

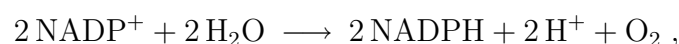
1 Photosystem I

1.1 Einleitung

Die Photosynthese sorgt für den Aufbau von organischer Materie durch Lichtenergie und schafft damit die Grundlage für fast alles irdische Leben. Die ältesten fossilen Cyanobakterien sind ca. 3,5 Milliarden Jahre alt. Vermutlich haben sich Bakterien mit anoxygener Photosynthese schon früher entwickelt und sind heute nur nicht mehr nachweisbar. Für diese war Sauerstoff ein starkes Zellgift. Erst die Cyanobakterien haben die oxygene, sauerstoffentwickelnde Photosynthese mit zwei hintereinander geschalteten Photosystemen entwickelt, wodurch ihnen die energetisch sehr aufwendige Spaltung molekularen Wassers möglich wurde. Die nötige Energie spendet die Sonne, die somit einen Hauptbeitrag zur Entstehung von terrestrischem Leben geleistet hat. Sie strahlt pro Tag ca. $1,5 \cdot 10^{22}$ kJ auf die Erde ein, wovon ca. 1 % durch photosynthetische Organismen absorbiert wird. Jährlich werden ca. 10^{11} t CO_2 durch Photosynthese fixiert ($\cong 10^{18}$ kJ). Die Gesamtreaktion der Photosynthese ergibt unter Lichtzufuhr folgende Bilanz:



wobei die freie Energiedifferenz zwischen dem Produktzustand und dem Ausgangszustand $\Delta G = 492,2$ kJ/mol beträgt. Die oxygene Photosynthese wird von den unterschiedlichsten Organismen genutzt. Bei Pflanzen und Grünalgen findet sie in den Chloroplasten statt. Der Innenraum, das Stroma, ist mit löslichen Enzymen des Calvinzyklus und membranartigen Strukturen, den Thylakoiden, gefüllt. Diese besitzen ein System aus Lipiddoppelmembranen, der Thylakoidmembran, die eine wässrige Innenphase, Thylakoidlumen, umschließt. In Cyanobakterien sind keine speziellen Zellorganellen ausgebildet und die Thylakoide sind direkt ins Zellplasma eingelagert. Photosynthese umfasst Licht- und Dunkelreaktionen. Letztere finden im Stromaraum statt und beinhalten die Fixierung von CO_2 zum Aufbau von Zucker. Sie werden vom Calvinzyklus beschrieben, der in Lehrbüchern eingehend behandelt wird [Str95, Voe95]. Die Lichtreaktionen laufen in und an der Thylakoidmembran ab. Sie beinhalten den Elektronentransport mit der Bilanz



1 Photosystem I

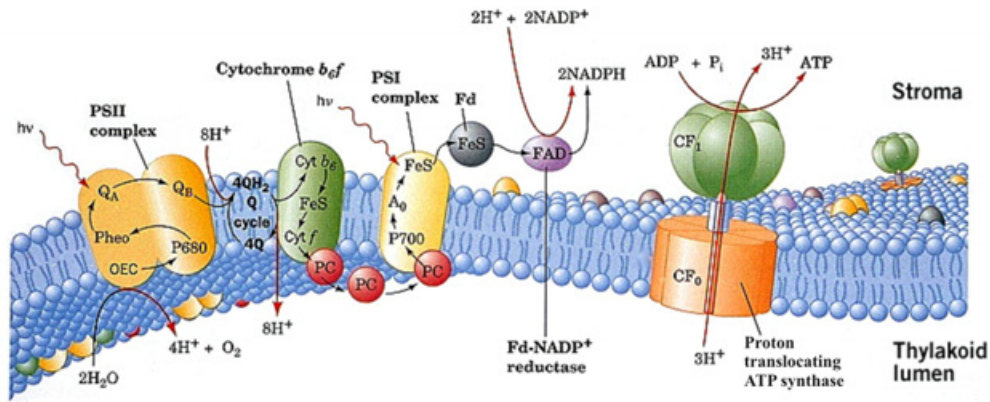
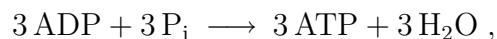


Abbildung 1.1: Schnitt durch die Thylakoidmembran. Vier Proteinkomplexe sind an der oxygenen Photosynthese beteiligt. Im PS II wird nach Absorption zweier Photonen P680 oxidiert und Q_B über transmembranen Elektronentransfer zum Hydrochinon (*plastoquinol* PQH_2) reduziert. Dieses diffundiert in die Membran zum Cytochrom b_6f ($Cyt\ b_6$). Derzeit reduziert die Wasseroxidase das $P680^+$ -Ion und spaltet dabei Wasser. Das Q_B wird vom $Cyt\ b_6$ reoxidiert. Dabei werden effektiv zwei Protonen ans Lumen abgegeben und zwei Elektronen durch den $Cyt\ b_6$ -Komplex transferiert und auf Plastocyanin (PC) übertragen. Im PS I wird nach Absorption eines Photons P700 oxidiert. Der transmembrane Elektronentransfer mündet auf Ferredoxin (Fd), welches $NADP^+$ zu $NADPH$ reduziert. Das $P700^+$ -Ion wird vom PC rereduziert. Der durch die Lichtreaktion aufgebaute Protonengradient zwischen Stroma und Lumen wird von der ATP-Synthase zur Umwandlung von ADP zu ATP genutzt. Das Bild wurde von Eberhard Schlodder zur Verfügung gestellt.

wobei die freie Energiedifferenz $\Delta G = 432,1\text{ kJ/mol}$ beträgt und die Photophosphorylierung



bei der die freie Energiedifferenz bei $\Delta G = 3 \cdot 49,3\text{ kJ/mol}$ liegt. Die „Maschinerie“ für diese Prozesse besteht aus vier Funktionseinheiten, die in die Thylakoidmembran eingebettet sind. In Abbildung 1.1 werden diese vier transmembranen Proteinkomplexe, bestehend aus Photosystem II (PS II), Cytochrom b_6f , Photosystem I (PS I) und der ATP- CF_0CF_1 -Synthase, in einem schematischen Schnitt durch die Membran dargestellt. In der Bildunterschrift werden die einzelnen Prozesse kurz skizziert. Eine ausführliche Abhandlung findet man z.B. in Ref. [Häd99]. Da das Augenmerk dieser Arbeit auf das PS I gerichtet ist, wird nur auf das PS I näher eingegangen. Das PS I ist ein Pigment-Proteinkomplex und eines von zwei Photosystemen, die im Zuge der oxygenen Photosynthese Lichtenergie in chemische Energie umwandeln. Unter Lichteinwirkung findet im PS I, ähnlich wie im PS II, eine Ladungstrennung statt, indem ein Elektron über eine Elektronentransferkette von Kofaktoren durch die Membran transportiert wird. Der oxidierte primäre Donator $P700^+$ wird von Plastocyanin oder Cytochrom c_6 wieder reduziert. Auf der Akzeptorseite wird Ferredoxin bzw. Flavodoxin vom terminalen Eisen-Schwefel-Zentrum reduziert. In einem weiteren Schritt wird schließlich $NADP^+$ zu $NADPH$ reduziert. Der Aufbau der Elektronentransferkette ähnelt der Bandstruktur hinsichtlich Valenz- und Leitungs-

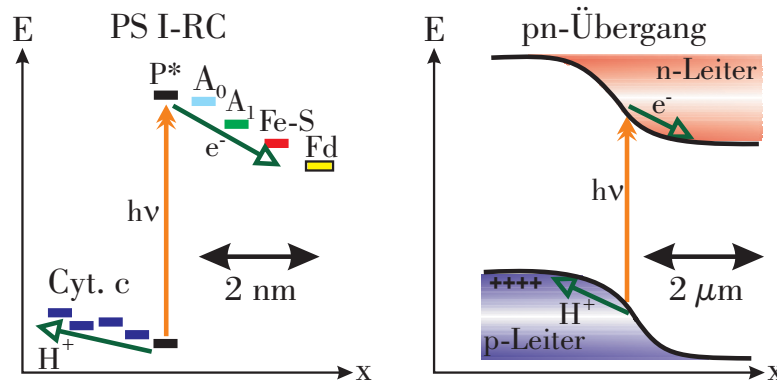


Abbildung 1.2: Vergleich zwischen PS I-Reaktionszentrum und Halbleiter-Photodiode hinsichtlich Energiefluss und Elektronenbewegung. Im physikalischen Sinn kann PS I als nanoskalierte molekulare Photodiode aufgefasst werden. Ihr Wirkungsquerschnitt übertrifft auf engstem Raum den eines synthetisch herstellbaren pn-Übergangs um drei Größenordnungen.

band in einem pn-Übergang. PS I kann als nanoskalierte Photodiode betrachtet werden. In Abbildung 1.2 wird das technische mit dem biologischen System verglichen. Die in der Thylakoidmembran eingebetteten PS I-Komplexe steuern den Energiefluss auf der nm-Längenskala, während in Halbleiter-Solarzellen, deren Herstellung aus hochreinen Kristallen sehr viel Energie kostet, die Ladungstrennung auf einer größeren Längenskala von Mikrometern erfolgt. Der Vorteil einer großen dielektrischen Funktion des biologischen Systems erwächst aus den großen Übergangsdipolmomenten von aromatischen Molekülen. Entsprechende Werte für Chlorophylle findet man in [Kno03]. Zur Nutzung von technischer Photovoltaik werden außer den Halbleiter-Zellen lichtsammlende Optiken, Spannungswandler und energiespeichernde Akkumulatoren benötigt. Insgesamt amortisiert sich Photovoltaik daher wenn überhaupt erst nach vielen Jahren Nutzung. Die an der Photosynthese beteiligten „molekularen Maschinen“ wie PS I werden von der Natur selbst hergestellt, verwendet und bei Beschädigung ausgetauscht. Die Energiebilanz ist positiv.

1.2 Aufbau und Funktion

1.2.1 Einführung

Die Struktur von PS I

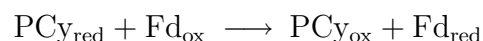
Die PS I von Prokaryonten und Eukaryonten sind ähnlich aufgebaute Multiproteinkomplexe. Leichte Unterschiede bestehen in Anzahl und Organisation der Polypeptide. Die

1 Photosystem I

Struktur des PS I von höheren Pflanzen und Algen umfasst 13 Proteinuntereinheiten und zusätzlich periphere Lichtsammelkomplexe (LHC I) [Mel05], ein Ringsystem aus Polypeptiden, dessen eingebaute Chlorophylle dem PS I von Eukaryonten einen größeren Wirkungsquerschnitt verschaffen. Das cyanobakterielle PS I besitzt 12 Untereinheiten (A – F, I – M, X) und eine Gesamtmolekülmasse von 350 kDa. Detaillierte strukturelle Informationen wurden durch Röntgenstrukturanalyse an Kristallen vom cyanobakteriellen PS I der thermophilen Spezies *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*, früher: *Synechococcus elongatus*) gewonnen. Die Auflösung beträgt derzeit 2,5 Å [Jor01]. Die Auflösung der Röntgenstruktur des PS I von höheren Pflanzen beträgt zum Vergleich zur Zeit 3,4 Å [Amu07]. Während vom PS I in Cyanobakterien angenommen wird, dass es in seiner natürlichen Umgebung in trimerer Form vorliegt [Boe87, Sch97], wurden in den Membranen von Eukaryonten bisher nur PS I-Monomere gefunden [Boe90, Ger02]. Das unterschiedliche Aggregationsverhalten ist vermutlich auf die leicht differenzierende Polypeptidzusammensetzung zurückzuführen. Im pflanzlichen PS I fehlen die Untereinheiten PsaM und PsaX gegenüber dem cyanobakteriellen PS I. Dafür sind zusätzlich die drei Untereinheiten PsaG, PsaH und PsaN vorhanden. Die Struktur des PS I von *T. elongatus* wird in Abbildung 1.3 gezeigt. Sein Gerüst wird von zwei großen (PsaA, PsaB) und sechs kleineren (PsaI, PsaJ, PsaK, PsaL, PsaM und PsaX) integralen Membranproteinen mit α -Helices gebildet. Drei Proteinuntereinheiten sind von der Stromaseite an den Komplex gebunden (PsaC, PsaD und PsaE) und eine ist in das Lumen exponiert (PsaF). Das Proteinrückgrat trägt 127 Kofaktoren: 96 Chlorophylle (grün eingezeichnet), 22 Carotinoide, vier Lipide, drei Eisen-Schwefel-Zentren (Fe_4S_4) und zwei Phylloquinone. Der Kern des Komplexes wird von den Untereinheiten PsaA und PsaB gebildet, die je elf transmembrane α -Helices enthalten, von denen jeweils fünf die Kernstruktur mit der Elektronentransferkette darstellen. Die restlichen 12 Polypeptide beinhalten einen großen Teil der Antennenchlorophylle. An die Untereinheit PsaC sind die terminalen Akzeptoren gebunden, die beiden Fe_4S_4 -Zentren F_A und F_B .

Die Funktion

Eine Übersicht der Funktion von PS I als lichtgetriebene Plastocyanin-Ferredoxin-Oxidoreduktase wurde bereits in der Einleitung 1.1 gegeben. Unter Lichteinwirkung transferiert PS I Elektronen vom Plastocyanin PCy oder Cytochrom *c*6 zum Ferredoxin Fd oder Flavodoxin. Die Bruttoreaktion wird durch die Gleichung



beschrieben. Das lösliche PCy befindet sich dabei im Lumen der Thylakoide und das Fd im Stromaraum der Chloroplasten bei den Eukaryonten bzw. im Cytoplasma bei den Prokaryonten. Die Reaktion wird durch die Absorption von Lichtenergie in den Antennenpigmenten angetrieben. In Abbildung 1.4 wird die Wirkungsweise des PS I als „Energie-trichter“ veranschaulicht. Nach effizientem Energietransfer wird die Anregungsenergie auf

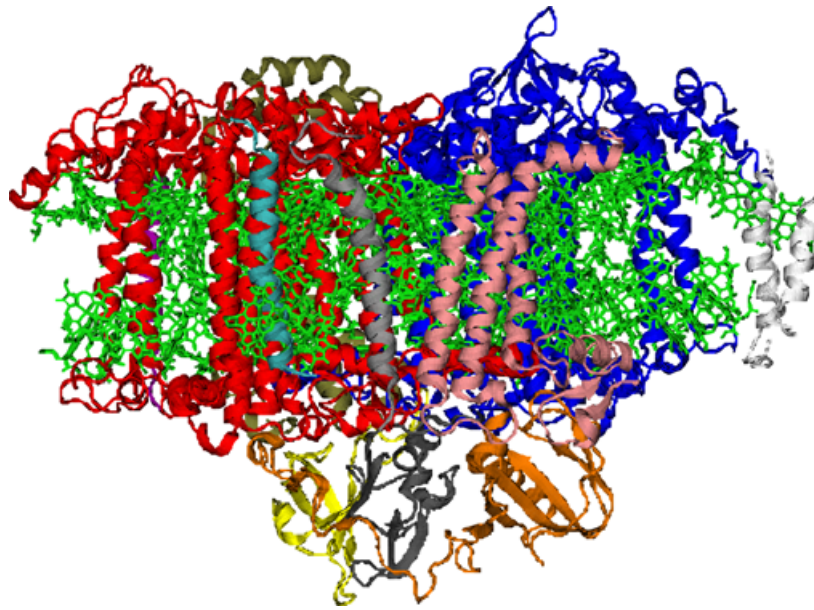


Abbildung 1.3: Strukturdarstellung eines PS I-Monomers vom Cyanobakterium *T. elongatus*. Die Blickrichtung liegt in der Membranebene, wobei sich oben die lumenale und unten die stromale Seite befindet. Die Antennenchlorophylle sind in grün eingezeichnet und die Proteinuntereinheiten in: PsaA → blau, PsaB → rot, PsaC → dunkelgrau, PsaD → orange, PsaE → gelb, PsaF → bronze, PsaI → grau, (PsaJ vollst. verdeckt), PsaK → weiß, PsaL → rosa, PsaM → mintgrün, PsaX → magenta. Die Trimerisierungsachse liegt bei der Untereinheit PsaL. Die Röntgenstruktur wurde in Ref. [Jor01] veröffentlicht. Die Darstellung wurde mit VMD erstellt [Hum96].

den primären Donator P700 übertragen. Die primäre Ladungsseparierung erfolgt aus dem ersten elektronisch angeregten Singulettzustand $^1\text{P700}^*$. Als primärer Elektronenakzeptor wirkt ein Chlorophyll, das als A_0 bezeichnet wird. Vom $\text{A}_0^{\bullet-}$ nimmt der sekundäre Akzeptor, das als A_1 bezeichnete Phylloquinon (Vitamin K_1), das Elektron auf. $\text{A}_1^{\bullet-}$ überträgt das Elektron auf F_X , einem der drei Fe_4S_4 -Zentren. F_A und F_B vermitteln schließlich als redoxaktive Gruppe die Elektronenübertragung vom $\text{F}_\text{X}^{\text{red}}$ auf das $\text{Fd}(\text{I})$. Wie beim bakteriellen RC ist auch das RC beim PS I in zwei Zweigen organisiert. Mehr Details zur Struktur und Funktion von PS I werden von den Ref. [Gol91, Set92, Bry92, Mal96, Bre97] geboten.

Pigmentgruppen und Absorptionseigenschaften

Die primären Lichtsammelpigmente in der Photosynthese sind die Chlorophylle (griechisch: *chloros* → grün, *phullon* → Blatt). Detaillierte Informationen über Struktur und Eigenschaften von Chlorophyllen findet man in den Ref. [Sch91, Str95]. In der oxygenen Photosynthese existieren zwei unterschiedliche Typen von Chlorophyllen: Chlorophyll a (Chl a) und Chlorophyll b (Chl b). Absorptionsspektren von Chl a und Chl b in Lösung werden in Abbildung 1.5 gezeigt. Durch die unvollständige Überlappung wird die spektra-

1 Photosystem I

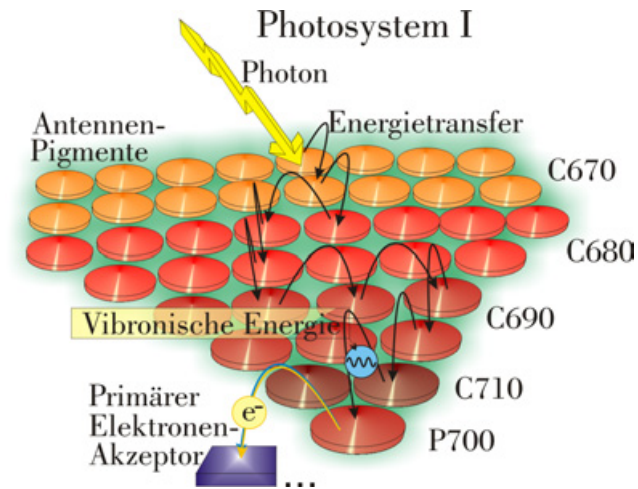


Abbildung 1.4: Veranschaulichung der Wirkungsweise des PS I als „Energietrichter“. Einfallende Photonen werden von dem Antennensystem gesammelt. Die meisten Pigmente haben hierfür ihr Absorptionsmaximum bei ca. $\lambda = 680 \text{ nm}$ (C680). Anschließend wird die Energie effektiv an niederenergetischer absorbierende Pigmente weitergeleitet. Die Energie kann auch Pigmente durchlaufen, deren angeregte Zustände unter dem des Reaktionszentrums liegen. Dann wird für den letzten Transferschritt die Absorption von vibronischer Energie aus dem Protein benötigt. Nach Anregung des P700 zum P700* erfolgt die Oxidation zum P700⁺, und eine stabile Ladungstrennung wird eingeleitet.

le Region, in der absorbiert werden kann, ausgedehnt. Bei beiden Arten von Chlorophyllen ist der Hauptanteil der Absorption über zwei Banden im sichtbaren Spektralbereich verteilt: Die Soret-Bande mit ihrem Maximum bei ca. 430 nm für Chl a (bzw. ca. 460 nm für Chl b) und eine Bande im roten Spektralbereich, die den Q_y -Übergang repräsentiert, mit ihrem Maximum bei ca. 670 nm für Chl a (bzw. ca. 650 nm für Chl b). Sowohl der Soret-Übergang als auch der Q_y -Übergang besitzen sehr große Extinktionskoeffizienten in der Größenordnung von $10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ [Sch91, Str95]. Die Ursache liegt in der Molekülstruktur. Chlorophyll besteht aus einem Tetrapyrrolring, an den eine Phytolkette gebunden ist. Das starke Übergangsdipolmoment wird von dem konjugierten π -Elektronensystem des Rings bewirkt. In der Ringebene kann senkrecht zu dem starken Übergangsdipol noch ein zweiter Übergang, der Q_x -Übergang, stattfinden. Dieser absorbiert im Bereich von 580 – 640 nm. Die Q_x -Bande wird jedoch aufgrund des nur schwach absorbierenden Q_x -Übergangs von der Q_y -Bande verdeckt. Die insgesamt schwache Absorption im grünen Spektralbereich lässt die Blätter der meisten Pflanzen grün aussehen.

Für die Funktionen des PS I ist noch eine zweite Gruppe Pigmente essentiell: die Carotinoide. Drei unterschiedliche Typen sind im PS I enthalten: Carotin, Lutein und Violaxanthin. Anders als bei den Chlorophyllen ist die Struktur der Carotinoide hauptsächlich linear. Sie besteht aus einer je nach Typ variierenden Polyenkette. Die Absorptionseigenschaften werden auch in diesen Systemen durch konjugierte π -Elektronen bestimmt. Der elektronische $S_0 - S_1$ -Übergang ist optisch verboten, so dass im Spektrum der $S_0 - S_2$ -Übergang dominiert. Dieser Übergang besitzt einen sehr großen Extinktionskoeffizienten von $1,3 \cdot 10^6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (für β -Carotin). Carotinoide übernehmen in der Photosynthese etliche Aufgaben. Zwei erscheinen besonders wichtig und werden hier kurz hervorgehoben. Carotinoide sind sehr effiziente Energiedonatoren und dienen dem PS I somit als zusätzliche Antennenpigmente. Vermutlich viel wichtiger als die Lichtsammelfunktion ist ihre doppelte Schutzfunktion für die Chlorophylle: Zum einen werden Tripletzustände der Chlorophylle effektiv gelöscht, die durch ihre Langlebigkeit unerwünschte Photoreak-

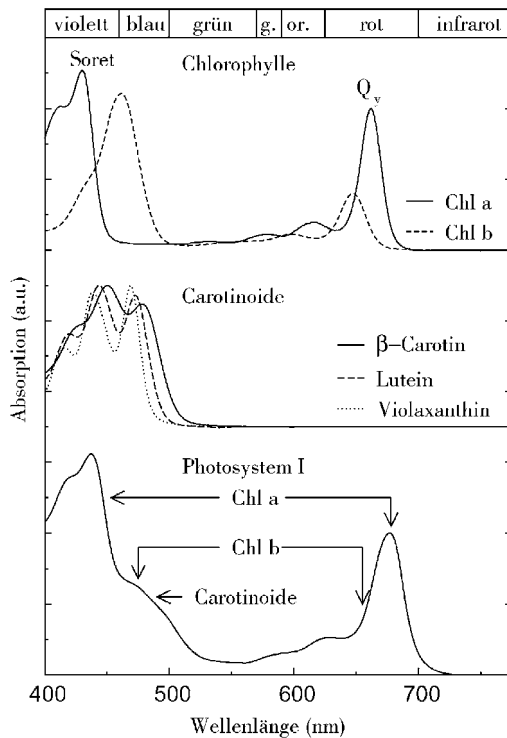


Abbildung 1.5: Absorptionsspektren bei Raumtemperatur. **Oben:** Chlorophyll a (Chl a) in Pyridin und Chlorophyll b (Chl b) in Aceton. **Mitte:** β -Carotin in Hexan, Lutein und Violaxanthin in Methylpentan. **Unten:** gesamter PS I-Komplex, der aus Mais isoliert wurde (PS I-200). Die Spektren sind nicht auf ihre Oszillatorstärke normalisiert. Quelle: [Gob02] (modifiziert).

tionen wie z.B. Bindungsbrechung bewirken können. Dadurch wird zum anderen die Entstehung von schädlichem Singulett-Sauerstoff stark herabgesetzt, der zur oxidativen Zerstörung von Pigmenten und Proteinen führt. Dennoch entstehender Singulett-Sauerstoff wird effizient in Triplett-Sauerstoff umgesetzt. Diese Funktion ist zum Überleben des Organismus notwendig. Die genauen Reaktionsprozesse der Carotinoide werden z.B. in Ref. [Häd99] beschrieben. Durch das starke Herabsetzen der Triplettausbeute der PS I-Pigmente ermöglichen die Carotinoide der optischen Einzelmolekül-Spektroskopie den Zugang auf das System.

Wie oben erwähnt, besteht der Chromophor-Teil eines PS I-Monomers aus 96 chemisch identischen Chl a-Molekülen. Ihre räumliche Verteilung, Orientierung und die unterschiedlichen Proteinbindungsplätze führen zu einer Vielzahl von Wechselwirkungen, die die lokalen optischen Übergangsenergien der Pigmente, genannt „*site energies*“, modifizieren. Auf die verschiedenen Kopplungsarten wird in den Abschnitten 1.2.2 und 2 genauer eingegangen. Der Einfluss auf die elektronische Struktur von gebundenen Pigmenten gegenüber der von gelösten Chlorophyllen bewirkt sowohl im Absorptions- als auch im Fluoreszenzspektrum Verschiebungen der Maxima von bis zu ca. 10 nm und eine starke Veränderung der Linienform. Wie der Abbildung 1.5 entnommen werden kann, wird z.B. das Absorptionsmaximum der Q_y -Bande auf ca. 680 nm verlagert. Die Heterogenität in den optischen Übergangsenergien der verschiedenen Pigmente und die zusätzlich überlagerten zeitlichen Fluktuationen, die auf der dynamischen Struktur von Proteinen beruhen, führen zu Verbreiterungen und Schultern in den Spektren. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit ist das Ausschmieren des Absorptionsspektrums oberhalb von

1 Photosystem I

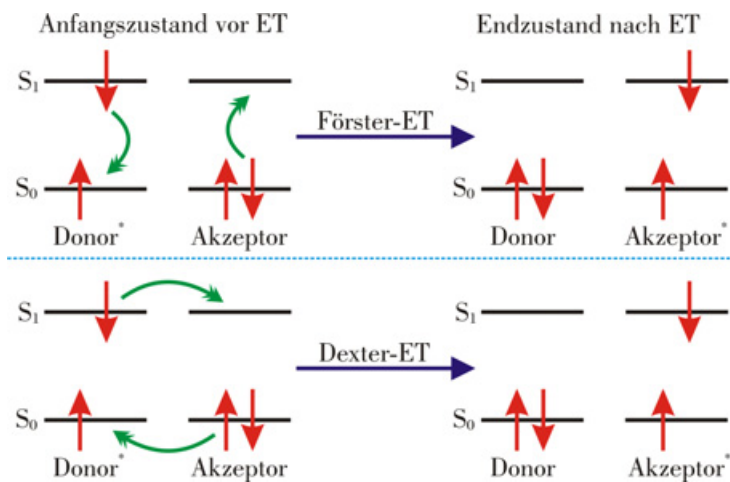


Abbildung 1.6: Schema zu den beiden Modellen des Energietransfers (ET). Im oberen Teil wird der Prozess des Förster-ET veranschaulicht und im unteren der des Dexter-ET. Die roten Pfeile symbolisieren die Spinzustände der beteiligten Elektronen in den Zuständen S_0 und S_1 . Die grünen Pfeile markieren die Übergänge der am jeweiligen ET beteiligten Elektronen.

$\lambda \geq 700$ nm interessant. Diese Absorption erfordert einen „Aufwärts“-Energietransfer, um das RC anregen zu können. Das in Abbildung 1.5 dargestellte PS I-Spektrum stammt von einer aus Maispflanzen extrahierten Probe, d.h. die oben erwähnten Chl b enthaltenden LHC I-Ringe tragen zum Spektrum bei.

1.2.2 Kopplungsmechanismen und Energietransfer

Das Antennensystem im PS I erstreckt sich über mehrere Proteinuntereinheiten, die zusammen einen supramolekularen Antennenkomplex bilden. Die größten Distanzen von Antennenpigmenten bis zum Reaktionszentrum (RC) betragen bis zu ca. 80 Å innerhalb eines cyanobakteriellen PS I-Monomers. Damit die absorbierte Strahlungsenergie effizient zum RC geleitet werden kann, muss die Transferzeit kurz gegenüber der natürlichen Lebensdauer der angeregten Zustände sein. Der Transfer über große Entfernungen erfolgt in mehreren Schritten über verschiedene Zwischenträger. Die Effizienz der strahlungslosen Übertragung von elektronischer Anregungsenergie hängt von dem Abstand, der Orientierung und den energetischen Verhältnissen von Donator und Akzeptor zueinander ab. In Pigment-Proteinkomplexen photosynthetischer Organismen treten zwei Energietransferprozesse auf, deren Mechanismen sich fundamental unterscheiden: der Förster-Energietransfer [För46] (auch Förster-Resonanztransfer genannt) und der Dexter-Energietransfer [Dex53, Dex69] (auch als Austauschtransfer bezeichnet). Beide Prozesse werden in Abbildung 1.6 schematisch gezeigt. Beim Förster-ET sind die Übergangsdipolmomente von Donator und Akzeptor über die Dipol-Dipol-Wechselwirkung gekoppelt.

Diese hängt proportional zu r^{-3} vom Abstand r ab. Die Transferrate steigt proportional zum Quadrat der Wechselwirkungsenergie an. Demnach gilt für die Rate des Förster-ETs die Abstandsabhängigkeit

$$k_{\text{Förster}} \propto \frac{\kappa^2}{r^6 n^4} \frac{\Phi_{\text{D}}}{\tau_{\text{D}}} \int_0^{\infty} d\lambda \lambda^4 \epsilon_{\text{A}}(\lambda) F_{\text{D}}(\lambda) = k_{\text{rad}} R_0^6 \frac{1}{r^6}.$$

Hierbei ist κ^2 ein Orientierungsfaktor, der die relative Orientierung der beteiligten Übergangsdipolmomente misst, n der Brechungsindex, Φ_{D} die Fluoreszenzquantenausbeute des Donators in Abwesenheit des Akzeptors, τ_{D} die Fluoreszenzlebenszeit, ϵ_{A} der Extinktionskoeffizient des Akzeptors, F_{D} das normalisierte Fluoreszenzspektrum des Donators und k_{rad} die Emissionsrate des Donators. Das Integral beschreibt den Überlapp des Fluoreszenzspektrums des Donators mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Üblicherweise werden die Parameter in einem Parameter R_0 zusammengefasst. Er entspricht dem sogenannten Försterradius, der den Donator-Akzeptorabstand angibt, bei dem die Wahrscheinlichkeit für eine Energieübertragung gerade 50 % beträgt. Donator und Akzeptor sind beim Förster-Mechanismus Resonanz-gekoppelt. Zwischen ihnen werden keine Elektronen ausgetauscht. Eine semiquantitative Betrachtung ergibt, dass der Försterradius bei großem Überlappungsintegral bis zu 100 Å betragen kann. Bei typischen Chl *a*-Abständen von ca. 8 – 16 Å in den Antennen und einem Energiebereich der einzelnen Absorptionsmaxima von ca. 660 – 730 nm finden ET-Schritte im Zeitbereich von ca. 100 fs bis wenigen ps statt, d.h. bei der Annahme einer mittleren Transferzeit von 1 ps sind bei einer Lebenszeit eines angeregten Singulettzustands von ca. 2 – 4 ns bis zu 100 sequentielle ET-Schritte möglich, bis die Energie mit einem Verlust $\leq 5\%$ das RC erreicht.

Dem Dexter-ET liegt ein andersartiger Mechanismus zugrunde. Er hängt von dem direkten Überlapp der elektronischen Wellenfunktionen des Donators und des Akzeptors ab. Da elektronische Wellenfunktionen außerhalb eines Moleküls exponentiell abfallen, ist ein sehr geringer Abstand zwischen Donator und Akzeptor erforderlich, typischerweise der van der Waals-Abstand, damit der Prozess stattfinden kann. Außerdem muss die Resonanzbedingung zwischen den Übergängen erfüllt sein, jedoch weniger streng als beim Förster-ET. Die Abstandsabhängigkeit der Rate des Dexter-ETs ergibt sich zu

$$k_{\text{Dexter}} \propto e^{-\alpha r},$$

wobei α dem Dexterkoeffizienten entspricht. Wird die Bedingung des Überlapps der Wellenfunktionen erfüllt, kann der Dexter-ET zwischen zwei Pigmenten sehr schnell, bis wenige fs, erfolgen. Dabei werden, anders als beim Förster-ET, Elektronen zwischen den Pigmenten ausgetauscht. Während beim Förster-ET aufgrund der langsam mit r abfallenden Abstandsfunktion $\sim r^{-6}$ Entfernungen von bis zu 100 Å in einem Schritt überbrückt werden können, ist der Dexter-ET aufgrund seiner exponentiellen Abstandsabhängigkeit

1 Photosystem I

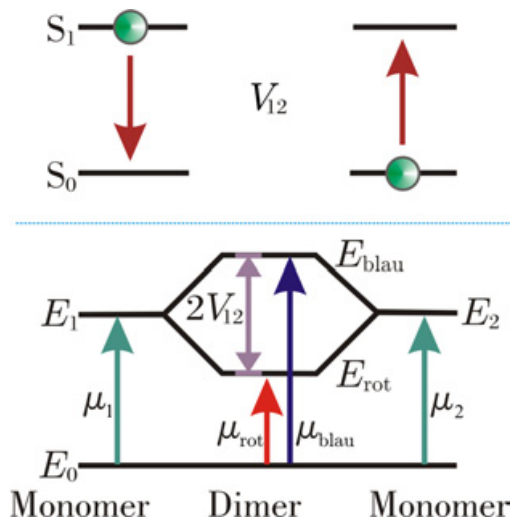


Abbildung 1.7: Schema zur exzitonischen Kopplung zwischen zwei identischen Monomeren. Durch die räumliche Annäherung der Monomere werden die beiden angeregten Zustände S_1 der Energien $E_1 = E_2$ der separaten Monomere aufgespalten. Zwei exzitonische Zustände der Energien E_{blau} , E_{rot} werden gebildet, deren Energiedifferenz der zweifachen Wechselwirkungsenergie V_{12} entspricht. Die zugehörigen Übergänge sind eingezeichnet. Unten wird in einer Vektordarstellung eine mögliche Orientierung der Übergangsdipolmomente angegeben. Von ihr ist abhängig, ob nur einer der exzitonischen Zustände oder beide optisch angeregt werden können. Strahlender Zerfall findet nur bei dem Zustand der Energie E_{rot} statt.

nur über sehr kleine Distanzen möglich. Aus Simulationen der Kinetik des ETs im PS I, einigen Phycobiliproteinen und äußeren Antennenkomplexen geht hervor, dass ein über mehrere hintereinander geschaltete Einzelschritte erfolgreicher Transfermechanismus nach Förster die Gesamtkinetik der Systeme sehr gut beschreiben kann. Eine Ausnahme bildet der ET von Carotinoiden zu Chlorophyllen. Der S_1 -Zustand von Carotinoiden hat nur eine Lebenszeit von maximal ca. 10 ps. Daher sind sie als Donatoren gemäß dem Förster-Mechanismus ungeeignet. Carotinoide sind häufig in sehr kleinem Abstand zu Chlorophyllen angeordnet, so dass die Voraussetzungen für einen effizienten Dexter-ET gegeben sind. Dieser ist essentiell für die effiziente Triplett-Löschung.

Sind in der Proteinstruktur zwei Pigmente sehr dicht beieinander lokalisiert, so dass Dexter-ET eventuell möglich ist, tritt zwischen den elektronisch angeregten Zuständen eine starke Wechselwirkung auf, die zu erheblichen Veränderungen in den optischen Spektren führt. Sie wird als exzitonische Kopplung bezeichnet. Zwei oder mehrere exzitonisch gekoppelte Pigmente bilden ein „Supermolekül“, dessen angeregter Zustand exzitonisch aufgespalten ist. Der Mechanismus wird in Abbildung 1.7 veranschaulicht. Die exzitonischen Zustände sind über die beteiligten Pigmente verteilt. Die Kopplung basiert im Wesentlichen auf der Dipol-Dipol-Wechselwirkung wie der Förster-ET. Formal kann die exzitonische Kopplung als Kopplungsmatrix

$$M = \begin{pmatrix} E_1 & V_{12} \\ V_{12} & E_2 \end{pmatrix}$$

geschrieben werden, wobei hier sich M in dem Fall auf ein Dimer bezieht. Auf der Hauptdiagonalen stehen die Übergangsenergien der beiden ungekoppelten Monomere. Die Nichtdiagonalelemente beinhalten die exzitonische Kopplung $V_{12} = V_{\text{Förster}} + V_{\text{Dexter}}$, die sich aus einem Förster- und einem Dexter-Anteil zusammensetzt. In der klassischen Punkt-Dipol-Näherung wird die Kopplungsenergie zwischen zwei Dipolen $\vec{\mu}_1$ und $\vec{\mu}_2$ im

Abstand r durch den Ausdruck

$$V_{12} \simeq \frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{r^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r})}{r^5} \quad (1.1)$$

beschrieben [Pop82]. Diese Näherungsform der Coulomb-Wechselwirkung ist anwendbar, wenn die räumliche Ausdehnung von beiden Übergangsdichten klein gegenüber dem intermolekularen Abstand ist. Die Energien der exzitonenischen Zustände in einem Dimer mit $E_1 = E_2$, wie in Abbildung 1.7 dargestellt, betragen: $E_{\text{blau}} = E_1 + V_{12}$ und $E_{\text{rot}} = E_1 - V_{12}$.

1.2.3 Proteinmatrix

Wie bei allen funktionellen Gruppen lebender Zellen spielt auch beim PS I das Proteinrückgrat eine tragende Rolle. Proteine sind lineare Polymere, die sich unter physiologischen Bedingungen spontan in eine kompakte 3D-Struktur falten. Der Faltungsmechanismus galt lange Zeit als Mysterium. Besonders interessant ist das Levinthal-Paradoxon [Lev69], wonach sich der native Zustand bei vorausgesetztem „*random walk*“ erst nach vielen Größenordnungen des gegenwärtigen Alters des Weltalls von $5 \cdot 10^{17}$ s einstellen würde. Nur in der Architektur des gefalteten Zustands „funktioniert“ die Kette aus Aminosäuren, liegt also die biologisch aktive Form des Proteins vor. Die Beziehung zwischen Funktion und Struktur stellt eine zentrale Frage der Proteinforschung dar. Die aus der Kristallographie erhaltenen Strukturen suggerieren oft ein statisches Bild der Proteinstruktur. Jedoch ist ein fundamentales Charakteristikum am Protein, dass die Funktion essentiell von der Dynamik der Struktur beeinflusst wird [Kar83]. Proteine fluktuieren im thermischen Gleichgewicht zwischen verschiedenen Strukturen und nehmen angeregte Zustände an, wenn Funktionsprozesse stattfinden. Ein gegebenes Proteinmodell liefert üblicherweise die Grundzustandsstruktur. Die Struktur von Zwischenzuständen, in denen das Protein sich nicht im Gleichgewicht befindet, ist momentan nur bei sehr wenigen Systemen bekannt. Die native Form eines Proteins ist nur in geeigneter Umgebung stabil. In wässriger Lösung gehört die Hydrathülle gewissermaßen zur Proteinstruktur dazu und beeinflusst ihre Eigenschaften maßgebend.

Um zu beleuchten, welche Art von Wechselwirkungen die native Form stabilisieren, wird die Gibbsche freie Energie $G = H - TS$ betrachtet, die sich aus der Enthalpie H und der mit der Temperatur T gewichteten Entropie S zusammensetzt. Der Beitrag der kovalenten Bindungen zur Enthalpie spielt aufgrund seiner energetischen Größe für die Dynamik der Polymerkette keine Rolle. Ins Gewicht fallen schwache Bindungen mit Energien nur wenig höher als $k_B T^1$, die somit thermischen Fluktuationen unterliegen: elektrostatische Wechselwirkungen zwischen polaren Seitenketten, van-der-Waals-Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Peptidkette und zwischen der Peptidkette und dem Lösungsmittel. Für Proteine ist charakteristisch, dass sich große enthalpische und

¹ k_B ist die Boltzmannkonstante.

1 Photosystem I

große entropische Beiträge in der freien Energie fast vollständig kompensieren, d.h. die Energiedifferenz entspricht der Bindungsenergie weniger Wasserstoffbrückenbindungen. Die resultierende marginale Stabilität ist für die Proteinfunktion essentiell und ermöglicht erst die Flexibilität der Struktur. Generell unterliegt dabei ein wesentlicher Teil der gesamten Bewegung dem Lösungsmittel, d.h. die enthalpischen und entropischen Beiträge zu den Fluktuationen der freien Energie im Protein stammen maßgeblich von der Umgebung und der Hydrathülle [Fen02, Bay05, Ren06].

Zur Modellierung der Stabilität des Proteins verwendet man eine effektive Energiefunktion, die alle Beiträge zur freien Energie außer der Konformationsentropie der Polypeptidkette enthält. Die Funktion beschreibt seine Potentialfläche als Hyperfläche in einem $(3n - 6)$ -dimensionalem Raum, wobei n der Anzahl der Atome des Proteins und der Hydrathülle entspricht, d.h. alle Konformationsfreiheitsgrade der Kette inklusive der Hydrathülle werden berücksichtigt. Ihr Ergebnis wird Energielandschaft des Proteins genannt. Die „traditionelle“ Beschreibung von Proteinen in diskreten Zuständen [Tso72] berücksichtigt keine Fluktuationen innerhalb jedes Zustands und stellt somit ein zu einfaches Modell dar, um spezielle Experimente zu erklären. In dem Modell der Energielandschaft wird ein Polypeptid als Polymer behandelt [Fra91, Wol95, Doy97], womit eine wesentlich realitätsnähere Beschreibung der Proteindynamik möglich ist. Das Protein wechselt demnach den Konformationszustand durch eine kontinuierliche Variation seiner molekularen Bindungslängen und Bindungswinkel. Da diese Bewegung unberechenbar ist, ähnelt sie stark einer Brownschen Bewegung in einem Kraftfeld. Einen Übersichtsartikel über die Brownsche Dynamik findet man in [Hän90].

Vom ungefalteten zum kompakten nativen Zustand hat die Energielandschaft global die Form eines Trichters [Dil97, Wol99]. Sein weiter Rand beschreibt die Vielzahl an offenen Konformationen der entfalteten Peptidkette, d.h. die hohe Konformationsentropie. Unterscheidet sich die gegebene Konformation deutlich von der nativen Form bzw. das Protein ist zufällig gefaltet, also denaturiert, dann erwartet man einen hohen Grad der Entartung. Die zugehörige Energielandschaft ist rau mit vielen lokalen Minima willkürlicher Struktur. Die native Form hingegen besitzt eine wohldefinierte Energielandschaft in der oben beschriebenen Trichterform mit geringer Rauigkeit. Die Vielzahl an nicht-nativen Zuständen sind von dem Minimum durch eine Energielücke getrennt. Beim Faltungsprozess können nicht alle lokalen Wechselwirkungen simultan optimiert werden, wodurch eine Quasi-Entartung des Grundzustandes entsteht. Demzufolge existiert im Minimum selbst eine große Menge an Mikrozuständen ähnlicher Energie, die auch als Konformationssubzustände bezeichnet werden [Fra79]. Experimente unterschiedlicher Methoden, wie Mößbauer-Spektroskopie und Röntgenbeugung, haben ergeben, dass auch innerhalb dieser Minima wieder Minima zu finden sind [R.H75, Fra79, Ans85, Fra88, You91]. Jeder Subzustand entspricht einem Punkt im oben beschriebenen Hyperraum, und Fluktuationen der Struktur verkörpern Sprünge zwischen diesen Punkten. Frauenfelder *et al.* haben zur Beschreibung von Proteinen die Formalismen von Gläsern und Spingläsern übernommen und postuliert, dass die Energielandschaft hierarchisch in Rängen mit sich sukzessiv

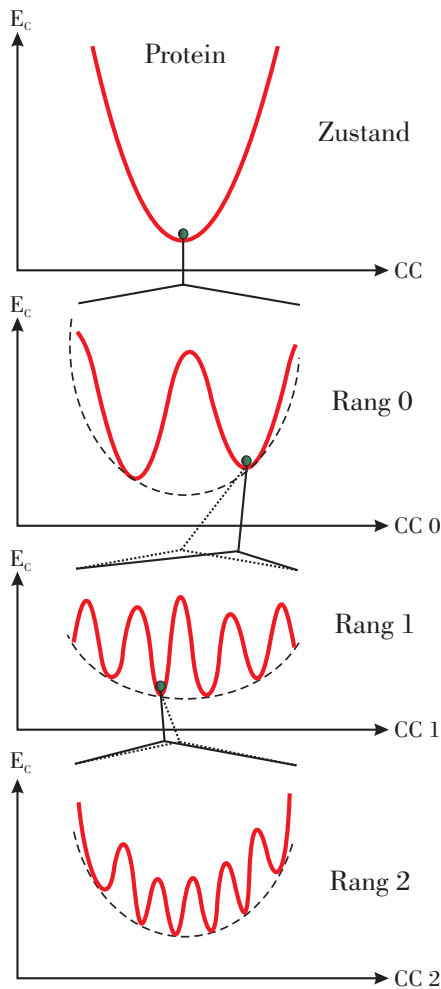


Abbildung 1.8: Stark vereinfachter eindimensionaler Querschnitt durch eine fiktive Energielandschaft eines Proteins. Oben wird ein Gesamtbild der Konformationsenergie E_C als Funktion der Konformationskoordinate CC gezeigt. Die Darstellungen darunter repräsentieren drei unterschiedliche Ränge mit sich von 0-2 sukzessiv in der Höhe verringern den Energiebarrieren. Jeder Energieminde entspricht ein spezieller Subzustand im jeweiligen Rang, der sich von den anderen in Enthalpie, Entropie und Volumen unterscheidet. Die Subzustände sind durch die Energiebarrieren voneinander separiert. Insbesondere ab Rang 1 ist die Auftragung von E_C über der jeweiligen CC als schematisch anzusehen. E_C ist eine Hyperfläche in einem Hyperraum. Die zahlreichen Energieminima und -barrieren können real nur durch Verteilungen beschrieben werden. Wie viele Ränge im PS I sinnvollerweise separat zu betrachten sind, ist unklar, d.h. nach Rang 2 ist die Existenz weiterer Ränge denkbar. Die Art der Darstellungsform stammt von Frauenfelder *et al.* [Fra91].

in der Höhe verringern den Energiebarrieren organisiert ist [Fra91, Fen02, Hof03, Fen04]. Dieses Modell der Energiefunktion wird in Abbildung 1.8 gezeigt. Fluktuationen zwischen verschiedenen Subzuständen innerhalb eines Ranges und zwischen den Subzuständen verschiedener Ränge werden durch die Bewegung unterschiedlicher Bestandteile des Systems aus Protein, Hydrathülle und Lösungsmittel ausgelöst. Unter physiologischen Bedingungen verharren Proteine generell nicht in einem Konformationszustand, sondern „erkunden“ ihre Energielandschaft durch ständiges Springen in andere Subzustände. Die große spektrale Breite an Energiebarrieren zwischen Konformationszuständen führt zu einer Proteindynamik, deren Zeitkonstanten sich über viele Größenordnungen erstrecken. Die harmonische Schwingung eines Wasserstoffatoms dauert z.B. unter physiologischen Bedingungen typischer Weise 10 fs. Die Proteindynamik ist stark von der Temperatur abhängig. Unterhalb einer Temperatur T_d , der so genannten dynamischen Übergangstemperatur, verhält sich das Protein wie ein harmonischer Festkörper, d.h. die Wärmekapazität steigt linear mit der Temperatur. Darüber ähneln die Bewegungen des Proteins innerhalb seiner nativen Form denen einer Flüssigkeit, d.h. insbesondere thermisch aktivierte Konformationsübergänge finden statt [Par02]. Der intuitiven Erwartung

1 Photosystem I

entgegen haben Experimente erwiesen, dass selbst nahe dem absolutem Nullpunkt Konformationsübergänge stattfinden [Köh89, Hof03]. Hofmann *et al.* haben Übergänge bei 1,4 K mit Hilfe von Einzelmolekül-Spektroskopie in Fluoreszenzanregung am LH2 beobachtet. In diesem Temperaturregime sind die meisten unter physiologischen Bedingungen möglichen Konformationsfluktuationen eingefroren. Grundsätzlich sind in Abhängigkeit von der Barrierenhöhe und -breite neben arrheniusaktivierten Prozessen auch Tunnelprozesse denkbar. Die Tunnelwahrscheinlichkeit P ist proportional zu

$$P \propto \exp\left(-\frac{2\ell\sqrt{2mH}}{\hbar}\right), \quad (1.2)$$

wobei ℓ der Reaktionskoordinatenlänge, H die Barrierenhöhe und m der Masse des tunnelnden Teilchens entsprechen. Elektronen tunneln über große Distanzen bis zu $< 25 \text{ \AA}$. Mit Gleichung 1.2 erhält man für die Transferlänge eines tunnelnden Protons bei gleicher Wahrscheinlichkeit einen Wert von $0,58 \text{ \AA}$, der der Länge der Reaktionskoordinate ähnelt. Die größere Masse eines Deuterons führt zu einer entsprechenden Distanz von $0,41 \text{ \AA}$. Untersuchungen mit Hilfe des kinetischen Isotopeneffekts sind demnach attraktiv, um Protonen-Tunneln in Enzymen nachzuweisen, was jedoch nur bei einer sehr begrenzten Anzahl von Enzymen gelang [Cha89, Jon96]. Hofmann *et al.* argumentieren in ihrer Studie, dass durch die Anregung mit Photonen mit einer Energie von jeweils ca. $1,5 \text{ eV} \gg k_{\text{B}}T$ das Spektrum an möglichen Konformationsänderungen, die ohne Einstrahlung bei $k_{\text{B}}T$ zugänglich sind, stark erweitert wird. Nach der Anregung kann jeweils ein neuer Gleichgewichtszustand gefunden werden, der nicht dem Ursprünglichen entsprechen muss. In den Fluoreszenzanregungsspektren spiegelt sich dieser Prozess durch variierende Übergangsenergien des Chromophors in einer spektral diffundierenden Linie wieder.

Generell sind sinnvoller Weise zwei verschiedene Relaxationsprozesse zu unterscheiden: Bei dem einen relaxiert das Molekül aus einem ungünstigeren Zustand in den Gleichgewichtszustand. Ein nicht-Gleichgewichtszustand wird hingegen durch eine chemische Reaktion oder eine Temperatur- oder Druckveränderung produziert. Die Relaxation aus diesem Zustand kann mittels einer Observablen $M(t, T)$, z.B. die spektrale Position oder Linienbreite einer Emissionslinie, beobachtet werden. Dann wird die Zustandsänderung durch die Relaxationsfunktion

$$\Phi(t, T) = \frac{M(t, T) - M_{\text{eq}}(T)}{M(0, T) - M_{\text{eq}}(T)}$$

charakterisiert. $M(0, T)$ entspricht dem Wert $M(t, T)$ direkt nach dem Sprung und $M_{\text{eq}}(T)$ dem Wert nach Erreichen des neuen Gleichgewichtszustandes. Einfache derartige Reaktionen verlaufen gemäß der Debye-Relaxation in exponentiellen Zeitverläufen und die Temperaturabhängigkeit folgt dem Arrhenius Gesetz

$$\kappa(H, T) = A \exp\left(-\frac{H}{k_{\text{B}}T}\right),$$

1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“

wobei H die Barrierenhöhe und A ein Vorfaktor sind. Komplexe Systeme, wie z.B. Gläser, zeigen ein anderes Verhalten [Ric94]. Die zeitlichen Verläufe von Relaxationen können meistens durch ein Potenzgesetz, die gestreckte Exponentialfunktion oder Kohlrauschfunktion

$$\Phi(t, T) = \Phi(0) \exp\left(-[\kappa(T)t]^\beta\right), \quad \beta < 1$$

beschrieben werden. Dabei folgt der Ratenkoeffizient $\kappa(H, T)$ häufig nicht dem Arrhenius Gesetz, sondern kann z.B. durch die Ferry-Bässler-Relation

$$\kappa(H^*, T) \simeq A \exp\left(-\left[\frac{H^*}{k_B T}\right]^2\right)$$

angenähert werden, wobei der Energieparameter H^* ein Maß für die statistische Rauigkeit der Energielandschaft darstellt. Die Ursache für nicht-exponentielle Verläufe liegt im kollektiven Charakter von Relaxationsphänomenen.

Aufgrund der großen Mannigfaltigkeit an mikroskopischen Faltungstrajektorien sind Details der Energielandschaft Messungen am Ensemble nicht zugänglich. Grundsätzlich sind optische Experimente, in denen ein an das Proteingerüst gekoppelter Chromophor als Sonde genutzt wird, interessant, um Proteindynamik sichtbar zu machen. Selektive Methoden wie zeitaufgelöstes Lochbrennen [Fri96, dH99, Ski99, Her04] und „*three-pulse stimulated photon echo*“ [Lee95a, Lee95b] haben bereits Zugang zu einigen Details verschiedener Energielandschaften gefunden. Aufgrund der hohen Selektivität kommt Einzelmolekül-Methoden ein großes Potential zu. Einen guten Übersichtsartikel über Untersuchungen von Konformationsdynamik mit Hilfe von Einzelmolekül-Spektroskopie findet man in [Wei99, Wei00].

1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“

1.3.1 Einführung

Ein interessantes Charakteristikum in der spektralen Heterogenität von PS I ist die Absorption bei größeren Wellenlängen als 700 nm, d.h. in einem Spektralbereich, der gegenüber dem primären Elektronendonator P700 rotverschoben liegt. Diese Besonderheit tritt sowohl beim PS I von grünen Pflanzen als auch bei dem von Algen und Cyanobakterien auf. Die Abbildung 1.9 zeigt ein Tieftemperatur-Absorptionsspektrum vom PS I des Cyanobakteriums *T. elongatus*. Die grobe Form und die Lage der beiden Hauptmaxima ähnelt der vom pflanzlichen PS I und wurde bereits anhand der Abbildung 1.5 beschrieben. Oberhalb von 700 nm bis ins nahe Infrarot sticht die absorbierte Intensität deutlich heraus und bildet sogar ein separates Maximum. Die Funktion und die Natur dieser Rotverschiebung gehören zu den Schlüsselthemen in der Spektroskopie am

1 Photosystem I

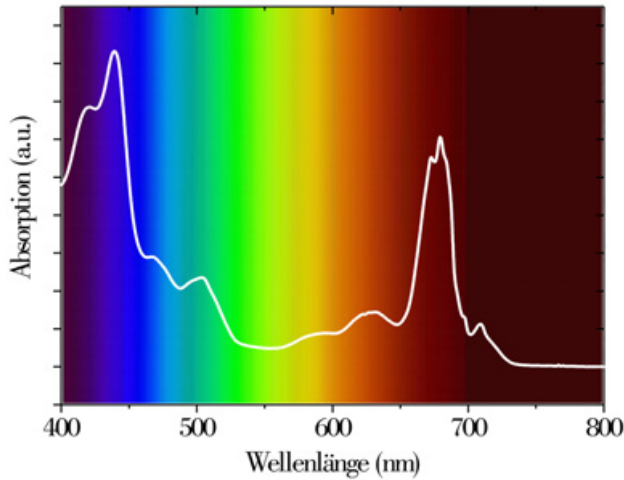


Abbildung 1.9: Absorptionsspektrum vom cyanobakteriellen PS I bei tiefer Temperatur (5 K). Bei der Probe handelt es sich um isolierte Trimere von der Spezies *T. elongatus* (Ensemble). Der Hintergrund spiegelt die entsprechenden Farben des sichtbaren Spektralbereichs wider. Die Messdaten stammen von Eberhard Schlodder.

PS I. Die Größe der energetischen Verschiebung gegenüber der primären photochemischen Falle beträgt bei Raumtemperatur $2 - 3 k_B T$. Einen Übersichtsartikel findet man in [vG94]. Obwohl für die stark rotverschobene Absorption nur eine kleine Gruppe aus 2-10 % aller Chlorophylle verantwortlich ist, wirkt sich die Anwesenheit dieser sogenannten „roten Chlorophylle“ stark auf den Energietransfer und das Einfangverhalten von Energie im gesamten PS I-Komplex aus. Dies belegen sowohl Experimente mit stationärer als auch mit zeitaufgelöster Spektroskopie. Um die roten Chlorophylle zu identifizieren wurden quantenchemische Rechnungen durchgeführt. Unter Vernachlässigung der Chlorophyll-Protein-Wechselwirkungen können die Tieftemperaturspektren der roten Chlorophylle nicht adäquat beschrieben werden [Sen02]. Auch Berechnungen der lokalen optischen Übergangsenergien von Chlorophyllen in ihrer lokalen Proteinbindungstasche wurden auf der Grundlage von Strukturdaten angestellt [Byr02, Dam02]. Obwohl diese Rechnungen die wesentlichen Merkmale der Absorptionsspektren von den Antennen-Chlorophyllen reproduzieren, können die roten Chlorophylle mit ihrer Hilfe nicht zugeordnet werden. Demnach sind experimentelle Studien, die detaillierte Informationen über Übergangsenergien, Anzahl der roten Chlorophylle und ihrer Kopplung liefern, von erheblicher Bedeutung. Detaillierte experimentelle Untersuchungen mit Hilfe konventioneller Fluoreszenzspektroskopie führen zu strukturlosen, inhomogen verbreiterten Ensemble-Spektren. Durch Techniken selektiver Spektroskopie, wie der häufig verwendeten Methode des nicht-photochemischen Lochbrennens in Kombination mit Messungen der linearen Druckverschiebung und der Starkverbreiterung wird darauf geschlossen, dass es sich bei den roten Chlorophyllen nicht um Monomere handeln kann, sondern vielmehr um stark gekoppelte Chlorophylle [Rät00, Rei01, Zaz02b, Iha03]. Aufgrund der zusätzlich auftretenden großen Stokesverschiebung und den aus simulierten Lochbrennspektren bestimmten großen Huang-Rhys-Faktoren wird den roten Zuständen zudem ein signifikanter Ladungstransfercharakter zugeordnet [Hay00, Rät00, Zaz02b, Hsi04]. In den folgenden Abschnitten wird auf einige Details der roten Chlorophylle genauer eingegangen.

1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“

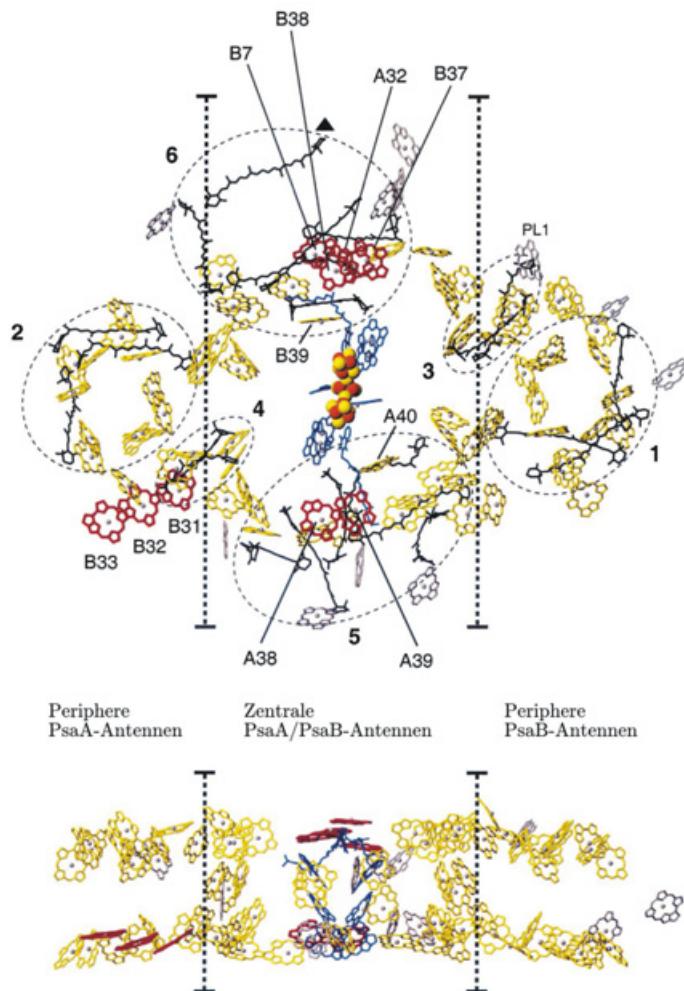


Abbildung 1.10: Konfiguration aller Kofaktoren im cyanobakteriellen PS I von *T. elongatus* mit Hauptaugenmerk auf den Antennenpigmenten. **Oben:** Aufsicht vom Stroma aus auf die Membranebene. **Unten:** Seitenansicht entlang der Membranebene. Organische Kofaktoren der Elektronentransfer-Kette sind in blau eingezeichnet, der Eisen-Schwefel-Cluster in gelb und orange und die Antennenpigmente in gelb. Die Chlorophylle, die an die peripheren Untereinheiten gebunden sind, und das Phospholipid sind grau eingefärbt. Die Carotinoide, die in sechs Clustern organisiert sind, werden durch die gestrichelten Ellipsoide angedeutet. Chlorophylle, die als Kandidaten für die roten Chlorophylle gelten, sind in rot dargestellt. Die Abbildung ist aus Jordan *et al.* entnommen [Jor01].

1.3.2 Ursprung der Rotverschiebung

Für die starke Rotverschiebung der roten Chlorophylle im PS I sind etliche Ursachen denkbar. Die Emissionen der roten Chlorophylle aller PS I Partikel haben gemeinsam, dass die emittierenden Spezies durch eine beträchtliche inhomogene Verbreiterung in der Größenordnung von $200 - 400 \text{ cm}^{-1}$ charakterisiert sind und ferner durch eine relativ große Stokesverschiebung, z.B. $160-200 \text{ cm}^{-1}$ bei den roten Chlorophyllen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 [Gob94, Pål96, Rät00, Hay00, Com00]. Aufgrund der Ähnlichkeit dieser Eigenschaften mit denen des photochemisch aktiven Pigments P_{RC} , dem „*special pair*“ des bakteriellen Reaktionszentrums, geht man davon aus, dass die roten Emissionen jenseits 700 nm im PS I ebenfalls von stark exzitonisch gekoppelten Chlorophyllen stammen [Shu93, Gob94, Com00, Eng01]. Auch bei dem Modell „Ring aus Dimeren“ der bakteriellen Lichtsammelkomplexe LH1 und LH2 führt man die beobachtete starke Rotverschiebung auf die starke exzitonische Kopplung innerhalb jedes einzelnen Dimers zurück [Fle97].

Falls der Ursprung in einer starken exzitonischen Kopplung innerhalb der roten Pig-

1 Photosystem I

mente liegt, so können Chl a-Moleküle, die für die rote Absorption verantwortlich sind, anhand ihrer dimeren bzw. multimeren Form am zuverlässigsten aus den strukturellen Daten von Jordan *et al.* abgeleitet werden [Jor01]. Die Abbildung 1.10 vermittelt einen Einblick in die Röntgenstruktur. Bezüglich dieser Daten werden von den Autoren vier mutmaßliche Kandidaten vorgeschlagen: drei Dimere und ein Trimer. Zwei dieser Dimere, aC – A38/aC – A39 nach der Notation der Autoren, sind auf der stromalen Seite der Membran in den Untereinheiten PsaA und PsaB angeordnet. Einer befindet sich in der Nähe von PsaL und der andere in der Nähe von PsaF. Das dritte Chl a-Pärchen aC – A32/aC – B7 liegt auf der lumenalen Seite in der Trimerisierungs-Region und steht im Kontakt mit PsaL. Bei allen drei Dimeren sind die Chlorin-Ebenen nahezu parallel ausgerichtet und mit einem Ebenenabstand von $3,5 \text{ \AA}$ π -gestapelt. Die laterale Verschiebung zwischen den Metallzentren beträgt $7,6 - 8,9 \text{ \AA}$. Das Chl a-Trimer ist ebenfalls auf der lumenalen Seite der Membran, jedoch in der Nähe von PsaX gebunden. Seine Chlorophylle aC – B31, aC – B32 und aC – B33 sind stufenweise in ähnlichen Chl a-Abständen wie bei den Dimeren angeordnet. Dieses vielfach als „Dreierstapel“ bezeichnete Trimer besitzt die Besonderheit, dass nur das aC – B31 fest an ein Histidin (His B470) gebunden ist. Die Mg^{2+} -Ionen der anderen beiden Chl a sind mit Wasser koordiniert. Damjanović *et al.* haben mittels der semi-empirischen quantenchemischen Methode INDO/S (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*) die Anregungsenergien der 96 Chl a im PS I-Monomer von *T. elongatus* berechnet [Dam02]. Aus den berechneten Eigenenergien des effektiven Hamiltonian wurde das Absorptionsspektrum berechnet und eine vorsichtige Zuordnung der roten Chlorophylle vorgenommen: Die Absorption bei $\lambda = 708 \text{ nm}$ wird gemäß einer Symmetrieanalyse einem Dimer A26 – A27 zugeschrieben, die bei $\lambda = 715 \text{ nm}$ einem Dimer B24 – B25 und die bei $\lambda = 719 \text{ nm}$ einem Tetramer der Chlorophylle A31, A32, B06 und B07.

1.3.3 Spektrale Eigenschaften

Absorption

Am PS I wurde mit Hilfe spektroskopischer Methoden am Ensemble bereits eine Vielzahl grundlegender Studien durchgeführt. Um zunächst einen Einblick in die hohe spektrale Heterogenität zu erhalten, betrachte man die linke Teilabbildung der Abbildung 1.11. In ihr sind die Absorptionsspektren von PS I verschiedener Cyanobakterien in trimerer und monomerer Form im roten Spektralbereich gegenübergestellt. Offensichtlich absorbiert der größte Teil der inneren Antennen-Chlorophylle in allen hier berücksichtigten PS I in einer breiten Bande mit einem Maximum bei ca. 680 nm , wobei außer in einem schmalen Bereich im Maximum zwischen den verschiedenen PS I kaum Abweichungen zu finden sind. Im Vergleich dazu zeigt freies Chlorophyll (Chl a), in organischem Lösungsmittel gelöst, bei ca. 670 nm ein breites Maximum in der Absorption [Hof91]. Auffällig heraus sticht nun die spektrale Vielfältigkeit, die sich am energetisch roten Fuß des Maximums abzeichnet. Aus den Kurvenverläufen geht deutlich hervor, dass die Anzahl und Energien

1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“

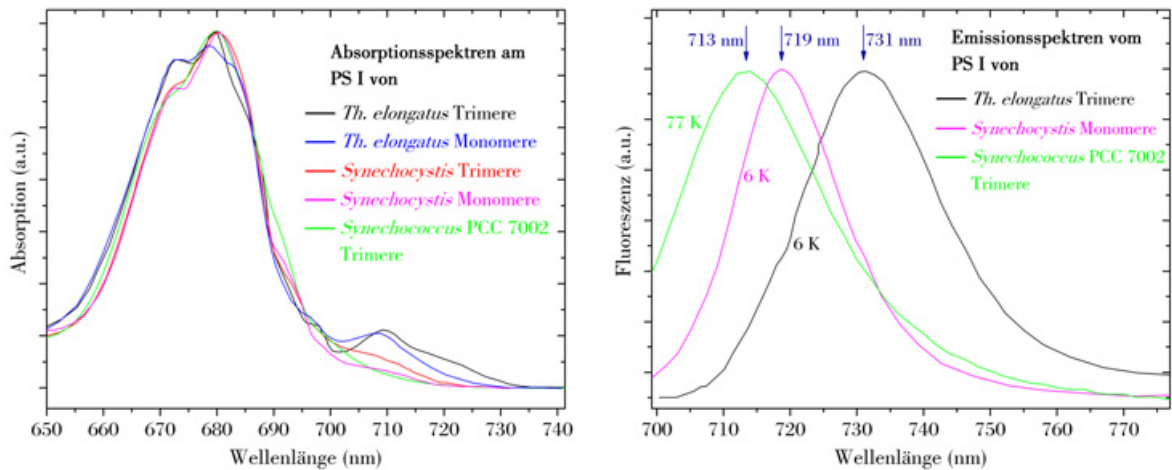


Abbildung 1.11: Ensemblemessungen am cyanobakteriellen PS I verschiedener Spezies. **Links:** übereinander gelegte Absorptionsspektren, die auf das jeweilige Absorptionsmaximum normalisiert wurden. **Rechts:** Fluoreszenzspektren, die auf das jeweilige Emissionsmaximum normalisiert wurden. Alle Spektren wurden bei ca. 6 K aufgenommen, außer die von *Synechococcus* sp. PCC 7002, deren Messtemperatur bei 77 K lag. Die Daten wurden aus Pålsson *et al.* [Pål96, Pål98] und Gobets *et al.* [Gob94, Gob01a] entnommen. Die Spektren vom PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002 wurden freundlicherweise von Eberhard Schlodder gemessen.

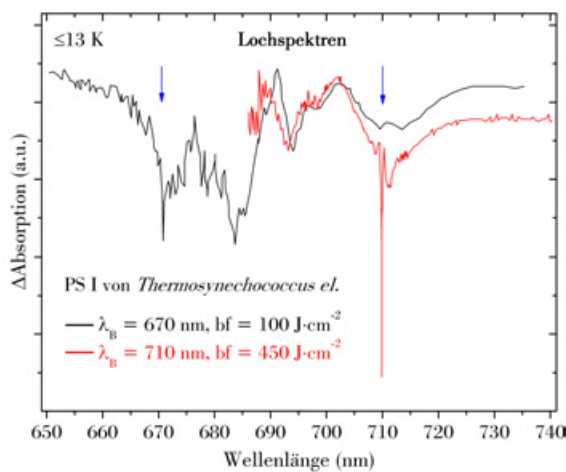


Abbildung 1.12: Typische Lochspektren am PS I von *T. elongatus*. Die blauen Pfeile markieren die im Bild angegebenen Brenn-Wellenlängen λ_B . In der schwarzen Kurve ($\lambda_B = 670$ nm) erkennt man deutlich die Satelliten bei ca. $\lambda \simeq 710$ nm und $\lambda \simeq 713$ nm. Für $\lambda_B = 710$ nm (rot eingetragen) wird das Loch von einer benachbarten breiten Struktur begleitet. Die Daten wurden aus Zazubovich *et al.* [Zaz02b] entnommen. Die Punktdichten der Literaturspektren wurden beim Digitalisierungsprozess verringert.

der roten Chlorophylle stark von der Spezies und darüber hinaus auch vom jeweiligen Aggregationszustand der PS I-Komplexe abhängig ist [Shu91, vdL93, Gob94, Pål96]. Mit Hilfe von Gaußscher Zerlegung wurden die Maxima der 4 K-Absorptionsspektren sowie die Anzahl der beitragenden Chl a abgeschätzt [Pål96, Gob01b]. Die ermittelten Werte sind in der Tabelle 1.1 gegenübergestellt. Auf diese Weise wurde die Gruppe der roten Chlorophylle erstmals aufgeteilt, d.h. man hat spektrale Anteile, die man aus der Struktur der Linienform extrahiert hat, unterschiedlichen Verbänden roter Pigmente zugeordnet. Aus den jeweils zentralen spektralen Lagen in der Absorption wurden in der Literatur entsprechende Bezeichnungen eingeführt. Demnach wird z.B. der Verband der

1 Photosystem I

Tabelle 1.1: Mittels Gaußscher Zerlegung von Absorptionsspektren bestimmte Anzahl der roten Chlorophylle. Die Lage der Maxima der Banden wurden aus [Gob01b] entnommen. Die Werte (+) stammen aus [Hay00] und die Werte (*) entsprechen den Angaben aus [Pål96], wobei diese an die korrekte Anzahl von Chl a-Molekülen angepasst wurden (in Anzahl pro Monomer).

PS I-Spezies	Absorption (nm)		Emission (nm)		Anzahl Chl a
	6 K	RT	6 K	RT	
<i>T. elongatus</i>	708	702	-	707	~ 3–4*
	719	708	730	723	~ 3–4*
<i>Synechocystis</i>	708	702–703	720	711–712	~ 2+
	714	-	-	-	~ 2+

Chl a mit der am weitesten rotverschobenen Absorption im PS I von *T. elongatus* C719 genannt [Pål96]. Für das inhomogen verbreiterte Band bei 708 nm von PS I-Trimeren von *Synechocystis* wird durch dieses Verfahren eine zugehörige Oszillatorstärke ermittelt, die einer Anzahl von ca. 4 – 5 Chl a-Molekülen entspricht. Aufgrund der Datenlage aus der Absorptionsspektroskopie wurde davon ausgegangen, dass PS I von *Synechocystis* nur diesen einen Verband roter Chlorophylle besitzt [Gob94, Pål98]. Hayes *et al.* gehen an dieser Stelle einen Schritt weiter mit Hilfe der Methode des nicht-photochemischen Lochbrennens (NPHB). Von ihnen wird demnach vorgeschlagen, dass zwischen zwei Beiträgen in der Bande unterschieden werden kann und dass zwei Chl a bei einem C706-Verband und ebenfalls zwei bei einem C714-Zusammenschluss mitwirken [Hay00]. Das Bild zweier Verbände von roten Pigmenten im PS I von *Synechocystis* wird ferner von Melkozernov *et al.* mit transienter Absorptionsspektroskopie unterstützt [Mel01b]. Im Gegensatz zum PS I von *Synechocystis* werden für PS I der Spezies *T. elongatus* gemäß der Tabelle 1.1 von Pålsson *et al.* zwei separate Banden ermittelt [Pål96], deren Maxima bei 708 nm und 719 nm liegen. Basierend auf einer NPHB-Studie wird auch beim PS I von *T. elongatus* von einem differenzierteren Ergebnis berichtet. Zazubovich *et al.* gehen danach von einem dritten Verband roter Chlorophylle bei ca. 715 nm (C715) aus [Zaz02b]. Außerdem berechnen sie unter Berücksichtigung der neuesten Strukturdaten [Jor01], aus denen die Anzahl von 96 Chl a pro PS I-Monomer hervorgeht, dass ca. sieben Chl a zur roten Absorption beitragen. In der Abbildung 1.12 sind zwei typische Lochspektren vom PS I von *T. elongatus* dargestellt. Bei einer Brennwellenlänge von $\lambda_B = 670$ nm tauchen Satelliten im Spektralbereich jenseits P700 auf, anhand derer man auf einen effektiven Energietransfer auf die roten Chlorophylle schließen kann. Außerdem zeigt sich, dass bei stark roter Brennwellenlänge ($\lambda_B = 710$ nm) zusätzlich zum scharfen Loch eine benachbarte breite Struktur erzeugt wird, die als Schwingungsseitenbande (PSB) interpretiert wird.

1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“

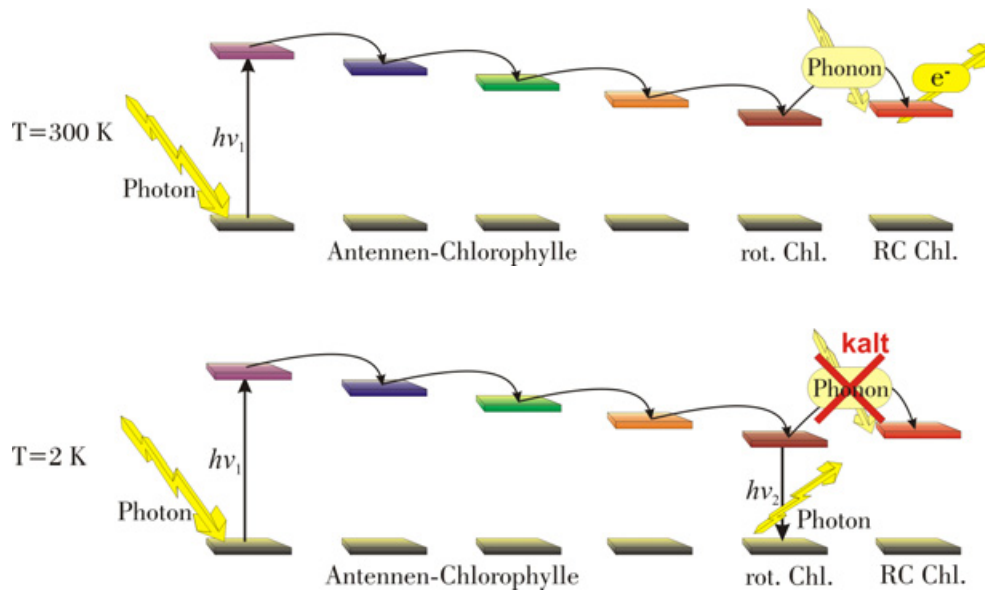


Abbildung 1.13: Energietransfer im Pigmentsystem vom PS I. Durch einfallendes Licht wird auf einem Antennenpigment ein angeregter Zustand erzeugt. Dieser bewegt sich über weitere Pigmente unter Energieverlust. Ein großer Teil der insgesamt von den Antennen gesammelten Energie gelangt bis zu den roten Chlorophyllen. In Abhängigkeit von der vorherrschenden Temperatur ergibt sich folgende Fallunterscheidung: **Oben:** Unter physiologischen Bedingungen genügt die Energie via Absorption von Schwingungsenergie, um das RC anzuregen. Es erfolgt eine stabile Ladungstrennung. **Unten:** Unter Laborbedingungen bei Tieftemperatur (1,4 K) genügt die vibronische Energie im Protein nicht aus, um den letzten Transferschritt zu ermöglichen. Der energetisch tiefste erreichbare Zustand relaxiert. Die Fluoreszenz der beteiligten roten Chlorophylle kann schließlich nachgewiesen werden.

Fluoreszenz

Die Gruppe der roten Chlorophylle hat trotz ihrer verhältnismäßig geringen Anzahl von Pigmenten großen Einfluss auf die Fluoreszenz von PS I. Die Komplexe aus *Synechocystis* zeigen bei Raumtemperatur ein Maximum bei 685-690 nm (F685), das eine breite Schulter bis hin zu ca. 780 nm besitzt [Wit92]. Das PS I von *T. elongatus* zeigt sein Maximum der Emission bei Raumtemperatur sogar jenseits von 700 nm [Hol93, Koe98]. F685 deutet sich hier nur als schwache Schulter an. Bei Raumtemperatur ist die Fluoreszenzquantenausbeute von PS I-Partikeln aller Spezies sehr gering [vG94] und die Quanteneffizienz der Ladungstrennung liegt bei 95 %. Die roten Chlorophylle können die Anregungsenergie sehr effizient auf den primären Donator P700 übertragen [Tri93a, Shu95, Mel98]. Durch eine Verringerung der Temperatur wird die Fluoreszenzquantenausbeute drastisch gesteigert [Gob94, Pål98, Byr00, Jel00], da ein großer Teil der Anregungsenergie in den roten Chlorophyllen gefangen bleibt, d.h. bei tiefen Temperaturen steht zu wenig vibronische Energie für den Aufwärts-Energietransfer zur Verfügung. Bei tiefer Temperatur erreichen ca. 50 % der gesamten Anregung nicht die photochemische Falle [Pål98, Gob01a].

1 Photosystem I

In Abbildung 1.13 wird der Prozess des Energietransfers in Abhängigkeit von der Temperatur illustriert. Ensemble-Emissionsspektren der drei in dieser Arbeit behandelten cyanobakteriellen PS I bei tiefer Temperatur werden in der rechten Teilabbildung der Abbildung 1.11 gezeigt. Im Vergleich emittiert also das PS I von *T. elongatus* stärker rotverschoben als die PS I der Spezies *Synechocystis* und *Synechococcus* sp. PCC 7002, wobei die Energiedifferenz zum letzteren knapp 350 cm^{-1} beträgt. Mit Hilfe von energiespektroskopischer Fluoreszenzspektroskopie an den roten Chlorophyllen des PS I von *Synechocystis* wurde anhand der Abhängigkeit des Emissionsmaximums von der Anregungswellenlänge der Abstand von Null-Phononen-Linie (ZPL) und PSB auf ca. 140 cm^{-1} abgeschätzt [Gob94, Gob98]. Der PSB wird eine stark ausgeprägte Stokesverschiebung für die roten Pigmente C708 von ca. 15 nm entnommen und ein Huang-Rhys-Faktor von mindestens $S = 3$ zugeordnet [Gob98]. Zum Vergleich liegt nach einer NPHB-Studie der entsprechende Huang-Rhys-Faktor je nach Brenn-Wellenlänge λ_B von 702-722 nm zwischen $S = 0,6$ und $S = 1,9$ [Rät00]. Aufgrund der ermittelten großen Huang-Rhys-Faktoren und der großen Stokesverschiebung wird von einem starken Ladungstransfercharakter der roten Zustände ausgegangen [Hay00, Rät00, Zaz02b, Hsi04].

1.3.4 Funktion in der Natur

Die Natur hat im Zuge der Evolution den Umweg des Energieflusses durch die gegenüber der Anregungsenergie des primären Elektronen-Donators rotverschobenen Pigmente eingerichtet. Die Ursache ist bis heute ungeklärt. Über die vermeintlich ausschlaggebenden Vorteile, die die Natur aus dieser energetischen Senke gewinnt, wird viel diskutiert. Intuitiv könnte man annehmen, dass die Gruppe der roten Chlorophylle als lokale Fallen auf die Anregungsenergie wirken und somit der Effizienz der Ladungstrennung im Reaktionszentrum abträglich sind. Dem hingegen vermuten einige Autoren, dass wenn sich das PS I im Ungleichgewicht befindet, ihre Anwesenheit die Effektivität steigern könnte, indem sie die Anregungsenergie nahe P700 konzentrieren [vG88b, vG88a, Muk90, Wer92, Hol93, Mel01a]. Ein anderer Vorschlag besteht darin, dass die roten Chlorophylle eine Art Schutzfunktion vor photochemischer Beschädigung übernehmen [Muk90, Kar99a]. Der Mechanismus könnte so funktionieren, dass die bei den roten Chlorophyllen lokalisierte Anregungsenergie vom oxidierten primären Donator $P700^+$ gelöscht wird, da die spektrale Überlappung der Emission der roten Pigmente und der Absorption von $P700^+$ als sehr günstig erachtet wird [Shu95, Kar99a]. Dadurch könnte die andernfalls unter sehr starken Lichtverhältnissen erhöhte Ausbildung von Triplett-Zuständen verhindert werden, die zur Erzeugung von schädlichem Singulett-Sauerstoff führen würde. Ferner wird als wesentliche Ursache ihrer Existenz erachtet, dass die roten Chlorophylle das PS I mit einem spektral erweiterten Wirkungsquerschnitt ausstatten [Tri93b, Tri93c]. In einer Studie von Rivadossi et al. wurde die Rolle der roten Pigmente im pflanzlichen PS I von grünen Blättern unter verschiedenen Lichtverhältnissen untersucht [Riv99]. Demnach sammeln die roten Chlorophylle, obgleich sie bei Tageslicht nur ca. 4 – 5 % des Lichts einfangen,

1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“

unter einer bei ca. 680 nm verringerten Licht-Umgebung bis zu 40 % der Gesamtheit aller einfallenden Photonen. Alternativ könnten die roten Chlorophylle auch nur eine Begleiterscheinung der hohen Dichte an Pigmenten im PS I-Partikel sein, die signifikant größer ist als in anderen photosynthetischen Antennenkomplexen. Eine Lösung von Chlorophyllen in organischem Lösungsmittel mit einer der im PS I vergleichbaren Konzentration zeigt eine stark verminderte Fluoreszenzquantenausbeute, während sich beim Absorptionsverhalten verglichen mit einer niedrig konzentrierten Lösung keine Änderung einstellt [Bed76]. Dieses Phänomen wird damit erklärt, dass bei hoher Chlorophyll-Konzentration einerseits ein erheblicher Energietransfer stattfinden kann und andererseits einige Chlorophylle zufällig so angeordnet sind, dass sie, genau übereinander liegend, in Form eines Dimers die Anregungsenergie löschen können. Im PS I sind die Antennenpigmente so organisiert, dass dieser Effekt nicht auftritt, da andernfalls die Effizienz des Systems stark darunter leiden würde. Stattdessen könnte im PS I die hohe Chlorophyll-Konzentration im Zusammenhang mit der Notwendigkeit, direkt übereinander liegende Chlorophylle zu vermeiden, dazu geführt haben, dass sich die vorhandenen exzitonisch gekoppelten räumlich versetzten Dimere gebildet haben [Gob01a, Fro01]. Ein gutes Beispiel für eine solche versetzte Schichtung von Pigmenten liefern Chlorosome, die Antennenkomplexe der grünen Schwefelbakterien, die einige Tausend Bakteriochlorophyll c (BChl c) enthalten. Ihr Absorptionsmaximum liegt bei ca. 740 nm, während sich das von BChl c in monomerer Form bei ca. 660 nm befindet. Darüber hinaus besitzen die BChl c-Moleküle in Chlorosomen eine 7-8 mal höhere effektive Oszillatorstärke als BChl c-Monomere [Sav98]. Welche dieser Ansätze wesentliches Kriterium der Natur waren, die roten Chlorophylle in den Bauplan mit einzubeziehen, bleibt spekulativ. Die Frage nach dem „warum“ wird aufgrund der Komplexität der Zusammenhänge auch in naher Zukunft eine spannende Frage darstellen. Zu ihrer Lösung beizutragen, ist nicht zuletzt auch Ziel dieser Arbeit.