kontakt mit zwei Reaktionszentren stehen. Pro Basisplatte eines Chlorosoms finden sich etwa 15 solcher FMO-Tetramere, wodurch diese

zu circa 70% abgedeckt wird. Dementsprechend sind ca. 60 FMO-Komplexe und 30 Reaktionszentren an ein Chlorosom geknüpft (BÍNA ET AL. 2016).

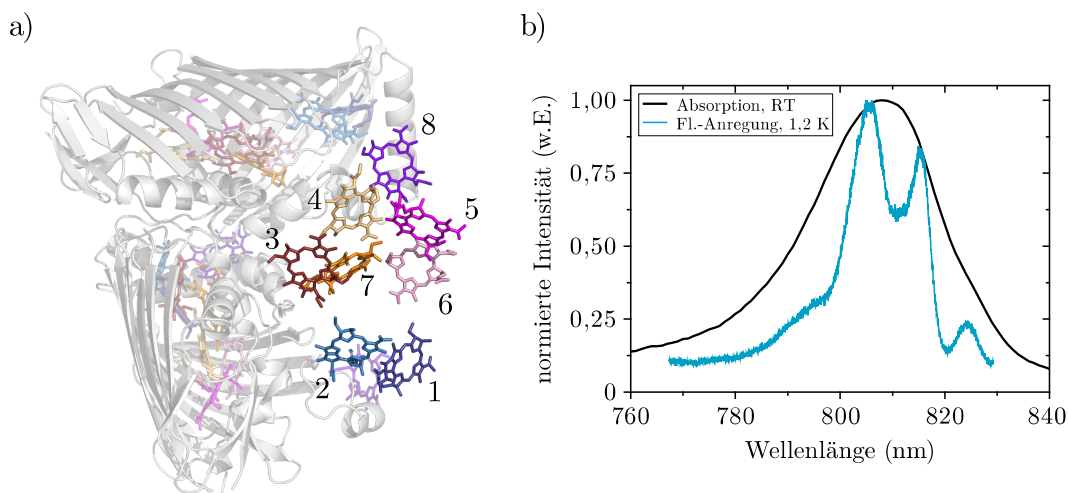


Abbildung 10: a) Struktur des dreiteiligen FMO-Komplexes; für eine Untereinheit wurde der Proteinumschlag weggelassen, um die relative Lage der BChl *a* deutlich zu machen; PDB-ID: 3ENI (TRONRUD ET AL. 2009), erstellt mit PyMOL (SCHRÖDINGER); b) Ensemble-Absorptions- und Fluoreszenz-Anregungsspektrum (bei Raumtemperatur (schwarz) bzw. 1,2K(türkis)) der FMO-Komplexe der Spezies *Cba. tepidum* in wässriger Lösung.

Der Komplex selbst besteht aus drei identischen Untereinheiten, die um eine gemeinsame Symmetrieachse angeordnet sind und von denen jede aus einem Proteinumschlag besteht, in den sieben BChl *a*-Moleküle verpackt sind (vgl. Abbildung 10a). Ein achttes BChl *a*-Molekül wurde erst im Jahr 2004 entdeckt und ist zwischen den Proteinumschlägen eingebettet (BEN-SHEM ET AL.). Es liegt auf der zum Chlorosom gewandten Seite des Komplexes und seine räumliche Orientierung begünstigt den Energietransfer von der Basisplatte auf den FMO-Komplex indem sein  $Q_y$ -Übergangsdipolmoment ähnlich ausgerichtet ist wie das der Bchl *a*-Moleküle der Basisplatte (TRONRUD ET AL. 2009).

Bei Raumtemperatur zeigen FMO-Komplexe in wässriger Lösung eine breite Absorptionsbande bei 808 nm (Halbwertsbreite:  $480\text{ cm}^{-1}$ , vgl. schwarze Linie in Abbildung 10b). Diese Bande spaltet bei 1,2 K in vier einzelne Peaks bei 797,2 nm, 805,7 nm, 815,1 nm und 824,2 nm mit Halbwertsbreiten von  $203\text{ cm}^{-1}$ ,  $140\text{ cm}^{-1}$ ,  $77\text{ cm}^{-1}$  und  $58\text{ cm}^{-1}$  auf (vgl. auch Daten zum Ensemblespektren im Film in Table 1, **P2**). Die

einzelnen Banden werden dabei durch exzitonische Zustände der einzelnen BChl-Moleküle gebildet. Der höchstenergetische Zustand bei  $\lambda \sim 790$  nm erstreckt sich über die BChl Nr. 6 und 7 (Nummerierung vgl. Abbildung 10a), die zusammen mit BChl Nr. 8 die bevorzugten BChl-Moleküle zur Aufnahme der Energie aus dem Chlorosom sind (THYRHAUG ET AL. 2016; KELL ET AL. 2016). Der zweite und dritte Peak des Spektrums bei etwa 806 nm und 815 nm wird von den beiden Pigmenten Nr. 4 und 5 gebildet, während der niederenergetische, vierte Peak schließlich vom BChl Nr. 3 herrührt (THYRHAUG ET AL. 2016; KELL ET AL. 2016). Im FMO-Komplex wird die absorbierte Energie über mehrere Stufen reduziert, bevor sie über das niederenergetische Molekül Nr. 3 ans Reaktionszentrum weitergegeben wird. Durch diese Energiekaskade ist sichergestellt, dass der Energietransfer durch den Komplex einseitig gerichtet verläuft. Die Details dieses Energietransfers durch den Komplex werden im folgenden Kapitel im Rahmen des vollständigen Energietransfer-Weges von der Absorption bis zum Reaktionszentrum ausführlich behandelt.

#### ***2.2.3.4 Exziton-Energie-Transfer der Grünen Schwefelbakterien***

Ebenso wie bei den Purpurbakterien wird bei Grünen Schwefelbakterien die für die Photosynthese nötige Lichtenergie durch eine Art energetischen Trichter von den Antennenkomplexen zum Reaktionszentrum geleitet. Dabei ist die Energie des angeregten Zustands von Schritt zu Schritt stets etwas geringer, sodass sich ein Exziton auf diesem Pfad nur in eine Richtung bewegen kann. Die Absorption eines einfallenden Photons ( $\lambda \sim 745$  nm) erfolgt mit sehr großer Wahrscheinlichkeit durch die BChl *c/d/e*-Aggregate (dunkelgrün in Abbildung 11). Innerhalb dieses Aggregates wird die absorbierte Energie in etwa 200 - 300 fs zu energetisch niedrigeren Zuständen weitergeleitet (PŠENČÍK ET AL. 1998). Zwischen den einzelnen Aggregaten finden sich Übergangsdauern von 1,8 ps und 5,6 - 5,9 ps, wobei die kürzere Zeitkonstante vermutlich mit einem einzelnen, kleinen Energietransferschritt korreliert (PŠENČÍK ET AL. 1998). Von den BChl *c/d/e*-Aggregaten wird die Anregungsenergie zunächst auf die bei  $\lambda \sim 795$  nm absorbierende Basisplatte (mittelgrün in Abbildung 11) übertragen, was im Falle von BChl *c* innerhalb von etwa 30 ps (CAUSGROVE ET AL. 1992) oder 40 - 60 ps abläuft (PROKHORENKO ET AL. 2000). Für Bakterienspezies deren Aggregate

aus BChl *d* bestehen, verlängert sich die Energietransferdauer auf 66 ps und für Spezies mit BChl *e*-Aggregaten auf 116 ps, was auf die unterschiedliche spektralen Überlappung der BChl *c/d/e*-Emission mit der Absorption der BChl *a*-Basisplatte zurückgeführt wird (CAUSGROVE ET AL. 1992). Die Quanteneffizienz dieses Energietransferschrittes von den BChl *c/d/e*-Aggregaten auf die Basisplatte beträgt nahezu 100 % (VAN DORSSSEN ET AL. 1986; WANG ET AL. 1990). Von dort gelangt die Anregungsenergie in 40 ps bis 175 ps (MIRKOVIC ET AL. 2017; DOSTÁL ET AL. 2016) auf einen der räumlich unterhalb der Basisplatte liegenden FMO-Komplexe (hellgrün in Abbildung 11), wobei die Energie der Anregung weiter reduziert wird.

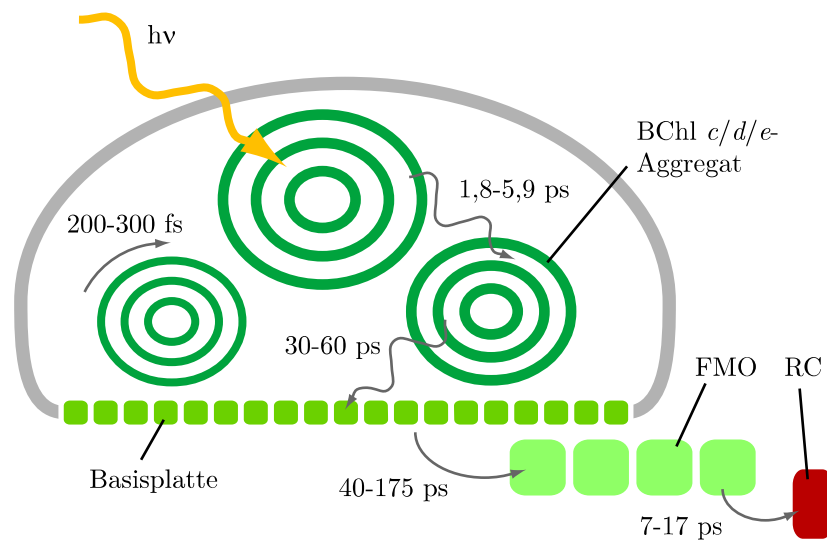


Abbildung 11: Schema des Exziton-Energie-Transfers bei Grünen Schwefelbakterien.

Im FMO-Komplex wird die Anregung in der Regel zunächst von einem Exziton-Zustand mit hoher Anregungsenergie ( $\lambda \sim 790$  nm) aufgenommen, der sich über die BChl Nr. 6 und 7 erstreckt (vgl. oben, KELL ET AL. 2016). Von dort kann die Anregungsenergie direkt ans Ausgangs-BChl Nr. 3 ( $\lambda \sim 825$  nm) transferiert werden, oder über Zwischenschritte über die beiden von BChl Nr. 5 und 4 gebildeten exzitonischen Zustände zu diesem Ausgangspigment gelangen. Alternativ ist ein zusätzlicher Zwischenschritt möglich, der die Anregung über die räumlich recht isolierten Pigmente Nr. 1 und 2 führt und anschließend über BChl Nr. 4 ebenfalls zum niederenergetischen Pigment Nr. 3 leitet. Je nach Pfad läuft dieser Prozess innerhalb einiger hundert Femto- bis einiger Picosekunden ab (THYRHAUG ET AL. 2016). Vom niederener-

getischsten Zustand des FMO-Komplexes wird die Energie innerhalb von 7-17 ps zum RC (dunkelrot in Abbildung 11) weiterleitet (OLSON 1998; DOSTÁL ET AL. 2016), wobei nach 200 ps noch etwa 25 % der ursprünglich vom FMO-Komplex absorbierten Energie in dessen energetisch niedrigsten Zustand verbleiben, was die Effizienz des Energietransfers auf ca. 75 % begrenzt (DOSTÁL ET AL. 2016).

Das P840-Reaktionszentrum der Grünen Schwefelbakterien unterscheidet sich vom P870-Reaktionszentrum der Purpurbakterien unter anderem in der räumlichen Konfiguration des BChl *a*-Dimers (BÜTTNER ET AL. 1992). Hinsichtlich der ersten Schritte zum ladungsgetrennten Zustand verhalten sich die Reaktionszentren dennoch ähnlich (OLSON 1998): Auch im RC der Grünen Schwefelbakterien dient das angeregte BChl *a*-Dimer als starkes Reduktionsmittel, reagiert unter Elektronenabgabe zu einem kationischen Radikal und initiiert so einen ladungsgetrennten Zustand (für eine ausführliche Beschreibung dieses Reaktionszentrums siehe HAUSKA ET AL. 2001 oder BLANKENSHIP 2008). Liegt das Reaktionszentrum auf Grund einer Anregung bereits im geschlossenen Zustand vor, so wird die Energie aus dem angeregten FMO-Komplex entweder zu einem der anderen, offenen Reaktionszentren geleitet, oder der Energietransferpfad wird auf 200-300 ps verzögert, um eine Doppel-Anregung des Reaktionszentrums zu vermeiden (PŠENČÍK ET AL. 1998).

### 2.2.3.5 *Chlorobaculum tepidum*

Die in **P2** und **P3** untersuchten Komplexe des Photosyntheseapparates wurden aus Bakterien der Spezies *Chlorobaculum tepidum* gewonnen, die zur Familie der Chlorobiaceae (Grüne Schwefelbakterien) gehören (vgl. Abbildung 12).

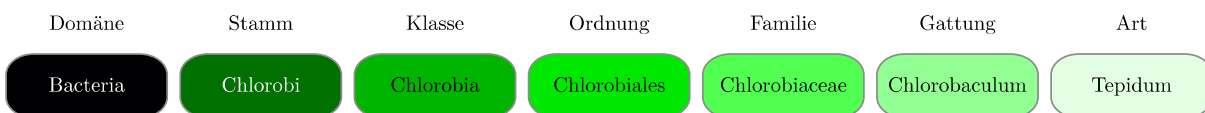


Abbildung 12: Taxonomische Einordnung der Grünen Schwefelbakterien-Art *Cba. tepidum*.

Diese Familie ist, im Gegensatz zu den Purpurbakterien, monophyletisch, das heißt ihre Vertreter bilden eine kohärente, isolierte Gruppe und stammen evolutionsbiologisch von gleichen Vorfahren ab und erhalten daher in der biologischen Systematik einen eigenen, unverzweigten Stamm (MADIGAN ET AL. 2009)).

Die Grünen Schwefelbakterien besiedeln ähnliche Habitate wie Schwefel-Purpurbakterien, also zum Beispiel sulfidhaltige Seen und sandige Küstenregionen, allerdings leben sie strikt anaerob, da Sauerstoff tödlich für diese Spezies ist (VAN GEMERDEN UND MAS 1995). Außerdem leben sie obligatorisch phototroph, das heißt sie benötigen zwingend Licht für ihren Stoffwechsel und können ausschließlich CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle verwenden (IMHOFF 1995). Daher ist die ökologische Nische dieser Bakterien sehr eng – durch die besonders effizienten Chlorosome als Lichtsammelkomplexe können sie aber auch in großen Wassertiefen leben, in die nur wenig Sonnenlicht vordringt. So findet man Bakterien dieses Stammes beispielsweise auch in einigen hundert Metern Tiefe des Schwarzen Meeres, wo das Wasser sauerstofffrei ist und eine Lichtintensität vorherrscht, die einer brennenden Kerze in 60 m Entfernung entspricht (GOTTSCHALK 2015).

*Cba. tepidum* Bakterien im Speziellen sind stäbchenförmig und typischerweise 0,6-0,8 x 1,3-2,6 µm groß, wobei einzelne Zellen Längen von bis zu 25 µm erreichen können (WAHLUND ET AL. 1991). Das Bakterium wächst optimal bei Temperaturen von circa 47 °C (bis maximal 52 °C) in mikrobiellen Matten an heißen Quellen und kann damit wesentlich heißere Bereiche besiedeln als alle weiteren Grünen Schwefelbakterien, die maximal Temperaturen von etwa 35 °C überleben (WAHLUND ET AL. 1991). Auf Grund dieser Hitzebeständigkeit und der enormen Lichtsammeleffizienz können diese Bakterien auch in der Tiefsee in zwei Kilometern Tiefe gefunden werden, am Rand von Schwarzen Rauchern wo sich 300 °C heißes Wasser aus der Quelle mit dem umgebenden 2 °C kalten Wasser vermischt. Dort dient den Bakterien die geothermische Strahlung der heißen Quelle als einzige Lichtquelle für die Photosynthese (BEATTY ET AL. 2005).

Da die Bakterien eine sehr kurze Generationszeit von lediglich zwei Stunden aufweisen, eignen sie sich sehr gut für die Photosyntheseforschung im Labor und für genetische Mutationsexperimente (WAHLUND ET AL. 1991).

## 2.3 Künstliche Lichtsammelsysteme

Wie oben geschildert treten innerhalb eines Aggregates in einem bakteriellen Chlorosom Heterogenitäten auf Grund der Vielzahl der Variationsmöglichkeiten für die Seitenketten der BChl-Moleküle auf. Ein einzelnes Chlorosom ist weiterhin stets eine Sammlung mehrerer solcher BChl-Aggregate, was die Inhomogenität weiter verstärkt. Auch durch Einschränkung der Variabilität der Seitenketten durch genetische Mutation lässt sich diese letztgenannte Heterogenität nicht verhindern, weshalb es bislang nicht gelungen ist, eine detaillierte Struktur der BChl-Aggregate auf atomarer Ebene zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde in der Vergangenheit versucht, künstliche, homogene Zylinder-Aggregate mit ähnlichen spektralen Eigenschaften zu synthetisieren.

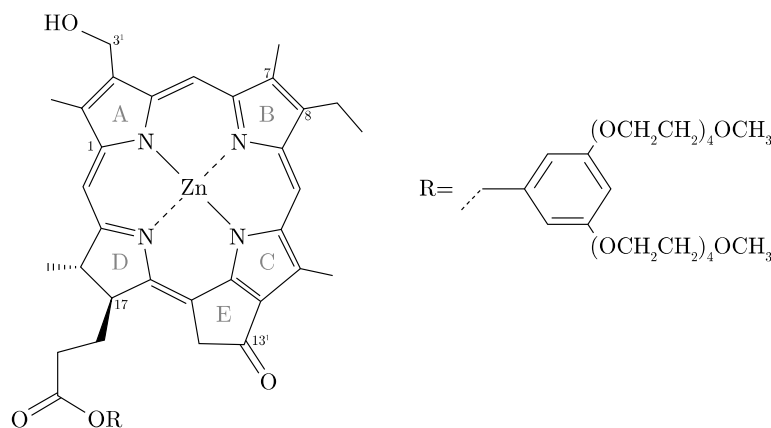


Abbildung 13: Chemische Struktur der in **Kapitel 5** verwendeten Zink-Chlorine.

Als Baustein für diese zylindrischen Aggregate eignen sich beispielsweise semi-synthetische Zink-Chlorine (ZnChl), die über diverse Syntheseschritte aus natürlichem BChl *d* hergestellt werden (TAMIYAKI ET AL. 1996; HUBER ET AL. 2008). Dabei wird das zentrale  $Mg^{2+}$ -Ion gegen ein  $Zn^{2+}$ -Ion ausgetauscht um die Stabilität der Aggregate zu erhöhen. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Selbst-Aggregation der Moleküle zu Zylindern eine Hydroxy-Gruppe am C-3<sup>1</sup>-Atom und eine Keton-Gruppe am C-13<sup>1</sup>-Atom erfordert (HUBER ET AL. 2005, vgl. Abbildung 13) und dass je nach Wahl der Seiten-*gruppe* R die zylindrische Anordnung in unterschiedlichen Lösungsmitteln begünstigt wird (HUBER ET AL. 2008; SENGUPTA UND WÜRTHNER 2013). In Kapitel 5 wurden Zink-



Chlorine mit dem in Abbildung 13 dargestellten Rest, ein Benzolring mit einer doppelten  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_4\text{OCH}_3$ -Seitenkette, verwendet<sup>7</sup>. Diese doppelte, amphiphile Oligoethylenglykol(OEG)-Kette verhindert sterisch die Bildung von Lamellen und induziert ein Aufrollen der Aggregate in wässriger Lösung (HUBER ET AL. 2008), wobei die OEG-Gruppen auf der Außenseite des Zylinders liegen (HUBER ET AL. 2005). Durch diese Anordnung wird, neben einer verbesserten Löslichkeit, ein Zusammenlagern der einzelnen Aggregate verhindert, da durch die räumliche Ausdehnung der Doppel-Seitenketten ein Ineinandergreifen der Ketten verhindert wird (SENGUPTA UND WÜRTHNER 2013).

Die sich selbständig bildenden Aggregate formen Zylinder mit etwa 6 nm Durchmesser und einer Länge von 300 nm bis zu 10  $\mu\text{m}$ . Im Transmissions-Elektronenmikroskop lässt sich auflösen, dass die innen hohlen Zylinder von einer etwa 2 nm dicken Monolage aus ZnChl-Molekülen gebildet werden und dass unterschiedliche Zylinder identische Querschnitte besitzen (SENGUPTA ET AL. 2012). Als molekulare Struktur schlagen die Autoren vor, dass die Zylinder aus einzelnen Ringen mit jeweils 20 ZnChl-Molekülen gebildet werden, die zueinander einen Abstand von 0,35 nm haben. Mit diesen Abmessungen bewegen sich die ZnChl-Röhrchen in einem Bereich der auch bei natürlichen Chlorosomen beobachtet wird (OOSTERGETEL ET AL. 2010) und auch die spektralen Ensembleeigenschaften der künstlichen Aggregate sind sehr ähnlich zu ihren natürlichen Vorbildern (BALABAN ET AL. 2005), weshalb diese als Modellsystem für die spektroskopische Untersuchung von zylindrischen Aggregaten dienen können. Von großem Vorteil ist die Homogenität der Proben, die deutlich schmalere Spektren liefern als Wildtyp- oder Mutanten-Chlorosome und so eine genauere Analyse der Auswirkungen bestimmter struktureller Parameter auf die Spektren mit Hilfe theoretischer Modellierung erlauben.

Weiterhin vorteilhaft ist, dass diese Komplexe in einem Wasser-Tetrahydrofuran-Gemisch auch bei Raumtemperatur über mehrere Monate stabil bleiben (SENGUPTA ET

---

7 Eine einheitliche Bezeichnung/Nummerierung der ZnChl existiert leider nicht, in der Literatur muss stets die chemische Formel überprüft werden. Die in **Kapitel 5** verwendeten Proben werden beispielsweise bezeichnet als ZnChl 1 (SENGUPTA ET AL. 2012), ZnChl 3 (SENGUPTA UND WÜRTHNER 2013) oder ZnChl 10d (HUBER ET AL. 2008).



AL. 2012), wobei der Aggregationsprozess reversibel ist und die Aggregate durch einen Wechsel der Polarität des Lösungsmittels in ihre Monomereinheiten zerlegt werden können (HUBER ET AL. 2005).

## 3 Wechselwirkung von Licht mit organischer Materie

### 3.1 Absorption und Emission organischer Moleküle

Wird ein Molekül einem elektromagnetischen Feld (beispielsweise Licht) ausgesetzt, kann es aus einem Anfangszustand  $|a\rangle$  in einen Endzustand  $|e\rangle$  übergehen<sup>8</sup>. Wird dem Strahlungsfeld dabei Energie entzogen, spricht man von „Absorption“, liegt der Endzustand dagegen energetisch unter dem Anfangszustand und wird beim Übergang ein Photon abgegeben, spricht man von „Emission“. Beschreibt man den Zustandsvektor des Strahlungsfeldes mit der Photonenzahl  $n$  als  $n|n_{\vec{k}}\rangle$ , so geht das gesamte System bei Absorption eines Photons vom Zustand  $|a\rangle n|n_{\vec{k}}\rangle$  in den Endzustand  $|e\rangle (n-1)|n_{\vec{k}}\rangle$  über. Ist die Wechselwirkung des Moleküls mit dem Strahlungsfeld gegeben durch  $V = -\hat{\vec{\mu}} \cdot \vec{E}$ , wobei  $\hat{\vec{\mu}}$  den totalen Dipoloperator des Moleküls und  $\vec{E}$  das elektrische Feld beschreibt, dann lässt sich mit Hilfe Fermis Goldener Regel das Absorptionsspektrum des Moleküls berechnen (KNOESTER 2002):

$$A(\nu) \propto n \cdot \sum_e \left| \langle e | \hat{\vec{\mu}} \cdot \vec{E} | a \rangle \right|^2 \cdot \delta(E_e - E_a - h\nu) \quad (1)$$

$E_a$  und  $E_e$  sind die Energieniveaus des Anfangs- und Endzustandes,  $\nu$  die Frequenz des eingestrahlten Lichts. Die Deltafunktion beschreibt, dass immer dann Absorption stattfindet, wenn die Energie des Anregungslichts den Resonanzfrequenzen des Pigment-Moleküls entspricht und als Absorptionsspektrum eine Abfolge von Deltapeaks zu erwarten ist. Tatsächlich ist die Breite der Absorptionsspeaks eines Moleküls endlich und bestimmt durch die inverse (endliche) Lebensdauer des angeregten Zustands (GREINER 1989). Diese ist in Gasen durch die spontane Emission des Moleküls begrenzt, wird in kondensierter Materie bei Raumtemperatur jedoch meist durch De-

---

<sup>8</sup> Die Reaktion des Moleküls kann dabei linear oder nicht-linear von der Intensität des Strahlungsfeldes abhängen, wobei die in dieser Arbeit betrachteten Vorgänge ausschließlich linearer Natur sind und nicht-lineare Effekte daher im Folgenden nicht betrachtet werden.

phasierungs- und Relaxierungsprozesse durch Wechselwirkung mit der Umgebung dominiert (KNOESTER 2002; MOERNER 2010). Diese allein durch die Lebensdauer des angeregten Zustands bestimmte Linienbreite wird *homogene Linienbreite* genannt und die zugehörige Spektrallinie ist Lorentz-förmig.

In einer glasartigen oder flüssigen Probe ist die Umgebung für jedes Pigment leicht unterschiedlich, was zu einer Normalverteilung der Übergangsenergie  $E_e - E_a$  um einen Mittelwert  $E_0$  mit der Breite  $\Delta$  führt. Hierdurch wird das Absorptionsspektrum einer Probe mit mehreren, nicht miteinander wechselwirkenden Chromophoren verbreitert, was als *statische Unordnung* bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu spricht man von *dynamischer Unordnung*, wenn die Übergangsenergie des Moleküls zum Beispiel auf Grund dynamischer Vorgänge in der umgebenden Proteinmatrix fluktuiert (BAIER ET AL. 2009). Finden diese Fluktuationen auf einer schnelleren Zeitskala als das zeitliche Auflösungsvermögen des Experiments statt, so führt dies in den meisten Fällen zu einer Gauß-förmigen Verbreiterung der Absorptionslinien. Bei Durchführung der Experimente bei kryogener Temperatur, werden die Vibrationsschwingungen des Moleküls in der Regel thermisch nicht angeregt (MOERNER 2015), sodass diese Fluktuationen langsam genug sind, um aufgelöst werden zu können. Dies ist beispielsweise im Fall von LH2-Komplexen teilweise möglich (HOFMANN ET AL. 2005; KUNZ ET AL. 2013) und wurde in **P1** ausgenutzt. Finden die Fluktuationen dagegen auf einer schnelleren Zeitskala als die Zeitauflösung des Experiments statt, wie beispielsweise bei den in **P2** gemessenen FMO-Komplexen, dann sind auch im Einzelmolekülspektrum verhältnismäßig breite Absorptionsbanden zu beobachten.

### 3.2 Pigment-Pigment-Wechselwirkung

Neben der Wechselwirkung mit ihrer Umgebung können Chromophore auch untereinander wechselwirken. Wenn die Pigment-Moleküle keine permanente Ladung besitzen und ihr Abstand groß ist im Verhältnis zu ihrer Ausdehnung, lässt sich die Wechselwirkung  $J_{nm}$  zwischen zwei Molekülen  $n$  und  $m$  in Dipolnäherung ausdrücken als

$$J_{nm} = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \left[ \frac{\vec{\mu}_n \cdot \vec{\mu}_m}{|r_{nm}|^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_n \cdot r_{nm}^{\rightarrow})(\vec{\mu}_m \cdot r_{nm}^{\rightarrow})}{|r_{nm}|^5} \right], \quad (2)$$

wobei  $\varepsilon$  die dielektrische Feldkonstante des Mediums und  $\vec{r}_{nm} = \vec{r}_n - \vec{r}_m$  die relative Position der Moleküle zueinander beschreibt (DIDRAGA ET AL. 2002). Der Vektor  $\vec{\mu}_i$  bezeichnet hierbei das Übergangsdipolmoment des Moleküls  $i$  – eine transiente (in erster Näherung di-polare) Polarisation des Moleküls, die durch die Wechselwirkung der Elektronen des Chromophors mit dem einfallenden elektromagnetischen Feld hervorgerufen wird.

Mit dieser Wechselwirkung  $J_{nm}$  lässt sich der Hamiltonoperator für das betrachtete System aufstellen, wobei vereinfachend angenommen wird, dass es sich bei den Molekülen um 2-Niveau-Systeme mit dem Grundzustand  $|g\rangle$  und dem angeregten Zustand  $|n\rangle$  handelt. Da im weiteren Verlauf dieses Kapitels auch Systeme mit  $N > 2$  wechselwirkenden Molekülen beschrieben werden sollen, ist die Verwendung der Pauli-Operatoren  $b_n^\dagger$  und  $b_n$  zur Beschreibung der Erzeugung und Vernichtung von Elektronen in einem bestimmten Molekülorbital sinnvoll (AGRANOVICH UND GALANIN 1982). Mit Hilfe dieser Operatoren wird der angeregte Zustand eines Moleküls gebildet, indem ein Elektron aus einem bestimmten Elektronenorbital der im Grundzustand besetzten Orbitale vernichtet wird, während gleichzeitig ein Elektron in einem bestimmten anderen, unbesetzten Orbital erzeugt wird (KNOESTER 2002).<sup>9</sup> Das Produkt aus Erzeugung und Vernichtung eines Elektrons  $b_n^\dagger b_n$  beschreibt so die Anregung des Moleküls  $n$  und die elektronisch angeregten Zustände des homogenen Dimer-Systems lassen sich mit dem Hamilton-Operator

$$H = E_0 \cdot \sum_n b_n^\dagger b_n + \sum_m \sum_{n \neq m} J_{mn} b_n^\dagger b_m \quad (3)$$

darstellen, der als Diagonal-Elemente die homogenen Übergangsenergien  $E_0$  und als Nicht-Diagonal-Elemente die Wechselwirkungen  $J_{nm}$  enthält (KNOESTER 2002). Hierbei bleiben Exziton-Exziton- sowie Exziton-Phonon-Wechselwirkungen explizit unberücksichtigt. Da es sich bei Absorption und Emission um eine lineare Antwort des Moleküls auf das elektromagnetische Feld handelt, genügt an dieser Stelle die Betrachtung von Anregungszuständen mit lediglich einer Anregung.

---

<sup>9</sup> Hierbei ist eine Vielzahl an Kombinationen von besetzten und unbesetzten Orbitalen denkbar, der Einfachheit halber beschränkt sich diese Betrachtung auf den dominierenden Übergang.

Die in Kapitel 3.1 geschilderte diagonale Unordnung kann in (3) berücksichtigt werden indem aus einer Normalverteilung der Breite  $\Delta$  für jedes Molekül  $n$  ein individueller Wert  $\delta E_n$  bestimmt und zur homogenen Übergangsenergie  $E_0$  addiert wird:

$$H = \sum_n (E_0 + \delta E_n) \cdot b_n^\dagger b_n + \sum_m \sum_{n \neq m} J_{mn} b_n^\dagger b_m. \quad (4)$$

Zur Berechnung der linearen Antwort dieses inhomogenen Systems wird die  $N \times N$ -Matrix des Hamiltonoperators diagonalisiert und man erhält die neuen Eigenzustände

$$|k\rangle = \sum_n \varphi_k(n) b_n^\dagger |g\rangle, \quad (5)$$

wobei die konkrete Form von  $\varphi_k(n)$  abhängig ist von der Anordnung der einzelnen Moleküle. Je nach Verhältnis der Wechselwirkungsstärke zum Ausmaß der Unordnung lassen sich hierbei die Fälle **starke** ( $J/\Delta \gg 1$ ) bzw. **schwache Wechselwirkung** ( $J/\Delta \ll 1$ ) unterscheiden, was im Folgenden zunächst am Beispiel eines Dimers veranschaulicht werden soll.

### 3.2.1 Inhomogenes Dimer, schwache Wechselwirkung

Ist die Unordnung  $\Delta$  deutlich größer als die Wechselwirkung  $J_{nm}$  zwischen zwei Molekülen – z.B. durch thermische Effekte, oder durch einen großen Abstand  $r_{nm}$  der Chromophore – dann sind die Energieniveaus und die Übergangsdipolmomente des

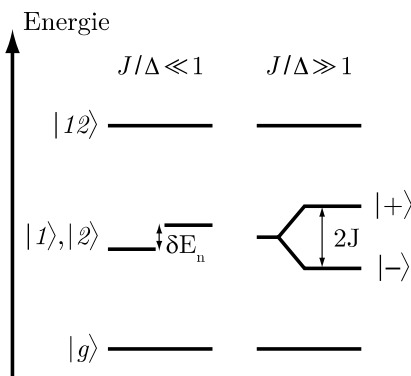


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Energieniveaus zweier Moleküle mit schwacher (links) und starker Wechselwirkung  $J$  (rechts).  $|g\rangle$  beschreibt den allgemeinen Grundzustand des Dimer-Systems, in dem beide Moleküle jeweils in ihrem Grundzustand vorliegen und  $|12\rangle$  beschreibt den Zustand in dem beide Moleküle gleichzeitig angeregt sind. Links:  $|1\rangle$  und  $|2\rangle$  beschreiben die Zustände, in denen Molekül 1 oder 2 im angeregten Zustand sind, während das jeweils andere in seinem Grundzustand verharrt. Rechts: Bei starker Wechselwirkung  $J$  spalten die Zustände  $|1\rangle$  und  $|2\rangle$  in die Zustände  $|+\rangle$  und  $|-\rangle$  auf; Details siehe Text.

Systems ähnlich zum ungekoppelten System und das Dimer besitzt die folgenden vier möglichen Zustände (vgl. Abbildung 14, links): Den Grundzustand  $|g\rangle$  in dem beide Moleküle im Grundzustand sind, die Zustände  $|1\rangle$  und  $|2\rangle$  in denen Molekül 1 oder 2 im angeregten Zustand sind, sowie der Fall in dem sich beide Moleküle gleichzeitig im angeregten Zustand befinden  $|12\rangle$ , wobei letzterer auf Grund der Annahme von lediglich einer Anregung keine weitere Rolle spielt. In diesem Grenzfall schwacher Kopplung ist eine Anregung weiterhin hauptsächlich auf den einzelnen Chromophoren lokalisiert und der Energietransfer zwischen den Molekülen lässt sich als Förster-Resonanzenergietransfer beschreiben, der häufig auch als „Hopping“ bezeichnet wird (HOFMANN 2004; ŞENER ET AL. 2011).

Dieser Grenzfall schwacher Wechselwirkung beschreibt in sehr grober Näherung die Situation der Chromophore im B800-Ring der LH2-Komplexe von *Rbl. acidophilus* (VAN OIJEN ET AL. 2000), wo die Wechselwirkungsstärke ( $-24 \text{ cm}^{-1}$ ) deutlich geringer ist als die Variation der Monomerenergie (ca.  $125 \text{ cm}^{-1}$ , SAUER ET AL. 1996).

### 3.2.2 Homogenes Dimer, starke Wechselwirkung

Ist dagegen die Stärke der Unordnung  $\Delta$  im Vergleich zur Wechselwirkung  $J_{nm}$  vernachlässigbar, oder liegt ein homogenes Dimer ohne Unordnung vor (das heißt zwei identische 2-Niveau-Moleküle mit gleicher Übergangsenergie  $E_0$  und Oszillatorenstärke  $|\vec{\mu}_1|^2 = |\vec{\mu}_2|^2$ ), dann spalten die beiden Zustände  $|1\rangle$  und  $|2\rangle$  in die beiden neuen Eigenzustände

$$|\pm\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(|1\rangle \pm |2\rangle) \quad (6)$$

mit den Energien  $E_{\pm} = E_0 \pm J$  auf. Diese Eigenzustände sind kohärente stehende Wellen, die über mehrere Moleküle delokalisiert sind und auch Frenkel-Exzitonen genannt werden (DAVYDOV 1971).

Die optische Antwort dieses homogenen Dimers auf ein äußeres Feld berechnet sich mit Hilfe des totalen Dipoloperators  $\hat{M} = \hat{\mu}_1 + \hat{\mu}_2$  nach KNOESTER 2002 aus

$$\langle \pm | \hat{M} | g \rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(\vec{\mu}_1 \pm \vec{\mu}_2). \quad (7)$$

Solange die beiden betragsgleichen ÜDM  $\vec{\mu}_1$  und  $\vec{\mu}_2$  nicht parallel zueinander orientiert sind, ist aus geometrischer Überlegung direkt ersichtlich, dass die beiden resultierenden optischen Übergänge  $\vec{M}_+$  und  $\vec{M}_-$  senkrecht zueinander polarisiert sind (vgl. Abbildung 15).

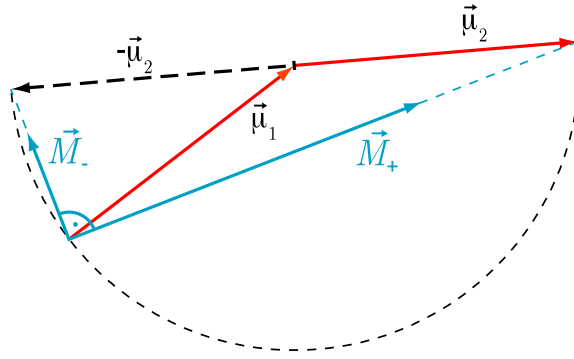


Abbildung 15: Geometrische Betrachtung der aus Gleichung (7) resultierenden Übergangsdipolmomente  $\vec{M}_\pm$  (blau) bei nicht-paralleler Anordnung gleichartiger Monomere (rot): Durch die identische Oszillatorenstärke  $|\vec{\mu}_1|^2 = |\vec{\mu}_2|^2$  lässt sich stets ein Thaleskreis (gestrichelt) konstruieren, der die Orthogonalität von  $\vec{M}_+$  und  $\vec{M}_-$  sicherstellt.

Der Winkel, den die beiden ÜDM  $\vec{\mu}_1$  und  $\vec{\mu}_2$  miteinander einschließen, bestimmt dabei die Verteilung der Oszillatorenstärke  $|\vec{M}_\pm|^2$  auf die beiden Zustände  $|+\rangle$  und  $|-\rangle$ . Im Absorptionsspektrum sind also zwei unterschiedlich stark ausgeprägte Banden der Energie  $E_\pm$  zu erwarten, die sich mit zueinander orthogonal polarisiertem Licht anregen lassen. Die energetische Aufspaltung zwischen diesen beiden Banden um  $2J$  ist bekannt als Davydov-Aufspaltung (DAVYDOV 1971).

Für den Fall parallel orientierter Übergangsdipolmomente  $\vec{\mu}_1$  und  $\vec{\mu}_2$  erhält, auf Grund der Symmetrie der Wellenfunktionen der neuen Eigenfunktionen, für lineare optische Prozesse lediglich der Zustand  $|+\rangle$  die vollständige Oszillatorenstärke vom Betrag  $2\mu^2$ . Das Absorptionsspektrum dieser Dimeranordnung zeigt folglich nur eine einzelne Bande hoher Intensität. Je nach Vorzeichen der Wechselwirkung  $J_{12}$  (bestimmt durch die relative Lage der parallel orientierten ÜDM) ist diese Absorptionsbande der Energie  $E_+$  rot- oder blauverschoben im Vergleich zur Absorption der Monomere und man spricht von J- bzw. H-Aggregaten.

Dieser Grenzfall der starken Wechselwirkung beschreibt die Dimerisierung der Chromophore, die für das in **P1** gezeigte Modell der LH2-Komplexe von *Alc. vinosum* zur Beschreibung der Aufspaltung der B800-Bande nötig ist. Ebenso ist dieser Grenzfall für die Moleküle des B850-Ringes zutreffend, für die auch experimentell gezeigt werden konnte, dass die angeregten Zustände vollständig delokalisiert sind (VAN OIJEN ET AL. 1999). Diese Delokalisierung angeregter Zustände in ringförmigen Aggregaten wird im Folgenden näher betrachtet.

### 3.2.3 Homogener Ring

Für ein System mit  $N > 2$  Molekülen mit periodischen Randbedingungen (zum Beispiel durch ringförmige Anordnung) erhält man im Grenzfall starker Wechselwirkung unter Verwendung des Bloch-Theorems für  $\varphi_k(n)$  in Gleichung (5)

$$\varphi_k(n) = \frac{1}{\sqrt{N}} \cdot e^{ik2\pi n/N}. \quad (8)$$

Dabei ist  $k$  die transversale Wellenzahl des Bloch-Zustandes und nimmt die Werte  $k=0, \pm 1, \pm 2, \dots, \pm \frac{N}{2}$  bzw.  $k=0, \pm 1, \pm 2, \dots, \pm \frac{N-1}{2}$  für gerad- und ungeradzahlige  $N$  an (KNOESTER 2002).  $\varphi_k(n)$  beschreibt dabei über den gesamten Ring delokalisierte, stehende Wellen mit  $k-1$  Knoten, wobei man für  $N=2$  den in Gleichung (6) dargestellten Fall des Dimers mit den Zuständen  $|\pm\rangle$  erhält. Für beliebige  $N$  beträgt die Energie des Zustands  $k$  für diese ringförmige Anordnung und für den Fall, dass nur Wechselwirkungen mit dem nächsten Nachbarn berücksichtigt werden,

$$E_k = E_0 + 2J \cos\left(\frac{2\pi k}{N}\right), \quad (9)$$

wobei die Aufspaltung der Zustände auf  $4J$  ansteigt (NOVODEREZHKIN UND RAZJIVIN 1995). In einem homogenen, ungestörten Ring erhalten dabei nur die beiden entarteten Zustände  $k=\pm 1$  Oszillatorenstärke, erst durch geringe Störungen erfolgt eine Umverteilung auch auf andere Zustände (RITZ ET AL. 1998; DIDRAGA ET AL. 2002; MOSTOVOY UND KNOESTER 2000).

Die Wechselwirkung eines Aggregats mit einem äußeren Feld hängt von der Anordnung der Monomere innerhalb des Aggregates ab, da sich die Übergangsdipolmomente der Exzitonenzustände  $k$  durch die Summation der ÜDM der einzelnen Chromophore



ergeben (SPITZ ET AL. 2002). Unter der Annahme, dass die ÜDM der Monomere weder genau parallel noch genau orthogonal zur Ebene des Ringes orientiert sind, überlagern sich die in der Ringebene liegenden Anteile der Monomer-ÜDM konstruktiv zu den entarteten Zustände  $k=\pm 1$ , die in der Ringebene liegend orthogonal zueinander polarisiert sind (siehe auch Appendix in LÖHNER ET AL. 2018). Die senkrecht zur Ringebene orientierten Anteile der Monomer-ÜDM summieren sich zum neuen Eigenzustand des Aggregats  $k=0$  auf (SPITZ ET AL. 2002).

Dieser Formalismus stark wechselwirkender Chromophore in einem ringförmigen Arrangement beschreibt näherungsweise den B850-Ring der LH2-Komplexe, wobei hier nicht berücksichtigt ist, dass durch die unterschiedlichen Abstände der BChl-Moleküle eigentlich ebenfalls eine Dimerisierung mit einbezogen werden muss (COGDELL ET AL. 2006).

### 3.2.4 Homogener Zylinder

Besteht das Molekülaggregat nicht nur aus einem einzelnen Ring, sondern aus mehreren identischen, übereinander gelagerten Ringen mit Abstand  $h$ , lassen sich mit obigem Formalismus auch zylindrische Strukturen beschreiben, wobei eine Anpassung der Notation nötig wird: Mit  $i$  werden die Ringe  $i=1,2,\dots,I$  durchnummeriert, die jeweils  $N$  Dipole beinhalten (vgl. dazu Abbildung 16).

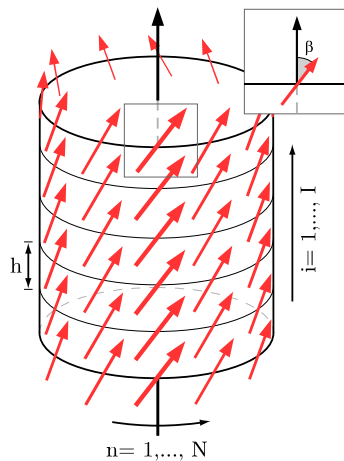


Abbildung 16: Anordnung von Übergangsdipolen (dargestellt als rote Pfeile) auf einer zylindrischen Struktur, aufgebaut aus  $I$  Einzelringen mit Abstand  $h$  und  $N$  Monomeren pro Ring; Ausschnitt: Seitenansicht zur Veranschaulichung des Winkels  $\beta$  zwischen der Zylinderachse und einem Übergangsdipolmoment.

Durch die Rotationssymmetrie ist, nach entsprechenden Umformungen, eine Entkoppelung des Hamiltonoperators

$$H = \sum_k H(k_n), \quad (10)$$

in  $N$  eindimensionale Gleichungen möglich, wobei der effektive Hamiltonoperator  $H(k_n)$  die einzelnen Ringe, jeweils im  $k_n$ -Bloch-Zustand, miteinander koppelt (eine detaillierte Rechnung findet sich in DIDRAGA ET AL. 2002). Mit den beiden Vektoren  $\vec{n} = (i, n)$  und  $\vec{k} = (k_i, k_n)$  erhält man analog zu Gleichung (5) die Exzitonzustände

$$|\vec{k}\rangle = \sum_{\vec{n}} \varphi_{\vec{k}}(\vec{n}) b_{\vec{n}}^{\dagger} |g\rangle \quad (11)$$

als Lösung. Wegen der Zylindersymmetrie erhalten für optische Anregungen lediglich die Zustände  $\vec{k} = (1, 0)$  und  $\vec{k} = (1, \pm 1)$  Oszillatorenstärke vom Betrag  $|\vec{\mu}_0|$ ,  $|\vec{\mu}_{\pm 1}|$  und  $|\vec{\mu}_{-1}|$  (MATSUSHITA ET AL. 2001; DIDRAGA UND KNOESTER 2002). Dabei ist  $\vec{k} = (1, 0)$  parallel zur Achse des Zylinders orientiert und die entarteten Zustände  $\vec{k} = (1, \pm 1)$  liegen senkrecht zu dieser Achse in der Ebene der Ringe und jeweils orthogonal zueinander. Auf Grund ihrer Entartung liefern diese beiden Zustände  $\vec{k} = (1, \pm 1)$  einen identischen Beitrag zum Spektrum (ein und dieselbe spektrale Position und Oszillatorenstärke  $|\vec{\mu}_{\pm 1}| = |\vec{\mu}_{+1}| = |\vec{\mu}_{-1}|$ , vgl. DIDRAGA ET AL. 2002).

Aus der Zylindersymmetrie des Aggregats lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Oszillatorenstärken  $|\vec{\mu}_0|$  und  $|\vec{\mu}_{\pm 1}|$  ableiten: Aus geometrischen Betrachtungen ergibt sich, dass der Winkel  $\beta$ , den die einzelnen Übergangsdipolmomente mit der Zylinderachse einschließen (vgl. vergrößerten Ausschnitt in Abbildung 16), dieses Verhältnis gemäß

$$\tan^2 \beta = \frac{2 \cdot |\vec{\mu}_{\pm 1}|^2}{|\vec{\mu}_0|^2} \quad (12)$$

bestimmt (DIDRAGA ET AL. 2002). Mit dieser Beziehung ist es prinzipiell möglich, den Winkel  $\beta$  mit Hilfe optischer Experimente direkt zu messen, wobei die Oszillatorenstärken  $|\vec{\mu}|^2$  aus dem experimentellen Spektrum ermittelt werden können, indem über die Fläche unter der jeweiligen Absorptionsbande integriert wird. Dies kommt beispielsweise bei der Betrachtung der ZnChl-Aggregate oder der Chlorosome zur Anwendung (vgl. **Kapitel 5** und **P3**).



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Experimenteller Aufbau

Um Informationen über die elektronische Struktur von Pigment-Komplexen zu erhalten wurden in dieser Arbeit Fluoreszenz-Anregungsspektren einzelner Komplexe aufgenommen. Dabei wird der zu untersuchende Komplex mit einem spektral möglichst schmalen Laser angeregt und die Intensität der rotverschobenen Emission des Komplexes beispielsweise mit einer Photodiode gemessen (ORRIT UND BERNARD 1990). Wird die Anregungswellenlänge  $\lambda$  variiert und über das Absorptionsprofil des Komplexes gefahren, so erhält man die Emissionsintensität  $E(\lambda)$ , die ein Maß für die Absorption ist, wenn die Energie vom absorbierenden zum emittierenden Zustand (nahezu) vollständig übertragen wird.

Die Fluoreszenz-Anregungsspektren in dieser Arbeit wurden mit einem selbstgebauten, konfokalen Mikroskop (Abbildung 17) bei 1,2 K aufgenommen. Als Anregungslaser dient ein mit einem Nd:YVO<sub>4</sub> (Millenia Vs, Spectra Physics) gepumpter

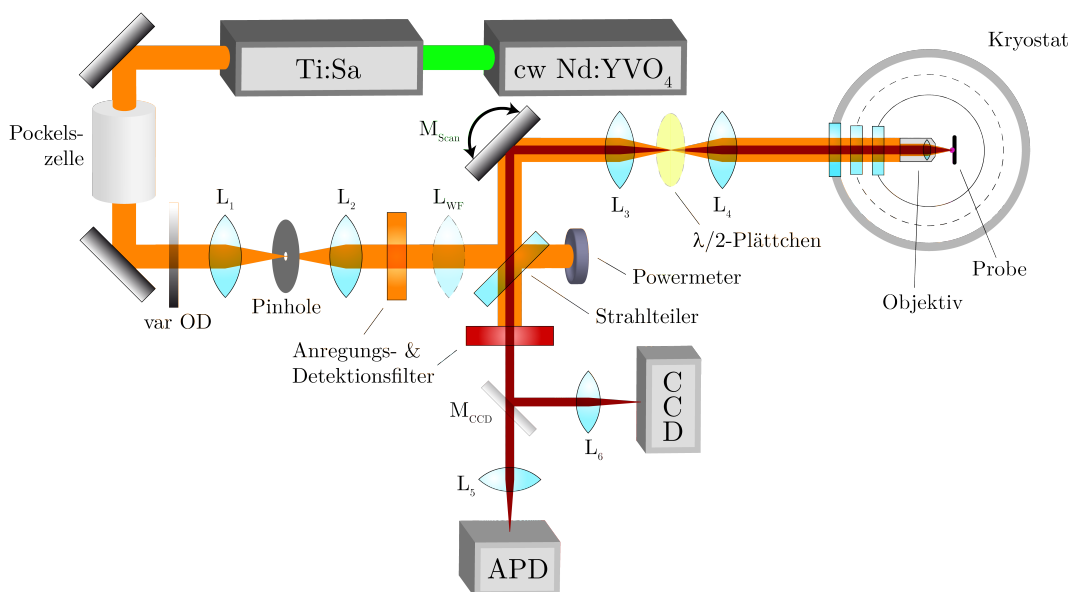


Abbildung 17: Schematische Skizze des verwendeten konfokalen Mikroskops; orange: Anregungsstrahlengang, dunkelrot: Detektionsstrahlengang.

Ti:Sa-Laser (3900S, Spectra Physics), dessen Wellenlänge mit Hilfe eines Schrittmotor-gesteuerten (Actuator 850 F, Nanomover und Motion Controller MM4005, Newport), doppelbrechenden Kristalls kontinuierlich im Bereich von 700 bis 1000 nm durchgestimmt werden kann. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Wellenlänge wurde mit einem Wavemeter (WaveMaster, Coherent) überprüft und beträgt etwa  $1 \text{ cm}^{-1}$ . Ein variabler Graufilter (M-925B, Newport) ermöglicht die präzise Einstellung der für das Experiment benötigten Laserintensität.

### **Weitfeldbild**

Um ein Weitfeldbild der Probe aufzunehmen wird der Laser mit Hilfe einer Linse  $L_{WF}$  auf die hintere Fokalebene eines Mikroskopobjektivs ( $NA=0,85$ , Microthek) fokussiert, sodass ein divergenter Strahl ins Objektiv gelangt, der nicht in die Probenebene fokussiert wird, sondern einen Bereich mit einem Durchmesser von etwa  $30 \mu\text{m}$  ausleuchtet (vgl. Figure 2, **P2**). Das von der Probe emittierte, rotverschobene Licht wird von demselben Objektiv aufgesammelt, durch einen Glaskeil als Strahlteiler geführt und von einer CCD-Kamera (iKon M 934-BR-DD, Andor) detektiert. Je nach untersuchter Probe wird eine geeignete Kombination von Anregungs- und Detektionsfilter eingesetzt, um die Emission der Komplexe vom Anregungslicht zu trennen.

### **Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie**

Zur Aufnahme des Fluoreszenz-Anregungsspektrums eines einzelnen Komplexes wird der Aufbau im konfokalen Modus verwendet, das heißt die Linse  $L_{WF}$  wird aus dem Strahlengang geklappt, wodurch das Abbild des Pinholes ( $\varnothing: 50 \mu\text{m}$ , Edmund Optik) mit dem Mikroskopobjektiv auf die Probenebene fokussiert wird, um ein möglichst geringes Probenvolumen ( $< 1 \mu\text{m}^3$ ) anzuregen und so Einzelmolekül-Experimente zu ermöglichen. Als Detektor kommt in dieser Konfiguration eine APD (SPCM-AQR-16, Perkin Elmer) zum Einsatz, deren Sensorfläche genügend klein ist, um als Detektionspinhole des konfokalen Aufbaus zu dienen. Mit Hilfe eines schrittmotorgesteuerten, kardanisch aufgehängten Spiegels  $M_{Scan}$  und dem telezentrischen Linsensystem  $L_3/L_4$  lässt sich das Anregungs- und Detektionsvolumen auf eine zuvor im Weitfeldbild aus-

gewählte Stelle ausrichten und ermöglicht so die gezielte Auswahl eines bestimmten Komplexes.

Beim Durchfahren der Wellenlänge auftretende Intensitätsspitzen werden mit Hilfe einer Pockelszelle abgemildert, um ein möglichst glattes Anregungsprofil zu erhalten. Weiterhin wird mit einem Powermeter (LaserMate-Q, Coherent) die Anregungsintensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgezeichnet, um bei der Auswertung die Emissionsintensität entsprechend zu korrigieren.

### ***Polarisationsabhängige Messungen***

Zur Untersuchung der Polarisationsabhängigkeit der Absorptionslinien bzw. -banden wird ein  $\lambda/2$ -Plättchen (690-1200 nm, Thorlabs) zwischen den telezentrischen Linsen eingebracht, das nach der Aufnahme jedes Fluoreszenz-Anregungsspektrums mit einem Schrittmotor (Ovis) um  $3,1^\circ$  gedreht wird (entspricht einer Drehung des Anregungslichts um  $6,2^\circ$ ). Für jeden Komplex werden mindestens 100 solcher Einzelspektren aufgezeichnet, aus denen die spektrale Lage sowie die Polarisationsabhängigkeit der einzelnen Banden zueinander ermittelt werden kann.

### ***Emissionsspektroskopie***

Neben den Fluoreszenz-Anregungsspektren wurden für manche Komplexe auch Emissionsspektren aufgezeichnet. Hierbei wird die Anregungswellenlänge nicht verändert, sondern bleibt fixiert auf einen zuvor festgelegten Wert. Als Detektor wird die CCD-Kamera (iKon M 934-BR-DD, Andor), kombiniert mit einem Spektrometer (Acton 250, Princeton Instruments; Gitter: 300 Linien/mm, Blaze: 1000 nm), verwendet. Um das Signal-Rausch-Verhältnis der Spektren zu verbessern, werden bei diesen Messungen 16 vertikale Pixel der Kamera zusammengefasst.

## 4.2 Probenpräparation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Spektren von verschiedenen Komplexen der bakteriellen Lichtsammelsysteme, sowie semi-künstlicher Lichtsammelkomplexe untersucht. Die Isolation der natürlichen Proben aus den Bakterien und die anschließende Aufreinigung, sowie die chemische Synthese der semi-künstlichen Komplexe wurde jeweils von Kooperationspartnern vorgenommen.

### **LH2-Komplexe**

Die in **P1** untersuchten LH2-Komplexe stammen aus der Gruppe von RICHARD COGDELL (University of Glasgow, Schottland) und wurden aus Bakterien der Spezies *Alc. vinosum* extrahiert: Die Bakterien werden bei hoher Lichtintensität (220 lux) und einer Temperatur von 40 °C in einem Nährmedium mit Natriumthiosulfat als Schwefelquelle gezüchtet, bevor die Zellen mit einer „French Press“ mechanisch zerstört werden und die LH2-Komplexe über mehrere Schritte von den restlichen Bestandteilen getrennt werden (für Details siehe CAREY ET AL. 2014 und NIEDZWIEDZKI ET AL. 2012). Die erhaltenen Proben sind auf eine optische Dichte von  $OD_{850\text{ nm}}=100$  (gemessen in einer 1 cm Küvette) konzentriert und werden bis zur Verwendung bei -20 °C im Dunkeln in einem 20 mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan/Salzsäure-Puffer (kurz: Tris/HCl) (pH 8 bei Raumtemperatur) gelagert, in dem Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM) mit einem Gewichtsanteil von 0,02 % gelöst ist. Das DDM dient hierbei als Detergens, das eine Aggregation der einzelnen Komplexe wirksam verhindert.

### **Chlorosome**

Die Chlorosom-Proben aus **P3** stammen von der Gruppe von DONALD A. BRYANT der Pennsylvania State University (Vereinigte Staaten von Amerika) und wurden aus grünen Schwefelbakterien der Spezies *Cba. tepidum* abgeschieden. Für die hier untersuchten Proben wurden sowohl natürlich vorkommende wildtypische Bakterien verwendet, als auch Bakterien, bei denen das *bchQ*- und *bchR*-Gen deaktiviert wurde (vgl. Kapitel 2.2.3.2 und CHEW ET AL. 2007).

Für die Isolation der Chlorosome werden die vollständigen Bakterien zentrifugiert, in einem speziellen Isolationspuffer gelöst und mit einer „French Press“ aufgeschlos-

sen. Mittels (Dichtegradienten-)Zentrifugation werden die Chlorosome von den restlichen Bestandteilen getrennt und mit einem Phosphat-Salz-Puffer gewaschen, bevor sie mit einer Ultrazentrifuge pelletiert werden (vgl. VASSILIEVA ET AL. 2002 und **P3**). Die Pellets werden mit einem (Di-)Kaliumphosphat-Kochsalz-Puffer gelöst, der mit den Proteaseinhibitoren Dithiothreitol (DTT) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt ist. Diese verhindern den Abbau der Proteine, sind in wässriger Lösung bei Raumtemperatur aber sehr instabil und degradieren innerhalb weniger Stunden, weshalb die Proben bei 4 °C gelagert werden. Vor dem Versand werden die Proben auf eine optische Dichte von  $OD_{733\text{nm}}=58$  (gemessen in einer 1 cm Küvette) gebracht und am Lehrstuhl in Bayreuth, ebenso wie die LH2-Komplexe, im Dunkeln bei -20 °C gelagert.

### **FMO-Komplexe**

Die in **P2** verwendeten FMO-Komplexe stammen ebenso wie die LH2-Komplexe aus der Gruppe von RICHARD COGDELL, und werden aus Zellen der Grünen Schwefelbakterien *Cba. tepidum* gewonnen. Die Bakterien wachsen unter anaeroben Bedingungen bei 43 °C und einer Beleuchtungsstärke von circa 1500 lux, bevor sie mit einer „French Press“ aufgeschlossen werden und ihre Bestandteile durch Zentrifugieren voneinander getrennt werden. Die FMO-Komplexe werden mittels Nickel-Affinitätschromatografie aus der Lösung ausgewaschen, mittels Ionenaustausch-Chromatografie aufgereinigt, durch eine Membran gefiltert und mit Hilfe einer Größenausschluss-Chromatografie nochmals weiter gereinigt (für mehr Details siehe **P2**). Bis zur Verwendung der Proben werden diese bei -80 °C in einem 20 mM Tris/HCl-Puffer ohne weiteres Detergens gelagert, da FMO gut wasserlöslich ist.

### **Zink-Chlorine**

Bei den in **Kapitel 5** untersuchten Proben handelt es sich um semi-synthetische Lichtsammelkomplexe, deren Grundbestandteile in der Gruppe von FRANK WÜRTHNER (Universität Würzburg) aus natürlichem Chlorophyll *a* derivatisiert wurden (Details siehe SENGUPTA ET AL. 2012; HUBER ET AL. 2005 und Kapitel 2.3). Durch die veränderten Seitengruppen verhalten sich die Moleküle amphiphil und aggregieren in wässriger



Lösung selbständig zu Nanoröhrchen (SENGUPTA UND WÜRTHNER 2013). Diese Aggregate sind einem Wasser-Tetrahydrofuran-Gemisch (1% Volumenanteil THF) chemisch deutlich stabiler als natürliche Aggregate aus Bakteriochlorophyll (SENGUPTA ET AL. 2012) und können bei Raumtemperatur unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung gelagert werden.

### **Präparation für Einzelkomplex-Proben**

Je nach Probe werden die Aggregate unterschiedlich für die Messung im Kryostaten vorbereitet. Bei allen drei Präparationsmethoden ist eine starke Verdünnung über mehrere Schritte notwendig, um eine genügend niedrige Konzentration für Einzelmolekül-Experimente zu erreichen. Die konkreten Verdünnungsschritte und Konzentrationen finden sich in den jeweiligen Publikationen.

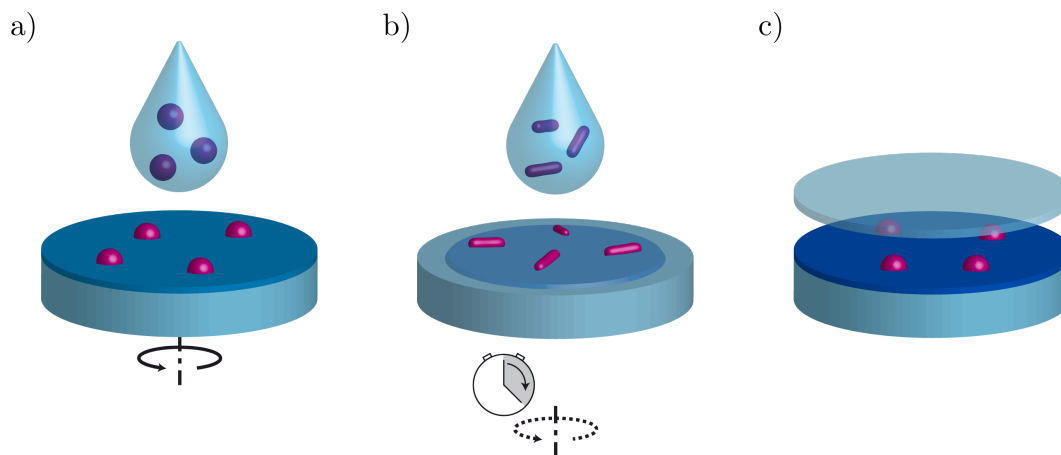


Abbildung 18: Schematische Darstellung zur Präparation von Einzelkomplex-Proben für Tieftemperaturmessungen

- a) Präparation mit PVA: Immobilisation der Komplexe in einer dünnen PVA-Schicht
- b) Antrocknen der Probe: Verdunsten und leichtes Abschleudern überschüssigen Puffers
- c) Puffer-Glycerin-Gemisch unter Glas: Einbettung der Komplexe in glasartigen Puffer.

Die LH2-Proben aus **P1** sowie die Zink-Chlorin-Proben aus **Kapitel 5** werden in einem **dünnen PVA-Film** eingebettet (vgl. Abbildung 18a). Dazu wird für den letzten Verdünnungsschritt (40fache Verdünnung) Puffer verwendet, der 2 g Polyvinylalkohol (PVA) pro 100 ml enthält. Von der stark verdünnten Probe mit circa zwei Prozent Gewichtsanteil PVA werden 15  $\mu$ l auf ein Quarzglasplättchen ( $\varnothing$ : 9,9 mm) aufgetropft. Bei der Präparation einer Zink-Chlorin-Probe wird anschlie-

ßend noch zwei Minuten gewartet, bis sich die Komplexe unter Stickstoffatmosphäre am Glas adsorbiert haben. Im Falle einer LH2-Probe wird diese Wartezeit übersprungen, da dies empirisch bessere Proben liefert. Anschließend wird die Probe zunächst für 10 Sekunden bei 500 U/min und anschließend 60 Sekunden bei 2000 (ZnChl) bzw. 2500 U/min (LH2) gspincoated (Spincoater P6700, Specialty Coating Systems).

Die Probenpräparation der Chlorosome aus **P3** kommt ohne PVA aus, hier werden 10 µl der verdünnten Probe auf ein Quarzglasplättchen aufgetropft und anschließend etwa 20 Minuten gewartet, um die **Probe antrocknen** zu lassen (vgl. Abbildung 18b). Nach dieser Zeit wird der eventuell noch vorhandene, restliche Puffer abgeschleudert, indem die Probe für etwa zehn Sekunden bei 500 U/min gspincoated wird.

Unabhängig von der Verwendung von PVA werden die Proben direkt nach dem Spincoaten unter Vermeidung von Lichteinstrahlung im Probenhalter des Kryostaten befestigt und mit diesem in den Kryostaten eingebaut. Anschließend werden die Proben mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und der Kryostat vorgekühlt, bevor dieser für die Messungen mit flüssigem Helium gefüllt wird und durch Reduktion des Innendrucks auf 1,2 K abgekühlt wird.

Für die Probenpräparation der FMO-Komplexe aus **P2** erweisen sich die beiden vorgenannten Methoden als ungeeignet. Als einzige funktionierende Möglichkeit zeigt sich die Präparation in **Puffer unter einem Mikroskopdeckglas** (vgl. Abbildung 18c). Bei tiefen Temperaturen würde der wässrige Puffer kristallisieren und eine optische Untersuchung einzelner Komplexe wäre auf Grund der Streuung des Mediums nicht möglich. Daher wird die Probe bei dieser Präparationsmethode im letzten Verdünnungsschritt mit der selben Menge reinen Glycerins vermischt, das beim Gefrieren die Bildung von Kristallen verhindert und eine amorphe, klare Probe gewährleistet. Um trotz der (erst einmal) flüssigen Probe eine flache Probenoberfläche zu erhalten wird zunächst, passend zum Kryostatprobenhalter, ein Mikroskop-Deckgläschen mit einem Glasschneider zurecht geschnitten und gereinigt. Dann wird der eigentliche Probeträger (die gleichen Quarzglasplättchen wie oben) in den Probenhalter des Kryostaten montiert und auf das eingebaute, waagrecht liegende Glas ein Tropfen

(0,5  $\mu$ l) der Probe in Puffer-Glycerin-Gemisch aufgebracht. Durch vorsichtiges Auflegen des zurechtgeschnittenen Deckgläschens verteilt sich die Probe homogen zu einem dünnen Film. Zum Schockgefrieren der Probe wird diese mit dem Probenhalter in die Probenkammer des Kryostaten eingetaucht, die zuvor bereits mit flüssigem Stickstoff gefüllt wurde. Zum weiteren Abkühlen des Kryostaten auf 1,2 K wird vorgegangen wie oben beschrieben.

### 4.3 Verwendete Chemikalien, Filter und Geräte

#### Chemikalien

Handelsname	chemischer Name	Hersteller
DDM	Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid	Carl Roth GmbH
Glycerin	Propan-1,2,3-triol	Sigma-Aldrich
PVA	Polyvinyl-Alkohol (124.000-186.000 g/mol)	Sigma-Aldrich
THF	Tetrahydrofuran	Sigma-Aldrich
Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	Sigma-Aldrich

#### Optische Filter

Bezeichnung	Filtertyp	Hersteller
BP 890/20	Bandpass	AHF Analysetechnik
BP 893/21	Bandpass	Dr. Hugo Anders
LP780	Langpass	AHF Analysetechnik
LP830	Langpass	AHF Analysetechnik
SP785 Razor Edge	Kurzpass	AHF Analysetechnik

#### Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Spincoater	P6700	Specialty Coating Systems
Pumplaser	Millenia Vs	Spectra Physics
Ti:Sa Laser	3900 S	Spectra Physics
Schrittmotor	Actuator 850 F	Nanomover
Schrittmotorsteuerung	Motion Controller MM4005	Newport
APD	SPCM-AQR-16	Perkin Elmer
CCD	iKon-M	Andor
Spektrometer	Acton 250 (300 Linien/mm)	Princeton Instruments

## 4.4 Simulationen

Die Simulationen in **P1** und **Kapitel 5** wurden mit selbstgeschriebenen MatLab-Programmen in Punkt-Dipol-Näherung durchgeführt, wobei der Programmcode für die grundlegenden quantenmechanischen Berechnungen von ERIK BLOEMSMA aus der Gruppe von JASPER KNOESTER (Universität Groningen) stammt.

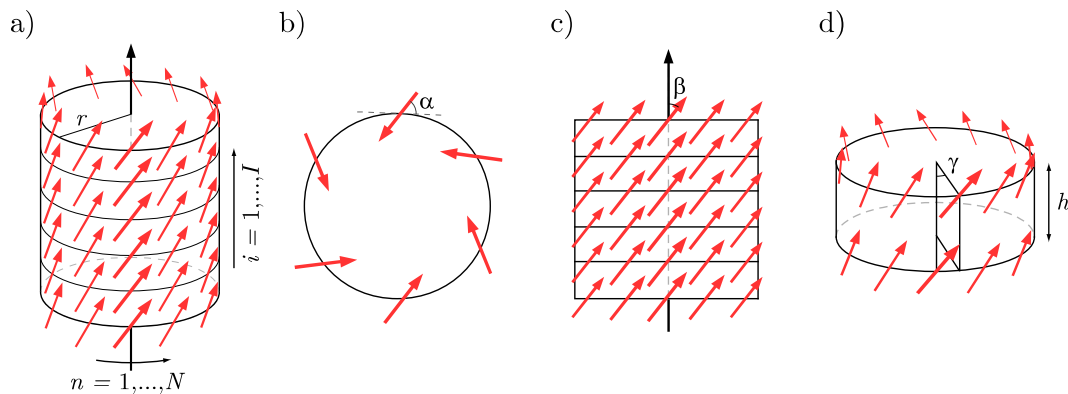


Abbildung 19: a) Schematische Darstellung von Dipolen (dargestellt durch rote Pfeile), angeordnet auf einer zylinderförmigen Struktur mit Radius  $r$  (Schrägansicht); b) Aufsicht auf den Zylinder zur Veranschaulichung des Winkels  $\alpha$  zwischen der Tangente an den Zylinder und den Übergangsdipolmomenten; c) Seitenansicht zur Veranschaulichung des Winkels  $\beta$  zwischen der Zylinderachse und den Übergangsdipolmomenten; d) Seitenansicht zweier Einzelringe des Zylinders mit Abstand  $h$ : Verdrehung der beiden Ringe um den Winkel  $\gamma$  um die gemeinsame Symmetrieachse.

Basis für die Simulationen von LH2-Komplexen und ZnChl-Aggregaten ist die Anordnung von Monomeren zu zylinderförmigen Aggregaten, die durch die Stapelung einzelner Ringe gebildet werden. Die Chromophore werden für die Simulationen in beiden Fällen auf ihr  $Q_y$ -Übergangsdipolmoment reduziert. Die **Position** der ÜDM wird hierbei festgelegt durch (vgl. Abbildung 19a,d)

- ihre Anzahl  $N_i$  pro Ring  $i$ ,
- den Radius  $r$ ,
- den Abstand  $h_i$ , sowie
- die Verdrehung  $\gamma_i$  der einzelnen Ringe zueinander.

Die **Orientierung** der ÜDM wird bestimmt durch (vgl. Abbildung 19b,c)

- den Winkel  $\alpha$ , den die Übergangsdipolmomente mit der Tangente an den Zylinder einschließen und
- den Winkel  $\beta$ , zwischen den Übergangsdipolmomenten und der Zylinderachse.

#### 4.4.1 LH2-Komplexe

In LH2-Komplexen liegen die BChl  $a$ -Moleküle auf zwei Ringen (B800- und B850-Ring), wobei der B850-Ring aus Bausteinen von je zwei BChl aufgebaut ist, die eine unterschiedliche räumliche Ausrichtung besitzen und deren Abstand innerhalb des Bausteins größer ist als zum nächsten BChl-Molekül des Nachbarbausteins (vgl. Abbildung 4a und Kapitel 2.2.2.2). Die BChl-Moleküle des B800-Rings sind in den in Kapitel 2.2.2.2 beschriebenen Komplexen der Spezies *Rbl. acidophilus* gleichmäßig über den Ring verteilt, für die in **P1** untersuchte Spezies *Alc. vinosum* wurde im Gegensatz dazu jedoch eine Dimerisierung angenommen, die durch unterschiedliche Abstände der Chromophore zueinander beschrieben werden kann.

Um diese räumliche Anordnung der Bakteriochlorophyll-Moleküle in der Simulation abzubilden wird ein Zylinder aus vier Einzelringen  $i=1, \dots, 4$  aufgebaut, wobei der Abstand  $h_i$  von Ring 1 zu 2 sowie von Ring 3 zu 4 jeweils Null beträgt (vgl. Abbildung 20). Die ersten beiden Ringe werden verwendet um den B850-Ring nachzubilden und die beiden Ringe 3 und 4 für die Nachbildung des B800-Rings. Auf

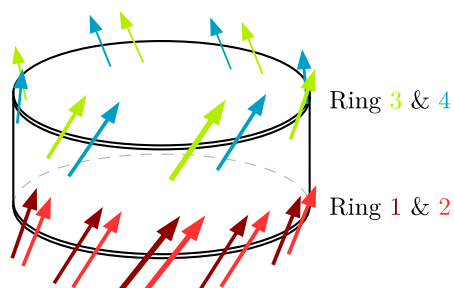


Abbildung 20: Skizze der zylinderförmigen Anordnung von ÜDM für die Simulation von LH2-Komplexen aus vier Einzelringen. Ring 1 und 2 (hell- und dunkelrot) bilden den B850-Ring, während Ring 3 und 4 (türkis und grün) den B800-Ring nachbilden, der nur die Hälfte an Chromophoren enthält (zu Anschauungszwecken ist die Zahl der Monomere pro Ring in der Skizze reduziert).

Grund der Symmetrie der LH2-Komplexe von *Alc. vinosum* werden in Ring 1 und 2 jeweils zwölf und in Ring 3 und 4 jeweils sechs Chromophore gleichmäßig über den Kreisbogen verteilt. Die unterschiedlichen Abstände zwischen den BChl *a*-Molekülen innerhalb des B850- bzw. B800-Rings werden erreicht, in dem  $|\gamma_1 - \gamma_2| < 30^\circ$  bzw.  $|\gamma_3 - \gamma_4| < 60^\circ$  gewählt wird.

Die Position des Übergangsdipolmoments  $n$  auf Ring  $i$  lässt sich mit  $t_{i,n} = (n-1) \frac{2\pi}{N_{2,i}} - \gamma_i$  schreiben als

$$\vec{r}_{i,n} = r \cdot \begin{pmatrix} \cos(t_{i,n}) \\ \sin(t_{i,n}) \\ h_i \end{pmatrix} \quad (13)$$

und der zugehörige Vektor des Übergangsdipolmoments lässt sich mit den oben beschriebenen Parametern  $\alpha$  und  $\beta$  sowie der Stärke des Übergangsdipolmoments  $D$  folgendermaßen ausdrücken:

$$\vec{\mu}_{i,n} = D \cdot \begin{pmatrix} -\sin(\beta_i) \cdot \sin(t_{i,n} - \alpha_i) \\ \sin(\beta_i) \cdot \cos(t_{i,n} - \alpha_i) \\ \cos(\beta_i) \end{pmatrix}. \quad (14)$$

Mit Hilfe von Gleichung (2) lässt sich aus (13) und (14) die Wechselwirkung  $J_{nm}$  aller Moleküle im LH-Komplex miteinander berechnen. Mit dieser Wechselwirkungsmatrix lässt sich gemäß Gleichung (3) der Hamiltonoperator für dieses System aufstellen, der als Diagonal-Elemente die homogenen Übergangsenergien und als Nicht-Diagonal-Elemente die Wechselwirkungen  $J_{nm}$  enthält.

In den Simulationen wurde ein geringes Maß an Unordnung in den Komplexen berücksichtigt, indem die in Kapitel 3.1 beschriebene diagonale Unordnung eingeführt und der entsprechende Hamiltonoperator (4) mit dem Term  $\delta E_{n,i}$  benutzt wurde. Dieser Parameter  $\delta E_{n,i}$  wird dabei so gewählt, dass die homogene Übergangsenergie jedes Chromophores individuell um einen ganzzahligen, zufällig aus dem Intervall  $[-75 \text{ cm}^{-1}; 75 \text{ cm}^{-1}]$  gewählten Wert erhöht bzw. verringert wird. Die Breite dieses Zufallsintervalls entspricht etwa der experimentell bestimmten Breite der Verteilung der B800-Linien (vgl. Figure 5b, **P1**). Variabilität von Position oder Orientierung der Übergangsdipolmomente im Komplex, die sich in einem Parameter  $\Delta J$  im zweiten Term des

Hamiltonoperators äußern würde, wurde bei der Simulation der LH-Komplexe nicht zusätzlich berücksichtigt, da diese Nicht-Diagonal-Unordnung  $\Delta J$  weniger relevant für selbst-organisierende Aggregate ist und in der Praxis stets von zusätzlicher diagonalen Unordnung begleitet werden würde (FIDDER ET AL. 1991).

Um den Einfluss der Wechselwirkungsreichweite auf das Spektrum zu untersuchen, kann der Hamiltonoperator bei Bedarf so modifiziert werden, dass

- nur die Wechselwirkung mit dem nächsten Nachbarmolekül in derselben Ringebene berücksichtigt wird, oder
- dass die Wechselwirkung aller Moleküle im B800- und B850-Ring zugelassen wird, jedoch keine Wechselwirkung zwischen den Ringen stattfindet.
- Ohne Modifikation wird die Wechselwirkung aller ÜDM im Komplex miteinander für die numerische Simulation der Spektren berücksichtigt.

Nach dieser eventuellen Veränderung erhält man aus der Diagonalisierung des Hamiltonoperators (4) die Energie und Oszillatorenstärke der Exzitonzustände. Indem die einzelnen Absorptionslinien mit einer Gauß-förmigen Funktion umhüllt werden, lässt sich das Absorptionsspektrum des simulierten Komplexes darstellen, wobei die Linienbreite der umhüllenden Funktion aus den experimentellen Daten abgeleitet wurde ( $15 \text{ cm}^{-1}$  für B800- bzw.  $150 \text{ cm}^{-1}$  für B850-Linien).

Auf Grund der schmalen Linienbreite lässt sich aus einem Einzelspektrum nicht erkennen, ob die Simulation einer bestimmten Geometrie die Aufspaltung der B800-Bande reproduziert, oder nicht. Aus diesem Grund wird die Simulation für jede Geometrie 1000 Mal mit stets zufälliger Unordnung wiederholt. Neben dem Vergleich des simulierten Summenspektrums mit dem experimentellen Ensemblespektrum werden aus der Simulation auch alle weiteren experimentell zugänglichen Daten – wie Polarisation der Einzel-Banden zueinander, Abhängigkeit der relativen Intensität der Banden von ihrer spektralen Position sowie Zahl der detektierbaren Banden – ausgewertet und mit den experimentellen Ergebnissen verglichen. An Hand dieser Auswertung kann überprüft werden, welche Geometrie geeignet ist, die gemessenen spektralen Ei-



genschaften zu reproduzieren. Durch iterative Variation und Überprüfung der Spektren kann so ein Strukturmodell entwickelt werden, wie in **P1** vorgestellt.

#### 4.4.2 ZnChl-Aggregate

Die Simulationen für die LH2-Komplexe und für die ZnChl-Aggregate unterscheiden sich in zwei wesentlichen Punkten: Die LH2-Komplexe bestehen aus vier Substrukturen (vgl. Abbildung 20) mit unterschiedlicher Anordnung und Orientierung der ÜDM, während das molekulare Arrangement der ZnChl-Aggregate von lediglich einer ringförmigen Wiederholeinheit gebildet wird, in der alle ÜDM identisch ausgerichtet sind. Für diese gleichmäßige Anordnung der Übergangsdipolmomente werden die Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  für jedes Molekül eines Aggregats identisch gewählt, ebenso wie der Abstand  $h$  zwischen den einzelnen Ringen.

Der zweite wesentliche Unterschied ist, dass für die Simulation der ZnChl-Aggregate ein „homogenes Modell“ verwendet wird, das heißt die Intra-Komplexheterogenität wird zunächst nicht durch einen Term im Hamiltonoperator (4) berücksichtigt, sondern durch das Umhüllen der Stick-Spektren mit Kurven großer Linienbreite ( $> 200 \text{ cm}^{-1}$ ) verwirklicht. Auf diese Weise ist ein direkter Vergleich eines einzelnen simulierten Spektrums mit dem Experiment möglich und der rechenintensive Simulationsprozess kann verkürzt werden: Für eine ausreichende Länge des Aggregats werden 1000 ringförmige Wiederholeinheiten á 20 ZnChl-Moleküle gestapelt (SENGUPTA ET AL. 2012), was in einer  $20\,000 \times 20\,000$ -Matrix als Hamiltonoperator resultiert, der wie oben diagonalisiert wird. Aus dieser Diagonalisierung erhält man wieder die Energie und Oszillatorenstärke der Exzitonzustände, mit denen das polarisationsabhängige Spektrum dargestellt und mit den experimentellen Daten verglichen wird. Durch eine iterative Anpassung der Parameter lassen sich so Spektren von unterschiedlichen, gemessenen Aggregaten sehr gut nachformen (vgl. nächstes Kapitel).

---

## 5 Experimente und Simulationen an ZnChl-Aggregaten

In diesem Kapitel werden Experimente und Simulationen an den in 2.3 beschriebenen semi-synthetischen ZnChl geschildert, die als wohldefinierte Modellsysteme für natürliche Chlorosome dienen. Trotz der scheinbar großen Homogenität der Aggregate zeigen die durchgeführten Einzelmolekül-Experimente deutliche Unterschiede zwischen den spektralen Eigenschaften einzelner Komplexe. Durch den Vergleich der Spektren mit theoretischen Simulationen lassen sich verschiedene strukturelle Modelle vergleichen und untersuchen, wie kleine Unterschiede in der räumlichen Anordnung der Monomere im Aggregat zu beachtlichen Unterschieden der optischen Eigenschaften führen.

Die Anordnung der Monomere zu Suprastrukturen in Chlorosomen ist Gegenstand einer jahrzehntelangen Diskussion, die auf die Vielzahl an Ebenen von Heterogenität zurückzuführen ist (HOLZWARTH UND SCHAFFNER 1994; TAMIYAKI 1996; PŠENČÍK ET AL. 2004; LINNANTO UND KORPPI-TOMMOLA 2013; GANAPATHY ET AL. 2009a): Innerhalb eines Chlorosoms finden sich Aggregate unterschiedlicher Größe und Form, die teils ineinander geschachtelt sind und aus verschiedenen Arten von BChl-Molekülen bestehen (vgl. Kapitel 2.2.3.2). Darüber hinaus ist diese Anordnung und Zusammensetzung von Chlorosom zu Chlorosom unterschiedlich, was zu weiterer Inhomogenität innerhalb einer Probe führt.

Um die exzitonische Wechselwirkung in multichromophoren Systemen zu untersuchen wurden daher in der Vergangenheit künstliche molekulare Aggregate synthetisiert, die deutlich geringere Inhomogenität aufweisen und deren Monomere auf natürlichen BChl-Molekülen basieren (HUBER ET AL. 2007, 2008; GANAPATHY ET AL. 2009b; SENGUPTA UND WÜRTHNER 2012, 2013) (vgl. auch Kapitel 2.3). Mit Hilfe von Rasterkraft- und Transmissionselektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die ZnChl-Monomere von selbst zu homogenen Zylindern mit einem Durchmesser von

etwa 6 nm assemblieren (SENGUPTA UND WÜRTHNER 2012) und damit vergleichbar sind mit Suprastrukturen, die auch in Chlorosomen gefunden werden. Da die molekulare Zusammensetzung dieser Aggregate wohldefiniert ist und aus lediglich einer Art von Monomeren besteht, ist zu erwarten, dass diese Modellsysteme deutlich homogener sind, als ihre natürlichen Vorbilder. In Kombination mit Einzelmolekül-Experimenten ist es außerdem möglich, tatsächlich einzelne Aggregate zu untersuchen, anstelle lediglich eines Chlorosomes, das stets ein kleines Ensemble von Aggregaten dargestellt.

### 5.1 Experimentelle Ergebnisse

Um die geometrische Anordnung und die elektronische Struktur der Aggregate miteinander zu verknüpfen wurden zunächst polarisationsabhängige Einzelmolekül-Spektren bei 1,2 K gemessen und anschließend mit den Spektren verglichen, die aus den in Kapitel 4.4 beschriebenen Simulationen berechnet wurden. Abbildung 21a zeigt einen Stapel von 160 einzelnen, nacheinander aufgenommenen Fluoreszenz-Anregungsspektren eines Einzelaggregats in einer zweidimensionalen Darstellung. Die horizontale Achse beschreibt die Energie der anregenden Photonen, während auf der vertikalen Achse die Polarisation des Anregungsstrahls aufgetragen ist. Die Intensität der jeweiligen Spektren ist im 2D-Plot farbcodiert dargestellt. Zwischen zwei aufeinanderfolgenden Spektren wurde das Anregungslicht jeweils um  $6,2^\circ$  gedreht. Die polarisationsabhängige Messung offenbart zwei Unterbanden im Spektrum, die beide eine deutliche Modulation der detektierten Fluoreszenzintensität, abhängig von der Polarisation des Anregungslichts, zeigen.

Rechts neben der 2D-Darstellung der Spektren in Abbildung 21a ist die gemessene Fluoreszenzintensität (farbige Punkte) als Funktion der Polarisation aufgetragen, gemessen an der im 2D-Bild entsprechend markierten spektralen Position. Die Modulation der Intensität ist in beiden Fällen vereinbar mit einer  $\cos^2$ -Abhängigkeit (gestrichelte Linien). Integriert man die Spektren unabhängig von ihrer Polarisation, so erhält man die schwarze Kurve in Abbildung 21a unten, die ihr Maximum bei  $13624 \text{ cm}^{-1}$  und eine Halbwertsbreite von  $190 \text{ cm}^{-1}$  hat. Die rote und blaue Kurve im selben Graph sind beispielhaft aufgeführt und gehören zu den Spektren, die mit der entsprechend markierten Polarisation aufgenommen wurden (horizontale Linien im

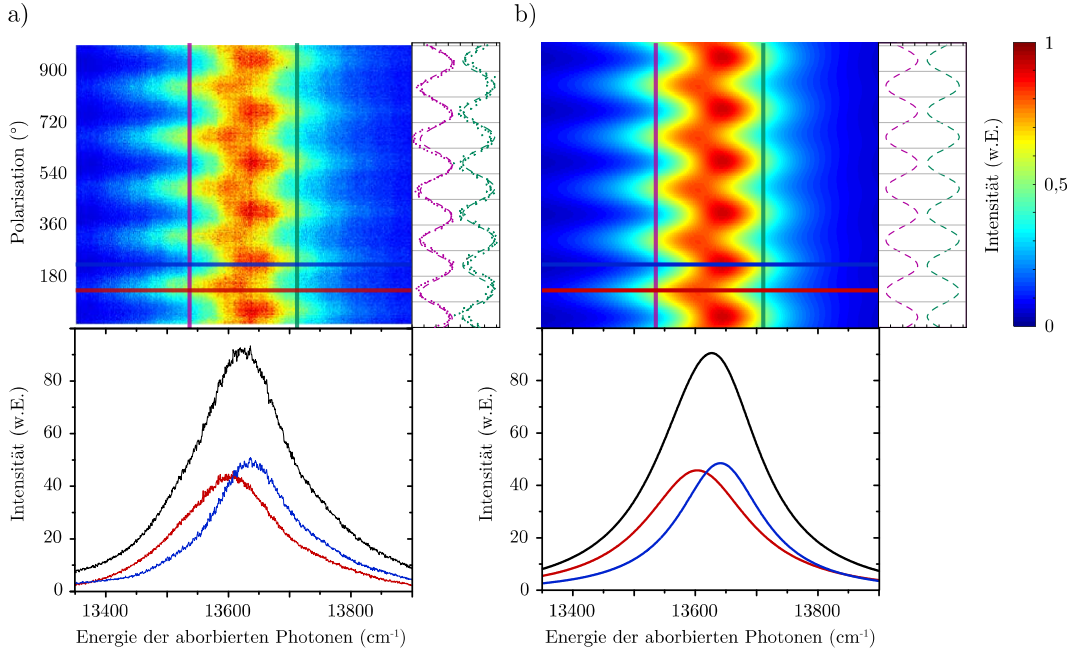


Abbildung 21: a) oben: Stapel von 160 nacheinander aufgenommenen Fluoreszenz-Anregungsspektren (1,2 K) eines einzelnen ZnChl-Aggregats. Zwischen zwei aufeinanderfolgenden Spektren wurde die Polarisation des Anregungslichts um  $6,2^\circ$  gedreht. oben rechts: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Polarisation für Anregungsenergien von  $13540 \text{ cm}^{-1}$  (magenta) bzw.  $13710 \text{ cm}^{-1}$  (grün), markiert durch vertikale Linien in der 2D-Darstellung. unten: Über alle Polarisationen gemittelttes Fluoreszenz-Anregungsspektrum (schwarz) und einzelne Spektren der Polarisation  $130^\circ$  (rot) bzw.  $217^\circ$  (blau), gekennzeichnet durch horizontale Linien im 2D-Plot. b) Globaler Fit des experimentellen Spektrums nach der im Text beschriebenen Vorgehensweise, Aufbau der Abbildung analog zu Teil a).

2D-Bild). Das Maximum dieser beiden Kurven liegt bei  $13604 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $13641 \text{ cm}^{-1}$  mit Halbwertsbreiten von  $204 \text{ cm}^{-1}$  und  $168 \text{ cm}^{-1}$ . Um die aufgenommenen Spektren quantitativ auszuwerten wurden die Daten mit einer Lorentz-förmigen Funktion global gefittet:

$$F(E, \Theta) = B + \sum_{i=1}^N A_i(E) \cdot \cos^2(\Theta - \varphi_i) \cdot \frac{W_i}{4 \cdot (E - E_i)^2 + W_i^2} \quad (15)$$

B beschreibt den Untergrund und ist für die gesamte Messung konstant,  $i$  zählt die spektralen Komponenten des Aggregats, die Größe  $A_i$  beschreibt die Amplitude der Komponente  $i$  und  $E$  und  $\Theta$  repräsentieren die Energie bzw. den Polarisationswinkel des einfallenden Lichts.  $\varphi_i$  ist in Gleichung (15) der Winkel zwischen der Projektion

des Übergangsdipolmoments der Komponente  $i$  in die Probenebene mit dem Laborsystem – die Angabe von  $\varphi_i$  wird also erst relativ zu  $\varphi_j$  zu einer physikalisch relevanten Größe. Die Winkeldifferenz berechnet sich dabei zu  $\Delta\Phi = |\varphi_i - \varphi_j|$ , falls das Ergebnis kleiner ist als  $90^\circ$  und ansonsten zu  $\Delta\Phi = |180^\circ - |\varphi_i - \varphi_j||$ . Die Lorentz-Kurve des Fits wird charakterisiert durch ihre spektrale Position  $E_i$  und ihre Halbwertsbreite  $W_i$ . Die Analyse wurde auf  $N=2$  beschränkt, da sich gezeigt hat, dass zwei spektrale Komponenten ausreichen um die Eigenschaften der experimentellen Daten hinreichend zu reproduzieren. Im Folgenden werden die beiden Banden als niederenergetische ( $i=1$ ) bzw. höherenergetische ( $i=2$ ) Bande bezeichnet. Das Ergebnis dieses globalen Fits für das in Abbildung 21a gezeigte Beispiel ist in Abbildung 21b dargestellt. Für die niederenergetische Bande (rote Kurve) liefert der Fit  $E_1 = 13602 \text{ cm}^{-1}$  mit einer Linienbreite von  $W_1 = 210 \text{ cm}^{-1}$  und für die höherenergetische Bande  $E_2 = 13646 \text{ cm}^{-1}$  und  $W_2 = 162 \text{ cm}^{-1}$ . Die relative Phasendifferenz der Polarisation beträgt bei diesem Komplex  $\Delta\Phi = 89,0^\circ$ .

In Abbildung 22 sind weitere Beispiele von polarisationsaufgelösten Fluoreszenz-Anregungsspektren einzelner Aggregate abgebildet, wobei die Darstellung analog ist zum Aufbau der 2D-Repräsentation in Abbildung 21a oben. Die gezeigten Spektren wurden so ausgewählt, dass sie deutliche Unterschiede erkennen lassen, um die später folgenden Simulationen an möglichst unterschiedlichen Komplexen testen zu können. Trotz der Variation der spektralen Eigenheiten zeigt jede Absorptionsbande der Spektren eine klare  $180^\circ$ -Modulation mit der Polarisation des Anregungslichtes.

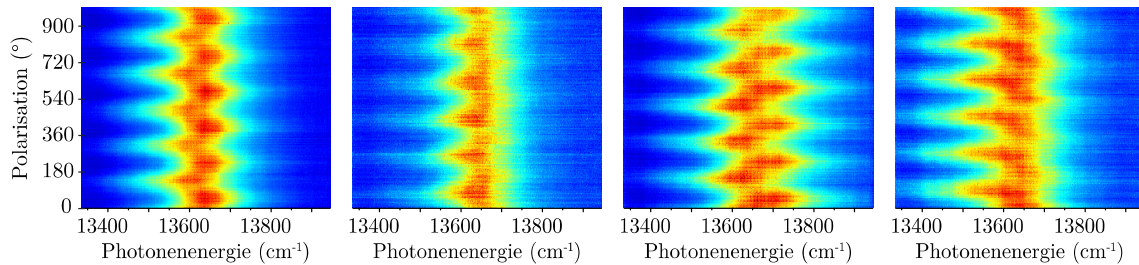


Abbildung 22: Beispiele polarisationsaufgelöster Spektren von vier verschiedenen ZnChl-Aggregaten in 2D-Darstellung (Anregungsintensität:  $25 \text{ W/cm}^2$ ).

Mit der oben beschriebenen, globalen Fitroutine wurden die Spektren von 51 einzelnen ZnChl-Aggregaten analysiert. Die daraus erhaltenen Daten sind in Histogramm-

form in Abbildung 23 aufgeführt: Abbildung 23a zeigt die Verteilung der Position der Absorptionsbanden, gemittelt über alle Polarisationsrichtungen des Anregungslichts (grau) bei  $(13629 \pm 27) \text{ cm}^{-1}$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Die roten und blauen Säulen zeigen die Verteilung der nieder- bzw. höherenergetischen Unterbanden bei  $(13611 \pm 20) \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $(13649 \pm 19) \text{ cm}^{-1}$ . Für jeden Komplex wurde die spektrale Verschiebung  $\Delta E_{12}$  zwischen diesen Banden berechnet, die bei  $(39 \pm 15) \text{ cm}^{-1}$  liegt (Abbildung 23b).

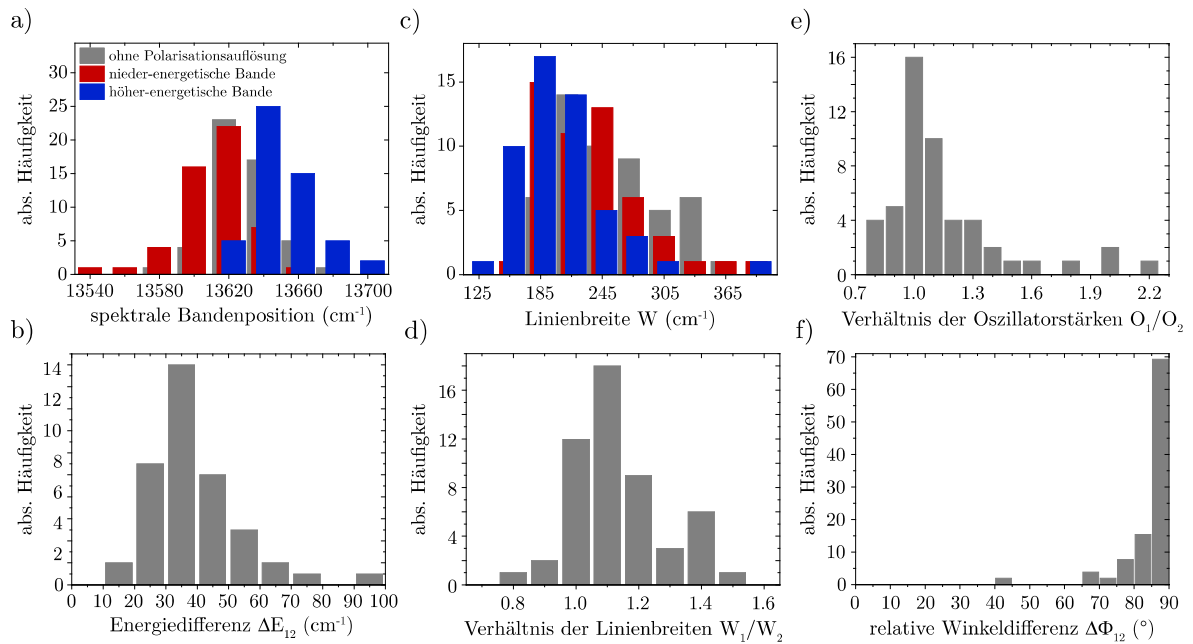


Abbildung 23: Statistische Verteilung der spektralen Parameter für 51 einzelne ZnChl-Aggregate; a) Verteilung der spektralen Position des über alle Polarisierungen gemittelten Spektrums (grau) und der beiden Unterbanden (rot, blau); b) Verteilung der Energieaufspaltung  $\Delta E_{12}$  zwischen den beiden Unterbanden; c) Verteilung der Halbwertsbreiten der polarisationsgemittelten (grau) und -aufgelösten (rot, blau) Spektren; d) Verteilung des Verhältnisses der Halbwertsbreiten  $W_1/W_2$  jedes einzelnen Aggregats; e) Verteilung des Verhältnisses der Oszillatorstärken  $O_1/O_2$  der beiden Unterbanden für jedes ZnChl-Aggregat (ein Datenpunkt bei 5,15 wurde zu Darstellungszwecken weggelassen); f) Verteilung der relativen Phasendifferenz  $\Delta\Phi$  der beiden Unterbanden.

Die Verteilung der Halbwertsbreiten ist in Abbildung 23c dargestellt und identisch zu Abbildung 23a aufgebaut: Die mittlere Breite der polarisationsunabhängigen Spektren beträgt  $(240 \pm 110) \text{ cm}^{-1}$ , während die beiden Unterbanden eine Breite von  $(231 \pm 48) \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $(207 \pm 46) \text{ cm}^{-1}$  aufweisen. Der kleine Unterschied der Linienbreiten von nieder- und höherenergetischer Bande wird deutlicher bei der Betrachtung

des Verhältnisses  $W_1/W_2$  für jedes Aggregat einzeln (Abbildung 23d): Die Verteilung liegt bei einem Mittelwert von 1,13 (Standardabweichung 0,15), das heißt, die niedereenergetischen Absorptionsbanden sind durchschnittlich 10-15 % breiter als die zugehörigen höherenergetischen Banden. Neben der spektralen Position und der Linienbreite lässt sich aus dem Fit auch das Verhältnis der Oszillatorenstärken  $O_1/O_2$  ableiten, das bei  $1,2 \pm 0,7$  liegt (Abbildung 23e). Weiterhin lässt sich – wie oben beschrieben – die Winkeldifferenz  $\Delta\Phi$  zwischen den beiden Banden berechnen (Abbildung 23f). Die Verteilung dieser Größe zeigt eine deutliche Häufung bei  $90^\circ$ , das heißt die optischen Übergänge, die verantwortlich sind für die beiden Unterbanden des Spektrums sind im Aggregat senkrecht zueinander polarisiert. Diese Beobachtung ist ein starker Indikator für die Anordnung der ZnChl-Monomere auf einer zylindrischen Struktur, die auch in zuvor durchgeführten Rasterkraft- und Transmissionselektronenmikroskopexperimenten detektiert wurde (SENGUPTA ET AL. 2012; SENGUPTA UND WÜRTHNER 2013).

Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Histogrammen in Abbildung 23 sind der Übersichtlichkeit halber nochmals in Tabelle 1 zusammengefasst:

*Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen der in Abbildung 23 gezeigten Histogramme.*

i	1	2
$E_i$ (cm <sup>-1</sup> )	$13611 \pm 20$	$13649 \pm 19$
$W_i$ (cm <sup>-1</sup> )	$231 \pm 48$	$207 \pm 46$
$\Delta E_{12}$ (cm <sup>-1</sup> )	$39 \pm 15$	
$\Delta\Phi_{12}$ (°)	$84 \pm 8$	
$O_1/O_2$	$1,23 \pm 0,63$	
$W_1/W_2$	$1,13 \pm 0,15$	

Aus dem experimentell gewonnenen Verhältnis der Oszillatorenstärken lässt sich – unter Annahme zylinderförmiger Aggregate – der Winkel  $\beta$ , der von den Übergangsdipolmomenten mit der Zylinderachse gebildet wird, berechnen (vgl. Kapitel 3.2).



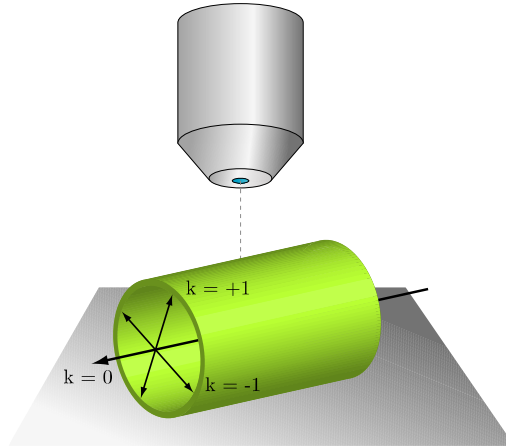


Abbildung 24: Skizze zur Veranschaulichung der Lage der zylinderförmigen Aggregate (grün) auf der Probenoberfläche und der exzitonischen Zustände im Zylinder, relativ zum Objektiv und der optischen Achse (grau gestrichelte Linie).

Dabei ist zu beachten, dass die ZnChl-Aggregate im Experiment mit ihrer Längsachse parallel zur Probenoberfläche liegen, die senkrecht zum Anregungs- und Detektionsstrahlengang ausgerichtet ist (vgl. Abbildung 24). Diese räumliche Orientierung führt dazu, dass von den entarteten Zuständen  $k_n = \pm 1$  nur die Hälfte einen Beitrag zum gemessenen Spektrum liefert, da Licht, das parallel zur optischen Achse emittiert wird, nicht mit Objektiven mit numerischer Apertur  $< 1$  detektiert werden kann (KANG ET AL. 2010). Aus diesem Grund gilt für die gemessene Oszillatorenstärke der höher-energetischen Bande

$$O_2 = \frac{1}{2} (|\vec{u}_{+1}| + |\vec{u}_{-1}|) = 1 \cdot |\vec{u}_{\pm 1}|, \quad (16)$$

womit sich nach Gleichung (12) der Winkel  $\beta$  gemäß

$$\tan \beta = \sqrt{\frac{2 \cdot O_2}{O_1}} \quad (17)$$

aus den experimentellen Daten berechnen lässt. Die mit dieser Gleichung (17) aus der Verteilung in Abbildung 23f errechneten Winkel  $\beta$  sind in Abbildung 25 dargestellt. Für diese Winkel zwischen Zylinderachse und Übergangsdipolmoment ergeben sich Werte im Bereich von  $31,9^\circ$  bis  $58,3^\circ$  mit einem Mittelwert von  $(52,8 \pm 4,3)^\circ$ .



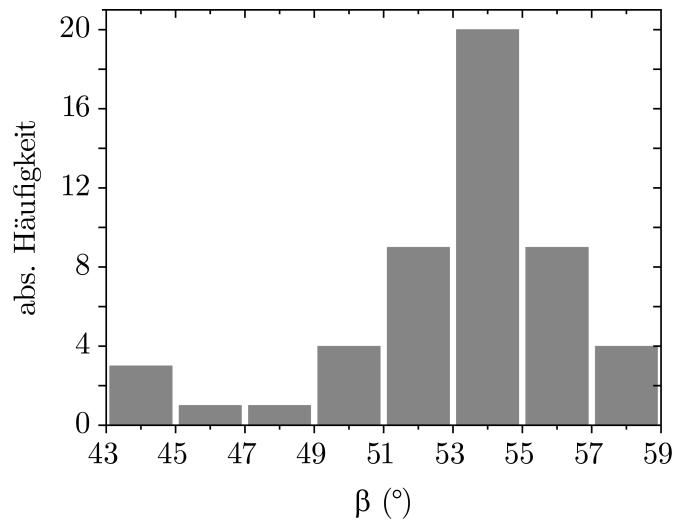


Abbildung 25: Verteilung des Winkels  $\beta$ , der den Winkel der Übergangsdipolmomente der Monomere mit der Symmetrieachse des Zylinders beschreibt (ein Datenpunkt bei  $32^\circ$  wurde zu Darstellungszwecken weggelassen, analog zu Abbildung 23e).

## 5.2 Diskussion

Die hier untersuchten synthetischen ZnChl-Aggregate können, wie oben beschrieben, als Modellsysteme für natürliche Chlorosome dienen. Daher werden im Folgenden die in 5.1 gewonnenen Daten mit den entsprechenden Werten der Chlorosome verglichen. Die Verteilung der spektralen Position der Absorptionsbande der ZnChl-Aggregate ist mit  $27\text{ cm}^{-1}$  deutlich geringer als die  $59\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $97\text{ cm}^{-1}$  die für natürliche Chlorosome des wildtypischen Bakteriums *Cba. tepidum* gemessen wurden (JENDRNY ET AL. 2014 bzw. **P3**). Die zugehörigen Halbwertslinienbreiten der polarisationsgemittelten Absorptionsspektren betragen  $240\text{ cm}^{-1}$  im Vergleich zu  $817\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $783\text{ cm}^{-1}$  beim natürlichen Chlorosom. Dies deutet, wie erwartet, auf eine wesentlich größere Heterogenität der natürlichen Proben hin: Während die ZnChl-Strukturen aus identischen, durch chemische Reaktionen kontrollierten Bausteinen bestehen, sind die Chlorosome aus unterschiedlichen BChl-Molekülen aufgebaut und daher wesentlich regelloser im Aggregat angeordnet (GANAPATHY ET AL. 2009a). Die Vermutung, dass ein Teil der Heterogenität der Spektren verursacht wird durch die Heterogenität der Bausteine wird gestützt durch Experimente an genetisch veränderten Chlorosomen, bei denen die Variabilität der Seitengruppen eingeschränkt ist (vgl. Kapitel 2.2.3.5). Bei Chlorosomen des *bchR*-Mutanten beträgt die Standardabweichung der Verteilung der

spektralen Position  $33\text{ cm}^{-1}$  und die Halbwertsbreite dieser Bande beträgt im Mittel  $437\text{ cm}^{-1}$  (GÜNTHER ET AL. 2016). Beide Werte liegen zwischen den recht heterogen angenommenen Wildtyp-Chlorosomen und den sehr homogenen künstlichen ZnChl-Aggregaten. Diese Tendenz lässt sich mit den in **P3** durchgeführten Messungen weiter verifizieren. Hier wurde dasselbe Mess- und Auswerteverfahren an wildtypischen Chlorosomen und an Chlorosomen des *bchQR*-Mutanten angewandt, wie an den in (GÜNTHER ET AL. 2016) beschriebenen *bchR*-Mutanten und den hier aufgeführten künstlichen Chlorosomen.

Die Heterogenität der Chlorosom-Spektren wird neben der Variabilität der Bausteine weiter erhöht durch die Anordnung mehrerer zylindrischer Strukturen ineinander, sodass jedes Spektrum auch bei guter räumlicher Trennung der Chlorosome in der Probe stets ein kleines Subensemble an Strukturen abbildet. Diese Mittlung wird bei den Experimenten an ZnChl-Aggregaten umgangen, sodass Eigenheiten der Spektren detektiert werden, die weder bei Messungen an Chlorosomen wildtypischer oder mutierter Bakterien aufgelöst werden können: Für nahezu alle Aggregate ist die niederenergetische Absorptionsbande breiter als die bei höheren Energien gelegene. Dies kann nicht mit einem zusätzlichen Relaxationsprozess des energetisch höheren Zustands erklärt werden (wie z.B. ein Zerfall zum niederenergetischen Zustand), da dies eine genau umgekehrte Verteilung der Breiten zur Folge hätte. Diese Beobachtung ist daher ein Indikator dafür, dass die Absorptionsbanden – trotz der hohen Probenhomogenität – noch immer inhomogen verbreitert sind.

### 5.3 Simulationen

Im Folgenden soll versucht werden, die oben gezeigten, polarisationsaufgelösten Fluoreszenz-Anregungsspektren und deren Variationen mit einem einzigen Frenkel-Exzitonen-Modell zu erklären, indem kleine Unterschiede in der molekularen Anordnung der Zink-Chlorine zugelassen werden. Die konkret in diesem Kapitel gezeigten Simulationen wurden von TENZIN KUNSEL (Universität Groningen) durchgeführt, der nach Vorab-Simulationen durch mich eine verbesserte Anpassung der Parameter vorgenommen hat. Das von TENZIN KUNSEL entwickelte Modell spiegelt die gemessenen Spektren sehr gut wieder. Mit Hilfe von molekular-dynamischen Simulationen konnte von

MERLE RÖHR (Universität Würzburg) jedoch gezeigt werden, dass der für das Modell gewählte Radius auf Grund sterischer Hinderung gegebenenfalls zu klein gewählt wurde. In der Folge muss nun von den beiden Gruppen iterativ ein Modell entwickelt werden, das die gemessenen spektralen Eigenschaften, die simulierten Spektren und die Anordnung der Moleküle unter Berücksichtigung ihrer räumlichen Ausdehnung abbildet. Da der Zeithorizont bis zur Fertigstellung des Modells nicht absehbar ist, der experimentelle Teil aber abgeschlossen ist, sind die bisherigen Ergebnisse in diesem Teil der Arbeit zusammengefasst.

Für das in diesem Kapitel gezeigte, vorläufige Modell soll (wie oben beschrieben) Intraaggregats-Inhomogenität außer Acht gelassen werden und Variationen nur zwischen den verschiedenen Aggregaten erlaubt sein. Wie in 3.2 beschrieben, erwartet man für das Spektrum eines solchen Modells zwei Absorptionsbanden, die senkrecht zueinander polarisiert sind. Mit der in Kapitel 4.4 beschriebenen Vorgehensweise lassen sich die gemessenen Spektren reproduzieren, indem die Strukturparameter  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  für jeden Komplex so verändert werden, dass die simulierten Spektren bestmöglich mit der Messung übereinstimmen, während alle weiteren Parameter unverändert bleiben (vgl. Tabelle 2). Für die Verbreiterung der aus der Simulation erhaltenen Stick-Spektren werden die aus dem Experiment gewonnenen Linienbreiten verwendet, um Simulation und Messung vergleichbar darzustellen, da die Linienbreite mit dem beschriebenen homogenen Modell nicht aus der Simulation gewonnen werden kann.

*Tabelle 2: Zusammenfassung der fixen Parameter für die Simulation der homogenen Aggregate.*

Parameter	Wert	Quelle
$\omega_0$	15432 cm <sup>-1</sup>	Huber et al. 2008
$\mu$	4 Debye	Patwardhan et al. 2010
$r$	1,7 nm	Sengupta et al. 2012
$h$	0,35 nm	Sengupta et al. 2012
$N_2$	20	Sengupta et al. 2012
$N_1$	1000	

Für eine bestmögliche Reproduktion der experimentellen Spektren werden die drei freien Parameter  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  folgendermaßen variiert: Der Winkel  $\beta$  kann nach Gleichung (17) direkt aus dem Experiment gewonnen und zur Nachbildung des Spektrums eingesetzt werden. Der Parameter  $\alpha$  beeinflusst vor allem die Energieseparation  $\Delta E$  der beiden Banden, die ebenfalls aus dem Experiment bestimmt werden kann. Hier ist eine iterative Anpassung des Parameters nötig, um die Stärke der Aufspaltung in der Simulation abzubilden. Ebenso wird der Winkel  $\gamma$  nach und nach angepasst, der verantwortlich ist für die mittlere Energie der Absorptionsbanden.

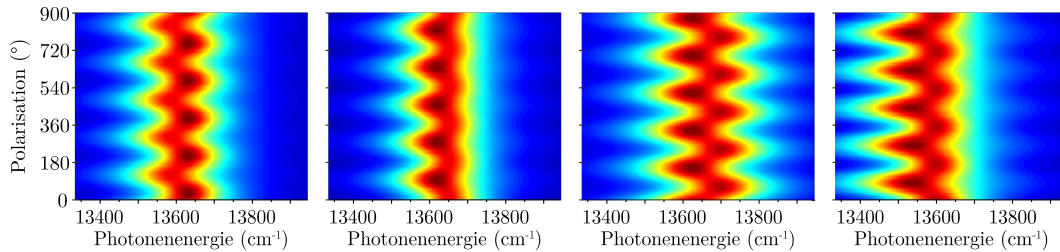


Abbildung 26: Simulierte, polarisationsaufgelöste Fluoreszenz-Anregungsspektren der in Abbildung 22 gezeigten Komplexe.

Abbildung 26 zeigt die bestmöglichen Simulationsergebnisse für die in Abbildung 22 dargestellten Messungen, wobei für den jeweiligen Komplex die in Tabelle 3 aufgeführten Strukturparameter  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  verwendet wurden.

Tabelle 3: Zusammenfassung der variablen Parameter für die in Abbildung 26 gezeigten vier Beispiel-Komplexe.

Komplex	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)	$\gamma$ (°)
1	42,5	53,7	4,2
2	43,3	52,8	3,8
3	42,7	48,6	0,4
4	43,7	50,7	1,7

Neben der offensichtlichen Übereinstimmung der simulierten Spektren mit den Messungen, lassen sich die spektralen Eigenschaften, wie die Energieaufspaltung  $\Delta E$  oder das Verhältnis der Oszillatorenstärken, auch numerisch vergleichen (Tabelle 4).

Die Ergebnisse in Tabelle 4 bestätigen die bereits vermutete gute Übereinstimmung der Simulationen mit den gemessenen Spektren: Die Energieaufspaltung zwischen den

Tabelle 4: Zusammenfassung der spektralen Parameter  $\Delta E$  und  $O_1/O_2$  aus experimentellen und simulierten Daten für die vier Beispielaggregate.

Komplex	Experiment		Simulation	
	$\Delta E$ (cm <sup>-1</sup> )	$O_1/O_2$	$\Delta E$ (cm <sup>-1</sup> )	$O_1/O_2$
1	72	0,97	73	1,08
2	46	1,14	45	1,14
3	60	1,53	63	1,51
4	33	1,33	32	1,33

beiden Banden stimmt im Rahmen weniger Wellenzahlen hervorragend überein. Ebenso reproduzieren die Simulationen das gemessene Verhältnis der Oszillatorenstärken für die Komplexe 2 – 4 ausgezeichnet, lediglich für Komplex 1 findet sich eine geringe Abweichung dieses Wertes.

Die Simulationen verdeutlichen, dass sich auch deutlich unterschiedliche Spektren mit einem einzigen Modell erklären lassen, wenn einzelne Strukturparameter in geringem Rahmen verändert werden. So bewirkt bereits die Verdrehung der Dipole zur Zylindertangente um 1-2° eine Verdopplung der Energieaufspaltung zwischen den beiden Absorptionsbanden. Ebenso verändert die Variation des Winkels der Dipole zur Zylinderachse um  $\pm 2^\circ$  das Verhältnis der Oszillatorenstärken um bis zu 50 % (vgl. Tabelle 3 und Tabelle 4). Diese minimalen Variationen der Chromophor-Orientierung erscheinen, bedingt durch die relativ weiche, nicht-kristalline Struktur der semi-natürlichen Aggregate, durchaus vertretbar. In den natürlichen Chlorosomen der Grünen Schwefelbakterien ist auf Grund der Seitengruppen-Heterogenität der Chromophore eine deutlich größere Variabilität anzunehmen. Dies macht sich in der Breite der jeweiligen Absorptionsbanden und der Verteilungen der weiteren spektralen Parameter bemerkbar. Eine ähnlich detaillierte Analyse der Unordnung im Komplex durch Simulationen wird hierdurch erschwert. Daher ist es wichtig, zunächst an einem Modellsystem die Exzitonen-Struktur und Auswirkung von Unordnung in einem zylinderförmigen Aggregat zu verstehen, um diese Erkenntnisse auf die natürlichen Aggregate zu übertragen und so künftig ein besseres Bild der Chlorosome zu erlangen.

Anzumerken zu diesen Simulationen ist, dass die Annahmen für Radius und Zahl der ZnChl-Moleküle pro Ring aus der selben Quelle (SENGUPTA ET AL. 2012) abgeschätzt wurde. Kürzlich von MERLE RÖHR durchgeführte Molekulardynamik-Simulationen lassen aber vermuten, dass die von TENZIN KUNSEL und mir an Hand dieser Publikation gewählte Kombination auf Grund der sterischen Hinderung der Seitengruppen nicht zu stabilen Aggregaten führen würde. Daher muss das Modell hinsichtlich dieser beiden Parameter überarbeitet werden. Die prinzipielle Aussage der Simulation, verschiedene Spektren mit einem gemeinsamen Modell mit geringer Interaggregats-Inhomogenität zu erklären, ist unserer Einschätzung nach davon aber nicht betroffen.



## Anhang: Überblick spektraler Eigenschaften von Chlorosomen

Tabelle 5: Zusammenfassung der experimentell gewonnenen, spektralen Eigenschaften der einzelnen Absorptionsbanden natürlicher, genetisch veränderter und künstlicher Chlorosome; Daten des *bchR*-Mutanten aus GÜNTHER ET AL. 2016.

	i/ij	WT	<i>bchR</i>	<i>bchQR</i>	ZnChl
Peak-Position <sub>i</sub>	1	13170 ± 56	13468 ± 26	13452 ± 18	13611 ± 20
	2	13274 ± 59	13502 ± 41	13471 ± 21	13649 ± 19
	3	13517 ± 80	13685 ± 39	13656 ± 40	
	4	13649 ± 91	13747 ± 57	13695 ± 45	
FWHM <sub>i</sub>	1	310 ± 86	233 ± 35	198 ± 25	231 ± 48
	2	432 ± 76	270 ± 41	230 ± 28	207 ± 46
	3	685 ± 109	495 ± 66	404 ± 31	
	4	701 ± 98	501 ± 63	408 ± 27	
$\Delta E_{ij}$	12	71 ± 66	34 ± 31	19 ± 13	39 ± 15
	34	101 ± 107	62 ± 53	38 ± 32	
$O_i/O_j$	12	1,04 ± 0,95	0,95 ± 0,35	0,95 ± 0,34	1,23 ± 0,63
	34	1,42 ± 0,77	1,24 ± 0,30	1,13 ± 0,13	





---

## Literaturverzeichnis

- AGRANOVICH, V. M.; GALANIN, M. D. (1982): Electronic excitation energy transfer in condensed matter. Amsterdam: North-Holland Publ. Co (Modern problems in condensed matter sciences, 3).
- ARNOLD, W.; MEEK, E. S. (1956): The polarization of fluorescence and energy transfer in grana. In: *Arch. Biochem. Biophys.* **60** (1), S. 82–90.
- BAIER, J.; GABRIELSEN, M.; OELLERICH, S.; MICHEL, H.; VAN HEEL, M.; COGDELL, R. J.; KÖHLER, J. (2009): Spectral Diffusion and Electron-Phonon Coupling of the B800 BChl *a* Molecules in LH2 Complexes from Three Different Species of Purple Bacteria. In: *Biophys. J.* **97** (9), S. 2604–2612.
- BALABAN, S.; TAMIAKI, H.; HOLZWARTH, A. R. (2005): Chlorins Programmed for Self-Assembly. In: WÜRTHNER, F. (Hg.): *Supermolecular Dye Chemistry* (Topics in Current Chemistry, 258). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, S. 1–38.
- BARNES, C. R. (1893): On the Food of Green Plants. In: *Bot. Gaz.* **18** (11), S. 403–411.
- BEATTY, J. T.; OVERMANN, J.; LINCE, M. T.; MANSKE, A. K.; LANG, A. S.; BLANKENSHIP, R. E.; VAN DOVER, C. L.; MARTINSON, T. A.; PLUMLEY, F. G. (2005): An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (26), S. 9306–9310.
- BEN-SHEM, A.; FROLOW, F.; NELSON, N. (2004): Evolution of photosystem I – from symmetry through pseudosymmetry to asymmetry. In: *FEBS Lett.* **564** (3), S. 274–280.
- BERNER, R. A. (2003): The long-term carbon cycle, fossil fuels and atmospheric composition. In: *Nature* **426** (6964), S. 323–326.
- BEYER, S. R.; MÜLLER, L.; SOUTHALL, J.; COGDELL, R. J.; ULLMANN, G. M.; KÖHLER, J. (2015): The open, the closed, and the empty: time-resolved fluorescence spectroscopy and computational analysis of RC-LH1 complexes from *Rhodospseudomonas palustris*. In: *J. Phys. Chem. B* **119** (4), S. 1362–1373.

- BÍNA, D.; GARDIAN, Z.; VACHA, F.; LITVIN, R. (2016): Native FMO-reaction center super-complex in green sulfur bacteria: an electron microscopy study. In: *Photosynth. Res.* **128** (1), S. 93–102.
- BLANKENSHIP, R. E. (2008): *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Oxford: Blackwell Science.
- BP EUROPA (2017): BP Energy Outlook 2017 edition. Hamburg. Online verfügbar unter <https://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/energy-outlook-2017/bp-energy-outlook-2017.pdf>, zuletzt geprüft am 29.03.2018.
- BROTOSUDARMO, T. H. P.; KUNZ, R.; BÖHM, P.; GARDINER, A. T.; MOULISOVA, V.; COGDELL, R. J.; KÖHLER, J. (2009): Single-molecule spectroscopy reveals that individual low-light LH2 complexes from *Rhodospseudomonas palustris* 2.1.6. have a heterogeneous polypeptide composition. In: *Biophys. J.* **97** (5), S. 1491–1500.
- BRYANT, D. A.; CANNIFFE, D. P. (2017): How nature designs light-harvesting antenna systems. Design principles and functional realization in chlorophototrophic prokaryotes. In: *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* **51** (3).
- BRYANT, D. A.; VASSILIEVA, E. V.; FRIGAARD, N.-U.; LI, H. (2002): Selective Protein Extraction from *Chlorobium tepidum* Chlorosomes Using Detergents. Evidence That *CsmA* Forms Multimers and Binds Bacteriochlorophyll *a*. In: *Biochemistry* **41** (48), S. 14403–14411.
- BUNDESNETZAGENTUR (2018): Realisierte Stromerzeugung. Online verfügbar unter <https://www.smard.de/blueprint/servlet/page/home/marktdaten/78>, zuletzt geprüft am 08.03.2018.
- BÜTTNER, M.; XIE, D.-L.; NELSON, H.; PINTHER, W.; HAUSKA, G.; NELSON, N. (1992): The Photosystem I-like P840-reaction center of Green S-bacteria is a homodimer. In: *BBA-Bioenergetics* **1101** (2), S. 154–156.
- CAREY, A.-M.; HACKING, K.; PICKEN, N.; HONKANEN, S.; KELLY, S.; NIEDZWIEDZKI, D. M.; BLANKENSHIP, R. E.; SHIMIZU, Y.; WANG-OTOMO, Z.-Y.; COGDELL, R. J. (2014): Characterisation of the LH2 spectral variants produced by the photosynthetic purple sulphur bacterium *Allochromatium vinosum*. In: *Biochim. Biophys. Acta* **1837** (11), S. 1849–1860.

- 
- CAUSGROVE, T. P.; BRUNE, D. C.; BLANKENSHIP, R. E. (1992): Förster energy transfer in chlorosomes of green photosynthetic bacteria. In: *J. Photochem. Photobio. B* **15** (1-2), S. 171–179.
- CHEW, A. G. M.; BRYANT, D. A. (2007): Chlorophyll biosynthesis in bacteria: the origins of structural and functional diversity. In: *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, S. 113–129.
- CHEW, A. G. M.; FRIGAARD, N.-U.; BRYANT, D. A. (2007): Bacteriochlorophyllide c C-8<sup>2</sup> and C-12<sup>1</sup> Methyltransferases Are Essential for Adaptation to Low Light in *Chlorobaculum tepidum*. In: *J. Bacteriol.* **189** (17), S. 6176–6184.
- COGDELL, R. J.; GALL, A.; KÖHLER, J. (2006): The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes. In: *Q. Rev. Biophys.* **39** (3), S. 227–324.
- DAVYDOV, A. S. (1971): Theory of Molecular Excitons. New York: Plenum Press.
- DEISENHOFER, J.; EPP, O.; MIKI, K.; HUBER, R.; MICHEL, H. (1985): Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. In: *Nature* **318** (6047), S. 618–624.
- DIDRAGA, C.; KLUGKIST, J. A.; KNOESTER, J. (2002): Optical Properties of Helical Cylindrical Molecular Aggregates. The Homogeneous Limit. In: *J. Phys. Chem. B* **106** (44), S. 11474–11486.
- DIDRAGA, C.; KNOESTER, J. (2002): Exchange narrowing in circular and cylindrical molecular aggregates. Degenerate versus nondegenerate states. In: *Chem. Phys.* **275** (1-3), S. 307–318.
- DOSTÁL, J.; PŠENČÍK, J.; ZIGMANTAS, D. (2016): In situ mapping of the energy flow through the entire photosynthetic apparatus. In: *Nat. Chem.* **8** (7), S. 705–710.
- DREWS, G. (2015): Bakterien - ihre Entdeckung und Bedeutung für Natur und Mensch. 2. Aufl. Berlin: Springer Spektrum.
- DUYSENS, L. N. M. (1952): Transfer of Excitation Energy in Photosynthesis. Dissertation. Utrecht University.
- EMERSON, R.; ARNOLD, W. (1932): A Separation of the Reactions in Photosynthesis by Means of Intermittent Light. In: *J. Gen. Physiol.* **15** (4), S. 391–420.

- FENNA, R. E.; MATTHEWS, B. W. (1975): Chlorophyll arrangement in a bacteriochlorophyll protein from *Chlorobium limicola*. In: *Nature* **258** (5536), S. 573–577.
- FIDDER, H.; KNOESTER, J.; WIERSMA, D. A. (1991): Optical properties of disordered molecular aggregates. A numerical study. In: *J. Chem. Phys.* **95** (11), S. 7880–7890.
- FRANK, H.; POLÍVKA, T. (2009): Energy Transfer from Carotenoids to Bacteriochlorophylls. In: HUNTER, C. NEIL, DALDAL, F., THURNAUER, M. C. UND BEATTY, J. THOMAS (Hg.): *The Purple Phototrophic Bacteria*. Dordrecht: Springer, S. 213–230.
- FRAUNHOFER INSTITUTE FOR SOLAR ENERGY (2017): Photovoltaics Report. Freiburg. Online verfügbar unter [www.ise.fraunhofer.de/content/dam/ise/de/documents/publications/studies/Photovoltaics-Report.pdf](http://www.ise.fraunhofer.de/content/dam/ise/de/documents/publications/studies/Photovoltaics-Report.pdf), zuletzt geprüft am 29.03.2018.
- FREIBERG, A.; PAJUSALU, M.; RÄTSEP, M. (2013): Excitons in intact cells of photosynthetic bacteria. In: *J. Phys. Chem. B* **117** (38), S. 11007–11014.
- FRIGAARD, N.-U.; BRYANT, D. A. (2006): Chlorosomes: Antenna Organelles in Photosynthetic Green Bacteria. In: SHIVELY, J. M. (Hg.): *Complex Intracellular Structures in Prokaryotes (Microbiology Monographs)*, Bd. 2. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 79–114.
- FRIGAARD, N.-U.; LARSEN, K. L.; COX, R. P. (1996): Spectrochromatography of photosynthetic pigments as a fingerprinting technique for microbial phototrophs. In: *FEMS Microbiol. Ecol.* **20** (2), S. 69–77.
- GABRIELSEN, M.; GARDINER, A. T.; COGDELL, R. J. (2009): Peripheral Complexes of Purple Bacteria. In: HUNTER, C. NEIL, DALDAL, F., THURNAUER, M. C. UND BEATTY, J. THOMAS (Hg.): *The Purple Phototrophic Bacteria*. Dordrecht: Springer, S. 135–153.
- GALL, A.; GARDINER, A. T.; COGDELL, R. J.; ROBERT, B. (2006): Carotenoid stoichiometry in the LH2 crystal. No spectral evidence for the presence of the second molecule in the alpha/beta-apoprotein dimer. In: *FEBS Lett.* **580** (16), S. 3841–3844.
- GANAPATHY, S.; OOSTERGETEL, G. T.; WAWRZYNIAK, P. K.; REUS, M.; CHEW, A. G. M.; BUDA, F.; BOEKEMA, E. J.; BRYANT, D. A.; HOLZWARTH, A. R.; DE GROOT, H. J. M. (2009a): Alternating syn-anti bacteriochlorophylls form concentric helical nanotubes in chlorosomes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** (21), S. 8525–8530.
- GANAPATHY, S.; SENGUPTA, S.; WAWRZYNIAK, P. K.; HUBER, V.; BUDA, F.; BAUMEISTER, U.; WÜRTHNER, F.; DE GROOT, H. J. M. (2009b): Zinc chlorins for artificial light-har-

- 
- vesting self-assemble into antiparallel stacks forming a microcrystalline solid-state material. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** (28), S. 11472–11477.
- GEST, H. (2002): History of the word photosynthesis and evolution of its definition. In: *Photosynth. Res.* **73** (1-3), S. 7–10.
- GOTTSCHALK, G. (2015): Welt der Bakterien, Archaeen und Viren. Ein einführendes Lehrbuch der Mikrobiologie. Weinheim: Wiley-VCH.
- GREEN, B. R.; PARSON, W. W. (Hg.) (2003): Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- GREINER, W. (1989): Quantentheorie. Spezielle Kapitel. 3. Aufl. Thun: Harri Deutsch (Theoretische Physik, 4 A).
- GÜNTHER, L. M.; JENDRNY, M.; BLOEMSMA, E. A.; TANK, M.; OOSTERGETEL, G. T.; BRYANT, D. A.; KNOESTER, J.; KÖHLER, J. (2016): Structure of Light-Harvesting Aggregates in Individual Chlorosomes. In: *J. Phys. Chem. B*.
- HARTIGAN, N.; THARIA, H. A.; SWEENEY, F.; LAWLESS, A. M.; PAPIZ, M. Z. (2002): The 7.5-Å Electron Density and Spectroscopic Properties of a Novel Low-Light B800 LH2 from *Rhodospseudomonas palustris*. In: *Biophys. J.* **82** (2), S. 963–977.
- HARTZLER, D. A.; NIEDZWIEDZKI, D. M.; BRYANT, D. A.; BLANKENSHIP, R. E.; PUSHKAR, Y.; SAVIKHIN, S. (2014): Triplet excited state energies and phosphorescence spectra of (bacterio)chlorophylls. In: *J. Phys. Chem. B* **118** (26), S. 7221–7232.
- HAUSKA, G.; SCHOEDL, T.; REMIGY, H.; TSIOTIS, G. (2001): The reaction center of green sulfur bacteria. In: *BBA-Bioenergetics* **1507** (1-3), S. 260–277.
- HESS, S.; CHACHISVILLIS, M.; TIMPMANN, K.; JONES, M. R.; FOWLER, G. J.; HUNTER, C. N.; SUNDSTRÖM, V. (1995): Temporally and spectrally resolved subpicosecond energy transfer within the peripheral antenna complex (LH2) and from LH2 to the core antenna complex in photosynthetic purple bacteria. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (26), S. 12333–12337.
- HESS, S.; FELDCHTEIN, F.; BABIN, A.; NURGALEEV, I.; PULLERITS, T.; SERGEEV, A.; SUNDSTRÖM, V. (1993): Femtosecond energy transfer within the LH2 peripheral antenna of the photosynthetic purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospseudomonas palustris* LL. In: *Chem. Phys. Lett.* **216** (3-6), S. 247–257.

- HOFF, A. J.; DEISENHOFER, J. (1997): Photophysics of photosynthesis. Structure and spectroscopy of reaction centers of purple bacteria. In: *Phys. Rep.* **287** (1-2), S. 1–247.
- HOFMANN, C. (2004): Pigment-pigment interactions and protein dynamics in light-harvesting complexes. A single-molecule study. 1. Aufl. Göttingen: Cuvillier.
- HOFMANN, C.; MICHEL, H.; VAN HEEL, M.; KÖHLER, J. (2005): Multivariate analysis of single-molecule spectra: surpassing spectral diffusion. In: *Phys. Rev. Lett.* **94** (19), S. 195501.
- HOLZWARTH, A. R.; SCHAFFNER, K. (1994): On the structure of bacteriochlorophyll molecular aggregates in the chlorosomes of green bacteria. A molecular modelling study. In: *Photosynth. Res.* **41** (1), S. 225–233.
- HUBER, V.; KATTERLE, M.; LYSETSKA, M.; WÜRTHNER, F. (2005): Reversible self-organization of semisynthetic zinc chlorins into well-defined rod antennae. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44** (20), S. 3147–3151.
- HUBER, V.; LYSETSKA, M.; WÜRTHNER, F. (2007): Self-assembled single- and double-stack pi-aggregates of chlorophyll derivatives on highly ordered pyrolytic graphite. In: *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **3** (6), S. 1007–1014.
- HUBER, V.; SENGUPTA, S.; WÜRTHNER, F. (2008): Structure-property relationships for self-assembled zinc chlorin light-harvesting dye aggregates. In: *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **14** (26), S. 7791–7807.
- IMHOFF, J. F. (1995): Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. In: BLANKENSHIP, R. E., MADIGAN, M. T. UND BAUER, C. E. (Hg.): *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria (Advances in photosynthesis)*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- IMHOFF, J. F. (2001): Transfer of *Rhodopseudomonas acidophila* to the new genus *Rhodoblastus* as *Rhodoblastus acidophilus* gen. nov., comb. nov. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51** (Pt 5), S. 1863–1866.
- IMHOFF, J. F. (2003): Phylogenetic taxonomy of the family *Chlorobiaceae* on the basis of 16S rRNA and fmo (Fenna-Matthews-Olson protein) gene sequences. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53** (Pt 4), S. 941–951.

- 
- IMHOFF, J. F.; PETRI, R.; SÜLING, J. (1998): Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the  $\alpha$ -Proteobacteria. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **48** (3), S. 793–798.
- INGEN-HOUZ, J. (1779): Experiments upon Vegetables. Discovering their great Power of purifying the Common Air in the Sun-shine and of Injuring it in the Shade and at Night. London: P. Elmsly and H. Payne.
- IUPAC (1976): Nomenclature of Corrinoids. In: *Pure Appl. Chem.* **48** (4), S. 495–502.
- IUPAC (1987): Nomenclature of Tetrapyrroles. In: *Pure Appl. Chem.* **59** (6), S. 787–832.
- JENDRNY, M.; AARTSMA, T. J.; KÖHLER, J. (2014): Insights into the excitonic states of individual chlorosomes from *Chlorobaculum tepidum*. In: *Biophys. J.* **106** (9), S. 1921–1927.
- KANG, H.; JIA, B.; GU, M. (2010): Polarization characterization in the focal volume of high numerical aperture objectives. In: *Opt. Express* **18** (10), S. 10813–10821.
- KELL, A.; BLANKENSHIP, R. E.; JANKOWIAK, R. (2016): Effect of Spectral Density Shapes on the Excitonic Structure and Dynamics of the Fenna-Matthews-Olson Trimer from *Chlorobaculum tepidum*. In: *J. Phys. Chem. A* **120** (31), S. 6146–6154.
- KEREÏCHE, S.; BOURINET, L.; KEEGSTRA, W.; ARTENI, A. A.; VERBAVATZ, J.-M.; BOEKEMA, E. J.; ROBERT, B.; GALL, A. (2008): The peripheral light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria have different 'ring' sizes. In: *FEBS Lett.* **582** (25–26), S. 3650–3656.
- KNOESTER, J. (2002): Optical properties of molecular aggregates. In: AGRANOVICH, V. M. UND LA ROCCA, G. C. (Hg.): Organic nanostructures. Science and applications: Nanostrutture organiche : scienza e tecnologia (Proceedings of the International School of Physics "Enrico Fermi", course 149). Amsterdam, Washington, D.C.: IOS Press.
- KOLBER, Z. S.; VAN DOVER, C. L.; NIEDERMAN, R. A.; FALKOWSKI, P. G. (2000): Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean. In: *Nature* **407** (6801), S. 177–179.
- KÖPKE, J.; HU, X.; MUENKE, C.; SCHULTEN, K.; MICHEL, H. (1996): The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800–850) from *Rhodospirillum rubrum*. In: *Structure* **4** (5), S. 581–597.



- KUNZ, R.; TIMPMANN, K.; SOUTHALL, J.; COGDELL, R. J.; FREIBERG, A.; KÖHLER, J. (2013): Fluctuations in the Electron-Phonon Coupling of a Single Chromoprotein. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**.
- LANG, H. P.; HUNTER, C. N. (1994): The relationship between carotenoid biosynthesis and the assembly of the light-harvesting LH2 complex in *Rhodobacter sphaeroides*. In: *Biochem. J.* **298** (1), S. 197–205.
- LI, Y. F.; ZHOU, W.; BLANKENSHIP, R. E.; ALLEN, J. P. (1997): Crystal structure of the bacteriochlorophyll a protein from *Chlorobium tepidum*. In: *J. Mol. Biol.* **271** (3), S. 456–471.
- LINNANTO, J. M.; KORPPI-TOMMOLA, J. E. I. (2013): Exciton Description of Chlorosome to Baseplate Excitation Energy Transfer in Filamentous Anoxygenic Phototrophs and Green Sulfur Bacteria. In: *J. Phys. Chem. B* **117** (38), S. 11144–11161.
- LIU, Z.; BRYANT, D. A. (2012): Bacteriochlorophyll Biosynthesis and Assembly in Green Chlorophototrophic Bacteria: Theme and Variations. In: KADISH, K. M., SMITH, K. M. UND GUILARD, R. (Hg.): Synthetic developments. Part II (Handbook of Porphyrin Science), Bd. 17. Singapore: World Scientific Publishing, S. 107–140.
- LÖHNER, A.; COGDELL, R.; KÖHLER, J. (2018): Contribution of low-temperature single-molecule techniques to structural issues of pigment-protein complexes from photosynthetic purple bacteria. In: *J. R. Soc. Interface* **15** (138).
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BROCK, T. D.; THOMM, M. (2009): Brock Mikrobiologie. 111. Aufl. München: Pearson Studium (bio Biologie).
- MARESCA, J. A.; CHEW, A. G. M.; ROS PONSATI, M.; FRIGAARD, N.-U.; ORMEROD, J. G.; BRYANT, D. A. (2004): The *bchU* Gene of *Chlorobium tepidum* Encodes the C-20 Methyltransferase in Bacteriochlorophyll *c* Biosynthesis. In: *J. Bacteriol.* **186** (9), S. 2558–2566.
- MATSUSHITA, M.; KETELAARS, M.; VAN OIJEN, A. M.; KÖHLER, J.; AARTSMA, T. J.; SCHMIDT, J. (2001): Spectroscopy on the B850 Band of Individual Light-Harvesting 2 Complexes of *Rhodospseudomonas acidophila* II. Exciton States of an Elliptically Deformed Ring Aggregate. In: *Biophys. J.* **80** (3), S. 1604–1614.

- 
- MATTHEWS, B. W.; FENNA, R. E.; BOLOGNESI, M. C.; SCHMID, M. F.; OLSON, J. M. (1979): Structure of a bacteriochlorophyll *a*-protein from the green photosynthetic bacterium *Prosthecochloris aestuarii*. In: *J. Mol. Biol.* **131** (2), S. 259–285.
- MCDERMOTT, G.; PRINCE, S. M.; FREER, A. A.; HAWTHORNTHWAITTE-LAWLESS, A. M.; PAPIZ, M. Z.; COGDELL, R. J.; ISAACS, N. W. (1995): Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. In: *Nature* **374** (6522), S. 517–521.
- McLUSKEY, K.; PRINCE, S. M.; COGDELL, R. J.; ISAACS, N. W. (2001): The Crystallographic Structure of the B800-820 LH3 Light-Harvesting Complex from the Purple Bacteria *Rhodospseudomonas acidophila* Strain 7050. In: *Biochemistry* **40** (30), S. 8783–8789.
- MECHLER, B.; OELZE, J. (1978): Differentiation of the photosynthetic apparatus of *Chromatium vinosum*, strain D. In: *Arch. Microbiol.* **118** (1), S. 109–114.
- MIRKOVIC, T.; OSTROUMOV, E. E.; ANNA, J. M.; VAN GRONDELLE, R.; GOVINDJEE; SCHOLES, G. D. (2017): Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms. In: *Chem. Rev.* **117** (2), S. 249–293.
- MOERNER, W. E. (2010): Single-Molecule Optical Spectroscopy and Imaging. From Early Steps to Recent Advances. In: GRÄSLUND, A., RIGLER, R. UND WIDENGREN, J. (Hg.): *Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology: Nobel Symposium*. Berlin, Heidelberg: Springer, S. 25–60.
- MOERNER, W. E. (2015): Single-Molecule Spectroscopy, Imaging, and Photocontrol: Foundations for Super-Resolution Microscopy (Nobel Lecture). In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54** (28), S. 8067–8093.
- MOSTOVOY, M. V.; KNOESTER, J. (2000): Statistics of Optical Spectra from Single-Ring Aggregates and Its Application to LH2. In: *J. Phys. Chem. B* **104** (51), S. 12355–12364.
- MUNK, K. (2008): *Mikrobiologie*. Stuttgart: Thieme (Taschenlehrbuch Biologie).
- MUNK, K. (2009): *Botanik*. Stuttgart: Thieme (Taschenlehrbuch Biologie).
- NIEDZWIEDZKI, D. M.; BÍNA, D.; PICKEN, N.; HONKANEN, S.; BLANKENSHIP, R. E.; HOLTEN, D.; COGDELL, R. J. (2012): Spectroscopic studies of two spectral variants of light-harvesting complex 2 (LH2) from the photosynthetic purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. In: *BBA-Bioenergetics* **1817** (9), S. 1576–1587.

- NOVODEREZHKIN, V. I.; RAZJIVIN, A. P. (1995): Exciton dynamics in circular aggregates: application to antenna of photosynthetic purple bacteria. In: *Biophys. J.* **68** (3), S. 1089–1100.
- OLSON, J. M. (1998): Chlorophyll Organization and Function in Green Photosynthetic Bacteria. In: *Photochem. Photobiol.* **67** (1), S. 61–75.
- OLSON, J. M.; ROMANO, C. A. (1962): A new chlorophyll from green bacteria. In: *Biochim. Biophys. Acta* **59** (3), S. 726–728.
- OOSTERGETEL, G. T.; REUS, M.; CHEW, A. G. M.; BRYANT, D. A.; BOEKEMA, E. J.; HOLZWARTH, A. R. (2007): Long-range organization of bacteriochlorophyll in chlorosomes of *Chlorobium tepidum* investigated by cryo-electron microscopy. In: *FEBS Lett.* **581** (28), S. 5435–5439.
- OOSTERGETEL, G. T.; VAN AMERONGEN, H.; BOEKEMA, E. J. (2010): The chlorosome: a prototype for efficient light harvesting in photosynthesis. In: *Photosynth. Res.* **104** (2-3), S. 245–255.
- (OPEC) ORGANIZATION OF THE PETROLEUM EXPORTING COUNTRIES (2017): Annual Statistical Bulletin. Wien. Online verfügbar unter [http://www.opec.org/opec\\_web/static\\_files\\_project/media/downloads/publications/ASB2017\\_13062017.pdf](http://www.opec.org/opec_web/static_files_project/media/downloads/publications/ASB2017_13062017.pdf), zuletzt geprüft am 29.03.2018.
- ORRIT, M.; BERNARD, J. (1990): Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal. In: *Phys. Rev. Lett.* **65** (21), S. 2716–2719.
- PAPIZ, M. Z.; PRINCE, S. M.; HOWARD, T.; COGDELL, R. J.; ISAACS, N. W. (2003): The Structure and Thermal Motion of the B800–850 LH2 Complex from *Rps. acidophila* at 2.0 Å Resolution and 100K. New Structural Features and Functionally Relevant Motions. In: *J. Mol. Biol.* **326** (5), S. 1523–1538.
- PATWARDHAN, S.; SENGUPTA, S.; WÜRTHNER, F.; SIEBBELES, LAURENS D. A.; GROZEMA, F. (2010): Theoretical Study of the Optical Properties of Artificial Self-Assembled Zinc Chlorins. In: *J. Phys. Chem. C* **114** (48), S. 20834–20842.
- PFLOCK, T. J.; OELLERICH, S.; KRAPF, L.; SOUTHALL, J.; COGDELL, R. J.; ULLMANN, G. M.; KÖHLER, J. (2011): The Electronically Excited States of LH2 Complexes from *Rhodospseudomonas acidophila* Strain 10050 Studied by Time-Resolved Spectroscopy and Dynamic Monte Carlo Simulations. II. Homo-Arrays Of LH2 Complexes

- 
- Reconstituted Into Phospholipid Model Membranes. In: *J. Phys. Chem. B* **115** (28), S. 8821–8831.
- PRINCE, S. M.; PAPIZ, M. Z.; FREER, A. A.; McDERMOTT, G.; HAWTHORNTHWAIT-LAWLESS, A. M.; COGDELL, R. J.; ISAACS, N. W. (1997): Apoprotein structure in the LH2 complex from *Rhodospseudomonas acidophila* strain 10050. Modular assembly and protein pigment interactions. In: *J. Mol. Biol.* **268** (2), S. 412–423.
- PROKHORENKO, V. I.; STEENSGAARD, D. B.; HOLZWARTH, A. R. (2000): Exciton Dynamics in the Chlorosomal Antennae of the Green Bacteria *Chloroflexus aurantiacus* and *Chlorobium tepidum*. In: *Biophys. J.* **79** (4), S. 2105–2120.
- PŠENČÍK, J.; IKONEN, T. P.; LAURINMAKI, P.; MERCKEL, M. C.; BUTCHER, S. J.; SERIMAA, R. E.; TUMA, R. (2004): Lamellar organization of pigments in chlorosomes, the light harvesting complexes of green photosynthetic bacteria. In: *Biophys. J.* **87** (2), S. 1165–1172.
- PŠENČÍK, J.; POLÍVKA, T.; NĚMEC, P.; DIAN, J.; KUDRNA, J.; MALÝ, P.; HÁLA, J. (1998): Fast Energy Transfer and Exciton Dynamics in Chlorosomes of the Green Sulfur Bacterium *Chlorobium tepidum*. In: *J. Phys. Chem. A* **102** (23), S. 4392–4398.
- PULLERITS, T.; SUNDRSTRÖM, V. (1996): Photosynthetic Light-Harvesting Pigment–Protein Complexes. Toward Understanding How and Why. In: *Acc. Chem. Res.* **29** (8), S. 381–389.
- REIHER, C. (2013): Zirkular Dichroismus Spektroskopie an Chlorosomen des grünen Schwefelbakteriums *Chlorobaculum tepidum*. Bachelorarbeit. Universität Bayreuth, Bayreuth.
- RITZ, T.; HU, X.; DAMJANOVIĆ, A.; SCHULTEN, K. (1998): Excitons and excitation transfer in the photosynthetic unit of purple bacteria. In: *J. Lumin.* **76-77**, S. 310–321.
- ROBERT, B.; COGDELL, R. J.; VAN GRONDELLE, R. (2003): The light-harvesting system of purple bacteria. In: GREEN, B. R. UND PARSON, W. W. (Hg.): *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- SAER, R. G.; BLANKENSHIP, R. E. (2017): Light harvesting in phototrophic bacteria. Structure and function. In: *Biochem. J.* **474** (13), S. 2107–2131.
- SAUER, K.; COGDELL, R. J.; PRINCE, S. M.; FREER, A.; ISAACS, N. W.; SCHEER, H. (1996): Structure-Based Calculations of the Optical Spectra of the LH2 Bacteriochloro-

- phyll-Protein Complex from *Rhodospseudomonas acidophila*. In: *Photochem. Photobiol.* **64** (3), S. 564–576.
- SCHEER, H. (2003): The Pigments. In: GREEN, B. R. UND PARSON, W. W. (Hg.): *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, S. 29–81.
- SCHEURING, S.; STURGIS, J. N. (2005): Chromatic adaptation of photosynthetic membranes. In: *Science* **309** (5733), S. 484–487.
- SCHRÖDINGER: PyMOL. The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.3.
- ŞENER, M. K.; SCHULTEN, K. (2009): From Atomic-Level Structure to Supramolecular Organization in the Photosynthetic Unit of Purple Bacteria. In: HUNTER, C. NEIL, DALDAL, F., THURNAUER, M. C. UND BEATTY, J. THOMAS (Hg.): *The Purple Phototrophic Bacteria*. Dordrecht: Springer, S. 275–294.
- ŞENER, M. K.; STRUMPFER, J.; HSIN, J.; CHANDLER, D.; SCHEURING, S.; HUNTER, C. N.; SCHULTEN, K. (2011): Förster energy transfer theory as reflected in the structures of photosynthetic light-harvesting systems. In: *Chem. Phys. Chem.* **12** (3), S. 518–531.
- SENGUPTA, S.; EBELING, D.; PATWARDHAN, S.; ZHANG, X.; BERLEPSCH, H. VON; BÖTTCHER, C.; STEPANENKO, V.; UEMURA, S.; HENTSCHEL, C.; FUCHS, H.; GROZEMA, F. C.; SIEBBELES, L. D. A.; HOLZWARTH, A. R.; CHI, L.; WÜRTHNER, F. (2012): Biosupramolecular nanowires from chlorophyll dyes with exceptional charge-transport properties. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51** (26), S. 6378–6382.
- SENGUPTA, S.; WÜRTHNER, F. (2012): Covalently stabilized self-assembled chlorophyll nanorods by olefin metathesis. In: *Chem. Commun.* **48** (46), S. 5730–5732.
- SENGUPTA, S.; WÜRTHNER, F. (2013): Chlorophyll J-Aggregates: From Bioinspired Dye Stacks to Nanotubes, Liquid Crystals, and Biosupramolecular Electronics. In: *Acc. Chem. Res.* **46** (11), S. 2498–2512.
- SPITZ, C.; KNOESTER, J.; OUART, A.; DAEHNE, S. (2002): Polarized absorption and anomalous temperature dependence of fluorescence depolarization in cylindrical J-aggregates. In: *Chem. Phys.* **275** (1-3), S. 271–284.
- STAEHELIN, L. A.; GOLECKI, J. R.; DREWS, G. (1980): Supramolecular organization of chlorosomes (chlorobium vesicles) and of their membrane attachment sites in *Chlorobium limicola*. In: *Biochim. Biophys. Acta* **589** (1), S. 30–45.

- 
- STATISTISCHES BUNDESAMT (2017): Pressemitteilung Nr. 409. Online verfügbar unter [https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2017/11/PD17\\_409\\_412.html](https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2017/11/PD17_409_412.html), zuletzt aktualisiert am 15.11.2017, zuletzt geprüft am 29.03.2018.
- STEENSGAARD, D. B.; WACKERBARTH, H.; HILDEBRANDT, P.; HOLZWARTH, A. R. (2000): Diastereoselective Control of Bacteriochlorophyll *e* Aggregation. 3-*S*-BChl *e* Is Essential for the Formation of Chlorosome-Like Aggregates. In: *J. Phys. Chem. B* **104** (44), S. 10379–10386.
- STÖCKER, H. (2004): Taschenbuch der Physik. Formeln, Tabellen, Übersichten. 5. korr. Aufl. Frankfurt am Main: Deutsch (DeskTop).
- TAMIAKI, H. (1996): Supramolecular structure in extramembraneous antennae of green photosynthetic bacteria. In: *Coordin. Chem. Rev.* **148** (0), S. 183–197.
- TAMIAKI, H.; AMAKAWA, M.; SHIMONO, Y.; TANIKAGA, R.; HOLZWARTH, A. R.; SCHAFFNER, K. (1996): Synthetic Zinc and Magnesium Chlorin Aggregates as Models for Supramolecular Antenna Complexes in Chlorosomes of Green Photosynthetic Bacteria. In: *Photochem. Photobiol.* **63** (1), S. 92–99.
- THYRHAUG, E.; ZIDEK, K.; DOSTAL, J.; BINA, D.; ZIGMANTAS, D. (2016): Exciton Structure and Energy Transfer in the Fenna-Matthews-Olson Complex. In: *J. Phys. Chem. Lett.* **7** (9), S. 1653–1660.
- TIMPMANN, K.; WOODBURY, N. W.; FREIBERG, A. (2000): Unraveling Exciton Relaxation and Energy Transfer in LH2 Photosynthetic Antennas. In: *J. Phys. Chem. B* **104** (42), S. 9769–9771.
- TRONRUD, D. E.; SCHMID, M. F.; MATTHEWS, B. W. (1986): Structure and X-ray amino acid sequence of a bacteriochlorophyll *a* protein from *Prosthecochloris aestuarii* refined at 1.9 Å resolution. In: *J. Mol. Biol.* **188** (3), S. 443–454.
- TRONRUD, D. E.; WEN, J.; GAY, L.; BLANKENSHIP, R. E. (2009): The structural basis for the difference in absorbance spectra for the FMO antenna protein from various green sulfur bacteria. In: *Photosynth. Res.* **100** (2), S. 79–87.
- VAN DORSSSEN, R. J.; GEROLA, P. D.; OLSON, J. M.; AMESZ, J. (1986): Optical and structural properties of chlorosomes of the photosynthetic green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. In: *BBA-Bioenergetics* **848** (1), S. 77–82.

- VAN GEMERDEN, H.; MAS, J. (1995): Ecology of Phototrophic Sulfur Bacteria. In: BLANKENSHIP, R. E., MADIGAN, M. T. UND BAUER, C. E. (Hg.): Anoxygenic Photosynthetic Bacteria (Advances in photosynthesis). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, S. 49–85.
- VAN NIEL, C. B. (1941): The Bacterial Photosyntheses and Their Importance for the General Problem of Photosynthesis. In: NORD, F. F. (Hg.): Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons, S. 263–328.
- VAN OIJEN, A. M.; KETELAARS, M.; KÖHLER, J.; AARTSMA, T. J.; SCHMIDT, J. (1999): Unraveling the Electronic Structure of Individual Photosynthetic Pigment-Protein Complexes. In: *Science* **285** (5426), S. 400–402.
- VAN OIJEN, A. M.; KETELAARS, M.; KÖHLER, J.; AARTSMA, T. J.; SCHMIDT, J. (2000): Spectroscopy of Individual Light-Harvesting 2 Complexes of *Rhodospseudomonas acidophila*. Diagonal Disorder, Intercomplex Heterogeneity, Spectral Diffusion, and Energy Transfer in the B800 Band. In: *Biophys. J.* **78** (3), S. 1570–1577.
- VASSILIEVA, E. V.; STIREWALT, V. L.; JAKOBS, C. U.; FRIGAARD, N.-U.; INOUE-SAKAMOTO, K.; BAKER, M. A.; SOTAK, A.; BRYANT, D. A. (2002): Subcellular Localization of Chlorosome Proteins in *Chlorobium tepidum* and Characterization of Three New Chlorosome Proteins: CsmF, CsmH, and CsmX. In: *Biochemistry* **41** (13), S. 4358–4370.
- WAHLUND, T. M.; WOESE, C. R.; CASTENHOLZ, R. W.; MADIGAN, M. T. (1991): A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot springs, *Chlorobium tepidum* sp. nov. In: *Arch. Microbiol.* **156** (2), S. 81–90.
- WANG, J.; BRUNE, D. C.; BLANKENSHIP, R. E. (1990): Effects of oxidants and reductants on the efficiency of excitation transfer in green photosynthetic bacteria. In: *BBA-Bioenergetics* **1015** (3), S. 457–463.
- WEILER, E. W.; NOVER, L.; NULTSCH, W. (2008): Allgemeine und molekulare Botanik. Stuttgart: Thieme.
- WEISS, C. (1972): The Pi electron structure and absorption spectra of chlorophylls in solution. In: *J. Mol. Spectrosc.* **44** (1), S. 37–80.
- WEISSGERBER, T.; ZIGANN, R.; BRUCE, D.; CHANG, Y.-J.; DETTER, J. C.; HAN, C.; HAUSER, L.; JEFFRIES, C. D.; LAND, M.; MUNK, A. C.; TAPIA, R.; DAHL, C. (2011): Complete

genome sequence of *Allochromatium vinosum* DSM 180(T). In: *Stand. Genomic Sci.* **5** (3), S. 311–330.

ZINTH, W.; WACHTVEITL, J. (2005): The first picoseconds in bacterial photosynthesis-ultrafast electron transfer for the efficient conversion of light energy. In: *Chem. Phys. Chem.* **6** (5), S. 871–880.





## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Abhandlung nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe.

Des weiteren erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

Bayreuth, den 12. April 2018

Alexander Löhner



## **TEIL B**

*Veröffentlichungen*



---

# Übersicht über die Publikationen

## *Zentrale Fragestellung*

Diese Dissertation besteht aus drei Publikationen, wovon zwei bereits veröffentlicht sind und eine weitere vor Kurzem beim *Journal of Physical Chemistry B* zur Publikation eingereicht wurde. Alle Teile beschäftigen sich mit der Analyse der elektronischen Struktur von Komplexen natürlicher Lichtsammelsysteme sowie der Ableitung struktureller Eigenschaften aus den spektroskopisch zugänglichen Informationen. Ergänzt werden die Veröffentlichungen um die in **Kapitel 5** dargestellten Messungen und Simulationen an künstlichen Lichtsammelkomplexen.

## *Inhalt der Veröffentlichungen*

Die zentrale Frage in **P1** war zu Beginn der Arbeit die Ursache der Aufspaltung der B800-Bande der LH2-Komplexe der Schwefel-Purpurbakterien-Art *Alc. vinosum* bei tiefen Temperaturen in zwei Unterbanden B800<sub>r</sub> und B800<sub>b</sub>. Auf Grund mangelnder struktureller Informationen war zunächst unklar, ob diese Bakterien zwei unterschiedliche Typen von LH2-Komplexen mit jeweils homogener Apoproteinstruktur ausbilden (die je einen eigenen B800-Peak besitzen) oder ob die Aufspaltung durch eine heterogene innere Apoproteinstruktur intrinsisch in jedem Komplex zu finden ist. Durch Messung einer größeren Anzahl an Einzelmolekül-Spektren sollte gezeigt werden, ob einzelne Komplexe Absorptionslinien in beiden B800-Subbanden aufweisen, oder ob sich verschiedene LH2-Komplexe unterscheiden lassen. Bereits während der Messungen wurde von NIEDZWIEDZKI ET AL. (2012) durch zeitaufgelöste Messungen zum Energietransfer in diesen Komplexen gezeigt, dass sich beide B800-Absorptionslinien im jeweils selben Komplex finden. Dies konnte durch meine Messungen bestätigt werden, da alle gemessenen Komplexe Absorptionslinien in jeder der beiden B800-Subbanden aufweisen (vgl. Figure 3, **P1**). Die von NIEDZWIEDZKI ET AL. formulierte Vermutung, dass die Aufspaltung der Bande durch ein zusätzliches BChl *a*-Molekül pro Polypeptid-Paar (vgl. Kapitel 2.2.2.2) verursacht werden könnte, wurde in **P1**

durch Messung des BChl *a*/Carotinoid-Verhältnisses jedoch widerlegt. Mit Hilfe von Zirkulardichroismus-Spektren konnte gezeigt werden, dass die BChl *a* des B800-Ringes von *Alc. vinosum* (im Gegensatz zu anderen Bakterien) exzitonisch gekoppelt sind und daher anders angeordnet sein müssen, als bei den LH-Komplexen anderer Spezies. Die exzitonische Kopplung kann, insbesondere im Zusammenhang mit der Aufspaltung der Bande, in einem statischen System durch eine Dimerisierung der B800-Moleküle erklärt werden. Um diese Möglichkeit zu prüfen wurden numerische Simulationen (in Punkt-Dipol- und Heitler-London-Näherung) durchgeführt, bei denen die räumliche Anordnung der BChl *a*-Moleküle zueinander variiert wurde, sowohl unter Einbeziehung als auch unter Vernachlässigung der Wechselwirkung zwischen B800- und B850-Ring. Um die Ergebnisse mit dem Ensemblespektrum vergleichen zu können wurden 1000 Einzelspektren unter Einbeziehung einer statischen Unordnung simuliert. An Hand dieser Simulationen lässt sich eine mögliche Struktur für die LH2-Komplexe der Spezies *Alc. vinosum* ableiten, die in **P1** ausführlich beschrieben ist und die auf dem Aufbau der Komplexe aus zwei unterschiedlichen Bausteinen basiert (vgl. Figure 7e, **P1**). Die Simulationen dieses Modells reproduzieren dabei nicht nur das Ensemblespektrum, sondern auch die aus den Einzelmolekül-Experimenten gewonnenen Parameter. Die Idee, dass die LH2-Komplexe aus zwei Bausteinen aufgebaut werden, die sich vor allem in der Position der B800-Moleküle unterscheiden, konnte durch eine – im Anschluss an die spektroskopischen Experimente durchgeführte – Sequenzierung der Polypeptidketten gestützt werden (vgl. Figure S2, **P1**). Diese zeigt, dass *Alc. vinosum* drei verschiedene  $\alpha$ -Apoproteinketten besitzt, die zwei unterschiedlich gestaltete Bindungstaschen für die B800-Moleküle bilden und so die beiden unterschiedlichen Bausteine ausformen können.

Ziel der Messungen in **P2** war es, detailliertere Informationen über die Zustände in FMO-Komplexen zu gewinnen, als dies aus Ensemblesmessungen möglich ist. Durch Betrachtung lediglich eines einzelnen Komplexes wurde erwartet, Spektren mit deutlich geringeren Linienbreiten zu messen, da so die Interkomplex-Heterogenität umgangen wird. Aus diesen wiederum ließen sich die lokalen Übergangsenergien der Zustände des Komplexes ableiten und so einerseits gegebenenfalls bestimmte BChl-

Moleküle einer spektralen Bande zuordnen und andererseits möglicherweise Informationen über die Kopplung der BChl-Moleküle untereinander gewinnen, die bislang lediglich aus theoretischen Betrachtungen abgeschätzt werden konnten. Die zu diesem Zweck gemessenen Einzelkomplex-Spektren unterscheiden sich jedoch kaum vom den Ensemblespektren, die unter identischen Bedingungen aufgenommen wurden (vgl. Figure 3 sowie Table 1 und 2, **P2**). Zwar lassen sich kleinere Unterschiede zwischen den Spektren einzelner Komplexe ausmachen, diese sind jedoch deutlich geringer als die spektrale Breite der Banden, die entweder durch Fluktuationen der Übergangsenergie oder durch Relaxation der Exzitonzustände dominiert wird. Diese Vorgänge finden offenbar auch bei kryogenen Temperaturen noch auf deutlich schnelleren Zeitskalen statt als die zeitliche Auflösung der Experimente, wodurch lediglich stark verbreiterte Banden gemessen werden können.

In **P3** wurden die spektralen Eigenschaften von Chlorosomen von wildtypischen sowie genetisch veränderten Grünen Schwefelbakterien untersucht, um daraus Rückschlüsse auf die innere Struktur dieser Komplexe zu ziehen. Die Anordnung der BChl-Moleküle in Chlorosomen ist seit vielen Jahren ein umstrittenes Thema (vgl. Kapitel 2.2.3.2). GANAPATHY ET AL. (2009) konnten für die Chlorosome des *bchQRU*-Mutanten durch die Kombination von Kryo-Elektronenmikroskopie, NMR-Spektroskopie und molekularer Modellierung ein detailliertes Bild für den Aufbau zylindrischer BChl-Aggregate entwickeln. Dafür wird durch Aneinanderlagerung von Einheitszellen, ermittelt aus den NMR-Daten, ein Gitter aufgebaut und entlang einer Achse der Einheitszelle aufgerollt (vgl. Figure 2, **P3**). Durch Rollen desselben Gitters unter  $90^\circ$  Verdrehung erhielten die Autoren die Struktur für die Aggregate des Wildtyp-Bakteriums. GÜNTHER ET AL. (2016) zeigten in ihrer Arbeit, dass zusätzlich zu den zuvor betrachteten Methoden auch optische Spektroskopie nötig ist, um ein Modell für Chlorosome des *bchR*-Mutanten zu entwickeln. Daher wurden in **P3** die Absorptionseigenschaften sowohl von Chlorosomen des Wildtyp-Bakteriums als auch des *bchQR*-



Mutanten<sup>10</sup> untersucht, um die vorgeschlagenen Modelle zu überprüfen. Dabei bestätigt sich zunächst die Erwartung, dass durch zunehmende Festlegung der Seitenketten der BChl-Moleküle die Homogenität der Spektren zunimmt. Interessanterweise implizieren die Ergebnisse, dass sich sowohl die Aggregate des Wildtyps als auch des *bchQR*-Mutanten sehr gut mit der Struktur beschreiben lassen, die auch für den *bchR*-Mutanten gültig ist, bei der der Rollwinkel zwischen den beiden von GANAPATHY ET AL. vorgeschlagenen Extremfällen 0° bzw. 90° liegt. Die spektralen Informationen legen hier also eine gemeinsame Struktur der Chlorosome nahe, die mit den früheren Messungen konsistent sind. Für Chlorosome des Wildtyps zeigt etwa ein Viertel der betrachteten Komplexe spektrale Signaturen, die bei den Mutanten nicht auftreten: Das Polarisationsverhalten einer Absorptionsbande weicht vom „üblichen“ Verhalten ab und lässt sich nicht, wie für die anderen Komplexe, mit der Theorie zweier konzentrischer Zylinder erklären. Theoretische Überlegungen legen nahe, dass bei dieser Gruppe von Komplexen neben den zu Zylindern gerollten Gittern auch lamellenartige, ungerollte Gitterstrukturen auftreten. Mit diesen Messungen kann gezeigt werden, dass, abhängig von der Zucht der Bakterien, in Chlorosomen nicht nur Zylinder oder Lamellen auftreten, sondern dass in einem einzelnen Chlorosom beide Formen beobachtet werden können.

---

10 Die Absorptionsbande des eigentlich zum Vergleich der Modelle interessanten *bchQRU*-Mutanten ist auf Grund der Verschiebung der Monomer-Absorption zu kürzerer Wellenlänge experimentell mit den verfügbaren Geräten nicht zugänglich, weshalb hier Chlorosome des *bchQR*-Mutanten untersucht werden, deren BChl-Seitenketten ebenfalls vollständig determiniert sind.

## Eigener Beitrag zu den Publikationen

**Publikation 1** von ALEXANDER LÖHNER, ANNE-MARIE CAREY, KIRSTY HACKING, NICHOLA PICKEN, SHARON KELLY, RICHARD COGDELL UND JÜRGEN KÖHLER ist in *Photosynthesis Research* (2015) unter folgendem Titel veröffentlicht:

„The origin of the split B800 absorption peak  
in the LH2 complexes from *Allochromatium vinosum*“

Ich habe (während meiner Diplomarbeit) die Einzelmolekül-Spektren aufgenommen und teilweise ausgewertet. Während meines Promotionsvorhabens erfolgte von mir eine weitere Auswertung und Analyse der Daten sowie Computersimulationen zur Interpretation der Spektren. Weiterhin habe ich Teile des Manuskripts geschrieben.

**Publikation 2** von ALEXANDER LÖHNER, KHURAM ASHRAF, RICHARD J. COGDELL UND JÜRGEN KÖHLER ist in *Scientific Reports* (2016) unter folgendem Titel veröffentlicht:

„Fluorescence-excitation and Emission Spectroscopy  
on Single FMO Complexes“

Ich habe alle Experimente und die zugehörige Auswertung durchgeführt, die Ergebnisse interpretiert und habe Teile des Manuskripts verfasst.

**Publikation 3** von LISA MARIA GÜNTHER<sup>\*\*</sup>, ALEXANDER LÖHNER<sup>\*\*</sup>, CAROLIN REIHER, TENZIN KUNSEL, THOMAS L. C. JANSEN, MARCUS TANK, DONALD A. BRYANT, JASPER KNOESTER UND JÜRGEN KÖHLER wurde kürzlich beim *Journal of Physical Chemistry B* unter folgendem Titel eingereicht:

„Structural variations in chlorosomes from wild-type and a *bchQR* mutant  
of *Chlorobaculum tepidum* revealed by single-molecule spectroscopy“

Ich habe zusammen mit der Masterstudentin CAROLIN REIHER die Messungen an den Chlorosomen des Wildtyps durchgeführt und habe diese anschließend ausgewertet. Diese Daten und die Daten der Chlorosome des *bchQR*-Mutanten habe ich zusammen mit LISA MARIA GÜNTHER diskutiert und habe weiterhin Teile des Manuskripts verfasst.

---

<sup>\*\*</sup> Gleicher Beitrag der beiden Autoren



**P1: The origin of the split B800 absorption peak  
in the LH2 complexes from *Allochromatium  
vinosum***

von Alexander Löhner, Anne-Marie Carey,  
Kirsty Hacking, Nichola Picken, Sharon Kelly,  
Richard Cogdell und Jürgen Köhler

Veröffentlicht in

Photosynthesis Research 2015. **123** (1), S. 23–31

(DOI: 10.1007/s11120-014-0036-2)

Nachdruck genehmigt durch Photosynthesis Research

Copyright © 2014, Springer Nature



# The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochromatium vinosum*

Alexander Löhner · Anne-Marie Carey ·  
Kirsty Hacking · Nichola Picken · Sharon Kelly ·  
Richard Cogdell · Jürgen Köhler

Received: 3 March 2014 / Accepted: 12 August 2014  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

**Abstract** The absorption spectrum of the high-light peripheral light-harvesting (LH) complex from the photosynthetic purple bacterium *Allochromatium vinosum* features two strong absorptions around 800 and 850 nm. For the LH2 complexes from the species *Rhodospseudomonas acidophila* and *Rhodospirillum molischianum*, where high-resolution X-ray structures are available, similar bands have been observed and were assigned to two pigment pools of BChl *a* molecules that are arranged in two concentric rings (B800 and B850) with nine (*acidophila*) or eight (*molischianum*) repeat units, respectively. However, for the high-light peripheral LH complex from *Alc. vinosum*, the intriguing feature is that the B800 band is split into two components. We have studied this pigment–protein complex by ensemble CD spectroscopy and polarisation-resolved single-molecule spectroscopy. Assuming that the high-light peripheral LH complex in *Alc. vinosum* is constructed on the same modular principle as described for LH2 from *Rps. acidophila* and *Rsp. molischianum*, we used those repeat units as a starting point for simulating the spectra. We find the best agreement between simulation and experiment for a ring-like oligomer of 12 repeat units,

where the mutual arrangement of the B800 and B850 rings resembles those from *Rsp. molischianum*. The splitting of the B800 band can be reproduced if both an excitonic coupling between dimers of B800 molecules and their interaction with the B850 manifold are taken into account. Such dimers predict an interesting apoprotein organisation as discussed below.

**Keywords** Light-harvesting complexes · *Allochromatium vinosum* · Single-molecule spectroscopy

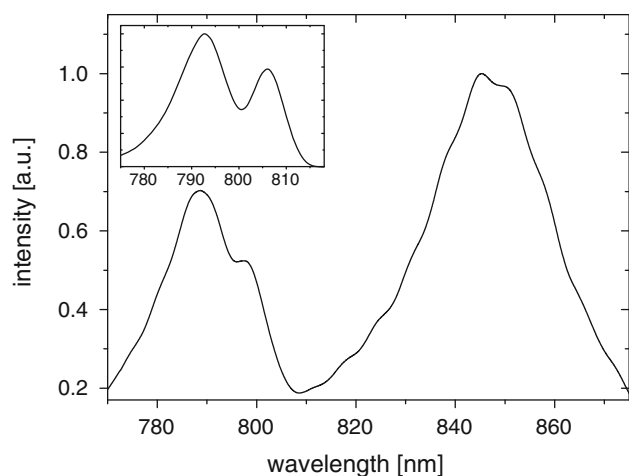
## Introduction

The light-harvesting (LH) apparatus of most photosynthetic purple bacteria consists of core reaction-centre LH1 complexes (RC-LH1) and peripheral LH2 complexes (Hunter et al. 2009). The sun light is absorbed mainly by the LH2 complexes, from where the energy is rapidly transferred via LH1 to the RC that acts as a transducer. Interestingly, all peripheral LH complexes form circular oligomers of two hydrophobic  $\alpha/\beta$ -apoproteins that non-covalently bind three BChl *a* molecules and one carotenoid, usually featuring a highly symmetric nonameric [*Rhodospseudomonas (Rps.) acidophila*, *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides*] or octameric [*Rhodospirillum (Rsp.) molischianum*] quaternary protein structure (McDermott et al. 1995; Walz et al. 1998; Köpke et al. 1996). The special feature of these LH2 complexes is that the BChl *a* molecules are arranged in two concentric rings slightly displaced with respect to each other along the common symmetry axis perpendicular to the plane of the rings. One ring consists of a group of well-separated BChl *a* molecules (B800) with an absorption band around 800 nm. The other ring consists of closely interacting BChl *a* molecules (B850), in near van der

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11120-014-0036-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Löhner · J. Köhler (✉)  
Experimental Physics IV and Bayreuth Institute for  
Macromolecular Research (BIMF), University of Bayreuth,  
Bayreuth, Germany  
e-mail: juergen.koehler@uni-bayreuth.de

A.-M. Carey · K. Hacking · N. Picken · S. Kelly · R. Cogdell  
Institute of Molecular, Cell & Systems Biology, College of  
Medical Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow,  
Glasgow, UK



**Fig. 1** Fluorescence-excitation spectrum of an ensemble of LH2 complexes from *Alc. vinosum* embedded in a thin film of PVA. The spectral positions of the three maxima, or shoulders, respectively, are  $(788.7 \pm 0.2)$ ,  $(797.5 \pm 0.2)$ , and  $(846.8 \pm 0.2)$  nm. The inset shows the B800 spectral region for a buffer/glycerol matrix, featuring peaks at  $(792.5 \pm 0.2)$  and  $(805.8 \pm 0.2)$  nm. All experiments were carried out at 1.2 K. The excitation intensity was  $100 \text{ W/cm}^2$

Waals contact, absorbing at about 850 nm. The variation in the  $Q_y$  absorption bands of chemically identical BChl *a* molecules results from the differences in their intermolecular interactions, which is a consequence of the different arrangements of the molecules in each of the pigment pools. This reflects the proper positioning of the chromophores by the protein scaffold, which is exploited for fine tuning the spectral range of these absorptions.

However, high-resolution structures are available only for very few types of peripheral LH complexes, two B800–B850 and one B800–B820 complex (McDermott et al. 1995; Köpke et al. 1996; McLuskey et al. 2001; Papiz et al. 2003), which have a well-defined apoprotein composition. These represent, however, only a small fraction of purple bacteria that have been described (Brunisholz and Zuber 1992; Gläser and Overmann 1999; Imhof 1995; Pfennig 1967; Yurkov and Beatty 1998), and many species have LH2 complexes with a more complicated apoprotein composition containing multiple types of LH2 apoproteins. Among this larger group, there are many bacteria that contain peripheral antenna complexes which have strikingly different near-infrared spectra compared to the “standard” LH2 complexes described above (Brotosudarmo et al. 2009).

Here, we examine the high-light peripheral LH complex from *Allochrochromatium (Alc.) vinosum*. Next to the well-known broad absorption band at  $(847.1 \pm 0.2)$  nm, its low-temperature absorption spectrum features two maxima within the B800 spectral region, see Fig. 1, namely at  $(788.7 \pm 0.2)$  nm (B800<sub>blue</sub>) and  $(797.5 \pm 0.2)$  nm (B800<sub>red</sub>) (Kereiche et al. 2008; Niedzwiedzki et al. 2012). Timed resolved energy

transfer studies (Niedzwiedzki et al. 2012) have shown that both B800 bands are present in the same individual LH2 ring. Assuming that this antenna complex is constructed on a similar modular principle, as that described for the B800–B850 LH2 complex from *Rps. acidophila*, the structural basis of this spectral variation is completely unknown.

## Experimental

### Sample preparation

The LH complexes were extracted and purified from *Alc. vinosum* cells grown at 220 lux, as described elsewhere (Niedzwiedzki et al. 2012). The purified LH2 complexes were stored in a 20 mM Tris–HCl buffer (pH 8 at room temperature) with 0.02 % DDM at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  until they were used. For single-molecule measurements, the LH2-samples were diluted in 20 mM Tris–HCl buffer, with 0.02 % DDM to a concentration of about 20 pM, and in the last dilution step, a 1.5 % PVA ( $m_w = 30,000\text{--}70,000$ ) solution was added. A drop (15  $\mu\text{l}$ ) of this solution was spin-coated onto a cleaned  $\text{SiO}_2$  plate for 10 s at 500 rpm and 60 s at 2,500 rpm to achieve a thin PVA film (thickness < 100 nm) in which the LH2 complexes were immobilised. The sample was mounted in a cryostat and immediately cooled down to 1.2 K. For the ensemble experiments, we used a 6 nM solution of LH2 complexes and replaced two thirds of the buffer with glycerol in order to avoid crystallisation at low temperatures.

### Pigment analysis and CD spectroscopy

The pigments from samples of the LH2 complex from *Alc. vinosum* and *Rps. acidophila* strain 10050 were extracted in 7/2 (v/v) acetone/methanol, and the absorption spectra of the extracts recorded from 400 to 900 nm. The ratio of the carotenoid absorption (the highest absorption around 474 nm in acetone/methanol) to that of BChl *a* at 770 nm was then determined from the absorption spectra. The CD spectra of both these complexes were recorded at room temperature in a JASCO J-810 CD spectropolarimeter between 700 and 900 nm using a cuvette with a 0.2 cm path length. The complexes had an OD of 4 at their B850 absorption band.

### Fluorescence-excitation spectroscopy

The samples were excited with the output from a titan-sapphire-laser (3900S, Spectra Physics) that was pumped by a Nd:YVO<sub>4</sub> laser (Millenia Vs, Spectra Physics). A controlled variation of the wavelength between 770 and 870 nm was achieved by turning the birefringent filter with a stepmotor (Actuator 850F, Motion Controller MM4005, Newport). The

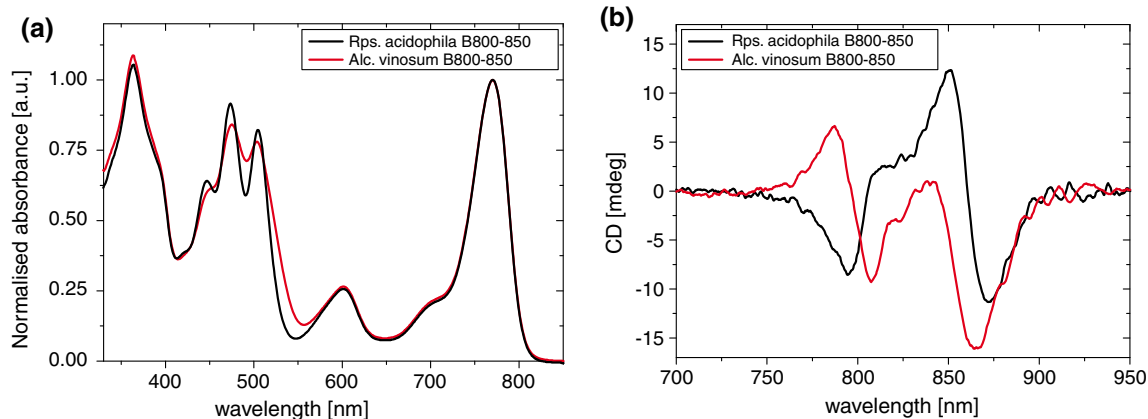
accuracy and the reproducibility of the wavelength variation were  $1 \text{ cm}^{-1}$  for the whole range of wavelengths, as verified with a wavemeter (WaveMaster, Coherent). The sample was excited through a home-build fluorescence microscope. In order to select an individual LH2 complex, the microscope was operated in widefield mode, and the laser wavelength was wobbled between 845 and 850 nm. The emission from the sample was collected by an objective (Mikrothek, NA = 0.85) that was mounted inside the cryostat, transmitted through three bandpass filters ( $2\times$  BP 890/20, AHF Analysetechnik;  $1\times$  BP 893/21, Dr. Hugo Anders) for suppressing residual laser light, and detected with a CCD-camera (iKon, Andor). From the widefield image, a spatially well-separated single LH2 complex was selected, and the microscope was switched to confocal mode. A similar setup is described in great detail in (Lang et al. 2006; Hofmann et al. 2004). For the experiments on ensembles, the sample holder as well as the microscope objective were replaced by a cuvette, and the light was focused (collected) onto (from) the sample via a lens ( $f = 200 \text{ mm}$ ) that was placed in front of the cryostat. For both single complexes and ensembles, the signal passed the same bandpass filters as mentioned above and was registered with a single-photon counting avalanche photodiode (SPCM-AQR-16, Perkin Elmer). During acquisition of the excitation spectra, the intensity of the laser was recorded as a function of the wavelength using a powermeter (LaserMate-Q, Coherent), and all spectra were corrected for variations of the laser intensity.

## Results and discussion

One possible origin of the split B800 band in the LH2 complex from *Alc. vinosum* is that there is an additional

BChl *a* molecule present per  $\alpha/\beta$  apoprotein pair (Niedzwiedzki et al. 2012) that absorbs around 800 nm in comparison to the standard LH2 complex from *Rps. acidophila*. In order to check this possibility, the ratio of BChl *a* to carotenoid in these two types of LH2 was determined by pigment extraction and comparison of the resulting absorption spectra, see Fig. 2a. These extractions were repeated three times, and the mean ratios obtained were  $1:1.10 \pm 0.01$  for *Rps. acidophila* and  $1:1.20 \pm 0.02$  for *Alc. vinosum*, respectively. Since both species feature a very similar BChl *a* to carotenoid ratio, we exclude the possibility that LH2 from *Alc. vinosum* does contain an extra B800 BChl *a* molecule per  $\alpha/\beta$  apoprotein pair.

The CD spectra of both the LH2 complexes from *Alc. vinosum* and *Rps. acidophila* were recorded from 700 to 950 nm. CD spectra of LH2 complexes have been shown to be useful in gaining information about whether the LH BChl *a* molecules are exciton coupled or not (Koolhaas et al. 1997; Cantor and Schimmel 2001). The CD spectra of these two LH2 complexes are shown in Fig. 2b. The LH2 complex from *Rps. acidophila* shows, as previously described, a single negative band in the region of the B800 BChl *a* band and a strong doublet positive/negative band in the region of B850. These spectra have been interpreted to show that the BChl *a* molecules in the B850 band are strongly exciton coupled and that those in the B800 band are largely monomeric. This conclusion is backed by the X-ray structure of the *Rps. acidophila* complex (McDermott et al. 1995) and has been confirmed by many spectroscopic experiments conducted since then (Cogdell et al. 2006; Hu et al. 2002; Sauer et al. 1996; van Oijen et al. 1999). The CD spectrum of the LH2 complex from *Alc. vinosum* shows doublet bands in both the B800 and B850 BChl *a* absorption bands. The simplest interpretation of this is that both these groups of BChl *a* molecules in the



**Fig. 2** **a** Normalised absorption spectra of the acetone/methanol (7:2) extracts from purified *Alc. vinosum* (red) and *Rps. acidophila* (black) B800–B850 LH2 complexes. The absorption spectra of each

supernatant are peak-normalised at 770 nm. **b** CD spectra for purified B800–B850 LH2 complexes from *Alc. vinosum* (red) and *Rps. acidophila* (black) on an expanded scale from 700 to 950 nm

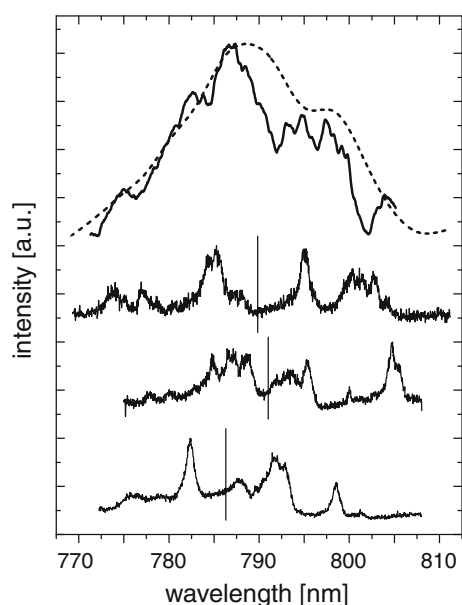


*Alc. vinosum* LH2 complex are excitonically coupled. This also implies that the organisation of the B800 BChl *a* molecules in the *Alc. vinosum* complex must be different from that in *Rps. acidophila*.

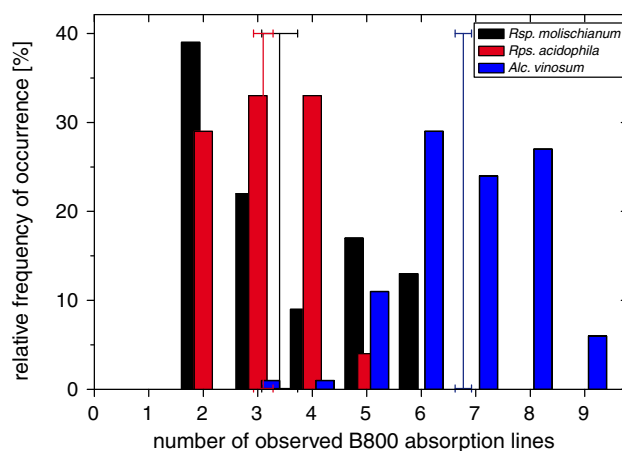
Spectra from single LH2 complexes and number of absorption lines in the B800 band

In Fig. 3, examples of fluorescence-excitation spectra from the B800 band of individual LH2 complexes from *Alc. vinosum* are shown. For comparison, the upper trace shows the fluorescence-excitation spectrum taken from an ensemble (dashed line) together with the spectrum that results from the summation of the spectra from 69 individual complexes (solid line). The ensemble spectrum shows two broad bands centred at 789 nm ( $12,674\text{ cm}^{-1}$ ) and 798 nm ( $12,531\text{ cm}^{-1}$ ), respectively, and is in good agreement with the summed spectrum. However, the general appearance of the individual spectra is heterogeneous with respect to the number of bands, their spectral positions and widths, and their spectral centre of mass.

The number of B800 absorption bands that can be identified in the spectra from individual LH2 complexes varies between 3 and 9. The distribution of this number is shown in Fig. 4 together with the respective distributions for LH2 from *Rsp. molischianum* and *Rps. acidophila* for comparison. For *Alc. vinosum*, it features a broad



**Fig. 3** The two traces overlaid at the top compare the B800 spectral region for an ensemble (dashed line) and the sum from 69 individual LH2 complexes (full line). The lower traces give three example spectra from individual complexes. For each individual spectrum, the vertical line indicates the position of the spectral mean, see text

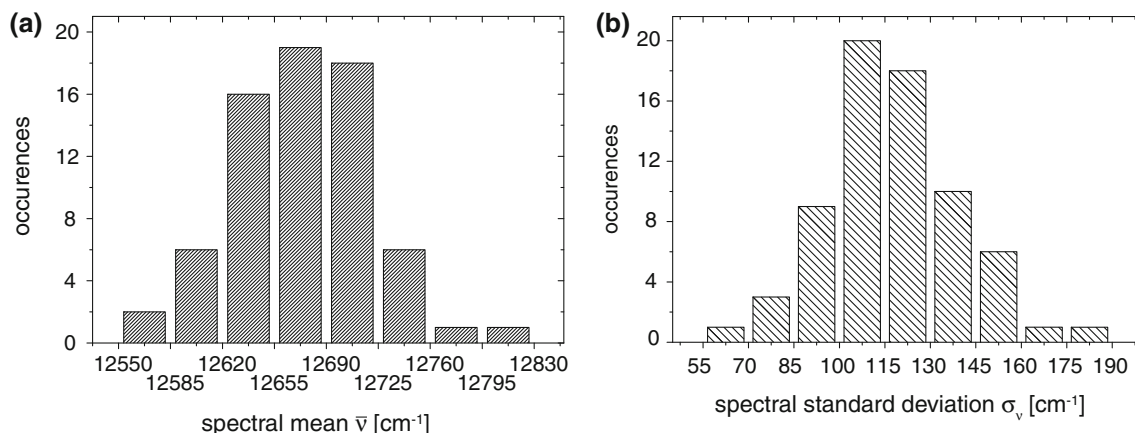


**Fig. 4** Distribution of the number of observed B800 absorption lines per single LH2 complex for *Rsp. molischianum*, *Rps. acidophila*, and *Alc. vinosum*. The mean values of these distributions are  $3.4 \pm 0.3$ ,  $3.1 \pm 0.2$ , and  $6.8 \pm 0.15$ , respectively, and are indicated by the vertical lines

maximum around 6–8 absorptions, which is significantly larger than what has been observed for the LH2 complexes from the other two species. Here, the spectra from individual LH2 complexes featured about 2–6 absorptions with a mean value around 3–4. These numbers are lower than the 8/9 predicted from the structures due to a slight delocalisation of the excitation energy over 2–3 B800 BChl *a* molecules (Hofmann et al. 2003). For both species, the structure of the LH2 complexes is known with high precision. They feature an octameric (*Rsp. molischianum*) or nonameric (*Rps. acidophila*) structure with eight or nine BChl *a* molecules in the B800 pigment pool. Hence, observing on average around seven lines from a single complex of *Alc. vinosum* indicates that the LH2 complexes from this species might have larger rings than those from *Rsp. molischianum* and *Rps. acidophila*. This is consistent with results from electron microscopy where it was found that LH2 complexes from *Alc. vinosum* feature either 12- or 13-fold symmetry (Kereïche et al. 2008).

#### Spectral heterogeneity

In order to quantify the spectral heterogeneity of the individual complexes, we followed the same strategy as in an earlier paper (van Oijen et al. 2000) where we distinguished between the heterogeneity between the ensemble of complexes (intercomplex heterogeneity) and the heterogeneity within an individual complex (intracomplex heterogeneity). Briefly, in order to quantify the intercomplex heterogeneity, we defined the spectral mean value,  $\bar{\nu}$ , of the fluorescence-excitation spectrum of a single LH2 complex as  $\bar{\nu} = \sum_i I(i) \cdot \nu(i) / \sum_i I(i)$ , where  $I(i)$  denotes the



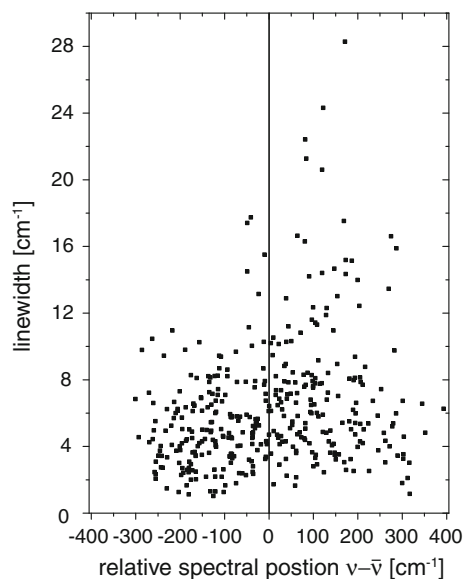
**Fig. 5** **a** Distribution of the spectral mean for 69 LH2 complexes. **b** Distribution of the standard deviations for the spectral spread of the B800 absorptions in a single complex

fluorescence intensity at datapoint  $i$ ,  $\nu(i)$  the spectral position corresponding to datapoint  $i$ , and the sum runs over all datapoints of the spectrum. The distribution of the spectral means, Fig. 5a, is centred at  $(12,674 \pm 3) \text{ cm}^{-1}$  and has a width (sdev) of  $100 \text{ cm}^{-1}$ . A measure for the intracomplex heterogeneity (diagonal disorder) is obtained by calculating the standard deviations  $\sigma_\nu$  of the intensity distributions in the individual spectra  $\sigma_\nu = [\overline{\nu^2} - \bar{\nu}^2]^{1/2}$ , where  $\bar{\nu}^2$  is given by  $\bar{\nu}^2 = \sum_i I(i) \cdot [\nu(i)]^2 / \sum_i I(i)$ . The result is shown in Fig. 5b. The mean of the histogram for  $\sigma_\nu$  amounts to  $(115 \pm 10) \text{ cm}^{-1}$ . Commonly, the diagonal disorder is given in terms of the full width at half maximum (FWHM) of the distribution of site energies rather than as a standard deviation. For a Gaussian distribution, the latter value has to be multiplied by a factor of 2.35 which yields  $270 \pm 25 \text{ cm}^{-1}$  for the diagonal disorder.

#### Linewidths and intracomplex energy transfer

The homogeneous linewidth of the individual absorption lines in the B800 band could not be obtained directly due to spectral-diffusion effects. In order to diminish the influence of the spectral motions, every single transition in each individual scan was fitted by a Lorentzian from which its peak position was obtained. In the next step, the separate scans were shifted in their spectral positions such that the fitted peak positions for that transition coincided. Then the shifted spectra were averaged, and the width of the absorption line under study was determined. This procedure allowed us to suppress all spectral-diffusion processes that were slower than the time needed to scan the laser across this transition, which took typically 10 ms. The observed linewidths of the B800 absorption bands vary between  $1.1$  and  $28.3 \text{ cm}^{-1}$ . In order to exclude intercomplex heterogeneity, we plotted in Fig. 6 the linewidths as a function of the spectral separation from the spectral mean

rather than as a function of the absolute spectral position. This reveals a slight preference for the broader B800 absorptions to appear at higher absorption frequencies. Qualitatively, this dependence is similar to what has been found earlier with other LH pigment protein complexes from purple bacteria (de Caro et al. 1994; Wu et al. 1996; van Oijen et al. 2000). Here, it was concluded that for all B800 states, B800  $\rightarrow$  B850 interband excitation energy transfer is effective, whereas for the energetically higher B800 states, energy transfer also occurs to lower lying B800 molecules. The different pathways result in variations of the lifetimes of the respective states over the region of the inhomogeneous linewidth. From the linewidths, we can obtain an upper



**Fig. 6** Widths (FWHM) of the B800 fluorescence-excitation lines from 69 individual complexes (474 absorption lines) relative to the separation from the spectral mean which is indicated by the vertical line

boundary for the decay time of the excited state of the B800 band  $\tau_{\text{eff}} = \frac{1}{2\pi \cdot c \cdot \Delta \bar{\nu}}$ , which varies across the B800 spectral region from 180 fs in the blue to 5 ps in the red. Since the intrinsic decay time of BChl *a* is about 5 ns at low temperature (Niedzwiadzki et al. 2011), these numbers essentially correspond directly to an lower boundary for the B800–B800 energy transfer time.

## Modelling

Since the data from CD spectroscopy indicate an excitonic character also for the excitations of the B800 pigments, we argue that the observed splitting of the B800 absorption band might be the result of a dimerisation between the BChl *a* molecules in the B800 pigment pool. This would lead to a systematic separation of the transition frequencies into upper and lower Davydov (1967) components where both spectral components have an oscillator strength that is determined by the coupling strength between the two monomers (Knox 1963). In order to substantiate this conjecture, we performed numerical simulations as a function of the geometrical arrangement of the BChl *a* molecules in the B800 pigment pool. For the basic geometry, we assume a ring structure with 12-fold symmetry. This choice is motivated by the following arguments. From the larger number of individual absorptions in the B800 band for *Alc. vinosum* with respect to the LH2 complexes of *Rsp. molischianum* and *Rps. acidophila*, we conclude that this LH complex from *Alc. vinosum* features a larger size, corroborated by the electron microscopy measurements mentioned above.

Moreover, an energetically stable network of antenna complexes is possible only for distinct ring sizes, which are 8, 9, 10, and 12 (Cleary et al. 2013). Therefore, we have chosen the value that coincides with Kereiche's

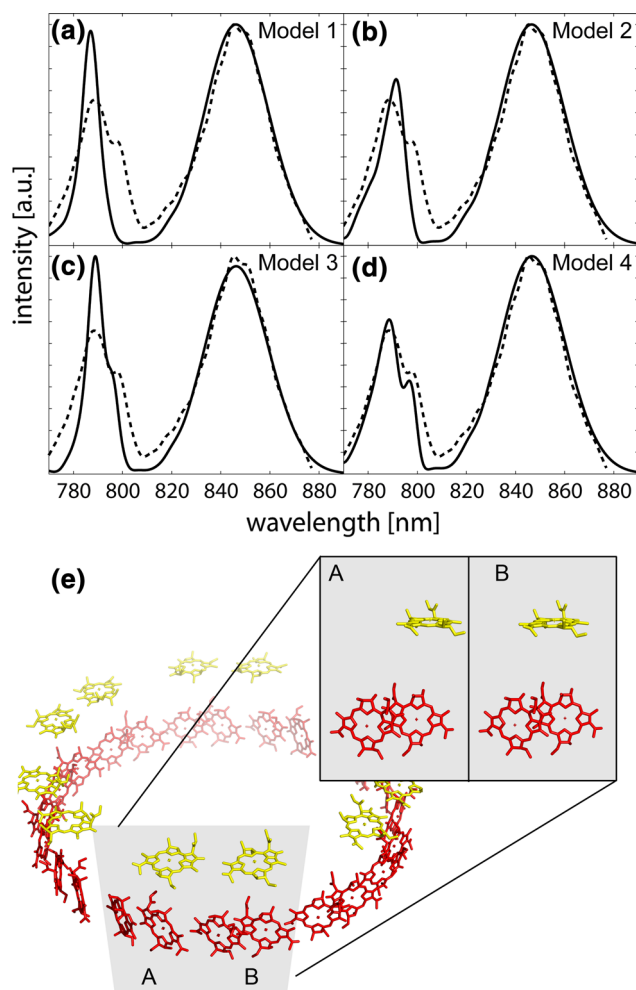
observations and that exceeds the size of LH2 from *Rps. acidophila*. In order to get started, we used a BChl *a* arrangement that was homologous to that within an  $\alpha\beta$  heterodimer of LH2 from *Rps. acidophila* and distributed twelve of these units equidistantly on a ring. Subsequently, the orientation of the BChl *a* molecules was readjusted such that the molecular transition-dipole moments were oriented parallel to the local tangent of the ring, and we performed numerical simulations in the Heitler–London approximation. In order to keep things simple, we approximated the intermolecular interactions and their dependencies on distance and mutual orientation as dipole–dipole type. The numerical values that have been used for the various parameters and models are summarised in Table 1.

For the Monte Carlo simulations, the diagonal disorder served as a random variable and was picked randomly from a Gaussian distribution with a width of  $\sigma = 150 \text{ cm}^{-1}$  (model 1). The sum of 1,000 simulated spectra is shown as the full line in Fig. 7a. It reproduces the spectral positions of the B800/B850 bands but, as could have been expected, it fails to produce a systematic splitting of the B800 band. Next, we introduced the above mentioned dimerisation within the B800 assembly (model 2). Therefore, we positioned the BChl *a* molecules with a centre to centre distance of 15.7 Å (intradimer) and 38.5 Å (interdimer) on the ring. Essentially this yields an alternating arrangement of two subunits A and B, each consisting of two B850 BChl *a* and one B800 BChl *a* molecule, that differ from each other in the mutual arrangement of the B800 to the B850 molecules within the subunit. For this arrangement, we find for the B800 BChl *a* molecules in dipole–dipole approximation an intradimer interaction strength of  $154 \text{ cm}^{-1}$  and an interdimer interaction strength of  $49 \text{ cm}^{-1}$ . As expected for this structure, the simulation yields a Davydov splitting in the B800 manifold, and the average separation between the

**Table 1** Parameters used for the simulations

	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
B800–B800 distance (Å)	20.0		15.7/38.5	
B800–B800 interaction ( $\text{cm}^{-1}$ )	84		154/49	
B850–B850 distance (Å)	9.0/11.0			
B850–B850 interaction ( $\text{cm}^{-1}$ )	629/328			
B800–B850 distance (Å)	17.3			
B800–B850 interaction <sup>a</sup> ( $\text{cm}^{-1}$ )	0		105/28/17/18/13	95/47/46/26/14
Torsion angle between B850 and B800 ring (°)	–		6	10

<sup>a</sup> The five strongest interactions (changing the torsion angle between the B800 and the B850 assembly from 6° to 10° leads to a decrease of the strongest B800–B850 interaction, but to an increase of the second to fifth strongest interaction)



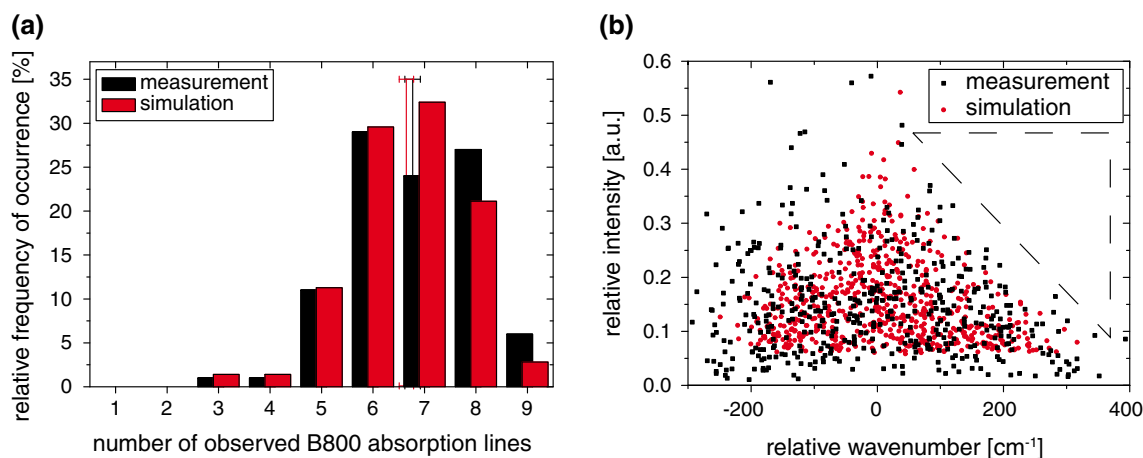
**Fig. 7** Comparison of the smoothed fluorescence-excitation sum spectrum from 69 individual complexes (*dashed line*) with the result of the sum of 1,000 simulated individual spectra for 4 different structural models (*full line*). **a** Model 1 equidistant distribution of 12 B800 BChl *a* molecules over a ring. **b** Model 2 equidistant distribution of six B800 BChl *a* dimers over a ring. **c** Model 3 as model 2 but including the interaction between the B800 and B850 BChl *a* molecules. **d** Model 4 as model 3 but for a torsion of  $10^\circ$  between the B800 and B850 rings as observed for LH2 from *Rsp. molischianum*. **e** Schematic sketch of the BChl *a* arrangement that has been used for the simulations according to model 4. The colour refers to the B850 (*red*) and B800 (*yellow*) BChl *a* molecules. The inset shows a front view of the two subunits A and B on an expanded scale. The pigment organisation according to model 4 is illustrated in a movie provided in the supporting information (structure illustrated using PyMol)

spectral centres of mass is  $290\text{ cm}^{-1}$ . However, because of the head-to-tail arrangement of the transition-dipole moments of the individual BChl *a* molecules, the upper Davydov components receive barely any oscillator strength and cannot be observed in the spectra. Hence, the model yields two states but only one observable band, Fig. 7b. As yet we have neglected the interaction between the B800

and the B850 molecules. However, for the BChl *a* arrangement given above, the B800–B850 separation is about  $17.3\text{ \AA}$  which yields a mutual interaction strength of  $105\text{ cm}^{-1}$ . This is clearly a value too large to be ignored, and we therefore run model 2 again, this time including the B800–B850 interaction (model 3). The result is shown in Fig. 7c and does now show a splitting of the B800 band. Both components of the band correspond to the lower Davydov components of the B800 states, which are further split by the interaction between the B800 and the B850 BChl *a* molecules. In the supporting information, we provide the results from a further model calculation where we included the B800–B850 interaction but skipped the dimerisation in the B800 ring. This approach does not result in a splitting of the B800 band. Moreover, we tested also whether the inclusion of the B800–B850 interaction would lead to the prediction of an experimentally not observed splitting of the B800 band for LH2 from *Rps. acidophila* (a dimerisation of the nonameric B800 arrangement of this species is obsolete). This was not the case, and apparently, it needs both a dimerisation of the B800 structure and the inclusion of the B800–B850 interaction to reproduce an observable splitting of the B800 band. It is worth noting that the splitting of the B800 transition energies due to the proposed dimerisation in the B800 BChl *a* assembly for *Alc. vinosum* also provides a straightforward explanation for the significant increase of the intracomplex disorder from  $130\text{ cm}^{-1}$  for *Rps. acidophila* to  $270\text{ cm}^{-1}$  for *Alc. vinosum*.

However, closer inspection of Fig. 7c reveals that the splitting of the B800 band that results from model 3 is clearly smaller than that observed experimentally. Comparison of the available high-resolution X-ray structures for LH2 from *Rps. acidophila* (Papiz et al. 2003) and *Rsp. molischianum* (Köpke et al. 1996) uncovers that the B800 and the B850 rings are rotated with respect to each other around the common symmetry axis by  $6^\circ$  in *acidophila* and  $10^\circ$  in *molischianum*. Thus for model 4, we increased this angle from  $6^\circ$  to  $10^\circ$  and obtain a very good reproduction of the ensemble spectrum of *Alc. vinosum*.

The reasonable agreement between the ensemble spectrum and the calculated spectrum based on model 4 tempts us to calculate the number and the relative intensities of the individual transitions that can be observed in the B800 band. The result is shown in Fig. 8 and is in very good agreement with the experimental observations. In particular for the relative intensities, as a function of the (relative) spectral position within the B800 band, we find experimentally that lines of high relative intensity are not observed at the blue edge of the B800 band. This is indicated by the dashed triangle in Fig. 8b. This trend is nicely reproduced by the model calculations.



**Fig. 8** **a** Comparison of the distributions of the number of B800 absorptions obtained from 60 single LH2 complexes (*black*) and from 100 simulated complexes (*red*). **b** Relative intensities of the B800 absorptions as a function of the relative spectral position within the

B800 band for 474 measured transitions (*black*) and 652 simulated transitions (*red*). The *dashed triangle* indicates a combination of parameters for which no data points are observed

## Conclusions

The results described here present a detailed structural explanation for the split B800 absorption band seen in the high-light LH2 complex from *Alc. vinosum*. Furthermore, the data shown above are fully consistent with the previous study by Niedzwiedzki et al. (2012) where it was shown that single LH2 rings from *Alc. vinosum* contain the split B800 absorption band and that this LH2 complex is larger than those from *Rps. acidophila* and *Rps. molischianum*, for which high-resolution X-ray structures are available. These conclusions are in line with single-complex spectroscopy described here, which reveals an increased number of absorption bands in the B800 spectral region with respect to the LH2 complexes from the other two species. For a model structure that reproduces the spectroscopic data, it turns out to be essential to take a dimerisation of the B800 BChl *a* molecules in a twelve-membered ring structure into account, where the mutual orientation of the B800 and B850 rings resembles that in *Rps. molischianum*. This dimerisation also implies that the LH2 apoprotein arrangement must be heterogeneous such that dimers of the standard LH2 subunits (see Fig. 7) in the form  $\alpha 1/\beta 1$ ,  $\alpha 2/\beta 2$  must alternate within the ring. This type of apoprotein heterogeneity is consistent with our recent study on the apoprotein composition of the LH2 complexes from *Alc. vinosum*. Interestingly, the B800 BChl *a* binding motifs present in the  $\alpha$  apoproteins in the B800–B850 LH2 from *Alc. vinosum* are molischianum-like in character but subtly different from each other. These  $\alpha$  apoproteins lack the N-terminal COO- $\alpha$ -Met B800 binding motif present in *Rps. acidophila* but do have the Asp residue that has been shown to bind the B800 BChl *a* in the B800–B850 LH2

complex in *Rps. molischianum* (Köpke et al. 1996). The  $\alpha$  apoprotein from *pucA1* just has a single Asp residue in the region responsible for binding the B800 BChl *a*, while the  $\alpha$  apoproteins from *pucA2* and *pucA3* have two Asp residues (see Fig. S2 in the supporting information). It is therefore tempting to suggest that the dimer of subunits required to explain the spectroscopic properties of this B800–B850 LH2 complex from *Alc. vinosum* contains one  $\alpha$  apoprotein with a single Asp residue in B800 BChl *a* binding site and one with the two Asp residues. The modelling work showing the relationship of this LH2 complex from *Alc. vinosum* to the LH2 complex from *Rps. molischianum* was carried out prior to the input of the information from the sequences of the LH2 apoproteins. It is therefore very satisfying that the data from both these parts of the study are so consistent.

**Acknowledgments** A. L. and J. K. thankfully acknowledge financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GRK1640) and the State of Bavaria within the initiative “Solar Technologies go Hybrid”. A.-M. C. is supported as a part of the Photosynthetic Antenna Research Centre (PARC), an Energy Frontier Research Centre funded by the DOE, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences under Award Number DE-SC 0001035. She carried out the Car: Bchl ratio study and the CD spectroscopy (with K.H. and S.K.). K. H. is supported by an EPSRC studentship. R. J. C. thanks both DOE and BBSRC for support.

## References

Brotosudarmo THP, Kunz R, Böhm P et al (2009) Single-molecule spectroscopy reveals that individual low-light LH2 complexes from *Rhodospseudomonas palustris* 2.1.6. Have a heterogeneous polypeptide composition. *Biophys J* 97:1491–1500



- Brunisholz RA, Zuber H (1992) Structure, function and organization of antenna polypeptides and antenna complexes from the 3 families of Rhodospirillaceae. *J Photochem Photobiol B* 15:113–140
- Cantor CR, Schimmel PR (2001) Biophysical chemistry. Part II: techniques for the study of biological structure and function, 12th edn. Freeman and Company, New York
- Cleary L, Chen H, Chuang C et al (2013) Optimal fold symmetry of LH2 rings on a photosynthetic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:8537–8542
- Cogdell RJ, Gall A, Köhler J (2006) The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes. *Q Rev Biophys* 39:227–324
- Davydov AS (1967) On the operator of exciton–phonon interaction. *Phys Status Solidi* 20:143–151
- de Caro C, Visschers RW, van Grondelle R et al (1994) Inter- and intraband energy transfer in LH2–antenna complexes of purple bacteria. A fluorescence line-narrowing and hole-burning study. *J Phys Chem* 98:10584–10590
- Gläser J, Overmann J (1999) Selective enrichment and characterization of *Roseospirillum parvum*, gen. nov and sp nov., a new purple nonsulfur bacterium with unusual light absorption properties. *Arch Microbiol* 171:405–416
- Hofmann C, Ketelaars M, Matsushita M et al (2003) Single-molecule study of the electronic couplings in a circular array of molecules: light-harvesting-2 complex from *Rhodospirillum molischanum*. *Phys Rev Lett* 90:013004
- Hofmann C, Aartsma TJ, Michel H et al (2004) Spectral dynamics in the B800 band of LH2 from *Rhodospirillum molischanum*: a single-molecule study. *N J Phys* 6:1–15
- Hu XC, Ritz T, Damjanovic A et al (2002) Photosynthetic apparatus of purple bacteria. *Q Rev Biophys* 35:1–62
- Hunter CN, Daldal F, Thurnauer MC et al (eds) (2009) The purple phototrophic bacteria. Springer, Dordrecht
- Imhof JF (1995) Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (eds) Anoxygenic photosynthetic bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Kereïche S, Bourinet L, Keegstra W et al (2008) The peripheral light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria have different ‘ring’ sizes. *FEBS Lett* 582:3650–3656
- Knox RS (1963) Theory of excitons. Academic Press, New York
- Koolhaas MH, van der Zwan G, van Mourik F et al (1997) Spectroscopy and structure of bacteriochlorophyll dimers. 1. Structural consequences of nonconservative circular dichroism spectra. *Biophys J* 72:1828–1841
- Köpke J, Hu X, Münke C et al (1996) The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800–850) from *Rhodospirillum molischanum*. *Structure* 4:581–597
- Lang E, Baier J, Köhler J (2006) Epifluorescence, confocal and total internal reflection microscopy for single-molecule experiments: a quantitative comparison. *J Microsc (Oxf, UK)* 222:118–123
- McDermott G, Prince SM, Freer AA et al (1995) Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature* 374:517–521
- McLuskey K, Prince SM, Cogdell RJ et al (2001) The crystallographic structure of the B800–820 LH3 light-harvesting complex from the purple bacteria *Rhodospseudomonas acidophila* strain 7050. *Biochemistry* 40:8783–8789
- Niedzwiedzki DM, Fuciman M, Kobayashi M et al (2011) Ultrafast time-resolved spectroscopy of the light-harvesting complex 2 (LH2) from the photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum*. *Photosynth Res* 110:49–60
- Niedzwiedzki DM, Bina D, Picken N et al (2012) Spectroscopic studies of two spectral variants of light-harvesting complex 2 (LH2) from the photosynthetic purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1817:1576–1587
- Papiz MZ, Prince SM, Howard T et al (2003) The structure and thermal motion of the B800–850 LH2 complex from *Rps. acidophila* at 2.0 (Å) over-circle resolution and 100 K: new structural features and functionally relevant motions. *J Mol Biol* 326:1523–1538
- Pfennig N (1967) Photosynthetic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 21:285–324
- Sauer K, Cogdell RJ, Prince SM et al (1996) Structure-based calculations of the optical spectra of the LH2 bacteriochlorophyll–protein complex from *Rhodospseudomonas acidophila*. *Photochem Photobiol* 64:564–576
- van Oijen AM, Ketelaars M, Köhler J et al (1999) Unraveling the electronic structure of individual photosynthetic pigment–protein complexes. *Science* 285:400–402
- van Oijen AM, Ketelaars M, Köhler J et al (2000) Spectroscopy of individual light-harvesting 2 complexes of *Rhodospseudomonas acidophila*: diagonal disorder, intercomplex heterogeneity, spectral diffusion, and energy transfer in the B800 band. *Biophys J* 78:1570–1577
- Walz T, Jamieson SJ, Bowers CM et al (1998) Projection structures of three photosynthetic complexes from *Rhodobacter sphaeroides*: LH2 at 6 Angstrom LH1 and Rc-LH1 at 25 Angstrom. *J Mol Biol* 282:833–845
- Wu HM, Reddy NR, Cogdell RJ et al (1996) A comparison of the LH2 antenna complex of three purple bacteria by hole burning and absorption spectroscopies. *Mol Cryst Liq Cryst Sci Technol A* 291:163–173
- Yurkov VV, Beatty JT (1998) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:695–724

**Supporting Information:****The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochromatium vinosum***

Alexander Löhner<sup>1</sup>, Anne-Marie Carey<sup>2</sup>, Kirsty Hacking<sup>2</sup>, Nichola Picken<sup>2</sup>, Sharon Kelly<sup>2</sup>,  
Richard Cogdell<sup>2</sup>, Jürgen Köhler<sup>1</sup>

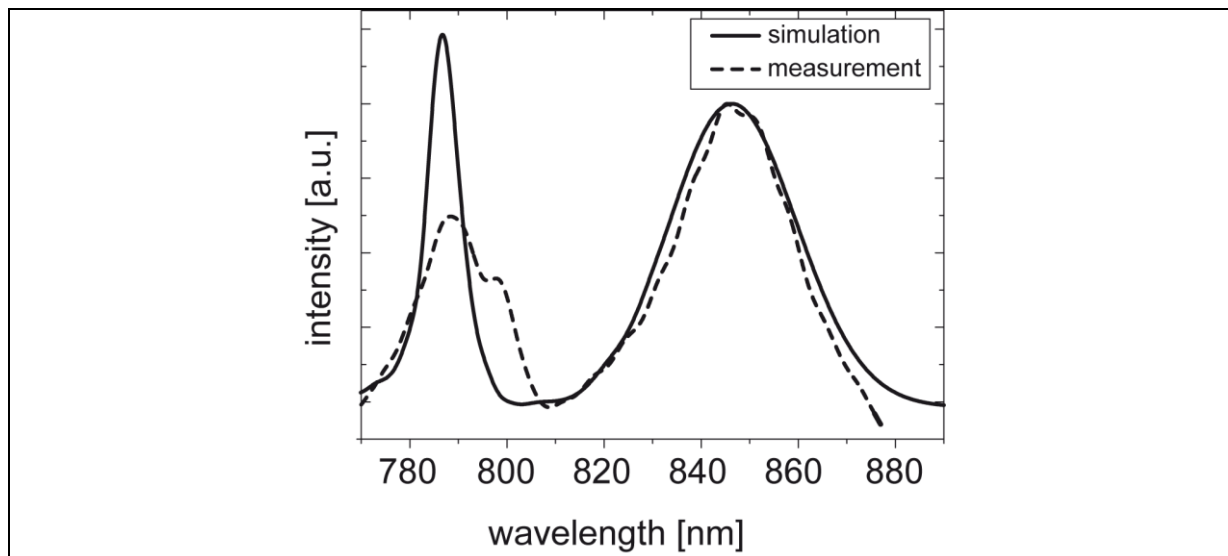
<sup>1</sup>Experimental Physics IV and Bayreuth Institute for Macromolecular Research (BIMF),  
University of Bayreuth, Germany

<sup>2</sup>Institute of Molecular, Cell & Systems Biology, College of Medical Veterinary and Life  
Sciences, University of Glasgow, United Kingdom

**Files in this Data Supplement:**

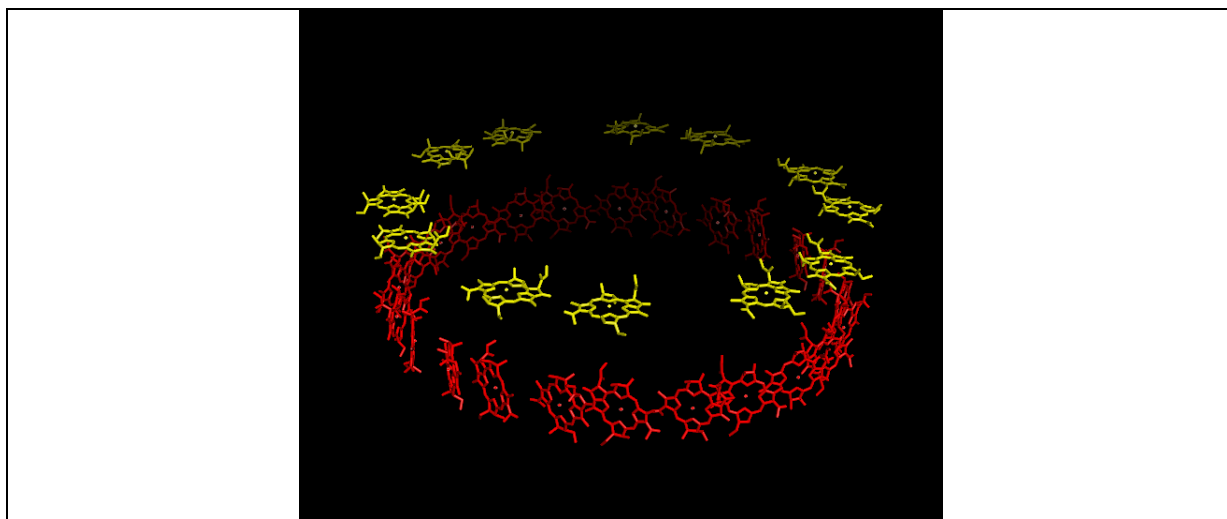
1. Simulated spectrum of our model neglecting the dimerisation within the B800 ring
2. Movie of the three-dimensional structure of our proposed model
3. Comparison of B800 Bchl *a* binding regions in the primary sequences of the  $\alpha$  apoproteins

## 1. Simulated spectrum of our model neglecting the dimerisation within the B800 ring



*Fig. S1: Comparison of the smoothed fluorescence-excitation sum spectrum from 69 individual complexes (dashed line) with the result of the sum of 1000 simulated individual spectra (full line). In this model we use an equidistant distribution of 12 B800 BChl *a* molecules over a ring including the interaction between the B800 and B850 BChl *a* molecules.*

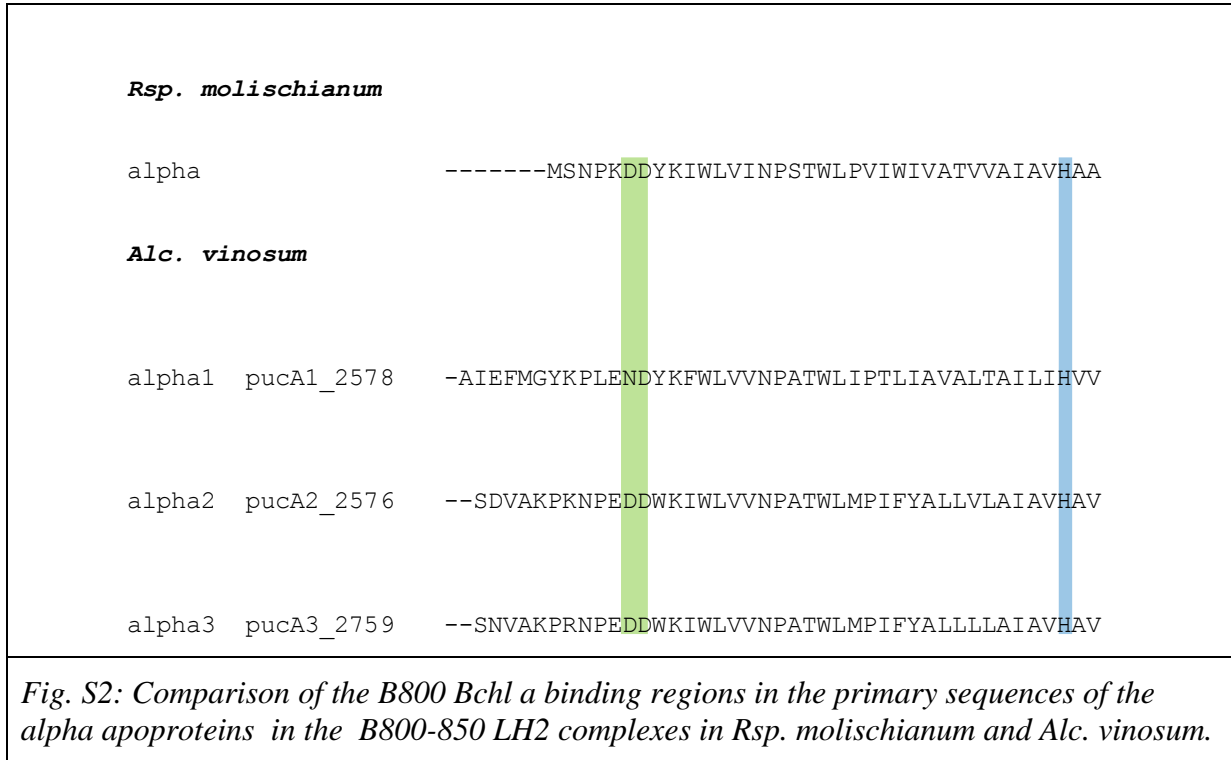
## 2. Movie of the three-dimensional structure of our proposed model



*Fig. S2: A video of the three-dimensional model of the proposed structure was made using PyMol.*



### 3. Comparison of B800 Bchl *a* binding regions in the primary sequences of the $\alpha$ apoproteins



The blue line highlights the conserved His residue (against which all the sequences are aligned in the sequence comparison figure) that is liganded to the central Mg<sup>++</sup> atom in the bacteriochlorin ring of one of the B850 Bchl *a* molecules. The Asp(D) residue that in *Rps. molischianum* is liganded to the central Mg<sup>++</sup> in the bacteriochlorin ring of the B800 Bchl *a* molecule is at position -28. It and the residue at position -29 are highlighted in green. Note the difference between alpha1 pucA1 and the other two *Alc. vinosum* genes. Alpha1 pucA1 only has a single D while the others have two. There is also another key difference between these two groups of genes. In the alpha apoprotein sequences that share the presence of two neighbouring Asp residues in the B800 binding region (positions -28 and -29), there is also an Asn(N) residue at position -32, and therefore, the capability of a strong H bond between this Asn at -32 and D residue at -29 as is seen in the crystal structure of the LH2 complex from

*Rsp. molischianum*. In the alpha apoprotein sequence that has only ONE Asp residue (alpha 1pucA1), there is a Pro (P) residue in place of the Asn residue at position -32. Proline does NOT form H bonds so alpha 1 pucA1 lacks the capability of forming a strong H bond between the residues at -32 and -29. These differences must be the origin of the different B800 Bchl *a* binding sites in the two different subunits required to explain the split B800 absorption band.



## **P2: Fluorescence-excitation and Emission Spectroscopy on Single FMO Complexes**

von Alexander Löhner, Khuram Ashraf,  
Richard J. Cogdell und Jürgen Köhler

Veröffentlicht in  
Scientific Reports 2016, **6**, S. 31875-81.  
(DOI: 10.1038/srep31875)


lizenziert unter einer Creative Commons Lizenz:

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Copyright © 2016, die Autoren



# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Fluorescence-excitation and Emission Spectroscopy on Single FMO Complexes

Alexander Löhner<sup>1</sup>, Khuram Ashraf<sup>2</sup>, Richard J. Cogdell<sup>2</sup> & Jürgen Köhler<sup>1</sup>

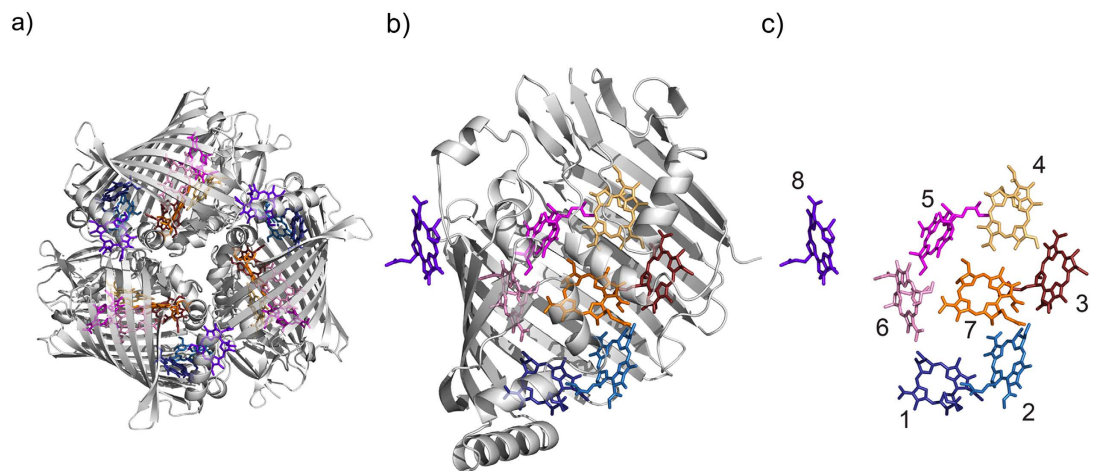
Received: 18 April 2016  
Accepted: 29 July 2016  
Published: 22 August 2016

In green-sulfur bacteria sunlight is absorbed by antenna structures termed chlorosomes, and transferred to the RC via the Fenna-Matthews-Olson (FMO) complex. FMO consists of three monomers arranged in  $C_3$  symmetry where each monomer accommodates eight Bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*) molecules. It was the first pigment-protein complex for which the structure has been determined with high resolution and since then this complex has been the subject of numerous studies both experimentally and theoretically. Here we report about fluorescence-excitation spectroscopy as well as emission spectroscopy from individual FMO complexes at low temperatures. The individual FMO complexes are subjected to very fast spectral fluctuations smearing out any possible different information from the ensemble data that were recorded under the same experimental conditions. In other words, on the time scales that are experimentally accessible by single-molecule techniques, the FMO complex exhibits ergodic behaviour.

Photosynthesis is one of the most important energy conversion processes on Earth. The generic principle of photosynthesis is that sunlight is absorbed by antenna complexes and then this energy is transferred efficiently to the photochemical reaction centre that acts as a transducer. Typically, both the antennae and the reaction centre (RC) are pigment-protein complexes accommodating a number of pigments that are properly positioned with respect to each other by the interaction with a protein scaffold. For many of these complexes the structural arrangement has been elucidated with high resolution<sup>1–9</sup>, stimulating enormous interest in the investigation of the structure-function relationships of these systems<sup>10</sup>. Next to ultra-fast time-resolved<sup>11–15</sup> and high-resolution spectroscopy<sup>16–23</sup> single-molecule techniques in particular have contributed tremendously to our current understanding of the electronic structure of those pigment-protein complexes<sup>24–30</sup>.

In green-sulfur bacteria sunlight is absorbed by antenna structures termed chlorosomes (a unique case where no proteins are involved) and transferred to the RC via the Fenna-Matthews-Olson (FMO) complex, which is thought to play an important role in unidirectional energy transfer<sup>31</sup>. As a matter of fact the FMO complexes of the bacterial species *Chlorobium limicola* and *Prosthecochloris aestuarii* were the first photosynthetic antenna complexes for which a high-resolution x-ray structure was determined<sup>32,33</sup>. Meanwhile the structure of the FMO complex from the species *Chlorobaculum (Cba.) tepidum* also became available<sup>34</sup>, and resembles closely the former one. Accordingly, this FMO complex consists of three identical subunits that are arranged in  $C_3$  symmetry with respect to each other, such that the  $C_3$  axis is perpendicular to the membrane axis, Fig. 1a. Each subunit contains 7 closely interacting bacteriochlorophyll (BChl) *a* molecules and an additional 8<sup>th</sup> BChl *a* pigment that is located in a region directed towards the chlorosome<sup>35</sup>, Fig. 1b,c. Numerous studies including linear spectroscopy, linear and circular dichroism, hole burning, transient absorption, and photon echo spectroscopy flanked by theoretical work and computer simulations have been performed on this system (reviewed in ref. 31), making this complex one of the most widely studied pigment-protein complexes so far. Unfortunately, the site energies of the pigments cannot be deduced directly from the ensemble absorption spectrum which features rather broad bands. As a consequence of this, the available information about the excitonic coupling between the BChl *a* pigments is based on theoretical calculations and/or numerical fits of the optical spectra, and the outcome is sensitive to the choice of the input parameters. Although the models discussed differ slightly in their details there is agreement that the electronic coupling between the seven BChl *a* in close proximity leads to the formation of exciton states

<sup>1</sup>Experimental Physics IV and Bayreuth Institute for Macromolecular Research (BIMF), University of Bayreuth, Germany. <sup>2</sup>Institute of Molecular, Cell & Systems Biology, College of Medical Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, United Kingdom. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.K. (email: juergen.koehler@uni-bayreuth.de)



**Figure 1. Structure of the FMO complex.** (a) Top-view of the trimeric FMO complex from *Chlorobaculum tepidum*. (b) Side view of the BChl *a* arrangement within one monomer unit. For clarity the phytol tails have been omitted. (c) Same as (b) without the protein scaffold. The delocalisation of the excitation over two pigments is indicated by similar colour tones (violet, blue, orange). Structural data taken from www.rcsb.org (protein code 3ENI).

that are delocalised over only a few monomers<sup>36</sup>. Upon excitation the decay from the highest to the lowest exciton state occurs on a (sub-)picosecond time scale, and the population can be transferred either by a few big steps or by many small steps involving all intermediate exciton states. Finally, the excitation energy leaves the FMO complex en route to the RC via BChl *a* number “3” (“exit pigment”), see Fig. 1b,c.

Recently, by applying 2D spectroscopy, long-lived quantum coherences among the electronic excitations of the pigments in the FMO complex have been observed<sup>37,38</sup>, and it has been argued that these reflect correlations of the site energy fluctuations. A technique that might shed some light on this debate is single-molecule spectroscopy, because, in general, the broadening of the spectra due to averaging over sample heterogeneities can be avoided. Indeed, there is a demand for experiments on single FMO complexes in the community and challenging experimental schemes have been proposed recently<sup>39</sup>. Here we present the fluorescence-excitation and emission spectra from individual FMO complexes from the species *Cba. tepidum* and find that these complexes behave ergodically on the experimental accessible timescales.

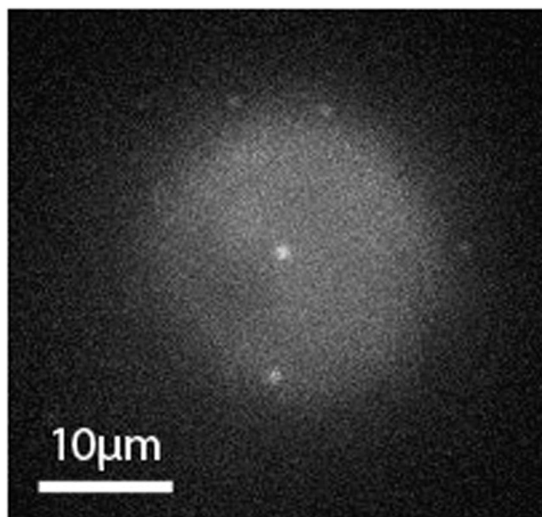
## Results

In order to select a single well-separated FMO for fluorescence-excitation spectroscopy we recorded a wide-field fluorescence image from the sample. An example for such an image is shown in Fig. 2. It features a few diffraction-limited bright spots, each corresponding to an individual FMO complex.

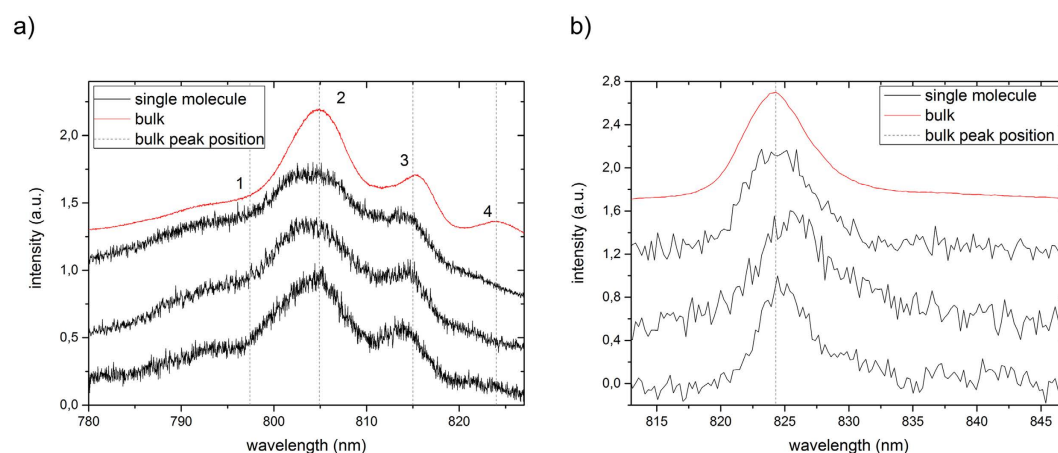
Evidence that we are dealing with a single FMO complex stems from the following observations: First, for 320 pM concentration and a diffraction-limited excitation volume for the laser spot this yields a probability of 0.15 for finding a single FMO within this spot. Given that the FMO complexes have no tendency to aggregate, the probability to find two FMOs within the same volume is already less than 0.02. Based on these numbers one expects an average distance between two FMO complexes of about 15  $\mu\text{m}$ , which is consistent with the widefield images of the samples. Second, for a single complex the emission rate  $n$  corresponding to the number of emitted photons per second is given by  $n = \frac{\sigma}{A} \cdot \frac{P}{h\nu} \cdot \Phi_F$ . Here  $\sigma$  denotes the absorption cross section,  $A$  the area of the focal spot,  $P$  the incident laser power,  $h\nu$  the photon energy and  $\Phi_F$  the fluorescence quantum yield. Inserting,  $\sigma = 5.88 \times 10^{-20} \text{ m}^2$  (calculated from the extinction coefficient =  $154 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ <sup>40</sup>),  $A = 6.36 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ ,  $P = 80 \text{ nW}$ ,  $h\nu = 2.48 \times 10^{-19} \text{ J}$ , and  $\Phi_F = 0.95$ , we expect a fluorescence emission rate of about 29,000 photons/s. From previous work we know that the collection efficiency of our low-temperature microscope is about 2%, which yields 600 counts/s for the detected rate from a single FMO, in agreement with our observations.

Figure 3 compares the low-temperature static optical spectra of FMO from *Cba. tepidum* for a bulk sample and three different single complexes. In accordance with absorption spectra in the literature, the fluorescence-excitation spectrum from an ensemble (Fig. 3a, red line) features four bands, here labelled 1–4 in the order of increasing wavelength. Those can be characterised by four Gaussians (for details see experimental section) that decrease in widths going from band 1 to band 4, see Table 1. The corresponding spectrum from the single FMO complexes (Fig. 3a, black lines) in shape resemble closely the ensemble spectrum, with the exception that band 4 shows a lower relative intensity with respect to the ensemble spectrum and is sometimes hard to detect. In order to verify whether the single complex spectrum is affected by the excitation intensity we repeated the experiment for one single complex lowering and raising the excitation intensity by a factor of 5 and 4 respectively. The lower excitation intensity corresponds to the lowest intensity for which we can record an excitation spectrum. For these different excitation intensities we did not find a significant variation of the spectral profile.

Figure 3b displays the low-temperature emission spectra from three other individual FMO complexes together with the emission spectrum from a bulk sample. The samples have been excited at 805 nm and the excitation intensity was  $250 \text{ W/cm}^2$ . Again we find a close resemblance between the ensemble and the single complex



**Figure 2.** Widefield image of a sample with an FMO concentration of 320 pM. For excitation the output of the laser was wobbled between 800 nm and 809 nm at a rate of  $0.3 \text{ s}^{-1}$ . The excitation intensity was  $175 \text{ W/cm}^2$ , and the acquisition time was 15 s.



**Figure 3.** Low-temperature spectra (1.2 K) of the FMO complex from *Chlorobaculum tepidum*.

(a) Fluorescence-excitation spectra of FMO from an ensemble (red) and three different single complexes (black). All spectra were recorded with an excitation intensity of  $12.5 \text{ W/cm}^2$ . The dashed vertical lines indicate the peak positions of the four Gaussians that have been used for fitting the bulk spectrum. For better comparison the spectra have been normalised, and are offset with respect to each other. The typical signal strength at the maximum amounts to 400 to 600 counts per second. Each spectrum corresponds to an average of 200 individual spectra recorded with an acquisition time of 19 s each. (b) Fluorescence emission spectra from an ensemble (red) and three different individual FMO complexes (black). The excitation wavelength was 805 nm, and the excitation intensity was  $250 \text{ W/cm}^2$ . For better comparison the spectra have been normalised, and are offset with respect to each other. Each spectrum corresponds to an average of 400 individual spectra recorded with an acquisition time of 5 s each.

spectra. The emission spectrum features a single band that can be characterised by a Gaussian shape with a width of about  $80 \text{ cm}^{-1}$  (FWHM). For comparison, with one FMO complex we also recorded an emission spectrum with a reduced excitation intensity of  $50 \text{ W/cm}^2$ . This resulted in an extremely noisy emission spectrum without significant change of its width. Details concerning the emission spectra are summarised in Table 2.

## Discussion

The general finding is that there is no observable significant difference in the peak positions found in the linear optical spectra recorded for an ensemble or individual FMO complexes. We do, however, find a slight variation in the widths of these bands between individual complexes. Heating effects by the laser as observed for example in ref. 41 in the past as an origin of the line broadening can be excluded. In their work the samples were excited with pulses of 2 ps duration at  $1 \text{ mJ/cm}^2$  corresponding to a peak excitation intensity of  $500 \text{ MW/cm}^2$ .



		Bulk	complex 1	complex 2	complex 3
Peak 1	position (nm)	797.4 ± 0.5	795 ± 2	794 ± 2	796 ± 2
	FWHM (cm <sup>-1</sup> )	355 ± 8	490 ± 15	260 ± 15	316 ± 15
Peak 2	position (nm)	804.9 ± 0.5	804.8 ± 0.5	804.6 ± 0.5	804.5 ± 0.5
	FWHM (cm <sup>-1</sup> )	99 ± 2	160 ± 5	152 ± 5	133 ± 5
Peak 3	position (nm)	814.9 ± 0.5	814.5 ± 0.5	814.2 ± 0.5	814.0 ± 0.5
	FWHM (cm <sup>-1</sup> )	71 ± 2	88 ± 5	100 ± 5	75 ± 5
Peak 4	position (nm)	824.0 ± 0.5			
	FWHM (cm <sup>-1</sup> )	52 ± 2			

**Table 1. Spectral positions and bandwidths observed in the fluorescence-excitation spectra displayed in Fig. 3a.** The spectral peaks have been numbered 1–4 in the order of increasing wavelength. For the single-complex spectra a meaningful analysis of the positions and widths of peak 4 is prevented by the low signal-to-noise ratio.

	Bulk	complex 4	complex 5	complex 6
position (nm)	824.4 ± 0.6	824.6 ± 0.8	826.0 ± 0.8	825.1 ± 0.8
FWHM (cm <sup>-1</sup> )	97.0 ± 1.5	99 ± 7	114 ± 7	72 ± 7

**Table 2. Spectral positions and bandwidths observed in the emission spectra displayed in Fig. 3b.**

The concomitant rise in temperature was then estimated to be about 10 K if the energy is distributed over a group of seven BChl *a* molecules and 500 K if the energy is concentrated, for example by annihilation processes, on a single BChl *a* molecule. Here the highest excitation intensity used is 250 W/cm<sup>2</sup>, i.e. more than 6 orders of magnitude lower than in the previous study. The widths of these bands, as predicted by theoretical work<sup>42</sup>, are determined mainly by the relaxation of the exciton states and/or fast fluctuations of the site energies of the individual pigments. Superimposed on this major contribution to the line-widths is a small additional broadening due to the heterogeneities (static and/or dynamic) between the complexes. Relaxation dynamics as the dominant origin of the line-widths is in line with the observation that the widths of the absorption bands decrease upon going from high- to low energy in the spectral positions of these bands. This is because the higher energy exciton states have more relaxation pathways available, which therefore accelerates their decay with respect to the low energy exciton states. The observed bandwidths of 70–400 cm<sup>-1</sup> provide a lower limit for the relaxation times of 10 and 70 fs, which is in agreement with previous work<sup>43,44</sup>. Similarly, previous theoretical work predicts fluctuations of the site energies of the individual pigments on the same time scale<sup>42,45,46</sup>. Obtaining a spectrum from a single FMO complex requires that the signal is collected for a finite dwell time, here 10 ms, in order to achieve a sufficient signal-to-noise ratio. Hence, a spectrum recorded from an individual FMO complex corresponds to a time-averaged spectrum, where the period over which the signal has been accumulated is very long with respect to the (predicted) time scale of the energetic fluctuations. In other words: A single FMO complex behaves ergodically on the experimentally accessible time scale. However, this single molecule study does reveal an important basic property of the internal energy transfer relaxation processes that take place within FMO, and it clarifies what kind of experiments with single FMO complexes can be done at all and what the relevant timescales are.

## Methods

**Sample preparation.** FMO was prepared from cells of the thermophilic green sulphur bacterium *Cba. tepidum*. A strain containing a His-tagged version of the green sulphur bacterium *Cba. tepidum* reaction centre (RC) was a gift from the group of Prof. Oh-Oka<sup>47</sup>. *Cba. tepidum* was grown anaerobically in the light in modified Pfennig's medium<sup>48</sup>, known as liquid CL media<sup>47,49</sup>. Glycerol stocks of the *Cba. tepidum* cells were inoculated in CL media and grown in 1.2 L air tight bottles that were allowed to go anaerobic by leaving them in the dark for 12 hours overnight. Cells were then grown at 43 °C under illumination for 2–3 days, at a light intensity of approximately 30 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, before harvesting by centrifugation (12,000 × g). The RC was purified as described in ref. 50 with the exception of the cell breakage, which was carried out by using a cell disrupter (25 psi). At the stage of nickel affinity chromatography a high salt wash with >500 mM NaCl elutes FMO. This dilute solution of FMO was then purified by ion exchange chromatography on Whatman DE52 cellulose. FMO eluted between 90–200 mM NaCl. It was then concentrated by ultrafiltration with a 50 kDa MWCO membrane (Minicon concentrator, Millipore) and further purified, in 20 mM Tris HCl, pH8, by size exclusion chromatography on a Sepharose S-200 (GE Healthcare) column<sup>51</sup>.

The FMO complexes were stored in a 20 mM Tris A buffer (pH 8.0 at room temperature) at –80 °C until they were used. For single-molecule measurements the samples were diluted within three steps in a 20 mM Tris A buffer to a concentration of 320 pM. In the last dilution step the pre-diluted sample was mixed with the same amount of pure glycerol to avoid crystallisation at low temperatures. A small drop (0.5 μl) of this solution was seeped onto a cleaned SiO<sub>2</sub> plate before the drop was covered with a microscope coverslip to get a flat sample surface. The prepared sample was put immediately into the cryostat, pre-filled with liquid nitrogen to flash freeze the sample before it was cooled down to 1.2 K. For bulk measurements the sample preparation was identical, except for the FMO concentration which was 800 μM.

**Fluorescence-Excitation Spectroscopy.** For the fluorescence-excitation experiments the samples are excited with the output from a titan-sapphire-laser (3900 S, Spectra Physics) that was pumped by a Nd:YVO<sub>4</sub> laser (Millenia Vs, Spectra Physics). The wavelength is varied between 770 nm and 827 nm by turning the birefringent filter with a stepper motor (Actuator 850 F, Motion Controller MM4005, Newport). The accuracy and the reproducibility of the wavelength variation is 1 cm<sup>-1</sup>, as verified with a wavemeter (WaveMaster, Coherent). The excitation light passes a home-build fluorescence microscope and is focussed by an objective (Mikrothek, NA = 0.85) that is mounted inside the cryostat to a diffraction-limited spot of 0.9 μm in diameter. For the selection of an individual complex the microscope is operated in wide-field mode and the laser wavelength is wobbled between 800 nm and 809 nm. The emission from the sample is collected by the same objective, transmitted through two band-pass filters (LP830, AHF Analysetechnik) for suppressing residual laser light, and detected with a CCD-camera (iKon, Andor). From the widefield image (Fig. 2) a spatially well separated FMO complex is selected and the microscope is switched to confocal mode. A similar setup is described in great detail in refs 52,53. The signal passes the bandpass filters mentioned above and is registered with a single-photon counting avalanche photodiode (APD) (SPCM-AQR-16, Perkin Elmer). During acquisition of the excitation spectra, the intensity of the laser is recorded as a function of the wavelength using a powermeter (LaserMate-Q, Coherent), and all spectra are corrected for variations of the laser intensity.

Since in the literature the FMO spectra are mostly given on a wavelength scale we have chosen to display the spectra in Fig. 3 on a wavelength scale. However, for fitting the data we used an energy equivalent axis (wavenumbers) on the abscissa and took the required intensity correction into account for the conversion of the spectral peak positions from wavenumbers to the corresponding wavelengths.

**Emission Spectroscopy.** For emission spectroscopy the sample is excited at 805 nm, and the light from the sample is guided through a spectrometer (Acton 250, Princeton Instruments) that accommodates a mirror and a grating (300 lines/mm, blaze 1000 nm). For selecting a single FMO complex the setup is operated in wide-field mode and the emission from the sample is directed onto a CCD-camera (iKon, Andor) via the mirror in the spectrometer. From the widefield image a single FMO complex is selected, the microscope is switched to confocal mode as before, and the mirror in the spectrometer is replaced by the grating. For registering the spectra with the CCD, 16 pixel were binned vertically to reduce the read-out noise. For a single complex 400 spectra were recorded successively with a dwell time of 5 s, which yields a total acquisition time of 30 minutes. Since the individual spectra did not feature any fluctuations on these time scales we display the sum spectrum in Fig. 3b.

## References

- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* **318**, 618 (1985).
- Ermiler, U., Fritzsche, G., Buchanan, S. K. & Michel, H. Structure of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.65 Å resolution: cofactors and protein-cofactor interactions: Structure. *Structure* **2**, 925–936 (1994).
- Papiz, M. Z., Prince, S. M., Howard, T. D., Cogdell, R. J. & Isaacs, N. W. The Structure and Thermal Motion of the B800-850 LH2 Complex from *Rps. acidophila* at 2.0 (Å) Over-Circle Resolution and 100 K: New Structural Features and Functionally Relevant Motions. *J. Mol. Biol.* **326**, 1523–1538 (2003).
- McDermott, G. *et al.* Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature* **374**, 517–521 (1995).
- Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J. & Iwata, S. Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center. *Science* **303**, 1831–1838 (2004).
- Löll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. & Biesiadka, J. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* **438**, 1040–1044 (2005).
- Zouni, A. *et al.* Crystal Structure of Photosystem II From *Synechococcus Elongatus* at 3.8 Å Resolution. *Nature* **409**, 739–743 (2001).
- Jordan, P. *et al.* Three-Dimensional Structure of Cyanobacterial Photosystem I at 2.5 Å Resolution. *Nature* **411**, 909–917 (2001).
- Amunts, A., Drory, O. & Nelson, N. The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* **447**, 58–63 (2007).
- Sauer, K. *et al.* Structure based calculations of the optical spectra of the LH2 bacteriochlorophyll-protein complex from *Rhodospseudomonas acidophila*. *Photochem. Photobiol.* **64**, 564–576 (1996).
- Zigmantas, D. *et al.* Two-Dimensional Electronic Spectroscopy of the B800-B820 Light-Harvesting Complex. *PNAS* **103**, 12672–12677 (2006).
- Collini, E. *et al.* Coherently wired light-harvesting in photosynthetic marine algae at ambient temperature. *Nature* **463**, 644–647 (2010).
- Harel, E. & Engel, G. S. Quantum coherence spectroscopy reveals complex dynamics in bacterial light-harvesting complex 2 (LH2). *PNAS* **109**, 706–711 (2012).
- Fidler, A. F., Singh, V. P., Long, P. D., Dahlberg, P. D. & Engel, G. S. Time Scales of Coherent Dynamics in the Light-Harvesting Complex 2 (LH2) of *Rhodobacter sphaeroides*. *JPC Let.* **4**, 1404–1409 (2013).
- Brixner, T. *et al.* Two-dimensional spectroscopy of electronic couplings in photosynthesis. *Nature* **434**, 625–628 (2005).
- Purchase, R. & Völker, S. Spectral hole burning: examples from photosynthesis. *Photosynth. Res.* **101**, 245–266 (2009).
- Freiberg, A., Rätsep, M., Timpmann, K., Trinkunas, G. & Woodbury, N. W. Self-Trapped Excitons in LH2 Antenna Complexes between 5 K and Ambient Temperature. *JPC B* **107**, 11510–11519 (2003).
- Rätsep, M. & Freiberg, A. Resonant Emission From the B870 Exciton State and Electron-Phonon Coupling in the LH2 Antenna Chromoprotein. *CPL* **377**, 371–376 (2003).
- Reddy, N. R. S., Small, G. J., Seibert, M. & Picorel, R. Energy transfer dynamics of the B800-B850 antenna complex of *Rhodobacter sphaeroides*: a hole burning study. *CPL* **181**, 391–399 (1991).
- Wu, H. M., Reddy, N. R. S. & Small, G. J. Direct observation and hole burning of the lowest exciton level (B870) of the LH2 antenna complex of *Rhodospseudomonas acidophila* (strain 10050). *JPC B* **101**, 651–656 (1997).
- Wu, H. M., Rätsep, M., Jankowiak, R., Cogdell, R. J. & Small, G. J. Hole burning and absorption studies of the LH1 antenna complex of purple bacteria: Effects of pressure and temperature. *JPC B* **102**, 4023–4034 (1998).
- Caro, C. de., Visschers, R. W., van Grondelle, R. & Völker, S. Spectral hole burning in pigment protein complexes of photosynthetic bacteria. *J. Lumin.* **58**, 149–153 (1994).

23. Creemers, T. M., Caro, C. de., Visschers, R. W., van Grondelle, R. & Völker, S. Spectral hole burning and fluorescence line narrowing in subunits of the light harvesting complex LH1 of purple bacteria. *JPC B* **103**, 9770–9776 (1999).
24. Cogdell, R. J., Gall, A. & Köhler, J. The architecture and function of purple bacteria: from single molecules to *in vivo* membranes. *Q. Rev. Biophys.* **39**, 227–324 (2006).
25. van Oijen, A. M., Ketelaars, M., Köhler, J., Aartsma, T. J. & Schmidt, J. Unraveling the electronic structure of individual photosynthetic pigment-protein complexes. *Science* **285**, 400–402 (1999).
26. Jelezko, F., Tietz, C., Gerken, U., Wrachtrup, J. & Bittl, R. Single molecule spectroscopy on photosystem I pigment protein complexes. *JPC B* **104**, 8093–8096 (2000).
27. Richter, M. F. *et al.* Refinement of the x-ray structure of the RC LH1 core complex from *Rhodospseudomonas palustris* by single-molecule spectroscopy. *PNAS* **104**, 20280–20284 (2007).
28. Brecht, M., Hussels, M., Schlodder, E. & Karapetyan, N. V. Red antenna states of Photosystem I trimers from *Arthrospira platensis* revealed by single-molecule spectroscopy. *BBA-Bioenergetics* **1817**, 445–452 (2012).
29. Krüger, T. P. J., Wientjes, E., Croce, R. & van Grondelle, R. Conformational switching explains the intrinsic multifunctionality of plant light-harvesting complexes. *PNAS* **108**, 13516–13521 (2011).
30. Hildner, R., Brinks, D., Nieder, J. B., Cogdell, R. J. & van Hulst, N. F. Quantum Coherent Energy Transfer over Varying Pathways in Single Light-Harvesting Complexes. *Science* **340**, 1448–1451 (2013).
31. Milder, M., Brüggemann, B., van Grondelle, R. & Herek, J. Revisiting the optical properties of the FMO protein. *Photosynth. Res.* **104**, 257–274 (2010).
32. Fenna, R. E. & Matthews, B. W. Chlorophyll arrangement in a bacteriochlorophyll protein from *Chlorobium limicola*. *Nature* **258**, 573–577 (1975).
33. Matthews, B. W., Fenna, R. E., Bolognesi, M. C., Schmid, M. F. & Olson, J. M. Structure of a bacteriochlorophyll a-protein from the green photosynthetic bacterium *Prosthecochloris aestuarii*. *J. Mol. Biol.* **131**, 259–285 (1979).
34. Li, Y.-F., Zhou, W., Blankenship, R. E. & Allen, J. P. Crystal structure of the bacteriochlorophyll a protein from *Chlorobium tepidum*. *J. Mol. Biol.* **271**, 456–471 (1997).
35. Ben-Shem, A., Frolow, F. & Nelson, N. Evolution of photosystem I – from symmetry through pseudosymmetry to asymmetry. *FEBS Letters* **564**, 274–280 (2004).
36. Louwe, R. J. W., Vrieze, J., Hoff, A. J. & Aartsma, T. J. Toward an Integral Interpretation of the Optical Steady-State Spectra of the FMO-Complex of *Prosthecochloris aestuarii*. 2. Exciton Simulations. *JPC B* **101**, 11280–11287 (1997).
37. Engel, G. S. *et al.* Evidence for Wavelike Energy Transfer Through Quantum Coherence in Photosynthetic Systems. *Nature* **446**, 782–786 (2007).
38. Cheng, Y.-C. & Fleming, G. R. Dynamics of Light Harvesting in Photosynthesis. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **60**, 241–262 (2009).
39. Tao, M.-J., Ai, Q., Deng, F.-G. & Cheng, Y.-C. Proposal for probing energy transfer pathway by single-molecule pump-dump experiment. *Scientific Reports* **6**, 27535 (2016).
40. Blankenship, R. E., Olson, J. M. & Miller, M. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995), pp. 399–435.
41. Gulbinas, V. *et al.* Singlet–Singlet Annihilation and Local Heating in FMO Complexes. *J. Phys. Chem.* **100**, 17950–17956 (1996).
42. Olbrich, C. *et al.* From atomistic modeling to excitation transfer and two-dimensional spectra of the FMO light-harvesting complex. *JPC B* **115**, 8609–8621 (2011).
43. Savikhin, S., Zhou, W., Blankenship, R. E. & Struve, W. S. Femtosecond energy transfer and spectral equilibration in bacteriochlorophyll a-protein antenna trimers from the green bacterium *Chlorobium tepidum*. *Biophys. J.* **66**, 110–114 (1994).
44. Savikhin, S. & Struve, W. S. Ultrafast Energy Transfer in FMO Trimers from the Green Bacterium *Chlorobium tepidum*. *Biochemistry* **33**, 11200–11208 (1994).
45. Wang, X., Ritschel, G., Wüster, S. & Eisfeld, A. Open quantum system parameters from molecular dynamics. *arXiv* (2015).
46. Cho, M., Vaswani, H. M., Brixner, T., Stenger, J. & Fleming, G. R. Exciton Analysis in 2D Electronic Spectroscopy. *JPC B* **109**, 10542–10556 (2005).
47. Azai, C. *et al.* A heterogeneous tag-attachment to the homodimeric type I photosynthetic reaction center core protein in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*. *BBA* **1807**, 803–812 (2011).
48. Wahlund, T. M., Woese, C. R., Castenholz, R. W. & Madigan, M. T. A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot springs. *Chlorobium tepidum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **156**, 81–90 (1991).
49. Azai, C., Tsukatani, Y., Harada, J. & Oh-oka, H. Sulfur oxidation in mutants of the photosynthetic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* devoid of cytochrome c-554 and SoxB. *Photosynth. Res.* **100**, 57–65 (2009).
50. Oh-oka, H., Kamei, S., Matsubara, H., Iwaki, M. & Itoh, S. Two molecules of cytochrome c function as the electron donors to P840 in the reaction center complex isolated from a green sulfur bacterium, *Chlorobium tepidum*. *FEBS Letters* **365**, 30–34 (1995).
51. Ashraf, K. U. D. University of Glasgow (2014).
52. Lang, E., Baier, J. & Köhler, J. Epifluorescence, confocal and total internal reflection microscopy for single-molecule experiments: a quantitative comparison. *J. Microsc.* **222**, 118–123 (2006).
53. Hofmann, C., Aartsma, T. J., Michel, H. & Köhler, J. Spectral dynamics in the B800 band of LH2 from *Rhodospirillum rubrum*: A single-molecule study. *New J. Phys.* **6**, 1–15 (2004).

## Acknowledgements

A.L. and J.K. thankfully acknowledge financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GRK1640) and the State of Bavaria within the initiative “Solar Technologies go Hybrid”. RJC and KA were supported as part of the Photosynthetic Antenna Research Center (PARC), an Energy Frontier Research Center funded by the U.S. Department of Energy, Office of Science, Basic Energy Sciences under Award #DE-SC0001035 and by the BBSRC grant no. BB/K00010179/1.

## Author Contributions

A.L. conducted the experiments, analysed the data and helped to write the paper. K.A. prepared the samples, R.J.C. supervised sample preparations and designed research. J.K. supervised the experiments, designed research and wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

## Additional Information

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Löhner, A. *et al.* Fluorescence-excitation and Emission Spectroscopy on Single FMO Complexes. *Sci. Rep.* **6**, 31875; doi: 10.1038/srep31875 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016



**P3: Structural variations in chlorosomes from wild-type and a *bchQR* mutant of *Chlorobaculum tepidum* revealed by single-molecule spectroscopy**

von Lisa M. Günther, Alexander Löhner  
Carolin Reiher, Tenzin Kunsel, Thomas L. C. Jansen, Marcus Tank,  
Donald A. Bryant, Jasper Knoester und Jürgen Köhler

Zur Publikation eingereicht bei  
The Journal of Physical Chemistry B  
(März 2018)



# **Structural variations in chlorosomes from wild-type and a *bchQR* mutant of *Chlorobaculum tepidum* revealed by single-molecule spectroscopy**

*Lisa M. Günther*<sup>\*1</sup>, *Alexander Löhner*<sup>\*1</sup>

*Carolin Reiher*<sup>1</sup>, *Tenzin Kunsel*<sup>2</sup>, *Thomas L.C. Jansen*<sup>2</sup>, *Marcus Tank*<sup>3,4</sup>,

*Donald A. Bryant*<sup>4,5</sup>, *Jasper Knoester*<sup>2</sup>, *Jürgen Köhler*<sup>1,6,7</sup>

<sup>1</sup> Spectroscopy of Soft Matter, University of Bayreuth, Universitätsstr. 30, D-95440 Bayreuth, Germany

<sup>2</sup> University of Groningen, Zernike Institute for Advanced Materials, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands

<sup>3</sup> Present address: Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minami-Osawa, Hachioji-shi, Tokyo, Japan 192-0397

<sup>4</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802 USA

<sup>5</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, Montana State University, Bozeman, MT 59717 USA

<sup>6</sup> Bayreuth Institute for Macromolecular Research (BIMF),

<sup>7</sup> Bavarian Polymer Institute,  
University of Bayreuth, Universitätsstr. 30, D-95440 Bayreuth, Germany

\* These authors contributed equally.



## Abstract

Green sulfur bacteria can grow photosynthetically by absorbing only a few photons per bacteriochlorophyll molecule per day. They contain chlorosomes, perhaps the most efficient light-harvesting antenna system found in photosynthetic organisms. Chlorosomes contain supramolecular structures comprised of hundreds of thousands of bacteriochlorophyll molecules, which are properly positioned with respect to one another solely by self-assembly and not by using a protein scaffold as a template for directing the mutual arrangement of the monomers. These two features – high efficiency and self-assembly – have attracted considerable attention for developing light-harvesting systems for artificial photosynthesis. However, reflecting the heterogeneity of the natural system, detailed structural information at atomic resolution of the molecular aggregates is not yet available. Here we compare results for chlorosomes from the wild type and two mutants of *Chlorobaculum tepidum* obtained by polarization-resolved, single-particle fluorescence-excitation spectroscopy and theoretical modelling with results previously obtained from NMR spectroscopy and cryo-electron microscopy. Only the combination of information obtained from all of these techniques allows for an unambiguous description of the molecular packing of bacteriochlorophylls within chlorosomes. In contrast to some suggestions in the literature, we find that, for the chlorosomes from the wild type as well as for those from mutants, the dominant secondary structural element features tubular symmetry following a very similar construction principle. Moreover, the results suggest that the various options for methylation of the bacteriochlorophyll molecules, which are a primary source of the structural (and spectral) heterogeneity of wild-type chlorosome samples, are exploited by nature to achieve improved spectral coverage at the level of individual chlorosomes.

---

## Introduction

In photosynthesis solar energy is absorbed by antenna complexes and efficiently transferred to a photochemical reaction centre, where it is used to produce a stable charge-separated state across the membrane<sup>1,2</sup>. One of the most efficient light-harvesting systems in nature is the chlorosome found in green bacteria<sup>3</sup>. It has been reported that a photon flux of only  $10^9$  photons/(cm<sup>2</sup>·s) at 750 nm is sufficient to enable photosynthetic growth of some green-sulfur bacteria<sup>4-6</sup>. For comparison, this is equivalent to illumination conditions that correspond to 1% of light from a full moon!

Chlorosomes are organelles enclosed by a monolipid envelope with dimensions of roughly (40-60) nm in width, (10-40) nm in height, and (100-200) nm in length, which are filled with hundreds of thousands of Bacteriochlorophyll (BChl) molecules<sup>7-10</sup>. The BChl molecules are organised in self-assembling aggregates that are stabilised by hydroxyl-chelation of the central Mg atom, hydrogen bonds, and van der Waals forces<sup>11</sup>. This is in contrast to most of the other antenna systems that are found in chlorophototrophy, for which the cofactors are properly positioned with respect to each other by interactions with a protein scaffold<sup>3,12,13</sup>. These two features – high light-harvesting efficiency and self-assembly in the absence of a protein scaffold – have inspired many researchers to consider chlorosomes as templates for novel organic solar cells<sup>14-16</sup>. Because the operational mode of antenna structures is determined by the properties of the electronic excited states of the chromophores, which in turn are imposed by the detailed supramolecular organization of the molecular building blocks, the elucidation of high-resolution antenna structures has significantly contributed to our current understanding of the structure-function relationships of the primary reactions in photosynthesis<sup>17,18</sup>. For chlorosomes, however, details about their structural organization are the subject of an ongoing debate, and several models for their secondary structures, including tubular and lamellar aggregates, have been proposed<sup>11,19-33</sup>. This discussion in part reflects the structural heterogeneity of the chlorosomes, which can vary with respect to the size of the assemblies, their detailed organisation, and the type and chemical modifications of BChl molecules<sup>34</sup>, preventing structure determination by high-resolution X-ray crystallography. In particular, natural chlorosomes contain mixtures of BChl molecules with modifications of the side chains R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> giving rise to a tremendous variety for the possible building blocks for the molecular aggregates within the

chlorosomes<sup>34,35</sup>. In Fig. 1 those variations are listed that are relevant for *Chlorobaculum (Cba.) tepidum*.

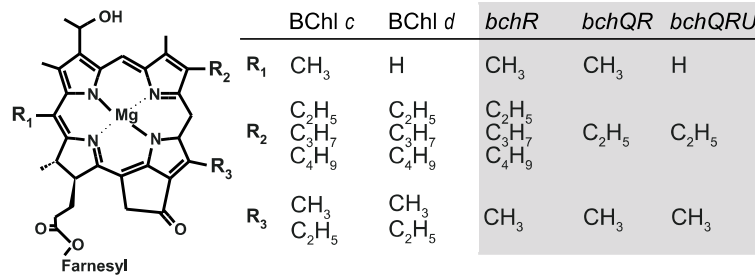


Fig. 1: Schematic representation of a BChl molecule. For clarity, the farnesyl tail has been omitted. The table summarizes the possible substituents for BChl *c*, BChl *d*, and for three mutants (shaded) for the side groups R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> at carbon positions C-20, C-8, C-12, respectively.

In the past, Bryant and co-workers have deciphered the biosynthesis of BChl *c* in *Cba. tepidum*, which has led to the preparation of a series of mutants for which the substituents of the side chains could be controlled resulting in a diminished heterogeneity<sup>3,35-37</sup>. For the triple mutant *bchQRU*, in which the composition of all three side chains can be defined, Fig. 1, the more uniform pigment composition allowed the development of a detailed structural model by combining information from cryo-electron microscopy (EM), nuclear-magnetic resonance (NMR), and molecular modelling<sup>21</sup>. In turn, this model served as a template for a structural model for the wild type (WT) chlorosomes. Briefly, according to the NMR data the short-range order of the pigment arrangement corresponds to *syn-anti* stacked BChl dimers on a Bravais lattice as shown in Fig. 2a. Given the hydrophobic tails of the BChl molecules the idea is that the concentric tubular superstructures that have been observed by cryo-EM, and which feature a spacing of about 2.1 nm between the tubes, see Fig. S1, are obtained by wrapping multiple layers of this grid onto a cylindrical surface along a rolling vector  $\vec{C}$ . Accordingly, the structures proposed for the chlorosomes of the *bchQRU* triple mutant and the chlorosomes of the WT differ from each other only by the angle  $\delta$  that is enclosed between the a-axis of the grid and the rolling vector  $\vec{C}$ , i.e., 90° for the WT and 0° for the *bchQRU* mutant<sup>21</sup>.

Further structural information can be obtained from optical spectroscopy. In molecular aggregates the details of the photo-physical properties of the electronically excited states, such as the transition energies, the oscillator strengths, and the polarisation behaviour, depend crucially on the mutual distances and orientations of the molecular building blocks, i.e. on the

molecular packing<sup>38–40</sup>. This allows one to test whether a proposed structural model is compatible with the experimentally observed spectra, and to discriminate between different structures. In this context it is important to note that, given the spacing between the concentric cylinders of about 2.1 nm, the multiple cylinders can be treated as uncoupled systems for modelling the optical spectra as has been shown previously in ref 40. Still distinctive spectral signatures that are characteristic for specific structural features might be lost in ensemble-averaged spectra due to the intrinsic heterogeneity of biological samples. The problem can be mitigated by applying single-molecule techniques.

The first studies on single chlorosomes provided information about the ground state properties and/or about the polarisation properties of the excited states for a few fixed excitation wavelengths<sup>20,32,41</sup>. In a previous study, individual WT chlorosomes from *Cba. tepidum* were investigated using polarisation-resolved fluorescence-excitation spectroscopy<sup>42,43</sup>. This revealed a strong modulation of the entire fluorescence-excitation spectra as a function of the polarisation of the excitation light, indicating a high degree of spatial organisation of the individual BChl molecules within a chlorosome. However, these studies also revealed the large degree of structural disorder in the WT chlorosomes from *Cba. tepidum*, which unfortunately prevented the development of a detailed proposal for a structural model.

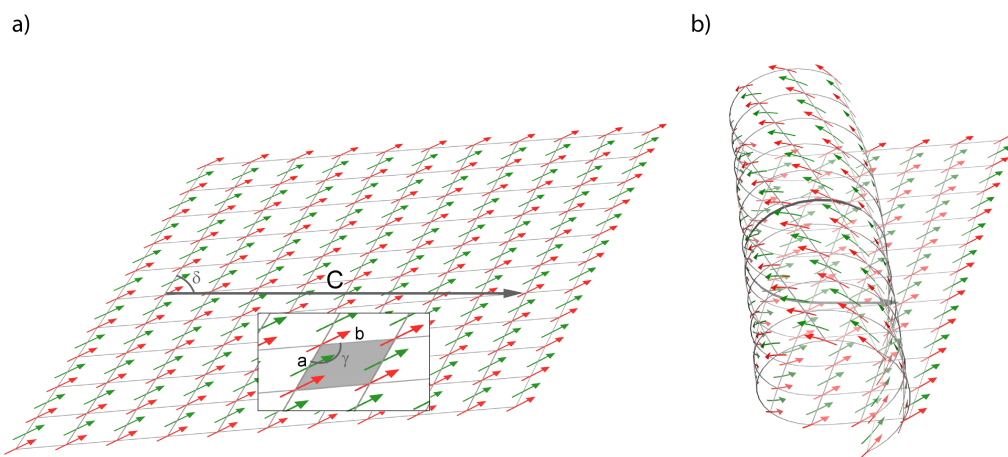


Fig. 2: a) Bravais lattice obtained from NMR for the short-range order of the BChl molecules according to ref 21. Each arrow represents the  $Q_y$  transition-dipole moment of a BChl molecule. The molecules in red (green) colour are inclined by  $4^\circ$  ( $-4^\circ$ ) with respect to the plane of the grid and distinguish between the syn and anti orientation of the monomers. The grey shaded area highlights one unit cell with lattice vectors  $a = 1.25$  nm,  $b = 0.98$  nm that enclose an angle of  $\gamma = 122^\circ$ . b) Wrapping the grid onto a cylindrical surface along a rolling vector  $\vec{C}$  (black arrow in part a)) enclosing an angle of  $\delta = 70^\circ$  with the  $a$ -axis of the grid yields the model structure proposed in ref 44 for the *bchR* mutant.

The same technique was recently applied to individual chlorosomes from the *bchR* mutant of *Cba. tepidum*<sup>44</sup>. For this strain one of the BChl *c* side chains is fixed as a methyl group<sup>37</sup>, see Fig. 1, resulting in more homogeneous structures and allowing for a detailed theoretical modelling of the spectra<sup>44</sup>. This yielded a packing of the BChl molecules in tubular symmetry such that the angle  $\beta$  between the monomer transition-dipole moments and the symmetry axis of the cylinder amounted to about  $55^\circ$ . This was in close agreement with the proposed structure of the *bchQRU* triple mutant<sup>21</sup>. From cryo-EM experiments a value of 1.24 nm was obtained for the distance between adjacent, symmetry equivalent BChls in the grid, which, to our great surprise, was in good agreement with the distances reported for the model structure of the aggregates in the WT chlorosomes. Apparently, the structural models either based on NMR and single-molecule spectroscopy, or based on NMR and cryo-EM were not in mutual agreement, and an unambiguous assignment of the BChl assembly in the *bchR* chlorosomes was only possible by combining the information obtained from all three techniques. This yielded a model for the basic structural element that can be envisaged to result from wrapping the lattice obtained from NMR onto a cylindrical surface along a rolling vector that is inclined with respect to the *a*-axis of the grid under an angle  $\delta$  of about  $70^\circ$ <sup>44</sup>, see Fig. 2b. The secondary structural element of tubular symmetry that results from this construction principle is compatible with both the mutual orientations of the transition-dipole moments of the optical bands observed in single-chlorosome spectroscopy and the distance between adjacent, symmetry equivalent BChls observed in cryo-EM. This raises the question whether the model structures proposed for the chlorosomes from the WT and the *bchQRU* mutant that were based solely on NMR and cryo-EM, and in particular the reported rolling angles of  $90^\circ$  and  $0^\circ$  for wrapping the grid onto a tubular surface, might also need some modification after taking into account spectroscopic data from single chlorosomes of these strains.

The *bchU* mutation included in the triple mutant converts BChl *c* into BChl *d*, see Fig. 1. Unfortunately, this shifts the monomer absorption from 666 nm to 655 nm in organic solvents<sup>45</sup>, and correspondingly, the absorption peak for BChl *d* containing chlorosomes shifts to about 729 nm<sup>46</sup>, which is out of the spectral range accessible for fluorescence-excitation spectroscopy in our experimental setup. Therefore, in this study, we compared chlorosomes from the WT to those from the *bchQR* double mutant. In this mutant strain the composition of all three side groups of the BChl molecules is defined, see Fig. 1, yet the spectral positions of the absorption bands are still within the experimentally accessible range, because this mutant still produces BChl *c*<sup>22,37</sup> (see Fig.S2 in the SI for the ensemble absorption spectra of the

mutants). Here we report the results from low-temperature polarisation-resolved fluorescence-excitation spectroscopy on individual chlorosomes of the WT and the *bchQR* mutant strains of *Cba. tepidum*. As expected, our study confirms that the degree of spectral heterogeneity decreases in the order WT, *bchR*, *bchQR*, suggesting that the spectral heterogeneity is closely connected to the degree of structural disorder. However, more interesting is the finding that the spectra of the chlorosomes of the WT and the *bchQR* mutant can be reproduced using the same arrangement for the monomer transition-dipole moments as reported previously for the *bchR* mutant. This result, indeed, calls for a modification of the structural model provided in ref 21.

## Experimental results

Examples of polarisation-resolved, fluorescence-excitation spectra from single chlorosomes from *Cba. tepidum* are shown in Fig. 3. The spectra in the top row have been taken from single chlorosomes from the WT samples, whereas the spectra in the bottom row have been taken from single chlorosomes from the *bchQR* mutant. Each pattern corresponds to a sequence of 97 (WT) or 200 (*bchQR* mutant) consecutively recorded fluorescence-excitation

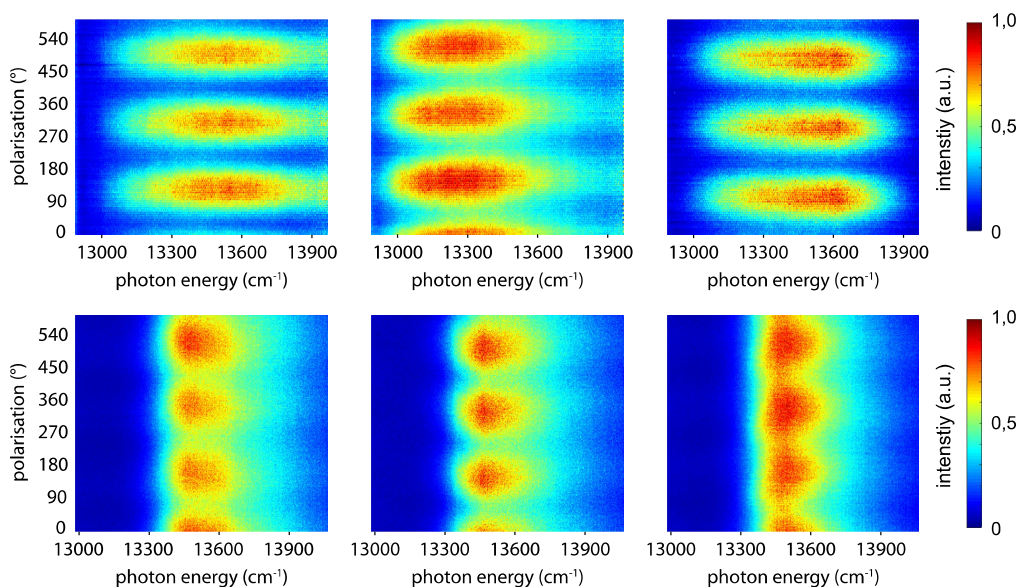


Fig. 3: Examples of fluorescence-excitation spectra from individual chlorosomes in two-dimensional representation as a function of the polarisation of the excitation light. All spectra have been recorded at 1.2 K. Top row) WT, stack of 97 spectra, recorded with an excitation intensity of 25  $W/cm^2$ . Bottom row) *bchQR* mutant stack of 200 spectra recorded with an excitation intensity of 5  $W/cm^2$ .



spectra, for which the horizontal axis corresponds to photon energy, and the vertical axis corresponds to the polarisation of the incident radiation. Between the recordings of two subsequent spectra the polarisation was rotated by a few degrees. The resulting fluorescence intensity is given by the colour code.

Between individual chlorosomes the spectral patterns show variations in their appearance. Yet, despite these variations two observations are striking. Firstly, for the chlorosomes from the *bchQR* mutant, Fig. 3 bottom, the widths of spectral features are significantly reduced with respect to those from the WT chlorosomes, Fig. 3 top. This clearly reflects the reduction in heterogeneity owing to the definition of the BChl side groups and probably C3<sup>1</sup> chirality by mutagenesis. Secondly, for all spectra for both the WT and *bchQR* mutant, the intensity is clearly modulated with a periodicity of 180° as a function of the polarization of the excitation light. This reflects a high degree of organisation of the hundreds of thousands BChl molecules that contribute to a single chlorosome spectrum. Similar to previous work<sup>44</sup>, the stacks of spectra can be analysed by a global fit routine that decomposes the spectrum into four spectral bands of Gaussian form:

$$F(E, \Theta) = B + \sum_{i=1}^4 A_i(E) \cdot \left[ \cos(\Theta - \varphi_i) \right]^2 \cdot \exp\left( -\frac{(E - E_i)^2}{W_i^2 / 4 \ln 2} \right) \quad (1)$$

Here “*i*” counts the spectral contributions, *B* denotes an offset that considers background signals, *A<sub>i</sub>(E)* denotes the amplitude of the respective contribution,  $\Theta$  corresponds to the polarization angle of the incident light with respect to a laboratory frame,  $\varphi_i$  refers to the angle of the projection of the transition-dipole moment of the respective spectral component on to the sample plane, and the lineshape is modelled as a Gaussian centred at an energy *E<sub>i</sub>* with a width (FWHM) of *W<sub>i</sub>*. For the total of about 100–250 spectra from each individual chlorosome, this yields 17 fit parameters where the amplitudes *A<sub>i</sub>(E)* and the phase angles  $\varphi_i$  were treated as global parameters. For the majority of chlorosomes studied (72 out of 75 for the WT and all the 29 from the *bchQR* mutant) including 4 Gaussians for the fitting sufficed to achieve good agreement between fit and experiment, while with less than 4 Gaussians the fit quality seriously deteriorated.

The following is based on this majority of chlorosomes and the details of the analysis will be exemplified on the polarisation-resolved spectrum from a single WT chlorosome shown in Fig. 4. The black line in Fig. 4b shows the experimental fluorescence-excitation spectrum averaged over all polarizations of the excitation light. It is centred at 13274 cm<sup>-1</sup>, and features a

width of  $740 \text{ cm}^{-1}$  (FWHM). The coloured lines correspond to the four spectral contributions from the fit routine, and the grey line represents their sum, which nicely reproduces the overall experimental spectrum.

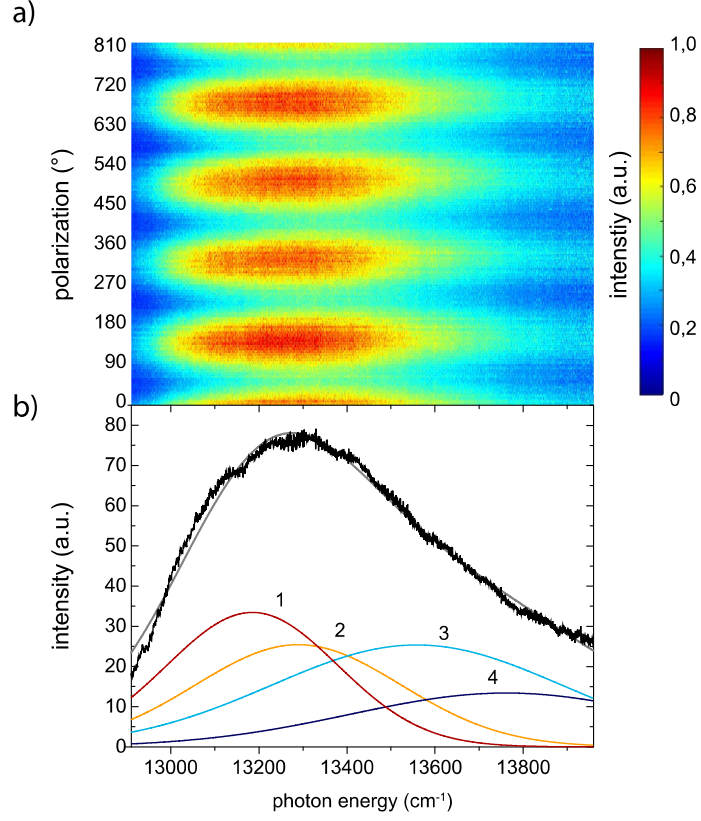


Fig. 4: a) Stack of 133 fluorescence-excitation spectra from an individual chlorosome of the WT as a function of the polarization of the excitation light. b) Fluorescence-excitation spectrum of the pattern averaged over all polarizations (black line) together with its decomposition into four (coloured), and the sum of the Gaussians (grey). The spectra were recorded at 1.2 K using an excitation intensity of  $25 \text{ W/cm}^2$ .

In the following, the four individual bands are labelled 1-4 in order of increasing energy of their centre position for further reference. In the example shown in Fig. 4 the first band (red) occurs at  $13166 \text{ cm}^{-1}$  with a width (FWHM) of  $W_1 = 451 \text{ cm}^{-1}$ . The second band (orange) has its peak position at  $E_2 = 13250 \text{ cm}^{-1}$  and a width of  $W_2 = 527 \text{ cm}^{-1}$ . The third (cyan) and fourth (dark blue) band are centred at  $E_3 = 13527 \text{ cm}^{-1}$  and  $E_4 = 13757 \text{ cm}^{-1}$  with widths of  $W_3 = 752 \text{ cm}^{-1}$  and  $W_4 = 764 \text{ cm}^{-1}$ , respectively. The phase differences,  $\Delta\Phi_{ij}$ , between the bands were calculated according to  $\Delta\Phi_{ij} = |\varphi_i - \varphi_j|$  if  $|\varphi_i - \varphi_j| < 90^\circ$ , and  $\Delta\Phi_{ij} = |180^\circ - |\varphi_i - \varphi_j||$  otherwise. For the example shown in Fig. 4 this yields  $\Delta\Phi_{12} = 81.2^\circ$ ,  $\Delta\Phi_{13} = 0.5^\circ$ ,  $\Delta\Phi_{14} = 79.5^\circ$ ,  $\Delta\Phi_{23} = 80.7^\circ$ ,  $\Delta\Phi_{24} = 1.7^\circ$ , and  $\Delta\Phi_{34} = 79.0^\circ$ . This procedure was employed to analyse the polariza-



tion-resolved, fluorescence-excitation spectra from 72 individual chlorosomes of the WT and 29 individual chlorosomes from the *bchQR* mutant from *Cba. tepidum*. The histograms in Fig. 5 display the statistics of the energetic positions and the widths of the four bands for these chlorosomes. It is important to note that a single chlorosome corresponds to a small subensemble of molecular aggregates. Hence, each entry in the histograms represents an average over such a subensemble, whereas the whole histogram represents the distribution of these averages within the macroscopic ensemble of chlorosomes.

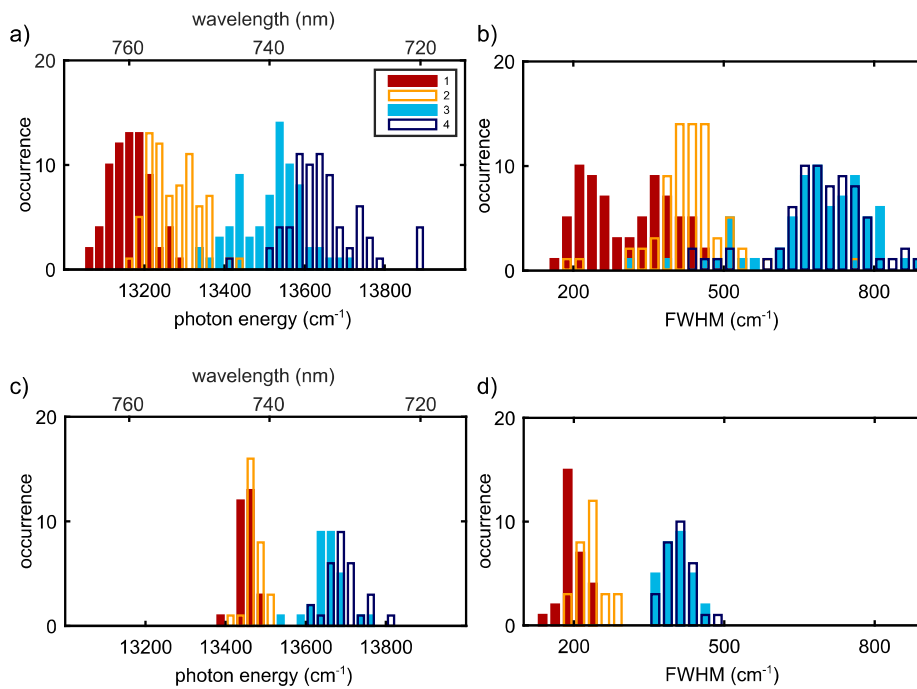


Fig. 5: Top: WT Bottom: *bchQR* mutant. a),c) Distributions of the spectral peak positions of the fitted Gaussians and b),d) Distributions of the widths (FWHM) of the fitted Gaussians.

The histograms presented in Fig. 5 can be characterized by the statistical parameters summarized in Table 1. For better comparison the table lists also the statistical data obtained from the *bchR* mutant that was the subject of previous study<sup>44</sup>.

Table 1: Mean values of the spectral positions  $E_i$  and linewidths  $W_i$  (FWHM) of the Gaussians obtained from sets of 72, 58, and 29 individual chlorosomes of the WT, *bchR*, and *bchQR* strains. The data for the *bchR* mutant are not shown in Fig. 5 and have been taken from ref 44. The colours in the table refer to the colour code used for distinguishing the four bands in the figures. The main entry in each cell gives the average value of the quantity considered for the set of chlorosomes studied, while the entry in parentheses gives the corresponding standard deviation. All values are in  $\text{cm}^{-1}$ .

Strain	WT (72)	<i>bchR</i> (58)	<i>bchQR</i> (29)
$E_{\text{peak, overall}}$ (sdev)	13366 (97)	13609 (33)	13492 (21)
$W_{\text{overall}}$ (sdev)	783 (91)	437 (54)	441 (70)
$E_1$ (sdev)	13170(56)	13468 (26)	13452 (18)
$W_1$ (sdev)	310(86)	233 (35)	198 (25)
$E_2$ (sdev)	13274(59)	13502 (41)	13471 (21)
$W_2$ (sdev)	432(76)	270 (41)	230 (28)
$E_3$ (sdev)	13517(80)	13685 (39)	13656 (40)
$W_3$ (sdev)	685(109)	495 (66)	404 (31)
$E_4$ (sdev)	13649(91)	13747 (57)	13695 (45)
$W_4$ (sdev)	701(98)	501 (63)	408 (27)

For the WT chlorosomes the widths of  $310 \text{ cm}^{-1}$  and  $432 \text{ cm}^{-1}$  of the two spectral components  $E_1$  and  $E_2$  are significantly narrower than the  $685 \text{ cm}^{-1}$  and  $701 \text{ cm}^{-1}$  values that have been found for the spectral components  $E_3$  and  $E_4$ . The same holds true for the spectral components of the *bchR* mutant ( $233 \text{ cm}^{-1}$  and  $270 \text{ cm}^{-1}$  vs.  $495 \text{ cm}^{-1}$  and  $501 \text{ cm}^{-1}$ ), and for those from the *bchQR* mutant ( $198 \text{ cm}^{-1}$  and  $230 \text{ cm}^{-1}$  vs.  $404 \text{ cm}^{-1}$  and  $408 \text{ cm}^{-1}$ ). In the following analysis, we group the four spectral components into a low-energy pair,  $E_1$  and  $E_2$ , and a high-energy pair,  $E_3$  and  $E_4$ , and determine for each individual chlorosome the difference of the polarization angles,  $\Delta\Phi_{12}$  and  $\Delta\Phi_{34}$  between the transitions within one pair, see Fig. 6 and Table 2.

Table 2: Mean values (standard deviations) of the relative phase angles between the bands 1 and 2 and between the bands 3 and 4 for the three types of chlorosomes. The data for the *bchR* mutant are not shown in Fig. 6 and have been taken from ref 44.

ij	12			34		
	WT	<i>bchR</i>	<i>bchQR</i>	WT	<i>bchR</i>	<i>bchQR</i>
$\Delta\Phi_{ij}$ (deg)	60 (34)	78 (16)	83 (6)	77 (16)	87 (3)	81 (34)

For the WT sample the differences in phase angles between bands 1 and 2 form a bimodal distribution peaking around  $0^\circ$  and  $90^\circ$ , which is averaged out to the values of  $60^\circ \pm 34^\circ$  for the

mean and the standard deviation. This illustrates the added value of single-molecule techniques, which allow one to obtain information about the distributions of parameters rather than only about their average values. In contrast, the entries in the histogram for the phase difference between bands 3 and 4, as well as the entries in both histograms for the *bchQR* mutant show pronounced maxima close to a value of  $90^\circ$ .

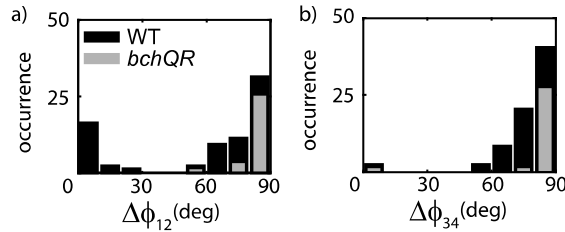


Fig. 6: Distributions of the relative phase angles  $\Phi$  between the bands 1 and 2, and between the bands 3 and 4. The black entries correspond to the WT chlorosomes and the grey entries correspond to the *bchQR* mutant.

## Discussion

Comparison of the histograms presented in Fig. 5 reveals a striking reduction in the widths of the corresponding distributions in comparing WT chlorosomes to those from the *bchQR* mutant. This statement is quantified by the data provided in Table 1. All entries in the table that can be associated with structural disorder, namely the standard deviations of the distributions of the spectral peak positions  $E_1$ - $E_4$ , the mean values of the widths of these peaks  $W_1$ - $W_4$ , and the standard deviations of the distributions of these widths, decrease in the order WT, *bchR* single mutant, to *bchQR* double mutant. These observations confirm the idea that the structural heterogeneity of the BChl aggregates within the chlorosomes can be very substantially reduced by decreasing the BChl homolog (sidechain) heterogeneity (Fig. 1 and Table 1; also see ref 37). Nevertheless, despite the differences in BChl homolog composition, the spectra from all three strains follow the same general pattern. For the chlorosomes of each strain, the observed spectral features can be separated into a low-energy and a high-energy doublet, and for each chlorosome type the widths of the bands in the high-energy doublet exceed those in the low-energy doublet by a factor of about  $2.0 \pm 0.4$ . This suggests that the formation of the molecular aggregates, within the chlorosomes follows a very similar construction prin-

ciple. For the chlorosomes from the *bchQR* mutant, the phase differences between the bands within the low-energy pair and the high-energy pair,  $\Delta\Phi_{12}$  and  $\Delta\Phi_{34}$ , mostly occur at  $90^\circ$ , see Fig. 6. This is a clear indication of an underlying cylindrical symmetry of the BChl aggregates within the chlorosomes<sup>47</sup>, and resembles the situation that was found earlier for the *bchR* mutant<sup>44</sup>. For the chlorosomes from the WT the observation is not that straight-forward. Here the phase differences between the bands in the high-energy pair,  $\Delta\Phi_{34}$ , accumulate as well at  $90^\circ$ , whereas those between the low-energy pair,  $\Delta\Phi_{12}$ , show a bimodal distribution peaking at  $0^\circ$  and at  $90^\circ$ . In order to analyse this observation in more detail, Fig. 7 displays the correlation between the phase differences  $\Delta\Phi_{12}$  and  $\Delta\Phi_{13}$  for both the WT and the *bchQR* mutant. The data points can be divided roughly into two groups, namely those that do not exhibit a correlation between  $\Delta\Phi_{12}$  and  $\Delta\Phi_{13}$  (group 1; shaded area in Fig. 7), and those that do exhibit such a correlation (group 2). Group 1 includes all chlorosomes of the *bchQR* mutant and 53 chlorosomes from the WT, corresponding to 74% of the WT chlorosomes studied. For the chlorosomes of group 1 the data points cluster around  $\Delta\Phi_{12} \approx 70^\circ$ -  $90^\circ$ , and the spectra feature approximately two mutually orthogonally polarized bands within each pair (in short:  $1 \perp 2$  and  $3 \perp 4$ ) and in addition two predominantly parallel-polarized pairs of bands  $1 \parallel 3$  and  $2 \parallel 4$ . Group 2 includes exclusively the remaining 26% of the WT chlorosomes studied. Here we find  $\Delta\Phi_{13} \approx 65^\circ$ -  $90^\circ$  and  $\Delta\Phi_{12} \leq 30^\circ$ . For this group of chlorosomes the analysis of the polarisation behaviour of the spectral bands yields approximately  $1 \parallel 2$ ,  $3 \perp 4$ , and  $1 \perp 3$  (implying  $1 \parallel 4$ ,  $2 \perp 3$ , and  $2 \parallel 4$ ).

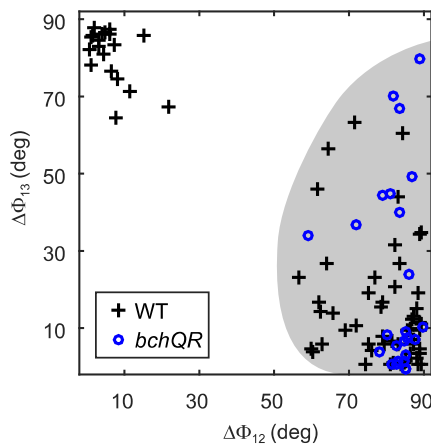


Fig. 7: Correlation between the phase shifts  $\Delta\Phi_{12}$  and  $\Delta\Phi_{13}$  for individual chlorosomes from the WT (crosses) and from the *bchQR* mutant (blue circles). The shaded area indicates those chlorosomes that are referred to as group 1 in the text.

In the following we refer to the chlorosomes in the two groups as WT-group1 and WT-group2, respectively. For these chlorosomes the distributions for the energetic separations,  $\Delta E_{12}$  and  $\Delta E_{34}$ , the ratios of the oscillator strength,  $O_1/O_2$  and  $O_3/O_4$ , and the difference of the polarization angles,  $\Delta\Phi_{ij}$  are given in Fig. 8, together with the corresponding distributions for the *bchQR* mutant.

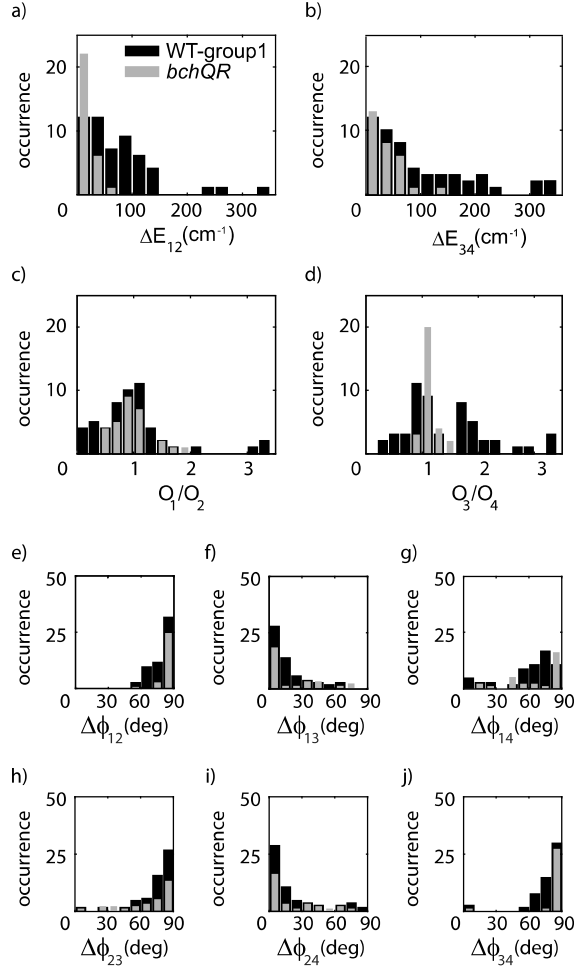


Fig. 8: a), b) Distributions of the energetic separation between the low-energy bands and the high-energy bands for an individual chlorosome. c), d) Distributions of the ratio of the oscillator strength between bands 1 and 2 and between bands 3 and 4, respectively. e-j) Distributions of the relative phase angles  $\Phi$  between the bands 1, 2, 3 and 4. The black entries correspond to the WT-group1 chlorosomes and the grey entries correspond to the *bchQR* mutant.

For the WT-group1 chlorosomes, the distributions for the energetic separations of the spectral components in the low- and high-energy pairs are rather wide with respect to those from the *bchQR* mutant that generally are separated by less than 100 cm<sup>-1</sup>. The same holds true for the widths of the distributions of the ratios of the oscillator strengths and the mutual phase differences. The widths of the distributions for the mutant are clearly narrower than those of the

Table 3: Mean values (standard deviations) of the energetic separations, the ratios of the oscillator strengths between the bands 1 and 2 as well as between the bands 3 and 4 for the three types of chlorosomes (WT-group1, *bchR*, *bchQR*). The data for the *bchR* mutant are not shown in Fig. 8 and have been taken from ref 44.

ij	12			34		
	WT-group1	<i>bchR</i>	<i>bchQR</i>	WT-group1	<i>bchR</i>	<i>bchQR</i>
$\Delta E_{ij}$ (cm <sup>-1</sup> )	71 (66)	34 (31)	19 (13)	101 (107)	62 (53)	38 (32)
$O_i/O_j$	1.04(0.95)	0.95 (0.35)	0.95 (0.34)	1.42(0.77)	1.24 (0.30)	1.13 (0.13)

corresponding distributions for the WT-group1 chlorosomes. This is clearly reflected by the corresponding standard deviations, see Tables 3 and 4, which decrease in the order WT-group1, *bchR* (single mutation), *bchQR* (double mutation).

Table 4: Mean values (standard deviations) of the relative phase angles between the bands 1, 2, 3 and 4 for the three types of chlorosomes (WT-group1, *bchR*, *bchQR*). The data for the *bchR* mutant are not shown in Fig. 8 and have been taken from ref 44.

$\Delta\Phi_{ij}$ (deg)	12	13	14	23	24	34
WT-group1	79 (10)	15 (16)	63 (24)	76 (16)	19 (22)	76 (17)
<i>bchR</i>	78 (16)	28 (27)	62 (28)	67 (26)	23 (26)	87 (3)
<i>bchQR</i>	83 (6)	17 (27)	69 (24)	68 (22)	19 (25)	81 (34)

The chlorosomes from the *bchQR* mutant as well as those assigned to WT-group1 exhibit the “standard” polarisation behaviour for molecular aggregates with an underlying tubular structure<sup>39,47,48</sup>. Briefly, for an ideal and sufficiently long molecular aggregate of cylindrical symmetry, i.e., exhibiting neither structural nor energetic disorder, the electronic coupling between the monomers gives rise to only three exciton states with non-zero transition-dipole moment for transitions from and to the electronic ground state. The transition-dipole moment of the lowest exciton state,  $\mu_{||}$ , is oriented parallel to the symmetry axis of the cylinder, whereas the other two transition-dipole moments result from a pair of degenerate exciton states with mutually orthogonal transition-dipole-moments,  $\mu_{\perp 1}$  and  $\mu_{\perp 2}$ , both oriented perpendicularly with respect to the symmetry axis of the tube, see Fig. 9a.

Together with the information that the chlorosomes are oriented with their long axis parallel to the surface of the substrate<sup>32</sup> and that for (the vast majority of) the molecular aggregates the long axes of the secondary structures within a chlorosome are oriented parallel with respect to each other<sup>5,21,27</sup>, this yields a direct relationship between the oscillator strength of the

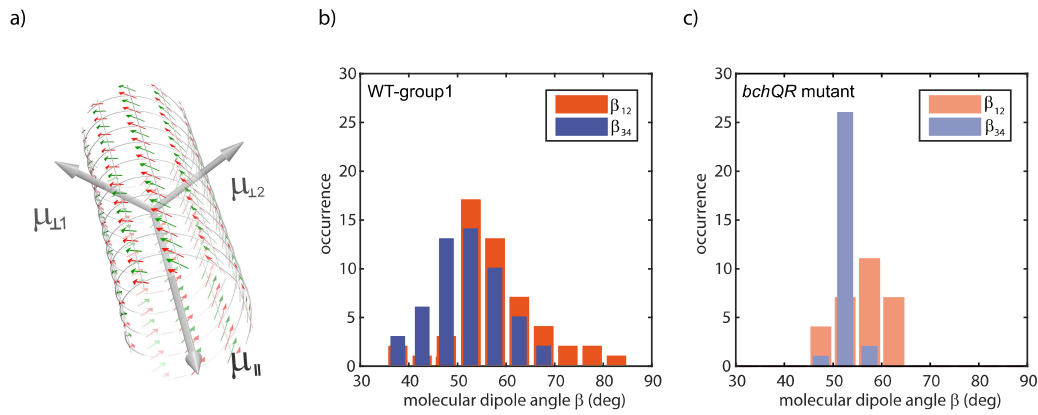


Fig. 9: a) Molecular aggregate with cylindrical symmetry. Electronic coupling yields three exciton states with dipole-allowed transitions to the electronic ground state. The corresponding transition-dipole moments are oriented parallel to the symmetry axis ( $\mu_{\parallel}$ ), and mutually orthogonal ( $\mu_{\perp 1}$ ,  $\mu_{\perp 2}$ ) with respect to that axis. b,c) Distributions of the angles  $\beta_{12}$  (low-energy pair) and  $\beta_{34}$  (high-energy pair) that are enclosed between the transition-dipole moments of the monomers and the symmetry axis of the cylinder for the WT-group1 (b) and the *bchQR* mutant (c).

parallel and perpendicular polarized exciton transitions and the angle  $\beta$  between the transition-dipole moments of the monomers and the symmetry axis of the cylinder:<sup>47</sup>

$$\beta = \arctan \left( \sqrt{\frac{2 \cdot O_{\perp}}{O_{\parallel}}} \right) \quad (2)$$

Here the factor of 2 accounts for the fact that only half of the oscillator strengths of the  $\mu_{\perp}$  transition-dipole moments can be detected in the polarization-resolved experiments, given the orientation of the tubular structures with respect to optical axis. Denoting the monomer dipole angles  $\beta_{12}$  and  $\beta_{34}$  for the low-energy pair and the high-energy pair, respectively, and using the data for the oscillator strengths shown in Fig. 8c,d, we obtain the distributions of these angles as shown in Fig. 9b for the WT-group1 and in Fig. 9c for the *bchQR* mutant. The mean values and standard deviations of these histograms are given in Table 5 and are compared with the data obtained previously from chlorosomes of the *bchR* mutant. Again, the widths of the distributions decrease in the order WT-group1, *bchR*, *bchQR*, which suggests that the structures of the molecular aggregates within the chlorosomes are better defined when the homolog variation due to the BChl side groups is more restricted (i.e., better defined). Yet, within statistical accuracy, all distributions are centred around a similar mean of about  $56^{\circ}$  for  $\beta_{12}$  and  $52^{\circ}$  for  $\beta_{34}$ . For some chlorosomes from the *bchQR* mutant it was found by cryo-EM that the molecular aggregates within a single chlorosome were not perfectly aligned with respect to each

other<sup>22</sup>. For these chlorosomes a small fraction (< 10%) of the secondary tubular structures within a single chlorosome was oriented with their symmetry axes perpendicular to that of the majority of the other structures. We have tested the influence of these variations on the outcome of eq.(2) and the resulting histograms in Fig. 9, see details in the SI. For the parameter range relevant for this work we find if at all a very small influence on the widths of the histograms shown in Fig. 9.

Table 5: Mean values (standard deviations) of the distributions of the molecular dipole angles  $\beta_{12}$  (low-energy doublet) and  $\beta_{34}$  (high-energy doublet) and distances between adjacent, symmetry equivalent BChls,  $d$ , of the supramolecular structures in chlorosomes obtained from cryo-EM<sup>21,22</sup>. The data for the *bchR* mutant are not shown in Fig. 9 and have been taken from ref. 44.

	WT-group1	<i>bchR</i>	<i>bchQR</i>
$\beta_{12}$	57.3° (9.6°)	56° (4.7°)	56.1° (4.5°)
$\beta_{34}$	51.7° (7.4°)	52° (3.4°)	53.1° (1.6°)
$d$ (nm)	1.22 / 1.25 <sup>21</sup>	1.24 <sup>44</sup>	0.69 <sup>22</sup>

Furthermore, Table 5 provides the distances between adjacent, symmetry equivalent BChls within the supramolecular structures that were obtained from cryo-EM for the three species. Here, the value of 0.69 nm found for the *bchQR* mutant<sup>22</sup> is significantly smaller than the 1.22 nm / 1.24 nm values that have been found for the WT and the *bchR* mutant<sup>21,44</sup>, respectively, as well as the 1.25 nm reported for the model structure of the WT<sup>21</sup>. However, this discrepancy is easy to understand. According to ref 22, the structural changes induced by the *bchQR* mutation lead to a deformation of the tetrapyrrole backbone of the BChl molecules that induces an arrangement of the BChl molecules in extended domains of alternating stacks of BChl molecules either in *syn* or *anti* orientation. In other words, in contrast to the chlorosomes of the WT and *bchR* strains, for which the molecules are arranged in dimeric *syn-anti* stacks, the BChl molecules in the *bchQR* mutant are arranged in monomer stacks. As a consequence of this, the distance between adjacent, symmetry equivalent BChls of 0.69 nm refers to the monomer repeat distance and not to the dimer repeat distance as for the other two species. Considering that in the *bchQR* mutant the assembly in parallel monomers is imposed by structural deformations of the BChl molecules, the value of 0.69 nm is in reasonable agreement with the 0.63 nm that results when the lattice parameter of a  $\approx 1.25$  nm of the unit cell shown in Fig. 2a is cut in half. At any rate, from the perspective of spectroscopy it is impossible to distinguish between dimeric *syn-anti* stacking or extended domains of monomeric (whether



*syn* or *anti*) BChl arrangements, because for *syn-anti* stacking the concomitant alternation of the transition-dipole moments by only  $\pm 4^\circ$  with respect to the plane of the cylinder is too small to make a detectable impact on the spectra. As a result, the combination of the available data from NMR, cryo-EM, and single-molecule spectroscopy yields for all three species, WT-group1, *bchR*, and *bchQR* the same basic arrangement of the transition-dipole moments, that can be visualized by wrapping the lattice obtained from NMR onto a cylindrical surface along a chiral vector that includes an angle  $\delta$  with the a-axis as proposed in ref 44, and illustrated in Fig. 2. The agreement of the mutual alignment of the transition-dipole moments for the *bchR* and the *bchQR* mutants is in agreement with results from ensemble circular dichroism (CD) spectroscopy, see Fig. S3, which yields nearly identical CD spectra for these two strains. While the ensemble CD spectrum from the WT chlorosomes is in qualitative agreement with those for chlorosomes from the *bchR* and the *bchQR* mutant, it appears quantitatively slightly different from the other two. We speculate that this difference might originate from the superposition of CD spectra from WT-group1 and WT-group2 chlorosomes.

Further information about the underlying structural issues can be obtained from the spectral separations  $\Delta E_{ij}$  between the mutually orthogonal polarized bands. For aggregates of cylindrical symmetry these splittings are directly related to the curvature of the structure, see Fig. S7 in the supporting information and ref 39. In Fig. 10 the energetic separations between the bands in the high-energy doublet,  $\Delta E_{34}$ , are displayed as a function of the energetic separations between the bands in the low-energy doublet,  $\Delta E_{12}$ , for all three species (WT-group1, *bchR*, and *bchQR*). Remarkably, for all three types of chlorosomes, the data points accumulate around a line that roughly satisfies the relation  $\Delta E_{34} \approx 1.5 \cdot \Delta E_{12}$  indicated by the grey shaded area in Fig. 10 that includes 89% of the total data points (87% for WT-group1, 86% for *bchR*, 97% for *bchQR*). For the chlorosomes from the WT-group1 and the *bchR* mutant,  $\Delta E_{12}$  ( $\Delta E_{34}$ ) covers the range from 0 - 150  $\text{cm}^{-1}$  (250  $\text{cm}^{-1}$ ), whereas these ranges are restricted for  $\Delta E_{12}$  ( $\Delta E_{34}$ ) to 0 - 50  $\text{cm}^{-1}$  (150  $\text{cm}^{-1}$ ), respectively, for the *bchQR* mutant. The reasonable degree of correlation found for all three chlorosome types is another independent and strong indication for close similarities in the molecular arrangement of the secondary structures of the BChls within those chlorosomes. Moreover, it is a strong signature for an underlying structural hierarchy within the overall organization of the BChl assembly. Nevertheless, for all three species the average spectral separations, and thus the curvatures of the secondary structural elements within a chlorosome, feature strong variations between individual chlorosomes. This variation

covers a range from about 4 nm - 20 nm for WT-group1 and *bchR*, whereas this inter-chlorosome variation is less pronounced for the *bchQR* mutant featuring structures with radii in the range 7 nm - 20 nm, i.e. lacking the structures with the strongest curvature. Though, on the mesoscale we find strong similarities for the underlying arrangements of the transition-dipole moments of the BChl molecules within the molecular aggregates in the chlorosomes from WT-group1, and the two mutants *bchR* and *bchQR*.

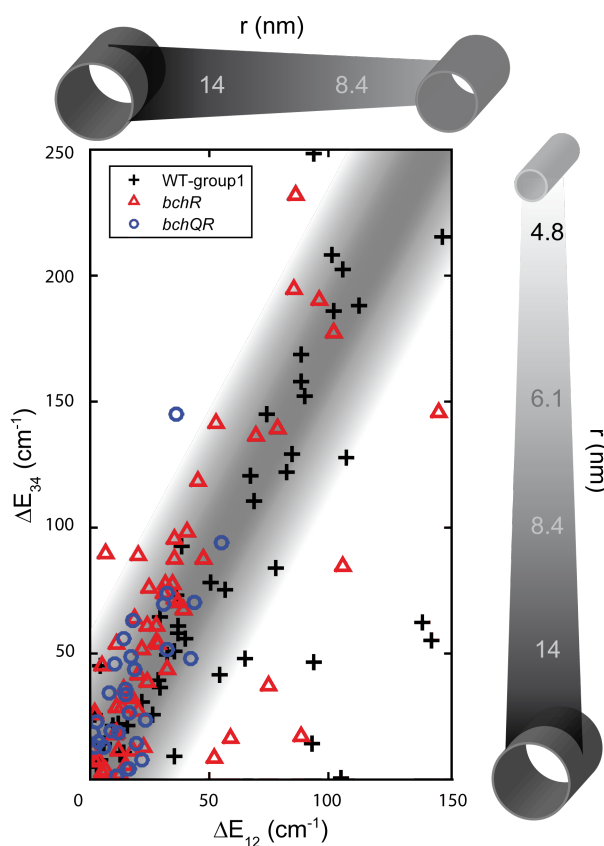


Fig. 10: Correlation between the energetic separations of the low- and high-energy doublet. The shaded area indicates the range of the most frequently observed energy splittings for each species. The structures on the top and on the right hand side of the diagram illustrate the radii of tubular structures that are consistent with the respective energy differences.

For about 26% of the chlorosomes that were assigned to WT-group2, the polarization-resolved, fluorescence-excitation spectra do not follow the above “standard” pattern that may be attributed to tubular structures. Instead, their spectra can be decomposed into four contributions whose gross mutual polarization behaviour can be expressed as  $1 \parallel 2$ ,  $1 \perp 3$ , and  $3 \perp 4$  (implying  $1 \parallel 4$  and  $2 \parallel 4$ ). On first sight, the mutually orthogonal transition-dipole moments for the two transitions highest in energy (see Fig. S8) seem to suggest that some structural elements of cylindrical symmetry prevail as well for the WT-group2 chlorosomes. However, it is

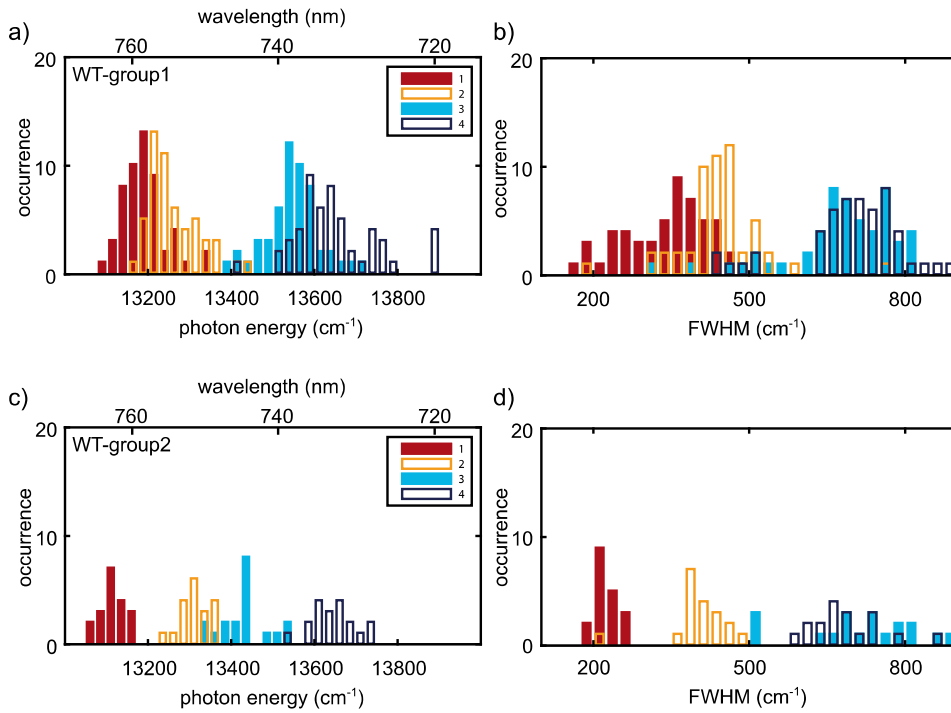


Fig. 11: Top: WT-group1; Bottom: WT-group2. a) c) Distributions of the spectral peak positions of the fitted Gaussians and b, d) Distributions of the widths (FWHM) of the fitted Gaussians.

worth noting that except for the deviation of the polarization pattern from that of the WT-group1 chlorosomes, we did not find any other observable that could be used for discriminating the two groups of chlorosomes. The distributions of the spectral peak positions  $E_1 - E_4$  and the widths  $W_1 - W_4$  of the four bands cover a similar range for both groups, Fig. 11. Summing the polarization-averaged spectra from individual chlorosomes for each group separately yields similar fluorescence-excitation spectra, peaking at  $13458 \text{ cm}^{-1}$  ( $743.1 \text{ nm}$ ) and  $13435 \text{ cm}^{-1}$  ( $744.3 \text{ nm}$ ) with widths (FWHM) of  $785 \text{ cm}^{-1}$  and  $766 \text{ cm}^{-1}$  for WT-group1 and WT-group2, respectively. Interestingly, comparing the distributions of the spectral peak positions, Fig. 11a,c, reveals that for the WT-group2 chlorosomes the peak positions of the four fitted bands are spread evenly across the spectrum. In other words, grouping the four bands into a low-energy pair and a high-energy pair, as it is obvious for the chlorosomes from WT-group1, cannot be justified for the WT-group2 chlorosomes. Hence, based on the information at hand it cannot be ruled out that all four transitions come from one superstructure. As has been shown by the Vacha group<sup>20</sup>, it is already sufficient to consider only a quarter of a cylinder for the structural elements of the BChl arrangement to obtain similar spectral features as those observed for a closed cylinder. Hence, we can speculate that the arrangement of the mo-

---

lecular aggregates in the WT-group2 chlorosomes resembles partial cylinders or lamella. Such structural elements have been observed also by electron microscopy<sup>27,29</sup>.

## Conclusions

We have studied individual chlorosomes from WT and a *bchQR* double mutant by polarization-resolved, fluorescence-excitation spectroscopy, and we have compared the results with those obtained from a *bchR* single mutant in a previous study. The spectral heterogeneity diminished in the order WT > *bchR* single mutant > *bchQR* double mutant, clearly demonstrating that the higher degree of structural order achieved through the mutations allows better resolution of distinctive spectral features (also see ref 37). Because the *bchR* and *bchQR* mutations correspond to a removal of methyl groups from the sidechains of the BChl *c* molecules, namely one at C-12 for *bchR*, and additional ones at C-8 for *bchQR* (see also Fig. 1), it is tempting to speculate that the methylations effectively substitute for protein interactions for fine tuning the site energies of the monomers in order to achieve a broadening of the absorption band for better spectral coverage in the natural organisms. From the linewidth distributions of the single chlorosome spectra (see Fig. 5b,d) then it becomes apparent that this overall broadening is already a property of the individual chlorosomes rather than of the macroscopic population as a whole.

Moreover, we find two types of spectral patterns for the chlorosomes of the WT. For the vast majority of the WT chlorosomes, i.e. about 75%, as well as for the chlorosomes from the two mutants studied, the predominant structural element for the meso-organisation of the monomers features tubular symmetry. The molecular packing of these aggregates can be reproduced by wrapping the NMR lattice reported in ref 21 onto a cylindrical surface along a rolling vector that is inclined by about 70° with respect to the *a*-axis of the grid, i.e. the same model structure that was obtained for the *bchR* mutant in a previous study<sup>44</sup>. For the WT chlorosomes this is in contrast to what has been reported before<sup>21</sup>. Yet, differences in the details of the monomer arrangement between the strains were found as well, namely between the secondary structures in the (majority) WT and *bchR* strains on the one hand, and the *bchQR* mutant on the other hand. It appears that in the *bchQR* chlorosomes the tubular elements with small radii are lacking, in contrast to those from the other two strains. A second spectral pattern that was found for about one quarter of the WT chlorosomes showed features that might

originate from cylindrical as well as other secondary structural elements allowing some leeway for speculation, for example being associated with those (curved) lamellar arrangements that are still the subject of ongoing debates in the literature<sup>19,21,22,25,28</sup>.

To summarize: i) Within an individual chlorosome the correlation between the energetic separations of the absorptions within the same pair of bands (i.e.  $\Delta E_{12}$  vs.  $\Delta E_{34}$ ) provides strong evidence for a structural hierarchy in the molecular packing. ii) Within an ensemble of chlorosomes from the same strain the individual aggregates feature strong variations in the curvature of their secondary structural elements. iii) Between different strains (here WT, *bchR* vs. *bchQR*) the chlorosomes feature strong variations in the radii of their secondary structural elements.

## Acknowledgement

We thank E. Bloemsma (Groningen) for providing the software for the global fit procedure, and G. Oostergetel (Groningen) for helpful discussions about the cryo-TEM results on the *bchQR* mutant, as well as Tobias Meier and Carmen Wolfring (both Bayreuth) for assistance with the spectroscopic experiments. A.L., L.M.G., and J.Kö. thankfully acknowledge financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GRK1640, Ko 1359/27-1) and the State of Bavaria within the initiative “Solar Technologies go Hybrid”. This work was also funded by the Division of Chemical Sciences, Geosciences, and Biosciences, Office of Basic Energy Sciences of the U.S. Department of Energy through Grant DE-FG02-94ER20137 to D.A.B.

## Material & Methods

### Chlorosome preparations

The preparations were made identically to those described in refs. 44 and 49.

### Preparation of single-particle sample

The stock solutions ( $OD_{733} = 58$  for a sample of 1 cm thickness) of chlorosomes from the wild type and the *bchQR* mutants of *Cba. tepidum* were stored in the dark at  $-20^{\circ}\text{C}$  in a buffer (5 mM dipotassium phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 5 mM monopotassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 150 nM sodium chloride ( $\text{NaCl}$ ), pH 7.2 at room temperature). For single-particle experiments these solutions were diluted in the same buffer to  $10^{-9}$  M, and about 10  $\mu\text{l}$  of the sample solu-

tions were adsorbed onto a SiO<sub>2</sub> glass substrate under nitrogen atmosphere for 30 min. and mounted in a helium cryostat.

At room temperature we found a significant increase on the fluorescence upon pre-reducing the samples. However, at cryogenic temperatures the fluorescence intensity did not depend on the treatment of the samples and we therefore refrained from reducing the samples prior to the optical experiment.

### Single-particle spectroscopy

For polarization-resolved fluorescence-excitation spectroscopy of the WT and the *bchQR* mutants two independent homebuilt widefield/confocal microscopes were used. In the following, the specific components are listed that were used in the setup for the experiments on the WT samples, whereas those used in the other setup were given in square brackets. Excitation light was provided by a tuneable Titanium:Sapphire laser (3900 S, Spectra Physics; [899-01, Coherent]) that was pumped by a frequency doubled continuous-wave Neodymium-Yttrium-Vanadat (Nd:YVO<sub>4</sub>) laser (Millenia Vs, Spectra Physics; [Verdi V10, Coherent]). In order to suppress non-amplified fluorescence from the laser crystal the output from the laser passed a band-pass filter (SP 785 Razor Edge, AHF Analysetechnik; [BP 736/128, AHF Analysetechnik]). Focussing of the laser beam and collection of the emission from the sample was accomplished by an objective (Mikrothek, NA = 0.85; [Edmund Optics, NA = 0.85]) that was mounted in the cryostat. For localizing single chlorosomes a wide-field fluorescence image was recorded by defocusing the excitation with an additional lens in the excitation path to a spot size of about 20 μm. The resulting wide-field fluorescence image was registered with a charge-coupled device camera (iKon, Andor; [LUCAEM R 604, Andor Technology Ltd.]). From this image spatially well isolated chlorosomes were selected, the defocusing lens was removed, and the excitation light was focussed to a diffraction-limited spot.

For the WT samples the laser wavelength was scanned between 718 nm and 775 nm ([698 nm – 795 nm for *bchQR*]), with a rate of 3 nm/s (2.8 nm/s) by rotating a birefringent filter via a motorized micrometer screw (Actuator 850 F, Motion Controller MM4005, Newport; [Nanomover, Melles Griot]). The accuracy and the reproducibility of the wavelength variation was 1 cm<sup>-1</sup>, as verified with a wavemeter (WaveMaster, Coherent; both setups). Between two successive scans the polarization of the excitation light was rotated in steps of 6.2° ([3°]) by a waveplate (Thorlabs Inc.; both setups) operated by a stepper motor (OWIS GmbH; both setups). The excitation intensity was adjusted to 25 W/cm<sup>2</sup> ([5 W/cm<sup>2</sup>]). After passing three

band-pass or two long-pass filters (LP 780, AHF Analysetechnik; [BP 850/80, AHF Analysetechnik]) to block residual laser light, the emission from a single chlorosome was focused onto a single-photon counting avalanche photodiode (PCM-AQR-16, Perkin Elmer; [SPCM-AQR-15, Perkin Elmer]). The profile of the fluorescence-excitation spectra did not depend on whether the detection window of the emission filters was sensitive to the spectral range of the emission from the baseplate or the entire chlorosome. In parallel to the data acquisition, the intensity of the excitation light was recorded as a function of the wavelength using a powermeter (LaserMate-Q, Coherent; both setups), and all spectra are corrected for variations of the laser intensity across the spectra.

## References

- <sup>1</sup> B. R. Green and W. W. Parson, eds., *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis* (Springer Netherlands, Dordrecht, 2003).
- <sup>2</sup> R. E. Blankenship, *Molecular mechanisms of photosynthesis* (Wiley Blackwell, Chichester, 2014).
- <sup>3</sup> D. A. Bryant and D. P. Canniffe, *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics* (2017).
- <sup>4</sup> J. T. Beatty, J. Overmann, M. T. Lince, A. K. Manske, A. S. Lang, R. E. Blankenship, C. L. van Dover, T. A. Martinson, and F. G. Plumley, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9306 (2005).
- <sup>5</sup> G. T. Oostergetel, H. van Amerongen, and E. J. Boekema, *Photosynthesis Research* 104, 245 (2010).
- <sup>6</sup> J. Overmann, H. Cypionka, and N. Pfennig, *Limnology and Oceanography* 37, 150 (1992).
- <sup>7</sup> J. M. Olson, *Photochemistry and Photobiology* 67, 61 (1998).
- <sup>8</sup> G. A. Montaño, B. P. Bowen, J. T. LaBelle, N. W. Woodbury, V. B. Pizziconi, and R. E. Blankenship, *Biophysical Journal* 85, 2560 (2003).
- <sup>9</sup> R. E. Blankenship, J. M. Olson, and M. Miller. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan, and C. E. Bauer (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995), pp. 399–435.
- <sup>10</sup> N.-U. Frigaard and D. A. Bryant. *Complex Intracellular Structures in Prokaryotes*, edited by J. M. Shively (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2006), pp. 79–114.
- <sup>11</sup> A. R. Holzwarth, K. Griebenow, and K. Schaffner, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 65, 61 (1992).
- <sup>12</sup> C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnauer, and J. T. Beatty, eds., *The Purple Phototropic Bacteria* (Springer Science & Business Media, Dordrecht, The Netherlands, 2008).
- <sup>13</sup> R. G. Saer and R. E. Blankenship, *Biochemical Journal* 474, 2107 (2017).



- 
- <sup>14</sup> S. Balaban, H. Tamiaki, and A. R. Holzwarth. *Supramolecular Dye Chemistry*, edited by F. Würthner (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2005), pp. 1–38.
- <sup>15</sup> S. Sengupta, D. Ebeling, S. Patwardhan, X. Zhang, H. von Berlepsch, C. Bottcher, V. Stepanenko, S. Uemura, C. Hentschel, H. Fuchs, F. C. Grozema, L. D. A. Siebbeles, A. R. Holzwarth, L. Chi, and F. Würthner, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 51, 6378 (2012).
- <sup>16</sup> D. M. Eisele, D. H. Arias, X. Fu, E. A. Bloemsma, C. P. Steiner, R. A. Jensen, P. Rebentrost, H. Eisele, A. Tokmakoff, S. Lloyd, K. A. Nelson, D. Nicastro, J. Knoester, and M. G. Bawendi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 75 (2014).
- <sup>17</sup> T. Mirkovic, E. E. Ostroumov, J. M. Anna, R. van Grondelle, Govindjee, and G. D. Scholes, *Chemical Reviews* 117, 249 (2017).
- <sup>18</sup> R. J. Cogdell, A. Gall, and J. Köhler, *Quarterly Reviews of Biophysics* 39, 227 (2006).
- <sup>19</sup> J. Alster, M. Kabeláè, R. Tuma, J. Pšenčík, and J. V. Burda, *Computational and Theoretical Chemistry* 998, 87 (2012).
- <sup>20</sup> S. Furumaki, F. Vacha, S. Habuchi, Y. Tsukatani, D. A. Bryant, and M. Vacha, *Journal of the American Chemical Society* 133, 6703 (2011).
- <sup>21</sup> S. Ganapathy, G. T. Oostergetel, P. K. Wawrzyniak, M. Reus, A. Gomez Maqueo Chew, F. Buda, E. J. Boekema, D. A. Bryant, A. R. Holzwarth, and H. J. M. de Groot, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 8525 (2009).
- <sup>22</sup> S. Ganapathy, G. T. Oostergetel, M. Reus, Y. Tsukatani, A. Gomez Maqueo Chew, F. Buda, D. A. Bryant, A. R. Holzwarth, and H. J. M. de Groot, *Biochemistry* 51, 4488 (2012).
- <sup>23</sup> A. R. Holzwarth and K. Schaffner, *Photosynthesis Research* 41, 225 (1994).
- <sup>24</sup> T. P. Ikonen, H. Li, J. Pšenčík, P. A. Laurinmaki, S. J. Butcher, N.-U. Frigaard, R. E. Serimaa, D. A. Bryant, and R. Tuma, *Biophysical Journal* 93, 620 (2007).
- <sup>25</sup> J. M. Linnanto and J. E. I. Korppi-Tommola, *Photosynthesis Research* 96, 227 (2008).
- <sup>26</sup> J. Oelze and J. R. Golecki. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan, and C. E. Bauer (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995).
- <sup>27</sup> G. T. Oostergetel, M. Reus, A. Gomez Maqueo Chew, D. A. Bryant, E. J. Boekema, and A. R. Holzwarth, *FEBS Letters* 581, 5435 (2007).
- <sup>28</sup> J. Pšenčík, S. J. Butcher, and R. Tuma, *Advances in Photosynthesis and Respiration* 39, 77 (2014).
- <sup>29</sup> J. Pšenčík, T. P. Ikonen, P. Laurinmaki, M. C. Merckel, S. J. Butcher, R. E. Serimaa, and R. Tuma, *Biophysical Journal* 87, 1165 (2004).
- <sup>30</sup> L. A. Staehelin, J. R. Golecki, and G. Drews, *Biochimica et Biophysica Acta* 589, 30 (1980).
- <sup>31</sup> H. Tamiaki, *Coordination Chemistry Reviews* 148, 183 (1996).
- <sup>32</sup> Y. Tian, R. Camacho, D. Thomsson, M. Reus, A. R. Holzwarth, and I. G. Scheblykin, *Journal of the American Chemical Society* 133, 17192 (2011).
- <sup>33</sup> R. J. van Dorssen, P. D. Gerola, J. M. Olson, J. Amesz, J., *BBA-Bioenergetics* 848, 77 (1986).



- <sup>34</sup> A. G. M. Chew and D. A. Bryant, *Annual Review of Microbiology* 61, 113 (2007).
- <sup>35</sup> Z. Liu and D. A. Bryant. *Handbook of Porphyrin Science. with Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine*, edited by K. M. Kadish, K. M. Smith, and R. Guilard (World Scientific Publishing, Singapore, 2012), pp. 107–140.
- <sup>36</sup> J. A. Maresca, A. G. M. Chew, M. Ros Ponsati, N.-U. Frigaard, J. G. Ormerod, and D. A. Bryant, *Journal of Bacteriology* 186, 2558 (2004).
- <sup>37</sup> A. G. M. Chew, N.-U. Frigaard, and D. A. Bryant, *Journal of Bacteriology* 189, 6176 (2007).
- <sup>38</sup> T. Brixner, R. Hildner, J. Köhler, C. Lambert, and F. Würthner, *Advanced Energy Materials* 5, 1700236 (2017).
- <sup>39</sup> C. Didraga, A. Pugžlys, P. R. Hania, H. von Berlepsch, K. Duppen, and J. Knoester, *The Journal of Physical Chemistry B* 108, 14976 (2004).
- <sup>40</sup> D. M. Eisele, C. W. Cone, E. A. Bloemsma, S. M. Vlaming, C. G. F. van der Kwaak, R. J. Silbey, M. G. Bawendi, J. Knoester, J. P. Rabe, and D. A. Vanden Bout, *Nature Chemistry* 4, 655 (2012).
- <sup>41</sup> S. Furumaki, Y. Yabiku, S. Habuchi, Y. Tsukatani, D. A. Bryant, and M. Vacha, *The Journal of Physical Chemistry Letters* 3, 3545 (2012).
- <sup>42</sup> M. Jendry, T. J. Aartsma, and J. Köhler, *The Journal of Physical Chemistry Letters* 3, 3745 (2012).
- <sup>43</sup> M. Jendry, T. J. Aartsma, and J. Köhler, *Biophysical Journal* 106, 1921 (2014).
- <sup>44</sup> L. M. Günther, M. Jendry, E. A. Bloemsma, M. Tank, G. T. Oostergetel, D. A. Bryant, J. Knoester, and J. Köhler, *The Journal of Physical Chemistry B* (2016).
- <sup>45</sup> N.-U. Frigaard, K. L. Larsen, and R. P. Cox, *FEMS Microbiology Ecology* 20, 69 (1996).
- <sup>46</sup> E. V. Vassilieva, N.-U. Frigaard, and D. A. Bryant, *The Spectrum (Center for Photochemical Sciences)* 13, 7 (2000).
- <sup>47</sup> C. Didraga, J. A. Klugkist, and J. Knoester, *The Journal of Physical Chemistry B* 106, 11474 (2002).
- <sup>48</sup> C. Didraga and J. Knoester, *The Journal of Chemical Physics* 121, 946 (2004).
- <sup>49</sup> E. V. Vassilieva, V. L. Stirewalt, C. U. Jakobs, N.-U. Frigaard, K. Inoue-Sakamoto, M. A. Baker, A. Sotak, and D. A. Bryant, *Biochemistry* 41, 4358 (2002).

**Supporting Information for:**  
**Structural variations in chlorosomes from wild-type and a**  
***bchQR* mutant of *Chlorobaculum tepidum* revealed by**  
**single-molecule spectroscopy**

*Lisa M. Günther*<sup>\*1</sup>, *Alexander Löhner*<sup>\*1</sup>  
*Carolin Reiher*<sup>1</sup>, *Tenzin Kunsel*<sup>2</sup>, *Thomas L.C. Jansen*<sup>2</sup>, *Marcus Tank*<sup>3,4</sup>,  
*Donald A. Bryant*<sup>4,5</sup>, *Jasper Knoester*<sup>2</sup>, *Jürgen Köhler*<sup>1,6,7</sup>

\* These authors contributed equally.

#### Contents

1. Model structure: double layer presentation
2. Ensemble spectra
3. Visualisation of the model structures
4. “Misalignment” of secondary structural elements
5. Spectral separation of the two mutually orthogonal polarized exciton transitions as a function of the radius of a tubular structure
6. Additional data for WT-group2

# 1 Model structure: double layer presentation

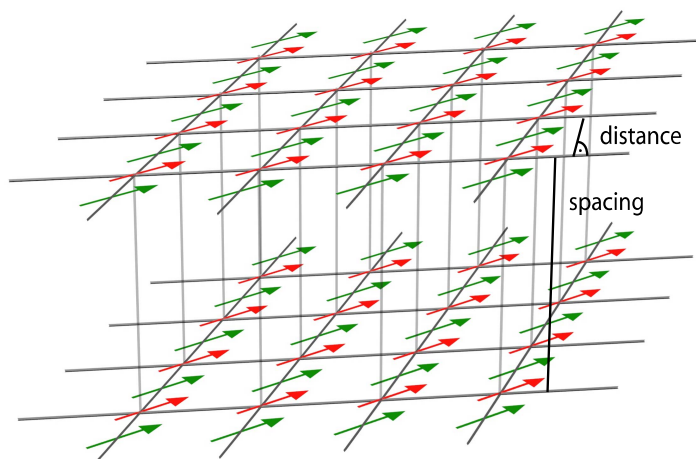


Fig. S1: Double layer formed from two Bravais lattices as obtained from NMR for the short-range order of the BChl molecules according to ref 1. Each arrow represents the  $Q_y$  transition-dipole moment of a BChl molecule. The molecules in red (green) colour are inclined by  $4^\circ$  ( $-4^\circ$ ) with respect to the plane of the layer and distinguish between the syn and anti orientation of the monomers. Both the distance  $d$  between adjacent, symmetry equivalent molecules in one layer and the spacing between the layers has been determined by cryo-EM experiments. For the species studied in this paper the distances  $d$  are given in table 5 of the main text. The spacings vary between 2.1 nm for the WT21 and 2.4 nm for the *bchQR* mutant<sup>2</sup>.

## 2 Ensemble Spectra

### 2.1 Absorption

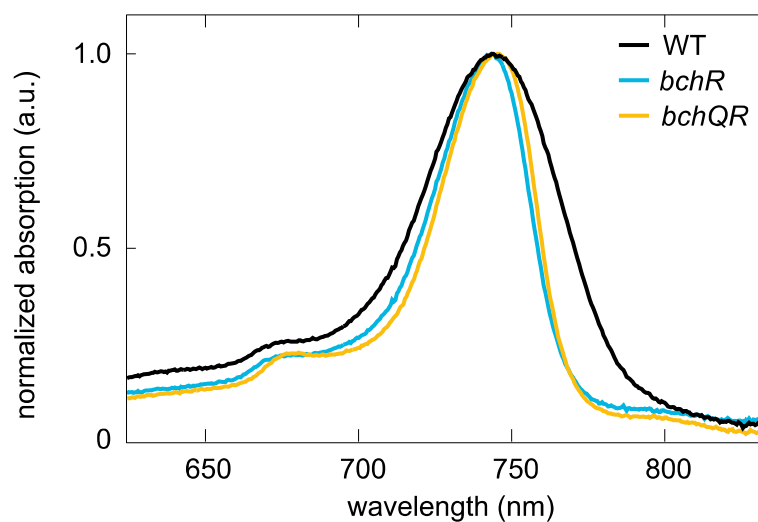


Fig. S2: Room temperature ensemble absorption spectra of the chlorosomes from the WT, *bchR*, and *bchQR* strains of *Cba. tepidum*.

### 2.2 Circular-dichroism

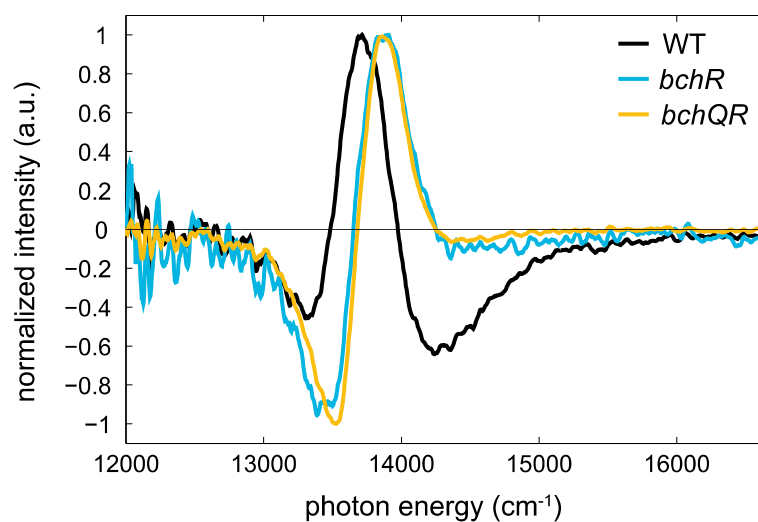


Fig.S3: Room temperature ensemble CD spectra of the chlorosomes from the WT, *bchR*, and *bchQR* strains of *Cba. tepidum*.

### 3 Visualisation of the model structures

Visualisation of the formation of the cylindrical aggregates from a sheet of transition-dipole moments arranged on a Bravais lattice.

Movie1: [link](#)

Transition-dipole moments on a Bravais lattice with lattice parameters  $a$  and  $b$  that are inclined by an angle  $\gamma$  with respect to each other. The green and red arrows represent the inclination of an angle  $\pm\alpha$  with respect to the plane of the lattice, according to the NMR grid detailed in ref 1. The secondary structural elements for the molecular aggregates are then obtained by wrapping this grid along a rolling vector that includes the angle  $\delta$  with the  $a$ -axis onto a surface with tubular symmetry. For the video the rolling angle amounts to  $70^\circ$  which yields the proposed arrangements of the transition-dipole moments in the secondary structural elements for the chlorosomes from WT-group1, *bchR*, and *bchQR*, respectively.

## 4 “Misalignment” of secondary structural elements

For the *bchQR* chlorosomes, in some cases, the cryo-EM images revealed secondary cylinder-like structures, whose symmetry axes were oriented mutually orthogonal with respect to each other<sup>2</sup>. In order to test the influence of a fraction of “misaligned” tubular structures within an individual chlorosomes on the optical spectra we modelled two extreme situations:

### 4.1 Symmetry axes of the cylinders perpendicular with respect to each other and perpendicular to the optical axis

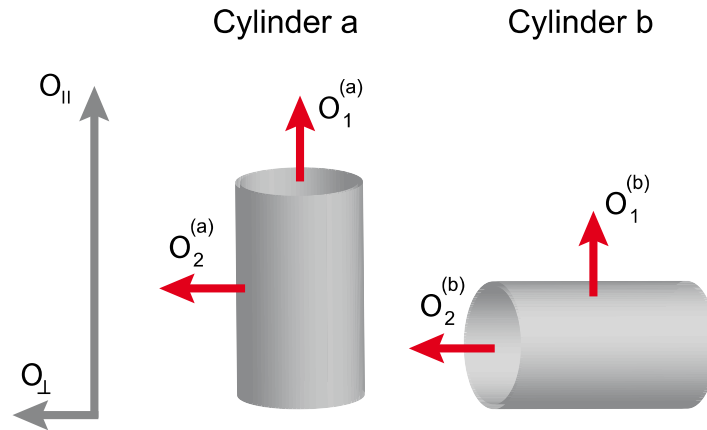


Fig. S4: Schematic illustration of mutually perpendicular oriented cylinder structures, where both symmetry axes are oriented perpendicular to the optical axis (perpendicular to the plane of the paper). The resulting polarizations of the allowed exciton transitions are indicated by the red arrows and the corresponding oscillator strengths are denoted by  $O$ . The grey axes set the reference frame which determines parallel ( $\parallel$ ) and perpendicular ( $\perp$ ) polarizations.

Without loss of generality we assume that the majority of the secondary structures is oriented as cylinder *a*, which sets the reference frame ( $\parallel$ ,  $\perp$ ). Let  $n$  denote the fraction of structures oriented as cylinder *a*. Then the contributions to the overall oscillator strength are given as

$$O_{\parallel} = n O_1^{(a)} + (1-n) O_1^{(b)} \quad \text{and} \quad O_{\perp} = n O_2^{(a)} + (1-n) O_2^{(b)}.$$

Under the reasonable assumption that the internal structures of the cylinders *a* and *b* are equivalent we have

$$O_2^{(a)} = O_1^{(b)} \quad \text{and} \quad O_1^{(a)} = O_2^{(b)}$$

and we find

$$\frac{O_{\parallel}}{O_{\perp}} = \frac{n \frac{O_1^{(a)}}{O_2^{(a)}} + (1-n)}{n + (1-n) \frac{O_1^{(a)}}{O_2^{(a)}}}$$

for the ratio of the measured oscillator strengths.

#### 4.2 Symmetry axes of the cylinders perpendicular with respect to each other and one symmetry axis parallel to the optical axis

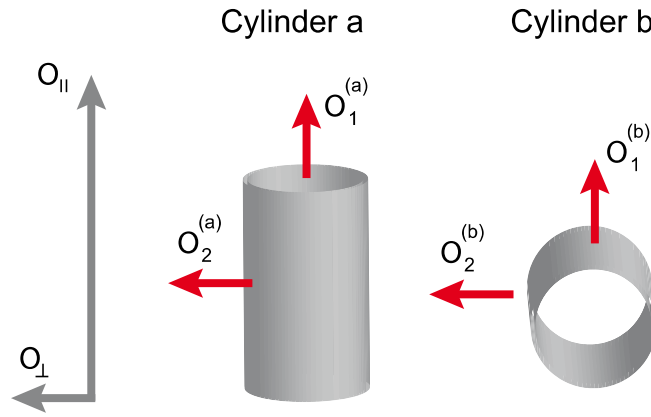


Fig. S5: Schematic illustration of mutually perpendicular oriented cylinder structures, where one symmetry axes is oriented perpendicular to the optical axis (perpendicular to the plane of the paper). The resulting polarizations of the allowed exciton transitions are indicated by the red arrows and the corresponding oscillator strengths are denoted by  $O$ . The grey axes set the reference frame which determines parallel ( $\parallel$ ) and perpendicular ( $\perp$ ) polarizations.

Under similar assumptions as above this yields

$$O_{\parallel} = n O_1^{(a)} + (1-n) O_1^{(b)} \text{ and } O_{\perp} = n O_2^{(a)} + (1-n) O_2^{(b)}$$

and

$$O_2^{(a)} = O_1^{(b)} \text{ and } O_2^{(a)} = O_2^{(b)}$$

and finally

$$\frac{O_{\parallel}}{O_{\perp}} = n \frac{O_1^{(a)}}{O_2^{(a)}} + (1-n).$$

As detailed in the main text the angle  $\beta$  between the monomer transition-dipole moments and the symmetry axis of the cylinder is given as

$$\beta = \arctan \left( \sqrt{\frac{2 \cdot O_{\perp}}{O_{\parallel}}} \right).$$

From the cryo-EM data it can be deduced that the fraction of “misaligned” structures amounts at most to 10%, i.e.,  $n \geq 0.9$ . Fig. S6 shows the variation of  $\beta$  as a function of the fraction  $n$  of “properly oriented” cylinders for both scenarios for the range  $n = 1$  to  $n = 0.5$ . For the range of interest, i.e.  $n \geq 0.9$ , and  $0.75 \leq O_1/O_2 \leq 1.25$ , which covers the bulk of the experimental data, the variation of  $\beta$  amounts to a few degree.

Nevertheless, it cannot be excluded that those “misaligned” secondary structures that have been observed in cryo-EM in the chlorosomes of the *bchQR* mutant, contribute to a small extend also to the widths of the distributions shown in Fig. 9,c.

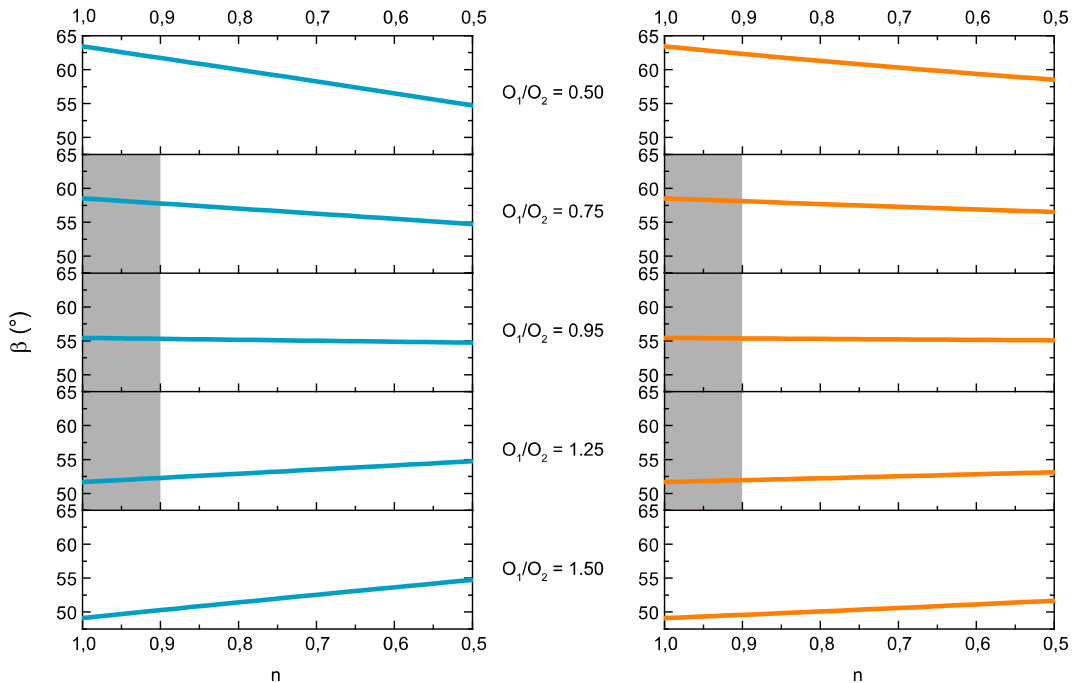


Fig. S6: Variation of the angle  $\beta$  as a function of  $n$  and as a function of the ratio of the oscillator strengths. The left hand side refers to situation 1 and the right hand side refers to situation 2. The grey area refers to the parameter range that is relevant for the current work.



## 5 Spectral separation of the two mutually orthogonal polarized exciton transitions as a function of the radius of a tubular structure

For transition-dipole moments arranged in tubular symmetry the spectral separation between the two orthogonal polarized exciton transition is directly related to the curvature of the cylinder. The data shown in Fig. S7 are based on the simulations detailed in ref 3, and have been fitted using<sup>4</sup>:

$$\Delta E = 8J \sin^2 \left( \frac{s \cdot \sin \theta + d \cos \theta}{2r} \right)$$

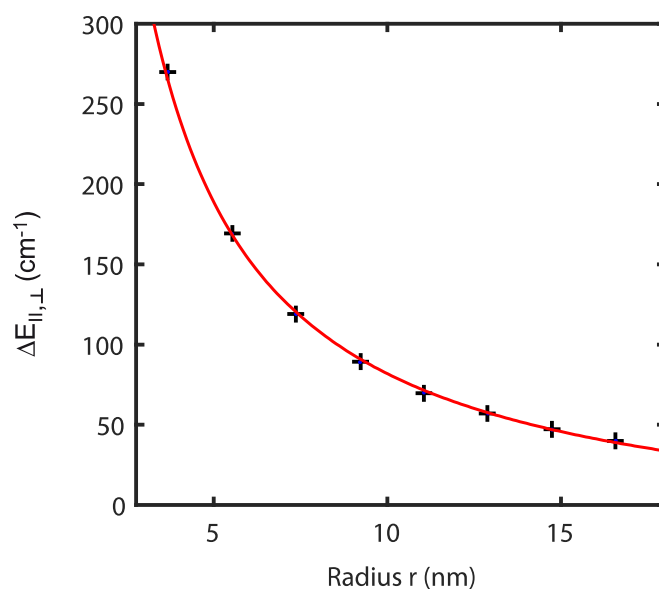


Fig S7: Correlation of radius  $r$  and energy splitting  $\Delta E$ ; for more details see ref 3,4

## 6 Additional Data for WT-group2

Relative phase differences between bands 3 and 4

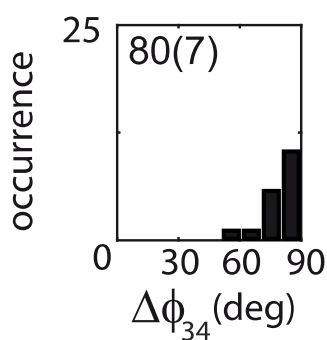


Fig. S8: Distribution and statistical parameters (mean  $\pm$  sdev) of the relative phase differences between the bands 3 and 4 for chlorosomes of WT-group2.

## References

- <sup>1</sup> S. Ganapathy, G. T. Oostergetel, P. K. Wawrzyniak, M. Reus, A. G. M. Chew, F. Buda, E. J. Boekema, D. A. Bryant, A. R. Holzwarth, and H. J. M. de Groot, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 8525 (2009).
- <sup>2</sup> S. Ganapathy, G. T. Oostergetel, M. Reus, Y. Tsukatani, A. G. M. Chew, F. Buda, D. A. Bryant, A. R. Holzwarth, and H. J. M. de Groot, *Biochemistry* 51, 4488 (2012).
- <sup>3</sup> L. M. Günther, M. Jendry, E. A. Bloemsma, M. Tank, G. T. Oostergetel, D. A. Bryant, J. Knoester, and J. Köhler, *The Journal of Physical Chemistry B* (2016).
- <sup>4</sup> C. Didraga, A. Pugžlys, P. R. Hania, H. von Berlepsch, K. Duppen, and J. Knoester, *The Journal of Physical Chemistry B* 108, 14976 (2004).