

KAPITEL 1

EINLEITUNG

1.1 Photosynthese und optische Spektroskopie

Der Begriff „Photosynthese“ hat sich eingebürgert für den Aufbau energiereicher organischer Verbindungen aus energieärmeren Verbindungen unter Ausnutzung der von der Sonne zur Verfügung gestellten Strahlungsenergie. Ein aus Wasser und Kohlendioxid synthetisiertes Zuckermolekül ist etwa 4,8 Attojoule energiereicher als seine Ausgangsstoffe (Atkins 1990). Für die Synthese eines Zuckermoleküls müssen grüne Pflanzen ungefähr 50 rote Lichtquanten aufwenden, was in etwa 14 Attojoule entspricht. Diese beachtliche Energiebilanz (out/in > 30%) zum einen und die praktisch ständige Verfügbarkeit der Ausgangsstoffe sowie der Energiequelle zum anderen begründen das große Interesse an diesem Energieumwandlungsprozeß. In unserer Zeit wachsender Umweltbelastungen und sich erschöpfender Ressourcen schaffen die Schadstofffreiheit der Reaktionsprodukte Sauerstoff und Kohlenhydrate und die Erneuerbarkeit der Ausgangsstoffe durch Verbrennungsprozesse eine zusätzliche Motivation, sich mit der Photosynthese als wissenschaftlicher Herausforderung zu befassen.

Die Vielzahl der unter dem Oberbegriff „Photosynthese“ zusammengefaßten physikalischen, chemischen und biologischen Prozesse und Erscheinungen ist Gegenstand der Untersuchungen von Wissenschaftlern in unterschiedlichen Fachrichtungen. In der vorliegenden Arbeit kann und soll keine umfassende Einführung gegeben werden. Eine Darstellung der physikalischen und chemischen Grundlagen ist in (Clayton 1980) zu finden, der neuere Stand der Kenntnisse zu den photophysikalischen Primärprozessen ist in (Witt 1996) und (Van Grondelle et al. 1994) zusammengefaßt. Einen Überblick über Breite und Tiefe der aktuellen Forschung kann man sich in (Garab 1998) bilden. Im folgenden werden einige Grundlagen skizziert.

Der primäre Energieumwandlungsschritt erfolgt bei höheren photosynthetisierenden Organismen in einem Pigment-Protein-Komplex, wo die primäre Strahlungsenergie absorbiert und über eine Folge von Elektronentransferreaktionen in zunächst elektrische, später in chemisch speicherbare Energie umgeformt wird. Dieser Pigment-Protein-Komplex wird Photosystem (PS) genannt, das wichtigste Pigment darin ist das Chlorophyll (Chl). Der Ort der primären Ladungstrennung ist ein spezielles Paar von zwei dicht beieinander liegenden, nahezu parallel orientierten

Chlorophyll-Molekülen („special pair“), das auch primärer Donator P genannt wird. Sowohl bei der Lichtabsorption als auch beim Ladungstrennungsprozeß ändert das beteiligte Chlorophyll die Struktur seiner Elektronenhülle, was eine Veränderung seiner optischen Eigenschaften zur Folge hat. Licht dient also der Photosynthese einerseits als Energiequelle, kann aber andererseits auch zur Analyse des Prozeßablaufes eingesetzt werden. Diese doppelte Funktion des Lichtes für die Photosynthese führte dazu, daß die Methoden der optischen Spektroskopie schon frühzeitig zur Erforschung der photosynthetischen Primärprozesse Anwendung fanden. Bis heute ist die optische Spektroskopie die wichtigste Methode bei der Erforschung der Photosynthese, was zur Entwicklung und Verwendung verschiedener, einander ergänzender Techniken geführt hat wie z.B. stationäre und zeitaufgelöste Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie, Polarisations-spektroskopie, Fluoreszenzinduktionsmessungen oder optisch detektierte Radiospektroskopie. In der vorliegenden Arbeit werden Verfahren der Fluoreszenzspektroskopie angewandt, und zwar die stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie sowie die Fluoreszenzinduktion. Diese Fluoreszenztechniken zeichnen sich durch eine spezielle Sensitivität für die zu untersuchende Fragestellung aus. Das soll im nächsten Abschnitt näher erläutert werden.

1.2 Die schnellen Primärprozesse der oxygenen Photosynthese

Zwei Photosysteme

Nicht immer und nicht bei allen Organismen setzt Photosynthese Sauerstoff frei. Der einfachere Photosyntheseapparat verschiedener Bakterien (außer Cyanobakterien) ist dazu noch nicht in der Lage.

Photosynthese wird als „oxygen“ bezeichnet, wenn als ultimativer Elektronenlieferant Wasser dient. Nach Abtrennung von insgesamt vier Elektronen und Protonen von zwei Wassermolekülen bildet sich ein Sauerstoff-Molekül, das dann als „Abgas“ entweicht. Um Elektronen von einem so stabilen Substrat wie Wasser auf das energiereiche NADPH (siehe unten) zu übertragen, ist die Energie mehrerer Photonen erforderlich. Dazu wurden zwei Photosysteme hintereinander geschaltet. Das geschah erstmals zu einem Zeitpunkt der Evolution, als sich bereits Photosysteme unterschiedlicher Typen herausgebildet hatten. So kam es, daß in allen Organismen mit oxygenen Photosynthese (Cyanobakterien, Algen, höhere Pflanzen) zwei Photosysteme unterschiedlichen Typs zusammenwirken (Blankenship 1992). Nur eines der beiden Photosysteme (Photosystem II, PS II; der primäre Donator P680 absorbiert bei ~ 680 nm) ist auf die Wasserspaltung spezialisiert und gibt die Elektronen über ein lösliches Chinon an den

Cytochrom b_6f -Komplex weiter. Von dort gelangen sie über lösliche Überträger (Plastocyanin oder Cytochrom c_6) weiter an das nachfolgende andere Photosystem (Photosystem I, PS I; der primäre Donator P700 absorbiert bei ~ 700 nm). Abb. [1.1] zeigt eine schematische Darstellung der Primärschritte und gibt einen Überblick über Bezeichnungen und Abkürzungen für die involvierten Redox-Komponenten.

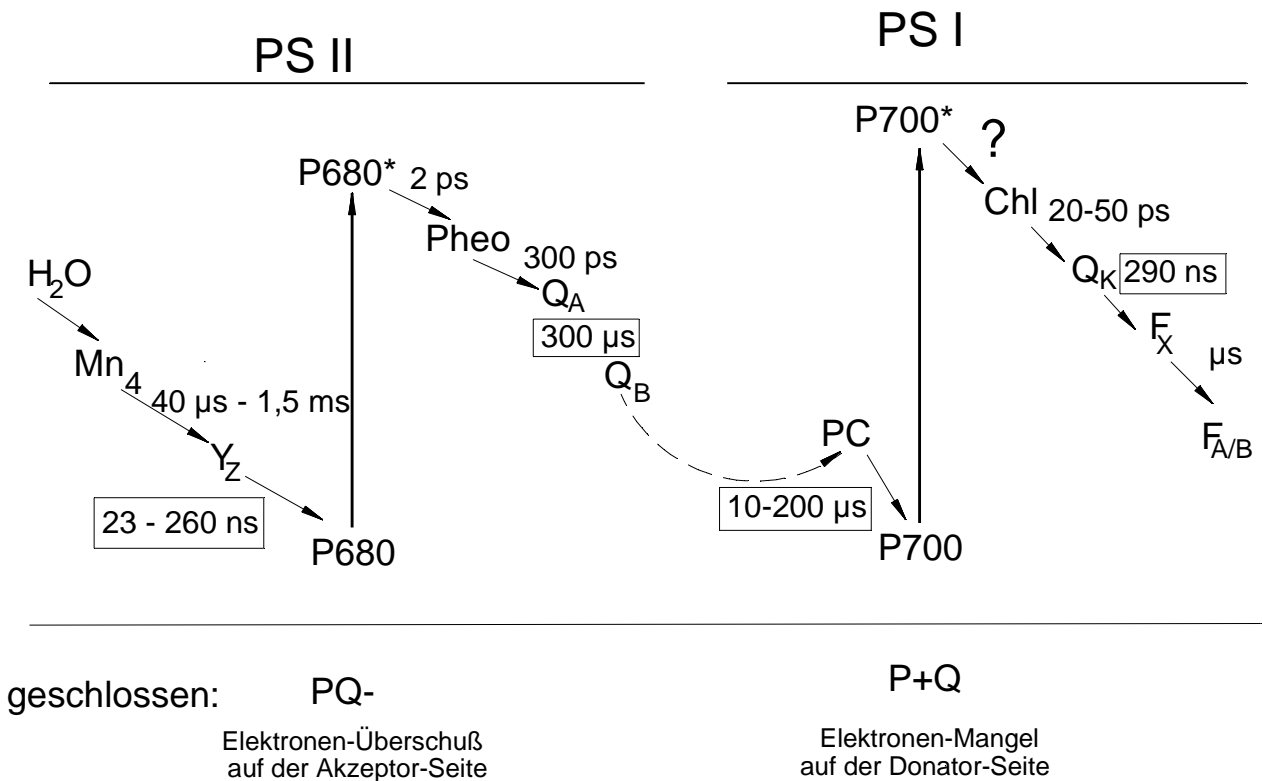


Abb. [1.1]

Schema der Elektronen-Transfer-Kinetik bei Zimmertemperatur. Zeiten nach (Witt 1996) Es bedeuten: Mn_4 - der wasserspaltende Mangancluster, Y_Z - der sekundäre Donator in PS II (ein Tyrosin), P680 - der primäre Donator in PS II (ev. ein Chl-Dimer), Pheo - der primäre Akzeptor in PS II (ein Pheophytin-Monomer), Q_A - der sekundäre Akzeptor in PS II, (ein Plastochinon), PC - beweglicher Elektronenüberträger, der den Cyt b_6f -Komplex mit PS I verbindet (ein Plastocyanin oder Cytochrom c_6), P700 - der primäre Donator in PS I (ein Chl-Dimer), Chl - der primäre Akzeptor A_0 in PS I (ein Chlorophyll-Monomer), Q_K - der sekundäre Akzeptor in PS I (ein Phyllochinon), $F_{X,A/B}$ - die terminalen Akzeptoren in PS I (drei 4Fe-4S-Cluster)

Nach weiterem Elektronentransfer über das Protein Ferredoxin werden die Elektronen schließlich zur Synthese der energiereichen Zwischenverbindung NADPH benutzt. Der transmembrane Elektronentransfer ist an einen Protonentransfer in Gegenrichtung gekoppelt. Der daraus resultierende pH-Gradient dient zur Synthese des energiereichen ATP. NADPH und ATP stellen dann die Energie für die Kohlenhydrat-Synthese zur Verfügung, die in einer nachgeschalteten Dunkelreaktionskette, dem sogenannten Calvin-Zyklus, erfolgt.

Photosynthetische Einheit

Der langsamste Schritt des lichtinduzierten Elektronentransfers vom Wasser zum NADPH dauert etwa 10 ms. Dies bedeutet, daß jedes Photosystem ungefähr 100 Photonen pro Sekunde absorbieren muß, um mit maximaler Leistung zu arbeiten. Das ist deutlich mehr, als von der Sonne selbst unter idealen Bedingungen bereitgestellt werden kann. Deshalb existieren außer den Elektronentransfer-Systemen, den sogenannten Reaktionszentren (RZ), zusätzliche Absorber-Systeme, sogenannte Antennen. Das können Chlorophyllmoleküle oder andere Pigmente sein, die Sonnenlicht aufnehmen, um es zum primären Donator der Reaktionszentren weiterzugeben. Dort überträgt der angeregte primäre Donator P spontan ein Elektron auf den primären Akzeptor A_0 . Die Anregungsenergie wird als Redox-Energie des ladungstrennten Paares $\{P^+, A_0^-\}$ „eingefangen“ („trapping“ von trap=Fallen). Das Gesamtsystem aus einem RZ und allen dazugehörigen Antennen wird photosynthetische Einheit genannt („photosynthetic unit“, PSU, Emerson & Arnold 1932, Gaffron & Wohl 1937, Duysens 1952, Sundström et al. 1999).

Förster-Anregungsenergie-Transfer

Die Weitergabe einer „Anregung“, also des durch Absorption eines Photons erzeugten angeregten Zustandes, erfolgt durch resonanten Anregungsenergie-Transfer, den sogenannten „Förstertransfer“. Dabei gibt das Donator-Molekül seine Anregung durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung mittels eines „inkohärenten hopping“-Prozesses an ein Akzeptor-Molekül weiter, ohne daß dabei Strahlung emittiert oder absorbiert wird. Entscheidend dafür ist, daß ein spektraler Überlapp zwischen dem Emissionsspektrum des Donators und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors besteht. Außer vom spektralen Überlapp hängt die Transfer-Wahrscheinlichkeit mit der sechsten Potenz vom Abstand zwischen Donatordipol und Akzeptordipol sowie von deren gegenseitiger Orientierung ab (Förster 1946).

Dieser Resonanz-Anregungsenergie-Transfer steht in Konkurrenz zu möglichen Prozessen des Anregungsabbaus durch Fluoreszenz, Interkombination, interne Konversion oder Annihilation mit anderen angeregten Zuständen. Fast alle diese Prozesse verlaufen im Bereich von Nanosekunden, und sind damit wesentlich langsamer als die Energieumwandlung im RZ, die im Bereich von Pikosekunden abläuft. Nur Annihilation kann viel schneller sein, tritt aber erst bei höheren Anregungsenergie-Dichten auf. Deshalb kann sich eine in einem Antennen-Chlorophyll durch Lichtabsorption erzeugte Anregung, ehe sie zerfällt, einige Zeit in der Antenne bewegen, indem sie zwischen den Chlorophyllmolekülen weitergegeben wird.

Boltzmann-Äquibrierung

Da nun jedes einzelne Chlorophyllmolekül sich in seiner eigenen, lokalen Umgebung befindet, mit der es individuell wechselwirkt, ist auch die Lage des Absorptions- und des Emissionsmaximums für alle Pigmente leicht unterschiedlich. Das Spektrum des Gesamtkomplexes ergibt sich durch inhomogene Verbreiterung des Spektrums eines Einzelmoleküls. Da das Emissionsspektrum der Farbstoffmoleküle gegenüber ihrem Absorptionsspektrum um die Stokes-Verschiebung rotverschoben ist, ist der Transfer hin zu Molekülen mit längerwelliger Absorption, der „downhill transfer“, bevorzugt gegenüber dem Anregungstransfer in entgegengesetzter Richtung, dem „uphill transfer“, zu Molekülen mit kürzerwelliger Absorption. Aufgrund der bei Zimmertemperatur thermisch verbreiterten Banden ist aber auch in diese Richtung ein Förster-Überlapp gegeben und ein Anregungstransfer möglich. Die dafür notwendige zusätzliche Energie wird der Umgebung entnommen. Die Wahrscheinlichkeit des Transfers vom kürzerwelligen zum längerwelligen Pigment verhält sich dabei zur Wahrscheinlichkeit des Transfers in entgegengesetzter Richtung entsprechend des Boltzmann-Faktors $\exp(-DE/kT)$, was beim Fehlen schnellerer Desaktivierungskanäle zur Einstellung einer Boltzmannverteilung der Aufenthalts-Wahrscheinlichkeit des angeregten Zustandes über die Antennen-Chlorophyll-Moleküle führt.

Kinetische Limitierungen

Die Anregung bewegt sich also in der PSU räumlich, zeitlich und spektral zwischen den Pigmenten mit ihrer unterschiedlichen Energie, ehe sie chemisch genutzt wird oder anderweitig zerfällt. Wie effizient die durch Lichtabsorption erzeugten Anregungen für die Ladungstrennung verwendet werden können, hängt also bei konstanter Bestrahlungsintensität und identischen sonstigen Zerfallskanälen von der Größe des Antenne-RZ-Komplexes, der konkreten Organisation des Transfers und der Geschwindigkeit der Ladungstrennung ab.

Dabei sind verschiedene Situationen denkbar:

- Einerseits könnte die Antenne schneller Anregungen in das RZ liefern, als sie dort verwertet werden können, beispielsweise um einen Puffer für Schwachlichtbedingungen zu haben. Der limitierende Schritt ist in diesem Fall die Ladungstrennung, man spricht von Trap-Limitierung.
- Alternativ könnte die Antenne schwächer ausgelegt sein, beispielsweise um Material zu sparen, und langsamer Anregungen in das RZ liefern, als sie dort verwertet werden können. Dann wäre das Reaktionszentrum nicht immer ausgelastet. Die Begrenzung liegt

in diesem Fall bei der Versorgung des primären Donators mit Anregungen, man spricht von Diffusions-Limitierung.

- Zwischen diesen Extremfällen sind natürlich auch verschiedene Abstufungen möglich.

Welche Art der Limitierung tatsächlich vorliegt, ist noch immer umstritten (z.B. Savikhin et al. 1999). Unter Einbeziehung evolutionsorientierter Überlegungen ist jedoch anzunehmen, daß sich Antenne und RZ in einem Optimierungsprozeß aufeinander abgestimmt haben und/oder einen Mechanismus besitzen, um sich verändernden Licht-Bedingungen durch dynamische Anpassung zu folgen. Die vorliegende Arbeit untersucht die Möglichkeit einer solchen Abstimmung für den PS I Kernantenne-RZ-Komplex aus dem Cyanobakterium *Synechococcus el.*

Kinetische Modelle

Die optische Spektroskopie eröffnet einen experimentellen Zugang zu den Primär-Schritten der Photosynthese. Die Anregungen, die das System über die Konkurrenzkanäle verlassen, enthalten Informationen über die Prozesse im System. Von diesen Konkurrenzkanälen ist der Anregungszerfall durch strahlende Singulett-Singulett-Übergänge fluoreszenzspektroskopisch detektierbar. Aus den meßbaren („apparenten“) Größen, nämlich der Wellenlängenabhängigkeit und dem Zeitverhalten der Fluoreszenzstrahlung kann nun auf die molekularen Prozesse und deren echte („intrinsische“) Parameter geschlossen werden. Diese sind nicht unbedingt direkt zugänglich, da sich die gemessenen Signale aus Anteilen zusammensetzen, die von der Kernantenne stammen und solchen, die ihren Ursprung im RZ haben.

Das Ergebnis solcher Berechnungen hängt in entscheidendem Maße davon ab, welches der erwähnten Modelle man zugrundelegt. Es handelt sich also um die Suche nach einem selbstkonsistenten Bild: Einerseits möchte man die intrinsischen Parameter mittels eines passenden Modells aus den gemessenen Daten erhalten, andererseits hofft man, aufgrund des physikalischen Sinngehalts der gewonnenen Parameter die Anwendbarkeit des Modells zu beurteilen.

1.3 Das Raum-Zeit-Energie-Problem für PS I aus *Synechococcus el.*

PS I aus Synechococcus elongatus

Das Untersuchungsobjekt dieser Arbeit ist der Photosystem I Kernantenne-RZ-Komplex aus dem thermophilen Cyanobakterium *Synechococcus elongatus*. Cyanobakterien sind ein verbreitetes Versuchsobjekt, da sie einerseits einfach aufgebaut sind wie Bakterien (es gibt noch keine höheren Zellorganellen wie Zellkern oder Chloroplasten, die Thylakoidmembran liegt direkt im Zytoplasma) und andererseits bereits einen Photosyntheseapparat wie grüne Pflanzen besitzen. Außerdem sind die isolierten Protein-Komplexe thermisch stabil und damit für Laboruntersuchungen bei Zimmertemperatur (ZT) geeignet. Darüber hinaus sind die PS I Teilchen aus *Synechococcus el.* dadurch attraktiv, daß sie mit einer Reinheit und Stabilität präpariert werden, die zur Kristallisation ausreicht.

Eine Besonderheit des Photosystems I besteht darin, daß sowohl ein Teil der Antennen-Chlorophyll-Moleküle als auch die Chlorophyll-Moleküle für die primäre Ladungstrennung an ein und dasselbe RZ-Protein gebunden sind. Man spricht deshalb von einem Kernantenne-RZ-Komplex, im Unterschied zu äußeren Antennen-Komplexen, die kein RZ enthalten und isolierten RZ-Komplexen, die gar keine Antennenmoleküle mehr enthalten.

Bisher ist es nicht gelungen, mittels biochemischer Behandlung alle Antennen-Chlorophylle aus dem Kernantenne-RZ-Komplex so definiert/behutsam abzutrennen, daß danach ein charakterisierter, funktionierender RZ-Komplex ohne Antenne vorläge. Da Antennen- und RZ-Chlorophyll-Moleküle im gleichen Spektralbereich absorbieren und emittieren, ist es unmöglich, ihre Fluoreszenz technisch voneinander zu trennen. Dies muß rechnerisch geschehen und dazu muß man sich auf Modellannahmen stützen.

Strukturell unterscheiden sich Cyanobakterien von höheren Pflanzen durch das Fehlen der (u. a. Chlorophyll b enthaltenden) äußeren Antennen-Komplexe LHC I (light harvesting complex, Golbeck 1987). Letzteres ist spektroskopisch günstig, da dadurch die Fluoreszenz des Kernantenne-RZ-Komplexes nicht zusätzlich durch die langwellige Emission (~ 735 nm) des LHC I maskiert wird.

Ziel der Arbeit ist es nun, die räumlichen, zeitlichen und spektralen Bewegungen der Anregung durch den PS I Kernantenne-RZ-Komplex zu verfolgen, und zwar mit möglichst hoher Genauigkeit, um die zugrundeliegenden Mechanismen und Parameter besser zu verstehen. Diese Bewegungen laufen im Bereich von (sub-) Pikosekunden und (sub-) Nanometern ab. Sie können

mit dem aktuellen Stand der Technik nicht in Echtzeit verfolgt werden. Deshalb muß sich die Beschreibung und Interpretation der Ergebnisse der hier verwendeten zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie auf unabhängig davon gewonnene Ergebnisse anderer Methoden stützen. Von besonderer Bedeutung sind dabei Informationen zur räumlichen Struktur des PS I Komplexes, die mittels Röntgenbeugung am kristallisierten Kernantenne-RZ-Komplex gewonnen werden können sowie Informationen zur spektralen Zusammensetzung des Kernantenne-RZ-Komplexes aus der Tieftemperatur-Absorptionsspektroskopie. Genauso wichtig sind die schon bisher aus zeitaufgelöster Spektroskopie gewonnenen Daten zum kinetischen Verlauf der ersten Schritte des Photosyntheseprozesses. Deshalb soll in den folgenden Abschnitten ein kurzer Überblick über den Stand der Kenntnisse über unser Untersuchungsobjekt, den PS I Kernantenne-RZ-Komplex aus *Synechococcus el.*, gegeben werden (vergl. auch Tabelle [1.3]).

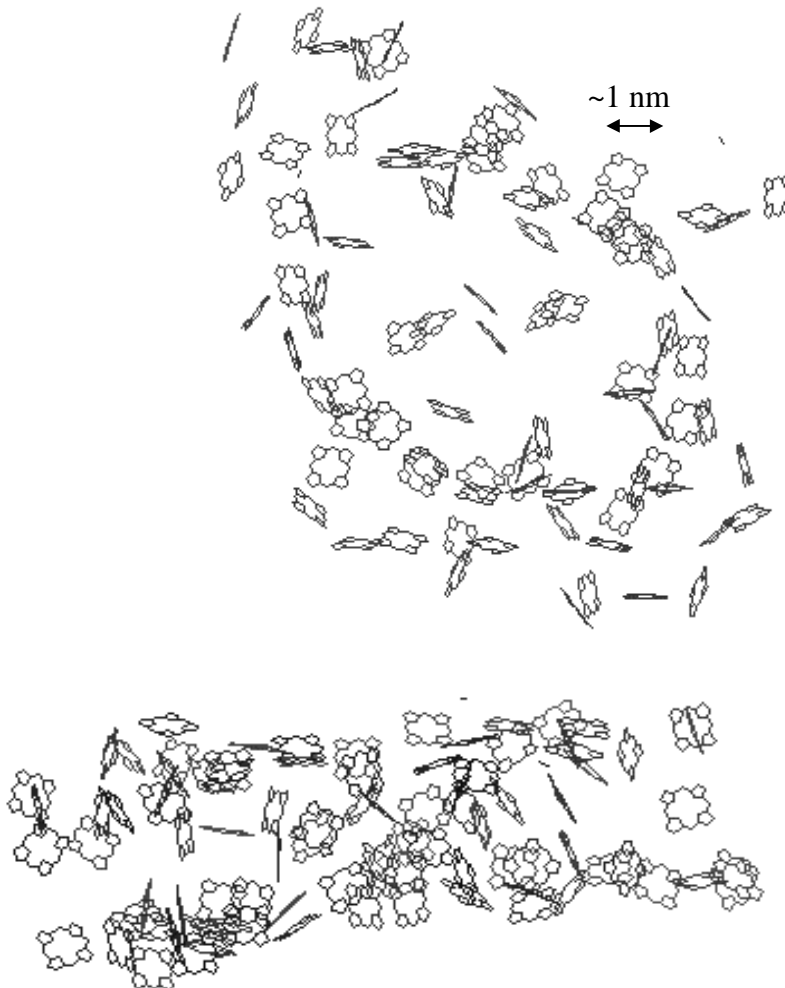
Strukturinformation

Informationen zur räumlichen Struktur können mittels Röntgenbeugung am kristallisierten Kernantenne-RZ-Komplex gewonnen werden. Mit der Verbesserung der erhaltenen Kristalle und der Anhäufung von immer besseren Beugungsdaten für PS I aus *Synechococcus el.*, gelang es in den letzten Jahren, die Auflösung der gewonnenen Strukturbilder auf 4 Ångström zu steigern (Witt 1995, Schubert et al. 1997, Fromme & Witt 1998, Klukas et al. 1999). Die so verfügbar gewordene Struktur zeigt den Kernantenne-RZ-Komplex als eine in die Thylakoid-Membran eingebettete Scheibe von ~ 90 Å Dicke und ~ 100 Å Radius. Diese Scheibe, der trimere Komplex, besteht aus drei identischen Monomeren. Jedes dieser Monomere besteht aus 11 Protein-Untereinheiten, von denen die beiden größten, die Untereinheiten A und B, jeweils den Kern bilden. Die Untereinheiten C, D, und E bilden auf der stroma-seitigen Thylakoid-Außenmembran eine Art „Deckel“, und die kleineren Einheiten F sowie I bis M bilden eine Art „Zaun“ um das Ganze. Der primäre Donator befindet sich in der Mitte des Komplexes an der „Unterseite“, der lumen-zugewandten Thylakoid-Innenseite. Wie in Abb. [1.2] wiedergegeben, liegen die etwa 100 Antennen-Chlorophyll-Moleküle pro P700 (Flemming 1996) im hydrophoben Membranbereich innerhalb des „Zauns“ aus kleineren Untereinheiten. Die meisten Antennen-Chlorophyll-Moleküle sind an die beiden großen Untereinheiten A und B gebunden. Neue Mutationsstudien an *Synechocystis sp. PCC 6803* zeigen jedoch, daß auch die peripheren Untereinheiten F/J, K, L, und M einige Chlorophyllmoleküle binden oder stabilisieren (Soukoulis et al. 1999). Dabei hat jedes Antennen-Chlorophyll-Molekül ein benachbartes mit

einem Abstand $< 16 \text{ \AA}$. Der Abstand zwischen zwei Chlorophyll-Molekülen aus unterschiedlichen Monomeren ist immer größer als 23 \AA . Im Zentrum des Komplexes finden sich außer zwei Chlorophyll-Molekülen, die den primären Donator P700 bilden, noch weitere vier Chlorophyll-Moleküle, darunter auch der primäre Akzeptor A_0 . Diese sechs „RZ“-Chlorophylle sind räumlich von allen übrigen Chlorophyll-Molekülen deutlich getrennt. Die ihnen am nächsten liegenden „verbindenden“ Chlorophyll-Moleküle, auch „linker“ genannt, könnten eine Art „Brücke“ zum Rest der Kernantennen-Chlorophyll-Moleküle bilden.

Abb. [1.2]

Anordnung der 89 derzeit aufgelösten Chlorophyllmoleküle im PS I Kernantenne-RZ-Komplex aus *Synechococcus el.* (Eintrag „2pps.pdb“ in der Brookhaven Proteindatenbank).
Blick auf die Membranebene (oben) und Schnitt durch die Membranebene (unten)



Alle Entfernungsangaben beziehen sich dabei auf den Abstand zwischen den zentralen Mg-Atomen der Chlorophyll-Moleküle. Es ist zu sehen, daß die Abstände zwischen benachbarten Dipolen nicht viel größer sind als ihre Ausmaße. Damit ist die Bedingung für eine Betrachtung

der Wechselwirkung in Punktdipolnäherung streng genommen nicht erfüllt. Nichtsdestotrotz können die aus der Struktur gewonnenen Abstandsinformationen als Anhaltspunkte zur Abschätzung von Energietransfer-Raten mit Hilfe des Förster-Formalismus dienen. Die Energietransferdauer zwischen zwei 16 \AA voneinander entfernten Chlorophyllmolekülen läßt sich mittels Förster-Formalismus zu etwa 1 ps abschätzen. Damit ist gewährleistet, daß die Relaxation in den Schwingungsgrundzustand vorher abgeschlossen ist.

Außerdem enthält der Komplex noch einige andere Kofaktoren: 2 Chinonmoleküle, 3 Eisen-Schwefel-Cluster, die allesamt um die Achse des Komplexes gruppiert und an der Umsetzung und Stabilisierung der primären Ladungstrennung beteiligt sind. Deshalb wird der zentrale Teil des Komplexes, der auch die sechs räumlich isolierten Chlorophyll-Moleküle enthält, Reaktionszentrums-Domäne genannt, im Gegensatz zum äußeren Teil, der entsprechend Antennen-Domäne genannt wird. Beide Domänen zusammen bilden den Kernantenne-RZ-Komplex.

Wie bereits erwähnt, spielt für die Effizienz des Anregungsenergie-Transfers neben dem Abstand zwischen Donator und Akzeptor auch die gegenseitige Orientierung ihrer Übergangsdipolmomente eine Rolle. Für den hier relevanten langwelligen Q_Y -Übergang im Chlorophyll-Molekül liegt das Dipolmoment in der Ebene des π -Elektronen-Systems etwa entlang der Verbindungslinie zwischen den Pyrrol-Ringen I und III (siehe Skizze des Moleküls in Abb. [1.3]).

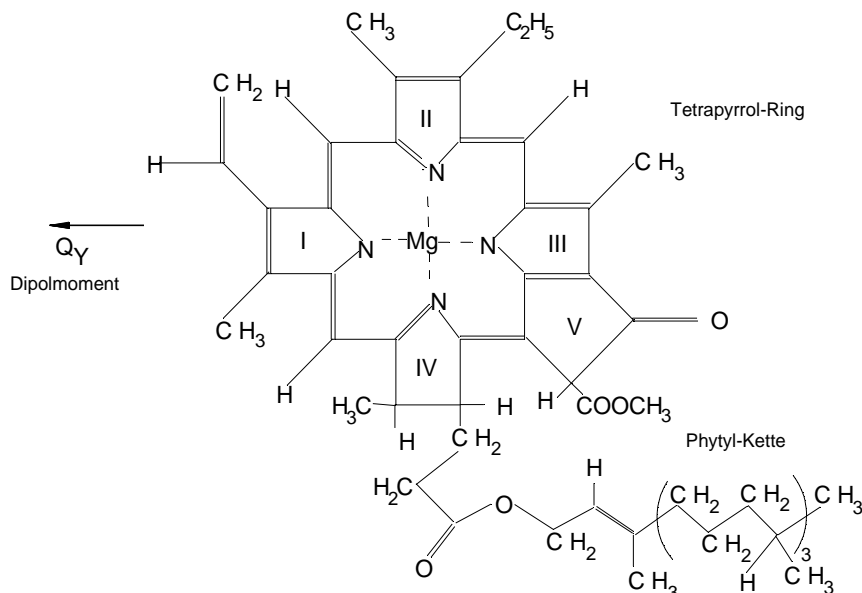


Abb. [1.3]

Schematische Darstellung eines Chlorophyll a-Moleküls (nach Clayton 1980). Der Durchmesser des Tetrapyrrol-Ringes beträgt $\sim 10 \text{ \AA}$

Mit der bisherigen Auflösung der aus der Röntgenbeugung gewonnenen Elektronendichte lassen sich keine Details des Chlorophyll-Moleküls unterscheiden. Die Phytyl-Seitenkette unterscheidet sich in der Elektronendichtekarte nur schwach von Aminosäureresten oder Karotinoid-Molekülen. Deshalb ist es zur Zeit zwar möglich, den Winkel zu bestimmen, den das ebene π -Elektronen-System mit der Membrannormalen bildet, nicht aber die genaue Lage des Q_Y -Übergangsmomentes in dieser Ebene. Hieran wird derzeit intensiv gearbeitet (Jordan 2000).

Spektrale Zusammensetzung des PS I Kernantenne-RZ-Komplexes

Informationen zur spektralen Zusammensetzung des PS I Kernantenne-RZ-Komplexes können aus dem Tieftemperatur-Absorptionsspektrum des Komplexes gewonnen werden. Dieses zeigt im Bereich der $Q_Y(0-0)$ Bande von 660 nm bis 730 nm eine Strukturierung in mehrere Sub-Banden. Im Gegensatz dazu behält die breitere Seitenbande von 600 nm bis 660 nm (Mischung aus $Q_Y(0-1)$ und $Q_X(0-0)$) auch bei 5 K ihre unstrukturierte Form (Flemming 1996, Pålsson et al. 1998).

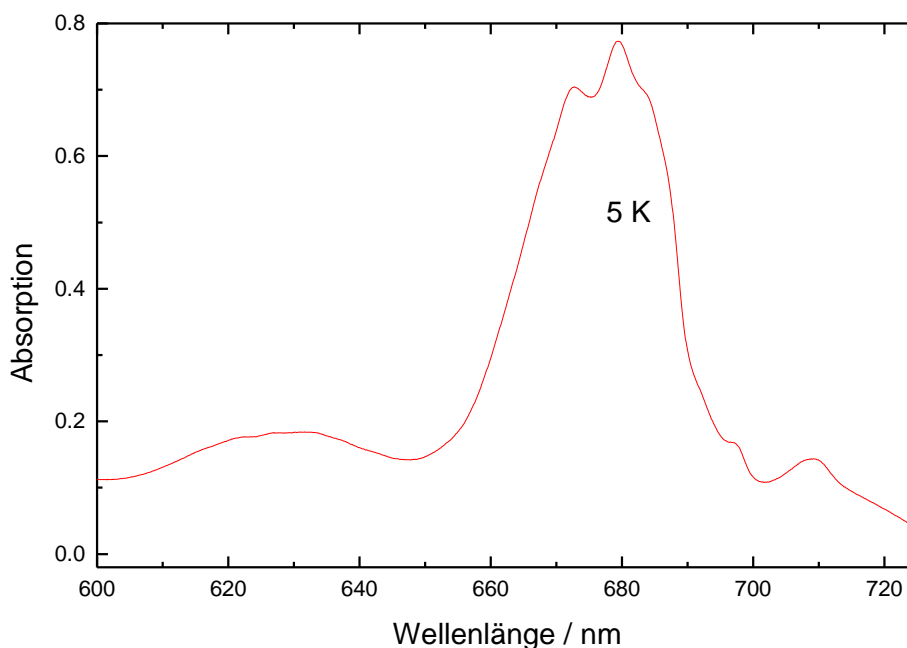


Abb. [1.4]

Absorptions-Spektrum des PS I Kernantenne-RZ-Komplexes aus *Synechococcus el.* bei 5 K

Das Auftreten verschiedener Subbanden in der langwelligen Absorptionsbande kann dahingehend interpretiert werden, daß sich die Absorption der Chlorophyll-Moleküle aufgrund

ihrer Wechselwirkung mit der lokalen Umgebung (Proteingerüst, Lösungsmittel, Detergens, andere Chlorophyll-Moleküle) voneinander unterscheidet. Interessant dabei ist, daß im Spektrum trotz der etwa 100 Chlorophyll-Moleküle pro Komplex nur acht mehr oder weniger deutliche Banden aufgelöst werden können. Das bedeutet, daß mehrere unterschiedliche Pigmente ähnliche Spektren aufweisen. Die Breite der Banden ist aber größer als die für ein einzelnes Chlorophyll-Molekül. Es ist anzunehmen, daß die Absorptionsmaxima der Pigmente eines „spektralen Pools“ eine gewisse Streuung aufweisen, was zu einer inhomogenen Verbreiterung führt. Dieser Inhomogenität wird durch die Annahme einer Gaußform für die Beschreibung der Banden Rechnung getragen. Um die spektrale Lage der Absorptionsmaxima aufzufinden, kann die zweite Ableitung des Tieftemperatur-Absorptionsspektrums als Anhaltspunkt herangezogen werden. Mit diesen Randbedingungen ist es möglich, das gemessene Spektrum als Summe mehrerer Gaußbanden anzupassen. Die relative Fläche unter jeder Gaußkurve gibt dann die relative Zahl der im Pool enthaltenen Pigmente wieder. Je nach Zahl, Breite und Lage der angenommenen Banden kann man dabei entsprechend der großen Zahl von freien Parametern zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. In der vorliegenden Arbeit wurde durchgängig eine Pigment-Zusammensetzung verwendet, die aus der Zerlegung von (Flemming 1996) unter expliziter Berücksichtigung des primären Donators erhalten wurde (Byrdin et al. 1999). Sie ist in Tabelle [1.1] dargestellt.

Tabelle [1.1]: Zusammensetzung des PS I Kernantenne-RZ-Komplexes nach Größe und spektraler Lage (Absorptionsmaximum) der Pigmentpools, bestimmt durch Gaußbandenzerlegung des 5 K Absorptionsspektrums aus Abb. [1.4]

Pool mit Absorptionsmaximum bei (nm)	A668	A674	A679	A685	A695	A702	A708	A720
Zahl der beteiligten Chl-Moleküle von 100	40	12	8	23	6	2	5	4

Der Pool bei 702 nm mit nur zwei Chlorophyll-Molekülen wurde eingeführt, um den primären Donator zu beschreiben, von dem man weiß, daß er bei ~700 nm absorbiert. Er wird deshalb auch P700 genannt (Kok 1960, Duysens et al. 1961, Döring et al. 1967). Wie ersichtlich, gibt es mit A708 und A720 zwei spektrale Pools, deren maximale Absorption bei größeren Wellenlängen als die des primären Donators liegt. Solche Pools, bzw. ihre Pigmente, werden als „Rote Pigmente“ bezeichnet. Die bisher charakterisierten PS I Kernantenne-RZ-Komplexe aus

verschiedenen Organismen weisen solche roten Pigmente in größerer oder kleinerer Zahl auf (Woolf et al. 1994, Pålsson et al. 1996, Karapetyan et al. 1997, Schiller et al. 1998). Das legt eine funktionale Rolle nahe, worüber jedoch derzeit noch keine Einigkeit besteht (Trissl 1993, Gobets et al. 1998a, Jennings et al. 1998).

Die individuellen Pigmentpools haben eine Halbwertsbreite von ~ 10 nm. Ausnahmen hiervon sind die beiden wesentlich breiteren „äußeren“ Pools, also die mit Absorptionsmaxima bei 668 nm und bei 720 nm mit über 15 nm Halbwertsbreite. Die große Breite des kurzwelligen Pools rührt von einer Überlagerung mit den $Q_Y(0-1)$ und Q_X Banden der längerwelligen Pigmente her. Für den längstwelligen Pigmentpool, der von nur vier Chlorophyll-Molekülen gebildet wird, ist bei einer so großen inhomogenen Breite die Beschreibung als „spektraler Pool“ vielleicht nicht mehr gerechtfertigt. Man könnte alternativ von individuellen Pigmenten sprechen. Gobets et al. (1994) haben an Proben aus *Synechocystis* für die dort enthaltenen roten Pigmente eine ungewöhnlich große Stokes-Verschiebung gemessen, die auch ein Maß für die homogene Linienbreite ist. Im Zusammenhang mit Holeburning-Studien von Gillie et al. (1989) werteten sie das als Hinweis auf eine exzitonische Kopplung individueller Pigmente und schlugen diese exzitonische Kopplung als eventuelle Ursache der langwelligen „roten“ Emission vor.

Die Zugehörigkeit zweier Chlorophyll-Moleküle zum gleichen spektralen Pool muß nichts darüber aussagen, wie weit sie räumlich voneinander entfernt sind. Vergleichbare lokale Umgebungen können sich auch an verschiedenen Enden des Komplexes finden lassen. Umgekehrt muß auch räumliche Nachbarschaft nichts über spektrale Ähnlichkeit aussagen, da die entscheidenden Wechselwirkungen sehr lokaler Natur sind. Wir stehen also vor dem Problem, daß sowohl unabhängige räumliche als auch spektrale Informationen verfügbar sind, diese aber nicht ohne weiteres einander zugeordnet werden können. Das führte dazu, daß eine Reihe möglicher Anordnungen vorgeschlagen wurden, die von streng trichterartig („funnel“, Seely 1973) über hierarchisch gegliedert („cluster“, „domains“, „subunits“, Den Hollander et al. 1983) bis zu völlig zufällig („random“, „pebble“, Owens et al. 1988) reichen.

Zeitverhalten

Ein Schlüssel zur Entscheidung zwischen den verschiedenen Modellen kann in der Zuhilfenahme einer zusätzlichen Dimension, der Zeitauflösung, liegen. Mit dem Försterformalismus ist ein Werkzeug gegeben, das gestattet, räumliche Abstandsinformationen und spektrale Absorptions- und Emissionseigenschaften für individuelle Pigmente zu verknüpfen und daraus Voraussagen

über den erwarteten Zeitverlauf der Anregungstransferprozesse abzuleiten. Zunächst nicht berücksichtigt bleibt dabei der Einfluß der gegenseitigen Orientierung der Übergangsdipolmomente, er kann aber als weiterer Parameter einfließen. Der Vergleich der so erhaltenen Aussagen mit zeitaufgelösten Messungen erlaubt dann Rückschlüsse darauf, ob ein vorgeschlagenes Arrangement ein konsistentes Bild ergeben kann.

1.4 Zeitaufgelöste Messungen der Dynamik angeregter Zustände in PS I

Während der letzten Jahre und Jahrzehnte konnten immer schnellere Prozesse in der Photosynthese zeitaufgelöst beobachtet werden. Das liegt zum einen an der Verbesserung der Meß- und Detektionstechniken und an der Möglichkeit, immer kürzere Anregungspulse zu erzeugen. Andererseits bringt der Einsatz dieser neuen Techniken, indem er neue Zeitbereiche eröffnet, zusätzlich schnellere, vorgelagerte Prozesse ans Tageslicht. So sind auf Zeitskalen von Femtosekunden über Piko-, Nano-, Mikro- und Millisekunden bis hin zu Minuten für die Photosynthese funktionell relevante Prozesse auszumachen. Die photophysikalischen Primärschritte, die Gegenstand dieser Arbeit sind, laufen, wie bereits erwähnt, im (Sub-) Pikosekunden-Bereich ab. Dieser Zeitbereich stellte vor nicht allzulanger Zeit die Grenze für zeitaufgelöste Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie dar. Viele der an der Auflösungsgrenze gewonnenen Daten und Informationen sind für sich allein genommen nicht tragfähig genug und bedürfen der gegenseitigen Bestätigung. Unter Berücksichtigung dieser Umstände ergibt sich in etwa folgendes Bild:

Einzelschritt-Transferzeit

Nach Lichtabsorption durch die Chlorophyll-Moleküle der Antenne und anschließender Relaxation in den Schwingungsgrundzustand des untersten elektronisch angeregten Singulett-Zustandes S_1^* , die sich im Femtosekundenbereich vollzieht, folgt eine Weitergabe der Anregungsenergie zwischen den Chlorophyll-Molekülen der Antenne. Dabei ändert sich im allgemeinen die Richtung des Übergang-Dipolmomentes. Dadurch ist mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzdepolarisation ein experimenteller Zugang zum Energietransfer gegeben.

Es gelang Du et al. (1993), an PS I Kernantenne-RZ-Komplexen mit ~40 Chl/P700 eine Fluoreszenzdepolarisierungszeit von ~180 fs zu ermitteln. Unter der Annahme, daß diese

Depolarisierung auf einen Energietransfer zwischen benachbarten Chlorophyll-Molekülen zurückzuführen ist und die einzelnen Chlorophyll-Moleküle zueinander zufällig orientiert sind, ordneten die Autoren diese Zeit in etwa einem einzelnen Anregungsenergie-Transferschritt zu. Sollten die benachbarten Chlorophyll-Moleküle eher parallel ausgerichtet sein, wäre die Zeit von 180 fs eine obere Grenze für einen einzelnen Anregungsenergie-Transferschritt.

Eine ähnliche Einzelschritt-Transferzeit von ~ 200 fs errechneten Owens et al. (1987). Sie maßen für unterschiedlich große Komplexe isotrope Fluoreszenzabklingzeiten von 20 ps bis 40 ps. Ein von Pearlstein (1982) entwickeltes Modell für eine zufällige Migration der Anregung zwischen den zu einem regelmäßigen Gitter angeordneten Antennen-Chlorophyll-Molekülen sagt eine lineare Beziehung zwischen der Zahl der Pigmente in der Antenne („Antennengröße“) und der beobachteten Fluoreszenzabklingzeit voraus. Owens et al. (1987) fanden nach Messungen an der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* mit effektiven Antennengrößen zwischen 20 und 40 Chl pro P700 diese Beziehung bestätigt. Außer der Einzelschritt-Transferzeit von ~ 200 fs wurde dabei auch eine intrinsische Ladungstrennungs-Lebensdauer von 3,4 ps bestimmt sowie ein Mittelwert von 2,4 Aufenthalten der Anregung beim primären Donator vor ihrer Verwertung gefunden. Davon ausgehend folgerten Owens et al. (1987), daß eine Limitierung in der Kinetik der Primärschritte eher in der Antenne als im RZ zu suchen sei („nearly diffusion limited“).

Energietransfer und Trap-Limitierung

Diese Interpretation wurde in der Arbeit von Wittmershaus et al. (1987) nicht geteilt, die aufgrund von Messungen an größeren Teilchen (~ 100 Chl/P700 aus der Grünalge *Phormidium luridum*) keine lineare Beziehung zwischen Antennengröße und Fluoreszenzabklingzeiten finden konnten. Die Autoren schlugen eine mögliche Limitierung durch das Reaktionszentrum vor („may tend towards the trap-limited case“).

Unterstützung fand die vorgeschlagene Trap-Limitierung, als es gelang, Anregungsenergie-Umverteilungsprozesse im Kernantenne-RZ-Komplex direkt spektroskopisch aufzulösen, und zwar durch Causgrove et al. (1989) in Absorptionmessungen und durch Holzwarth et al. (1993) auch in Fluoreszenzmessungen. Beide Arbeiten fanden Umverteilungszeiten (5-12 ps), die deutlich kürzer waren als die Lebensdauern für den Abbau des angeregten Zustandes (25 bis 40 ps). Da die dabei erstmals aufgelösten Transferprozeß-Lebensdauern als eine Obergrenze anzusehen sind, schien es Holzwarth et al. (1993) gerechtfertigt, die Gesamt-Kinetik als „essentially trap-limited“ zu bezeichnen.

Diese Ansicht wurde in der Folgezeit durch weitere Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen an Systemen mit unterschiedlichem Pigmentgehalt gestützt. Dabei wurden, ausgehend von einer Trap-limitierten Kinetik, folgende Lebensdauern für den primären intrinsischen Ladungstrennungsschritt errechnet: (Kumazaki et al. 1994): 3 ps, (Pålsson et al. 1995): 2 ps, (DiMugno et al. 1995) < 1 ps, (Hastings et al. 1994a): 1,6 ps. White et al. (1996) schließlich nutzten die bis dahin verfügbaren Strukturdaten (Koordinaten von ~ 45 Chlorophyll-Molekülen, Krauß et al. 1993), um mittels Modellierung einen Bereich für die intrinsische Ladungstrennungsdauer abzuschätzen, der noch mit ihren Messungen kompatibel ist. Sie erhielten eine Untergrenze von 0,83 ps und eine Obergrenze von 6,7 ps; die beste Beschreibung wurde mit einem Wert von 1,4 ps erzielt. Dabei wurden alle Angaben zur intrinsischen Ladungstrennungs-Lebensdauer errechnet aus den experimentell erhaltenen Fluoreszenzabkling-Lebensdauern und der Besetzungswahrscheinlichkeit des primären Donators im Kernantenne-RZ-Komplex. In Trap-limitierten Modellen ist diese Besetzungswahrscheinlichkeit durch die Boltzmannverteilung der Anregungsenergie über die Pigmente des Kernantenne-RZ-Komplexes bestimmt.

Gestörtes Gleichgewicht

Mit zunehmender Qualität der Präparationen wurde der PS I Kernantenne-RZ-Komplex aus *Synechococcus el.* sowohl strukturell als auch spektral besser charakterisiert. Als die Strukturdaten auf die räumliche Trennung des RZ von den übrigen Chlorophyll-Molekülen der Kernantenne hinwiesen, führte das zu dem Vorschlag, daß möglicherweise in Analogie zur Situation in Purpurbakterien das RZ nicht in die schnelle Äquilibration der Antenne einbezogen ist. Valkunas et al. (1995) schlugen ein Modell mit sogenannter „Transfer-to-the-Trap“-Limitierung vor.

Die verbesserten Präparationen zeigten, daß der PS I Kernantenne-RZ-Komplex aus *Synechococcus el.* mehr rote Pigmente enthält als angenommen. Das Emissionsmaximum des intakten Komplexes liegt deutlich längerwellig als 700 nm (Turconi et al. 1994, Pålsson et al. 1996, Pålsson et al. 1998, Gobets et al. 1998b). Aus der größeren Zahl roter Pigmente folgt eine geringere Besetzungswahrscheinlichkeit für den primären Donator P700. Nach ähnlichen Befunden an PS I Teilchen aus Mais mit ~ 200Chl/P700 folgten Croce et al. (1996) aus dieser geringeren Besetzungswahrscheinlichkeit für den primären Donator P700 eine schnellere intrinsische Ladungstrennungszeit im Bereich von 0.5 ps bis 1 ps und daß die PS I Kinetik möglicherweise doch Diffusions-limitiert sei. Spektrale und räumliche Informationen flossen in ein Modell von Jennings et al. (1997) ein, worin versucht wird, die beiden vorstehenden Aspekte

zu vereinen. Auch hier gelangten die Autoren zu der Aussage, daß das RZ nicht in die Äquilibration der Antenne einbezogen ist („equilibration perturbation“).

Jüngste Messungen wurden von unterschiedlichen Gruppen einerseits als Bestätigung des „Transfer-to-the-Trap“-limitierten Modells interpretiert (Gobets et al. 1998a,b). Andererseits wurden unterschiedliche Limitierungen für spektral unterschiedliche Teile des Antennen-Komplexes postuliert (Dorra et al. 1998; Holzwarth et al. 1998). In den Arbeiten beider Gruppen wurden intrinsische Ladungstrennungszeiten von weniger als einer Pikosekunde errechnet: Gobets et al. (1998a,b) gaben 0,4 bis 1 ps an und Holzwarth et al. (1998) erhielten 0,3 bis 0,5 ps. Demgegenüber maßen Kumazaki et al. (1998) an Proben mit reduziertem Gehalt an Antennen-Chlorophyll Transferzeiten zwischen einzelnen Chlorophyll-Molekülen, die sich bis in den Pikosekunden-Bereich erstrecken. Es zeigt sich, daß intrinsische Anregungsenergietransfer- und Ladungstrennungszeiten von der gleichen Größenordnung zu sein scheinen.

Savikhin et al. (1999) schließlich fanden mit einer Zeitauflösung von 100 fs an Proben aus *Synechocystis sp. PCC 6803* Transferzeiten von 2 ps und 6,5 ps gegenüber einer Trappingzeit von 24 ps. Mit Hilfe einfacher Modelle auf der Grundlage weniger spektraler Pools konnten jedoch diese Daten nicht zufriedenstellend erklärt werden. Weder „Transfer“- noch „Trap“-Limitierung erlaubten eine widerspruchsfreie Beschreibung der Experimente. Die Autoren schlugen daraufhin eine inhomogene Verbreiterung des roten Antennenpools über unterschiedliche Partikel vor. Damit ist es auch mit den neuesten, derzeit schnellsten Messungen nicht möglich, aufgrund direkt aufgelöster Zeitkonstanten eine eindeutige Entscheidung zwischen den vorgeschlagenen kinetischen Limitierungen zu treffen.

Niedrige Temperaturen verändern die Energietransfer-Kinetik

Mit abnehmender Temperatur verringert sich der Boltzmannfaktor $\exp(-DE/kT)$ so weit, daß ein effektiver Aufwärts- Energietransfer immer unwahrscheinlicher wird. Das schränkt die Durchlässigkeit einiger Energie-Migrationskanäle ein. Als Folge sollte eine veränderte Energietransfer-Dynamik beobachtbar sein. Für die anders als im PS I aufgebauten Reaktionszentren aus dem Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides* wurde erklärt (Marcus & Sutin 1985) und gezeigt (Van der Laan et al. 1990), daß die intrinsische Ladungstrennungszeit kaum temperaturabhängig ist. Der Transferschritt aus der Antenne zum primären Donator hingegen wird, wie alle Transferschritte, vom spektralen Überlapp zwischen Antenne und primärem Donator und damit von der Temperatur abhängen. Vom Studium der Kinetik angeregter Zustände bei niedrigen

Temperaturen erhofft man sich daher zusätzlichen Aufschluß über Struktur und Funktionsweise des PS I Kernantennen-RZ-Komplexes (Trinkunas & Holzwarth 1997).

Wittmershaus et al. (1992) maßen an PS I Proben aus *Synechocystis sp. PCC 6803* eine Zunahme der Fluoreszenzausbeute bei 5 K gegenüber 300 K auf das 25-fache. Die Autoren erklären das mit der Anwesenheit roter Pigmente mit Absorptionsmaxima deutlich längerwellig als das des primären Donators. Für eine auf ein solches Pigment gelangte Anregung wurde eine Aktivierungsenergie von 36 meV bei 5 K ermittelt, um zum primären Donator zu gelangen. Das entspräche einem Absorptionsmaximum von etwa 715 nm für die roten Pigmente.

Werst et al. (1992) fanden bei einer zeitaufgelösten Temperaturstudie (36 K - 295 K) an 40 Chl/RZ PS I Teilchen aus *Chlamydomonas reinhardtii* wellenlängenabhängige Fluoreszenzlebensdauern um 20 ps, 100 ps, 1 ns und 5 ns. Diese Heterogenität der Zerfallszeiten erfordert kompliziertere Modelle zur Erklärung. In einer entsprechenden Simulation gelangten Jia et al. (1992) zu dem Schluß, daß ein simples Trichtermodell mit den Daten von Werst et al. (1992) unvereinbar sei, während nichts gegen eine zufällige räumliche Anordnung der spektral unterschiedlichen Antennenpigmente spricht.

1.5 Der Einfluß der Umgebung auf Zustand und Reaktionskinetik in PS I

Der genaue Verlauf der zu untersuchenden photophysikalischen Primärprozesse wird in nicht geringem Maße von den konkreten Umgebungsbedingungen, in denen sich die Probe befindet, abhängig sein. Drei wesentliche Faktoren sollen hier kurz beleuchtet werden.

Die Geschwindigkeit des Ladungstrennungs-Prozesses hängt, wie bei jeder chemischen Reaktion, vom Angebot an Ausgangsstoffen und Reaktionsprodukten ab. In diesem Falle ist das Angebot oder der Mangel an verfügbaren Elektronen entscheidend. Im Unterpunkt Redox-Bedingungen wird darauf eingegangen.

Zum zweiten ist der zu untersuchende Kernantenne-RZ-Komplex für die Messung aus der Photosynthese-Membran herausgelöst worden. Um membranständige Proteine, die zur Aufrechterhaltung ihrer funktionalen Struktur auf eine lipophile Umgebung angewiesen sind, in wäßriger Lösung funktionsfähig zu erhalten, muß man sie mit einer Schutzschicht aus amphiphilen Molekülen umgeben. Dafür finden verschiedene Detergentien Verwendung. Die Funktionsfähigkeit des Komplexes hängt in entscheidender Weise von der Eignung der Detergentien ab. Auf dieses Problem wird im Unterpunkt Detergens-Bedingungen eingegangen.

Ein dritter Faktor, der auf die Kinetik der Ladungstrennung Einfluß nehmen kann, ist der Aggregationsgrad der Probe. Wie im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, spielt die Größe der Antenne eine wichtige Rolle. Es ist daher möglich, daß sich die Fluoreszenz-Zerfallskinetik für trimere und monomere Komplexe unterscheidet. Auf diese Frage wird im Unterpunkt Aggregations-Bedingungen eingegangen.

Redox-Bedingungen

Der primäre Donator P700 gibt bei der Ladungstrennung ein Elektron an den primären Akzeptor A_0 ab. Dieser reicht es sofort an einen sekundären Akzeptor A_1 (auch: Q_K) weiter. Auch diese Prozesse lassen sich zeitaufgelöst spektroskopisch verfolgen und zwar mittels transienter Absorption. Die Reduktion des primären Akzeptors ruft ein Absorptions-Bleichsignal hervor, dessen Maximum Wasielewski et al. (1987) bei 695 nm fanden, Nuijs et al. (1986) bei 693 nm sowie Kumazaki et al. (1994) und Hastings et al. (1994b) um 685 nm. Es ist allerdings unmöglich, die Bildung des reduzierten primären Akzeptors A_0 direkt zu verfolgen, da der vorgelagerte Energietransfer in das RZ geschwindigkeitsbestimmend ist. Deshalb ist die intrinsische Ladungstrennungszeit auch für Absorptionsmessungen nicht zugänglich. Für die Re-

Oxidation des reduzierten primären Akzeptors A_0 ? wurden in (Nuijs et al. 1986) und (Shuvalov et al. 1986) ~ 30 ps gemessen, für die des sekundären Akzeptors A_1 ? > 25 ns. Genauer wurde letztere Zeit von Schlodder et al. (1998) an Proben aus *Synechococcus el.* zu 290 ns bestimmt. Jedes der Radikalpaare kann in den Grundzustand neutraler Donator/neutraler Akzeptor rekombinieren. Bei Zimmertemperatur wird das nicht beobachtet, da die Vorwärts-Transferraten immer eine Größenordnung schneller sind als die Rekombinationsraten. Die Situation ändert sich für tiefe Temperaturen, wo Vorwärts-Transferschritte ausgefroren werden und die Ratenkonstanten für Rekombinationsprozesse den Vorwärtsraten vergleichbar werden können. Der oxidierte primäre Donator $P700^+$ hingegen, der seine Elektronen in intakten Membranen über lösliche Überträger vom Cytochrom b_6f -Komplex und letztendlich vom anderen Photosystem PS II nachgeliefert bekommt, wird erst im Bereich von Mikrosekunden re-reduziert. Abb. [1.1] zeigt in einer Skizze aktuelle Werte für die Lebensdauern der meisten Vorwärts-Elektronentransfer-Schritte (Zahlen aus Witt 1996, siehe auch die Übersichts-Artikel von Brettel 1997 und Golbeck 1994).

Nach einem vollständigen Ladungstrennungszyklus von PS I ist der limitierende Schritt in der Wiederherstellung des funktionellen Zustands der RZ-Komponenten die Re-Reduktion von $P700^+$, wir haben also in PS I unmittelbar nach erfolgter Ladungstrennung die folgende Situation: Der primäre Donator liegt oxidiert vor, der primäre Akzeptor und der sekundäre Akzeptor liegen re-oxidiert vor: $\{P700^+, A_0, A_1\}$. Das ist anders für PS II, wo die Re-oxidation des ersten Chinon-Akzeptors etliche hundert Mikrosekunden dauert, im Gegensatz zu Nanosekunden für die Re-Reduktion des dortigen primären Donators. Das führt zum folgenden Zustand: der primäre Donator liegt re-reduziert vor, der sekundäre Akzeptor liegt reduziert vor: $\{P680, Q_A\}$. Beide RZ-Zustände werden als „geschlossen“ bezeichnet, da unter diesen Bedingungen die nachfolgende Lichtabsorption nicht zu einer stabilen Ladungstrennung führt. Sie repräsentieren jedoch völlig unterschiedliche Situationen. In PS I mit oxidiertem P700 ist die Photochemie vollständig geblockt. In PS II kann das primäre Radikalpaar $\{P680^+, Pheo\}$ gebildet werden, aber eine Stabilisierung der Ladungstrennung ist blockiert. Der Begriff „offenes PS I“ wird in dieser Arbeit als ein Synonym für „PS I mit P700 im reduzierten (ungeladenen) Zustand“ benutzt und andererseits bedeutet „geschlossenes PS I“, daß der primäre Donator oxidiert vorliegt.

Der Übergang vom offenen zum geschlossenen RZ wird „Schließen des RZ“ genannt und blockiert im PS I die Photochemie und damit den Hauptzerfallskanal für die Anregungszustände. Es wird also ein Effekt auf die Fluoreszenz-Eigenschaften des Systems erwartet. Wenn solche

licht-induzierten Änderungen der Fluoreszenz-Quantenausbeute auf der Zeitskala des RZ-Schließens verfolgt werden, spricht man von einem Fluoreszenz-Induktions-Transienten. Dieser Effekt ist wohlbekannt aus PS II und wurde kürzlich von Trissl (1997) auch indirekt für PS I beobachtet, das aus *Synechocystis sp PCC 6803* psb DI/DII/C⁻ isoliert wurde. Ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluß des Redoxzustandes des primären Donators im PS I Kernantenne-RZ-Komplex auf die Fluoreszenzeigenschaften zu untersuchen.

Detergens-Bedingungen

Die räumliche Struktur und damit die Funktionsfähigkeit des PS I Kernantenne-RZ-Proteinkomplexes wird durch seinen Einbau in die photosynthetische Thylakoid-Membran definiert und stabilisiert. Hierfür spielen hydrophil/hydrophobe Wechselwirkungen eine wesentliche Rolle. Für die spektroskopischen Untersuchungen muß der PS I Kernantenne-RZ-Komplex isoliert und aus der Thylakoid-Membran herausgelöst werden. Zur Aufrechterhaltung seiner Struktur und Funktionsfähigkeit in wäßriger Umgebung benutzt man Detergentien.

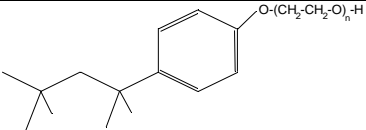
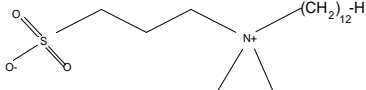
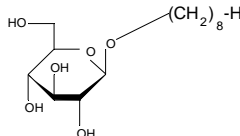
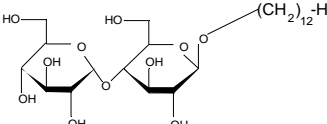
Bezeichnung	Molekülstruktur	CMC in Wasser bei 25°C in mmol/l	IUPAC-Name
TX-100		0,20 für n=8	Octylphenolpoly (ethyleneglycolether) _n
SB 12		3,6	N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate
OGP		20	1-O-n-Octyl-β-D-glucopyranoside
β-DM		0,18	1-O-n-Dodecyl-β-D-glucopyranosyl(1→4)α-D-glucopyranoside

Tabelle [1.2]

Name, Formeln und kritische Mizellenbildungskonzentration (CMC) für einige bei der Isolation von Membranproteinen gebrauchte Detergentien

(aus „Detergents for membrane research“, Boehringer Mannheim)

Sie ermöglichen eine hydrophobe Mikro-Umgebung in einer hydrophilen Makro-Umgebung, indem sie sich in der Art einer Seifenblase („Mizelle“) um den zu lösenden Komplex anordnen. Detergens-Mizellen bilden sich in einem polaren Lösungsmittel ab einer Mindest-Konzentration, der kritischen Mizellen-Konzentration („CMC“).

Bei zu geringer Detergenskonzentration aggregieren die Komplexe, um die zum Wasser exponierte Oberfläche zu minimieren. Von der Auswahl geeigneter Detergentien und ihrer Konzentration hängen die Form, Größe und Funktionalität des gelösten Protein-Komplexes ab. In (Dekker et al. 1988) wurde gezeigt, daß Detergens-Konzentrationen der drei- bis fünffachen CMC erforderlich waren, um Aggregation eines ebenfalls transmembranen PS II Proteinkomplexes zu vermeiden. Andererseits kann eine zu harsche Detergens-Behandlung die native Struktur und damit die Funktionsfähigkeit des Protein-Komplexes beeinträchtigen, indem Detergens-Moleküle beispielsweise beginnen, Pigment-Protein Wechselwirkungen zu stören. So zeigen PS I Präparationen aus *Synechococcus el.* nach Behandlung mit TX-100 ein stationäres Fluoreszenz-Spektrum, bei dem die den roten Pigmenten entsprechende Bande fast völlig fehlt (Owens et al. 1988). Die Autoren geben an, daß sich mit jeder weiteren TX-100 Waschung der Pigmentgehalt der Probe vermindert auf letztlich 55 Chl/P700. Holzwarth et al. (1993) verwendeten ebenfalls TX-100 (0,05%), erhielten aber einen Pigmentgehalt von 100 Chl/P700. Das stationäre Emissionsspektrum dieser Proben zeigt bei Zimmertemperatur zwei ungefähr gleich große Banden mit Maxima um 680 nm und 720 nm. In (Turconi 1993) wurden stationäre Fluoreszenz-Spektren für PS I Proben aus *Synechococcus el.* präsentiert, wo die langwellige Bande das Zimmertemperatur-Emissionsspektrum dominiert, wie das aus der Pigment-Zusammensetzung zu erwarten ist. Für diese Präparation wurde 0,05% SB 12 verwendet. In der gleichen Arbeit wurde auch gezeigt, daß höhere Konzentrationen an SB 12 eine Zunahme der kurzwelligen Bande zur Folge hat und daß für andere Detergentien wie β -DM oder TX-100 andere Grenzkonzentrationen gelten. Ein ähnliches Verhalten zeigten Croce et al. (1996) für Mais-Präparationen mit dem Detergens OGP. Hingegen konnten Hastings et al. (1995) beim Vergleich von Proben, die aus *Synechocystis* gänzlich ohne Detergens oder unter Verwendung von β -DM gewonnen wurden, „kaum Veränderung“ bemerken.

Aggregations-Bedingungen

Es ist eine Besonderheit der Cyanobakterien im Vergleich zu Algen und höheren Pflanzen, daß ihr Antennenapparat etwas anders aufgebaut ist. Der pflanzliche PS I Kernantenne-RZ-Komplex ist von einem zusätzlichen Antennen-Komplex umgeben, der bei Cyanobakterien fehlt. Dafür gibt es dort zusätzliche Antennenproteine, die sogenannten Phycobiliproteine. Deshalb können sich die cyanobakteriellen monomeren Kernantenne-RZ-Komplexe zu trimeren Strukturen anordnen. In dieser trimeren Struktur wird der Komplex kristallisiert. Für Präparationen aus *Synechocystis* gelang es Kruijff et al. (1994), die trimere Form reversibel in die monomere Form zu überführen, indem die Salzkonzentration im Puffer verändert wurde. Die Detergensbehandlung kann zu einer irreversiblen Aufspaltung der Trimer-Komplexe führen. Außerdem kann durch Mutation PS I ohne L-Untereinheit erzeugt werden. Da diese Untereinheit für die Trimerisierung wesentlich ist, kann der Komplex nach dieser Mutation keine Trimere mehr bilden (Flemming 1996). Sowohl Trimere als auch Monomere zeigen photosynthetische Aktivität. Deshalb ist bis heute nicht geklärt, ob eine oder beide Formen als „nativ“ zu bezeichnet ist. Es gab Versuche, einen funktionalen Vorteil der einen oder anderen Form zu finden. In den entsprechenden Studien an PS I aus *Synechocystis* (Turconi et al. 1996) und *Spirulina* (Karapetyan et al. 1997) gelang es aber nicht, bei Zimmertemperatur Unterschiede in der Fluoreszenz-Kinetik zwischen trimeren und monomeren Proben ausfindig zu machen. Übereinstimmend wurde gefunden, daß der Gehalt an roten Pigmenten in den Monomer-Präparationen gegenüber den Trimer-Präparationen leicht reduziert ist (3 statt 6 rote Pigmente für *Spirulina*, für *Synechocystis* nicht quantifiziert). Gleiches wurde von Flemming (1996) auch für PS I Proben aus *Synechococcus el.* gefunden (8 statt 10 rote Pigmente).

1.6 Ziele und Gliederung der Arbeit

Wie in den vorangehenden Abschnitten gezeigt wurde, bestehen bezüglich der konkreten Funktionsweise des Anregungsenergie-Transfers und –Abbaus im PS I Kernantenne-RZ-Komplex aus *Synechococcus el.* noch etliche Unklarheiten bzw. strittige Fragen. Zu ihrer Klärung wurden Messungen der PS I Fluoreszenzkinetik im Bereich von Millisekunden und Pikosekunden bei ZT und 5 K durchgeführt und versucht, ihre Ergebnisse durch Modellierungen zu reproduzieren. Besonderes Augenmerk wurde auf folgende Fragen gerichtet:

Gibt es einen Unterschied in der Dynamik der angeregten Zustände für offenes PS I (reduzierter primärer Donator P700) und geschlossenes PS I (oxidiertes primäres Donator P700⁺)

Kann die Dynamik der angeregten Zustände für PS I durch ein Gleichgewichtsmodell adäquat beschrieben werden?

Zeigt ein solches Modell eine kinetische Limitierung in der Dynamik der angeregten Zustände und wenn ja, welcher Art? Ist es auf dieser Grundlage möglich, eine intrinsische Ladungstrennungszeit oder andere intrinsische Parameter zu errechnen?

Welchen Einfluß haben Größe, Zusammensetzung und Präparation des Kernantenne-RZ-Komplexes auf die Dynamik der angeregten Zustände?

Welche Rolle spielen die „roten“ Pigmente in der Dynamik der angeregten Zustände?

Lassen sich mit Hilfe der kinetischen Daten Aussagen über die räumliche Anordnung der verschiedenen Spektralformen machen?

Anregungsenergie- Transfer im Kernantenne-RZ- Komplex aus <i>Synechococcus el.</i>	Raum	Zeit	Energie
Technik	Röntgen- Strukturanalyse	Zeitaufgelöste Einzelphotonenzählung	Tiefemperatur- Absorptionsspektroskopie
Befund	Koordinaten von 6 Chl im RZ 83 Chl in der Antenne, davon 2 Linker Chl zwischen Antenne und RZ	5 kinetische Komponenten bei ZT 5-10 ps 15-40 ps 40-80 ps ~200ps ~ 2 ns	spektrale Lage von 8 Absorptionsbanden bei 5 K 40 Chl bei 668 nm 12 Chl bei 674 nm 8 Chl bei 679 nm 23 Chl bei 685 nm 6 Chl bei 695 nm 2 Chl bei 702 nm 5 Chl bei 708 nm 4 Chl bei 720 nm
derzeitige experiment. Auflösung (bedingt durch)	0,4 nm (Diffraktion des Kristalles)	5 ps (Systemantwort)	5 nm (Monochromatorspalte)
Reichweite des Anregungsenergie- Transfers	7,4 nm Försterradius	3 ns Fluoreszenzlebensdauer	200 cm ⁻¹ spektrale Bandbreite

Tabelle [1.3]

Überblick über die in der vorliegenden Arbeit benutzten Rahmendaten für den Anregungsenergie-Transfer im Kernantenne-RZ-Komplex aus *Synechococcus el.*

In Tabelle [1.3] sind schematisch noch einmal einige wesentliche der derzeit verfügbaren Randbedingungen zur Lösung dieser Problemstellung zusammengefaßt. Hinzu kommen natürlich noch unzählige Befunde, die mit Hilfe anderer Techniken gewonnen wurden. Die in Tabelle [1.3] aufgezählten Daten flossen direkt oder indirekt in die durchgeführten Messungen und Modellierungen ein.

Daraus ergibt sich folgende Struktur der Arbeit:

Im Kapitel 1 wurden die grundlegenden Begriffe und Konzepte vorgestellt, die Eignung der Methoden der optischen Spektroskopie für die Untersuchung von Fragestellungen aus der Photosynthese begründet (1.1), kurz die Primärprozesse der oxygenen Photosynthese beschrieben (1.2), die Schlüsselrolle von kinetischen Messungen bei der Klärung des Zusammenhangs zwischen Strukturdaten und Spektraldaten aufgezeigt (1.3), ein Überblick über bereits vorliegende kinetische Messungen gegeben (1.4), die Bedeutung von Redoxzustand und Umgebungsbedingungen für das kinetische Verhalten unterstrichen (1.5) sowie die Fragestellung nach der Funktionsweise des Anregungsenergie-Transfers und –Abbaus im PS I Kernantennen-RZ-Komplex aus *Synechococcus el.* motiviert.

Im Kapitel 2 werden die verwendeten Meß- und Auswerteverfahren vorgestellt, die Präparation und Charakterisierung der Proben zusammengefaßt (2.1), die Apparatur zur Aufnahme von Fluoreszenzinduktions-Transienten beschrieben (2.2), Funktionsweise und Leistungsmerkmale der Anlage zur Messung zeitaufgelöster Fluoreszenzkinetik im ps-Bereich erklärt (2.3) sowie eine Einführung in die Art der Darstellung der Meßergebnisse (DAS) und deren Aussagekraft gegeben (2.4).

Im Kapitel 3 werden die Ergebnisse der Messungen vorgestellt, dem Einfluß der Umgebungsbedingungen auf die stationäre Fluoreszenz nachgegangen (3.1), eine Abhängigkeit der Fluoreszenzausbeute vom Redoxzustand des primären Donators festgestellt (3.2) sowie die Kinetik des Fluoreszenzabklingens ermittelt für trimere PS I Proben bei ZT (3.3), trimere PS I Proben bei 5 K (3.4) und monomere PS I Proben bei ZT und 5 K (3.5)

Im Kapitel 4 werden Modellierungsmethoden und –ergebnisse vorgestellt, einige thermodynamische Grundlagen nachgereicht (4.1), der technische Aspekt der kinetischen Modellierung beleuchtet (4.2), ein Drei-Pool-Modell zur Beschreibung der Dynamik angeregter Zustände im PS I Kernantenne-RZ-Komplex mit offenem und geschlossenem RZ bei ZT und 5 K vorgeschlagen (4.3), Förster-Transferraten aus den spektralen Eigenschaften der Pigment-Pools errechnet (4.4) sowie strukturelle und spektrale Informationen benutzt um das bisher vollständigste kinetische Strukturmodell des PS I Kernantenne-RZ-Komplex aufzustellen (4.5).

Im Kapitel 5 werden die Ergebnisse der Kapitel 3 und 4 gegenübergestellt und versucht, auf die Fragen am Anfang dieses Abschnitts eine Antwort zu formulieren, insbesondere wird die Abhängigkeit der Fluoreszenz-Löscheffizienz vom Redoxzustand des primären Donators begründet und ihre Konsequenzen aufgezeigt (5.1), die entscheidende Rolle der „roten“ Pigmente für die Fluoreszenzkinetik bei ZT und Tieftemperatur herausgestellt und was daraus für deren Anordnung im PS I Kernantenne-RZ-Komplex angenommen werden muß (5.2), der Disput zwischen „Transfer“- und „Trap“-limitierter Kinetik durch den Vorschlag einer wohlausgewogenen Kinetik mit vergleichbarem Einfluß aller beteiligten Prozesse bereichert (5.3) und endlich die Grenzen der hier durchgeführten Messung/Modellierung und Wege zu ihrer Überwindung aufgezählt (5.4).

Das Kapitel 6 schließlich faßt zusammen, was in den vorherigen Kapiteln alles an wichtigem gesagt wurde.

Der Anhang umfaßt eine Literaturliste, Danksagung und Lebenslauf sowie eine Tabelle der experimentell gemessenen Spektren, während sich die Abkürzungsliste und das Inhaltsverzeichnis am Anfang der Arbeit befinden.