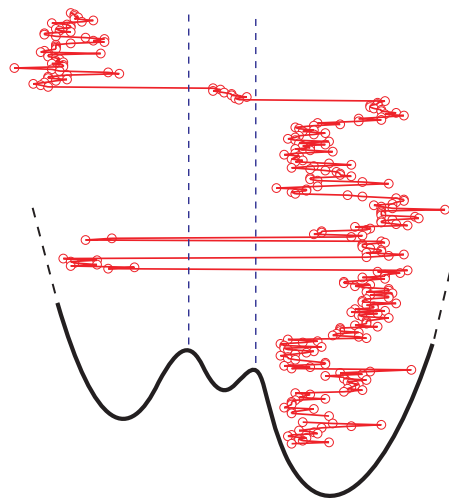


Einzelmolekül-Spektroskopie am Photosystem I



Im Fachbereich Physik
der Freien Universität Berlin
eingereichte Dissertation



Hauke Studier

5. November 2007

Diese Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe von
Prof. Dr. Robert Bittl an der Freien Universität Berlin.

Berlin, am 5. November 2007

Erstgutachter: Prof. Dr. Robert Bittl
Zweitgutachter: Prof. Dr. Paul Fumagalli

Tag der Disputation: 17. Dezember 2007

Certainly no subject or field is making more progress on so many fronts at the present moment than biology, and if we were to name the most powerful assumption of all, which leads one on and on in an attempt to understand life, it is that all things are made of atoms, and that everything that living things do can be understood in terms of the jiggings and wiggings of atoms.

R. P. Feynman [Fey63]

Abstract

A confocal spectrometer for low temperatures with sufficient efficiency to detect single-molecule fluorescence was built in the course of this work. It was used to investigate spectral properties, heterogeneities and dynamics of the low-energy antenna chlorophylls in individual Photosystem I (PS I) complexes from three different cyanobacteria: *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*), *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus* sp. PCC 7002. A fluorescence polarization analysis on single PS I monomers from *T. elongatus* reveals three pigment pools contributing to the red-shifted emission. In addition, the angle between the transition dipole moments of emitters from C708 and C719 were determined to be near 90° . In the spectral regions of the red-most states of all three species intense zero-phonon lines (ZPLs) were observed showing marked spectral diffusion. A clear effect due to the substitution of hydrogen for deuterium in the solvent was discovered, visible as significant reduction of spectral fluctuations. This suggests that proton displacement is one of the main processes responsible for fine-tuning of site energies in PS I. The occurrence of spectral jumps of ZPLs above 10 cm^{-1} in absence of external excitation was proved to be highly unlikely at 1.4 K. Consequently, at cryogenic temperatures proton tunneling in the vicinity of the red pools is very unlikely without excitation. Even for far red-shifted states of the PS I from all of the three above-mentioned species small Huang-Rhys factors were found, implying only a weak coupling of the electronic transition to the bath of vibrational modes. This finding indicates that no distinct electron-phonon coupling is necessary for the strong redshift of these states.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1 Photosystem I	5
1.1 Einleitung	5
1.2 Aufbau und Funktion	7
1.2.1 Einführung	7
1.2.2 Kopplungsmechanismen und Energietransfer	12
1.2.3 Proteinmatrix	15
1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“	19
1.3.1 Einführung	19
1.3.2 Ursprung der Rotverschiebung	21
1.3.3 Spektrale Eigenschaften	22
1.3.4 Funktion in der Natur	26
2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen	29
2.1 Einleitung	29
2.1.1 Stand der Forschung	30
2.2 Photophysik eines Makromoleküls	31
2.2.1 Einführung	31
2.2.2 Grundlagen für die optische Molekülspektroskopie	35
2.2.3 Absorption und Fluoreszenz	36
2.2.4 Modellierung der spektralen Form	38
2.3 Konfokale Mikroskopie	43
2.3.1 Einführung	43
2.3.2 Konfokales Prinzip	44
2.3.3 Laterale und axiale Auflösung	45
3 Experiment	51
3.1 Aufbau des konfokalen Spektrometers	51
3.1.1 Einführung	51
3.1.2 Funktionsweise und Übersicht	52
3.1.3 Lichtquelle: Laser und Einmoden-Lichtwellenleiter	54
3.1.4 Rastermethode: Galvano-Spiegeldreher	55
3.1.5 Ansprüche an das Objektiv	56

3.1.6	Badkryostat und Pumpensystem	58
3.1.7	Die Lochblende	61
3.1.8	Optisches Filtersystem	62
3.1.9	Lawinenphotodiode und Spektrometer mit CCD-Kamera	62
3.1.10	Detektionseffizienz	65
3.1.11	Computergestützte Datenakquisition	66
3.2	Präparation der Proben	66
3.2.1	Einführung	66
3.2.2	Photosystem I-Proben	66
3.2.3	Lösungsmittel zur Verdünnung der Probe	67
3.2.4	Anordnung der Probe	67
3.3	Messbedingungen	68
3.3.1	Experimentelle Auflösung bei tiefer Temperatur	68
3.3.2	Nachweis für die Detektion einzelner Moleküle	70
3.3.3	Verwendete Anregungsleistung	70
3.3.4	Hintergrundsignal bei der Aufnahme eines Spektrums	72
4	Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände	73
4.1	Einleitung	73
4.2	Stationäre Fluoreszenzspektren individueller PS I-Trimere	73
4.2.1	von <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	74
4.2.2	von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	75
4.2.3	von <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	76
4.3	Spektrale Dynamik in der Fluoreszenz	78
4.3.1	Zeitabhängigkeit der Linienbreite	79
4.3.2	Emissionslinien mit mehreren diskreten Realisierungen	81
4.3.3	Energiebereiche der Emissionslinien	82
4.3.4	Spektrale Diffusion von breiten Emissionsbanden	84
4.4	Separation von Fluoreszenzbanden	86
4.4.1	PS I-Monomere von <i>T. elongatus</i>	86
4.4.2	PS I in trimerer Form	91
4.5	Vergleich der Fluoreszenz einzelner Komplexe mit der eines Ensembles	94
4.6	Diskussion	98
4.7	Zusammenfassung	103
5	Energielandschaft der Proteinumgebung	105
5.1	Einleitung	105
5.2	Korrelation zwischen Fluktuationsrate und Energieänderung	105
5.2.1	beim PS I von <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	105
5.2.2	beim PS I von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	109
5.3	Auslöser der Fluoreszenzdynamik bei tiefer Temperatur	112
5.4	Auswirkung von schwerem Wasser im Lösungsmittel	114

5.4.1	auf das PS I von <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	114
5.4.2	auf das PS I von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	117
5.5	Direkte Beobachtung von hierarchischen Rängen	119
5.6	Entstehung der breiten roten Fluoreszenzbande	123
5.7	Diskussion	124
5.8	Zusammenfassung	133
6	Charakterisierung der roten Zustände	135
6.1	Einleitung	135
6.2	Bestimmung der Elektron-Phonon-Kopplungsstärke aus der Linienform .	136
6.2.1	beim PS I von <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	137
6.2.2	beim PS I von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	140
6.2.3	beim PS I von <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	144
6.3	Korrelation zwischen verschiedenen roten Zuständen	146
6.3.1	Änderungen im Energietransfer	147
6.3.2	Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten	149
6.4	Diskussion	151
6.5	Zusammenfassung	158
	Zusammenfassung	161
	Ausblick	165
	Summary	167
	Anhang	169
	Literaturverzeichnis	173
	Publikationen	191
	Akademischer Lebenslauf	193
	Danksagung	195