

**Messungen und Modellierungen  
zur Dynamik angeregter Zustände in Photosystem I**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Freien Universität Berlin  
Fachbereich Physik

vorgelegt von

**Martin Byrdin**

aus Freiberg

Berlin 1999

1. Gutachter: Prof. D. Stehlik

2. Gutachter: Prof. M. Heyn

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.1999

## ABSTRACT

In this work, dynamics of excitation energy transfer and decay in a cyanobacterial PS I core antenna-RC-complex from *Synechococcus el.* is studied combining fluorescence induction techniques with picosecond fluorescence lifetime measurements at temperatures between 5 K and 300 K with special attention to the oxidation state of the primary donor P700. The measured fluorescence behaviour is modeled by simulations of the excited state transfer and decay based on structural and spectral information.

For the first time, a difference in the quenching efficiency of the PS I core-antenna-RC-complex with open vs. closed RC was resolved both by fluorescence induction and ps- fluorescence as well as by quasi steady state spectroscopy. As the form of the steady state spectra at RT is (nearly) identical, the found difference of  $12\pm 5\%$  in fluorescence yield is not due to spectral differences between the open and closed RC states but to a  $\sim 3$  ps difference in the overall excitation decay lifetime. Thus, in closed PS I the excited state is quenched slightly worse than in open PS I.

Time-resolved fluorescence could resolve non-conservative transfer spectra both at RT and at 5 K, indicating that the quenched state of the complex is not fully equilibrated. As a consequence, trap limitation of the excited state kinetics can be excluded.

From the excited state lifetime at 5 K in closed PS I complexes a A720-P700 distance of  $\sim 3.5$  nm is calculated. The observed inter-monomer exchange of excitation energy suggests the localization of some A720 pigments in the connecting domain of the trimeric unit. Structural/spectral information based simulation of the excited state dynamics reveals the necessity for some A708 pigments to be placed next to the RC domain to increase the transient population of P700. The kinetics observed on a model with such arrangement of the red pigments yields optimal parameters as an intrinsic charge separation rate constant of  $(0.5 \text{ ps})^{-1}$  and a Förster radius of 7.3 nm for the reproduction of the measured fluorescence. Above that, the simulation shows an equilibration perturbation over the whole red wing of the emission and the determining influence of the red pigments. The kinetics in closed PS I can be described by fast quenching via internal conversion if the non-oxidized P700 Chl is set to maximal absorption at 685 nm. Testing the influence of the various parameters leads to the conclusion that for open PS I, the observable excited state decay is characterized by well-balanced kinetics rather than limiting cases.

## KURZFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Dynamik von Transfer und Abbau der Anregungsenergie in einem cyanobakteriellen PS I Kernantenne-RZ-Komplex aus *Synechococcus el.* untersucht durch Kombination von Fluoreszenzinduktion mit ps-zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen bei Temperaturen zwischen 5 K und 300 K unter besonderer Beachtung des Redoxzustandes des primären Donators P700. Das gemessene Fluoreszenzverhalten wird durch Simulation der Anregungsenergie-dynamik auf der Grundlage struktureller und spektraler Daten modelliert.

Erstmalig wurde ein Unterschied in der Löscheffizienz des PS I Kernantenne-RZ-Komplexes mit offenem bzw. geschlossenem RZ sowohl durch Fluoreszenzinduktion und ps- Fluoreszenz als auch durch quasistationäre Spektroskopie aufgelöst. Der Unterschied in der Fluoreszenzausbeute von  $12 \pm 5$  % ist nicht auf spektrale Unterschiede zwischen offenem und geschlossenem System zurückzuführen, sondern auf eine  $\sim 3$  ps Differenz in der Lebensdauer des Anregungszustandes. Damit ist im geschlossenen PS I die Löschung etwas langsamer als im offenen.

Mittels zeitaufgelöster Fluoreszenz wurden nicht-konservative Transferspektren sowohl für ZT als auch für 5 K gefunden, folglich ist der gelöschte Zustand nicht völlig thermisch equilibriert, was eine Trap- Limitierung der Anregungsdynamik ausschließt.

Aus der Lebensdauer der Anregung bei 5 K in geschlossenem PS I kann ein A720-P700 Abstand von  $\sim 3,5$  nm abgeschätzt werden. Der beobachtete Austausch von Anregungen zwischen unterschiedlichen Monomeren kann durch Lokalisierung einiger A720 Pigmente in der Verbindungsdomäne des Trimers erklärt werden. Struktur/spektral gestützte Simulation der Anregungsdynamik erweist die Notwendigkeit, einige A708 Pigmente unmittelbar am RZ zu plazieren, um die transiente Population von P700 zu erhöhen. Auf der Grundlage dieser Anordnung der roten Pigmente ergibt die kinetische Modellierung optimale Parameterwerte von  $(0.5 \text{ ps})^{-1}$  intrinsischer Ladungstrennungsrates und 7,3 nm Försterradius für die Reproduktion der gemessenen Fluoreszenz. Weiterhin zeigt die Simulation eine Störung des thermischen Gleichgewichts im roten Spektralbereich und die entscheidende Rolle der roten Pigmente. Die Dynamik von geschlossenem PS I kann durch schnelle Löschung mittels interner Konversion beschrieben werden, wenn das nicht-oxidierte P700 Chl maximal bei 685 nm absorbiert. Ein Test des Einflusses der verschiedenen Parameter zeigt, daß für offenes PS I der Anregungszustand durch ausgewogene Kinetik statt limitierender Fälle beschrieben wird.

## Inhaltsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen	5
<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Photosynthese und optische Spektroskopie	6
1.2 Die schnellen Primärprozesse der oxygenen Photosynthese	7
1.3 Das Raum-Zeit-Energie-Problem für PS I aus <i>Synechococcus el.</i>	12
1.4 Zeitaufgelöste Messungen der Dynamik angeregter Zustände in PS I	19
1.5 Der Einfluß der Umgebung auf Zustand und Reaktionskinetik in PS I	24
1.6 Ziele und Gliederung der Arbeit	29
<b>2 Experimentelle Methoden</b>	<b>33</b>
2.1 Probenpräparation und -charakterisierung	33
2.2 Fluoreszenz-Induktion	36
2.3 ps-zeitaufgelöste Fluoreszenz	37
2.4 Datenanalyse, zerfallsassoziierte Spektren	45
<b>3 Messungen</b>	<b>51</b>
3.1 Einfluß der Umgebung auf das stationäre Fluoreszenzspektrum	51
3.2 Fluoreszenz-Induktion	55
3.3 ps-Fluoreszenz bei Zimmertemperatur	60
3.4 ps-Fluoreszenz bei Tieftemperatur	69
3.5 ps-Fluoreszenz an monomeren PS I Proben	73
<b>4 Modellierungen</b>	<b>79</b>
4.1 Kinetik und Energetik des Kernantenne-RZ-Komplexes	79
4.2 Simulation der Kinetik im Kernantenne-RZ-Komplex	87
4.3 Pool-Modelle: keine Berücksichtigung räumlicher Information	95
4.4 Hybridmodell: acht homogene äquidistante Pigmentpools	105
4.5 Struktur-Modelle: Berücksichtigung räumlicher Information	112
<b>5 Dynamik angeregter Zustände in Photosystem I</b>	<b>121</b>
5.1 Löscheffizienz des offenen und geschlossenen RZ	121
5.2 Rolle der „roten“ Pigmente	124
5.3 Kinetische Modelle zwischen Transfer- und Trap- Limitierung	135
5.4 Grenzen und Verbesserungen des Modells	139
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>142</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>146</b>
Danksagung	155
Lebenslauf	155
Verzeichnis der Spektren	156

Der Autor war bemüht, diese Arbeit nach den Prinzipien der herkömmlichen deutschen Rechtschreibung zu verfassen. Anhänger der reformierten Schreibweise seien hiermit um Nachsicht gebeten.

## Verwendete Abkürzungen

ADC	Analog to Digital Converter, Analog/Digital Wandler
ATP	AdenosinTriPhosphat, ein Zwischenspeicher chemischer Energie
β-DM	Beta-DodecylMaltosid, Detergens zur Isolation von PS I
CFD	Constant Fraction Discriminator, erzeugt Standardpulse
CMC	Critical Micelle Concentration, Kritische Mizellenbildungs-Konzentration
CS	Charge Separation, Ladungstrennung
DAS	Decay-Associated Spectrum, zerfalls-assoziertes Spektrum
DAAS	Decay-Associated Amplitude Spectrum, zerfalls-assoziertes Amplitudenspektrum
DAXS	Decay-Associated Excitation Spectrum, zerfalls-assoziertes Anregungsspektrum
DAYS	Decay-Associated Yield Spectrum, zerfalls-assoziertes Ausbeutespektrum
DCM	4-Dicyanmethylen-2-Methyl-6-(p-Dimethylaminostyryl)-4H-pyran, ein Laserfarbstoff
FOI	Förster Overlap Integral, Förster Überlapp Integral
FWHM	Full Width at Half Maximum, Gesamtbreite bei halber Maximalamplitude
IRF	Instrument Response Function, Systemantwortfunktion
LHC I	Light Harvesting Complex I, Lichtsammelkomplex im Photosystem I
MCA	Multi Channel Analyzer, Vielkanalanalysator
MCP	Micro Channel Plate, Mikrokanalplatte
NADPH	NikotinamidAdeninDinukleotidPhosphat, ein Elektronenüberträger
PMS	PhenazinMethoSulfat, ein Redoxmediator (giftig!)
PMT	PhotoMultiplierTube, Sekundärelektronenvervielfacher
PS I/II	Photosystem I/II, zentrale Pigment-Protein-Komplexe der oxygenen Photosynthese
PSU	PhotoSynthetic Unit, Photosynthetische Einheit
RZ	ReaktionsZentrum
SAS	Species-Associated Spectrum, spezies-assoziertes Spektrum
TAC	Time to Amplitude Converter, Zeit zu Amplitude-Wandler
TCSPC	Time-Correlated Single Photon Counting, zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung
TRES	Time-Resolved Emission Spectrum, zeitaufgelöstes Emissionsspektrum
ZT	ZimmerTemperatur

Die Abkürzungen für die Redox-Komponenten der beiden Photosysteme findet man in der Unterschrift zu Abb. [1.1] auf Seite 8.

Die hier verwendeten Zeiten, Längen, Energien sind so klein, daß die Skala der Vorsätze bis zum unteren Ende ausgenutzt wird:

Mikro	μ	10 <sup>-6</sup>
Nano	n	10 <sup>-9</sup>
Piko	p	10 <sup>-12</sup>
Femto	f	10 <sup>-15</sup>
Atto	a	10 <sup>-18</sup>

Wenn im Zusammenhang mit thermodynamischen Betrachtungen der Term  $kT$  vorkommt, sind die Boltzmannkonstante  $k = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$  und die absolute Temperatur  $T$  gemeint.

## Danksagung

An der Entstehung des vorliegenden Papiers hatten viele Menschen den einen oder anderen Anteil, ich möchte ihnen allen danken, bitte die nicht Erwähnten um Vergebung darob und die Erwähnten auch.

Insbesondere möchte ich danken:

- Prof. Stehlik für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten
- Prof. Heyn für die Übernahme des Zweitgutachtens
- Theo Roelofs und Eberhard Schlodder für die wissenschaftliche & persönliche Betreuung, Fürsorge, Kompetenz, Diskussion...
- Ingo Rimke für den Platz an Laser & Computer
- Marianne Cetin für die gewissenhafte Messung der Induktionstitration
- Petra Fromme und Prof. Witt für die PS I Proben
- Enrico Gratton und dem LFD@UIUC für die Bereitstellung von Globals Unlimited
- Tamara Georgiewna für die unverzagte Suche nach Literatur
- Prof. Vieth für die zahllosen Verständnisfragen
- den Kellerkindern Ingeborg, Katja, Kerstin, Mathias, Volker für all die schöne Dunkelheit
- Frau Wallat für manche Pipette
- Rolf für die Antwort auf manche Frage
- Rafael und Heike für all den heißen Tee zusammen
- TTL, Tischlerei, Studenten-, Elektronik- und Mechanikwerkstatt für geduldige Hilfe
- den Kristallographen Patrick und Norbert für die Strukturdaten
- Budapest für die Photosynthesetagung 1998 und die erhellenden Gespräche mit Bas, Dieter, Massimo, Nassavard, Roberta...
- überhaupt der ganzen Arbeitsgruppe im Wandel der Zeiten und ihre vielen netten Gäste als da (waren) sind, soweit die Erinnerung reicht...Andreas, Aleksei, Aleksandra, Art, Elisabeth, Firdus, Frau Suarez, Hannes, Hans, Harald, Karsten, Kef, Lars, Mark, Olga, Peizhu, Peter, Rainer, Rajif, Sabine, Sergej, Stefan, Ulrike, Uwe... für die schöne Zeit zusammen
- Beate, Gabi, Ingmar, Roswitha, Sweta für Meinungen zu diesem Elaborat
- Clarissa und Ophelia für alles, was sich mit Worten nicht ausdrücken läßt
- Mango Mango für das Motto

## Lebenslauf

1966	Geburt in Freiberg
1973-1980	Schule in Freiberg
1981-1985	Erweiterte Oberschule in Freiberg „Spezialklasse mit verstärktem neusprachlichem Unterricht“
1985-1987	Wehrdienst in Mühlhausen
1987-1994	Studium der Physik/Biophysik Universität Moskau
1994	Diplom „Fluoreszenzmikroskopie an Protoplasten“
1994-1996	wissenschaftlicher Mitarbeiter Universität Potsdam „Fluoreszenzanisotropie an geordneten Systemen“
1996-1999	Promotion Biophysik Freie Universität Berlin
1998	Baruch Byrdin geboren
1999	Dissertation „zeitaufgelöste Fluoreszenz an Photosystem I“

## Verzeichnis der Spektren

System			Spektrum		
Temperatur	Aggregat	Redoxzustand	DAAS	DAYS	stationär
ZT	Trimer	geschlossen	Abb. [3.10] Seite 62	Abb. [3.11] Seite 62	Abb. [3.9] Seite 60
	Monomer	geschlossen	Abb. [3.19] Seite 74	Abb. [3.20] Seite 74	
5 K	Trimer	geschlossen	Abb. [3.15] Seite 71	Abb. [3.17] Seite 72	Abb. [3.8] Seite 59
		gemischt	Abb. [3.16] Seite 71	Abb. [3.18] Seite 72	Abb. [3.14] Seite 69
	Monomer	geschlossen	Abb. [3.22] Seite 77	Abb. [3.24] Seite 78	Abb. [3.21] Seite 75
		gemischt	Abb. [3.23] Seite 77	Abb. [3.25] Seite 78	

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit sind an folgenden Orten publiziert:

Byrdin, M., I. Rimke, C. Flemming, E. Schlodder, and T. A. Roelofs. 1998. Excitation energy transfer and trapping in PS I: fluorescence induction and picosecond fluorescence kinetics. *In*. Photosynthesis. Mechanisms and effects. Proceedings of the XI<sup>th</sup> International Photosynthesis Congress. 1998. Garab, G., editor Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Vols I-V, 567-570.

Byrdin, M., I. Rimke, E. Schlodder, D. Stehlik, and T. A. Roelofs. 2000. Decay kinetics and quantum yields of fluorescence in photosystem I from *Synechococcus el.* with P700 in the reduced and oxidized state: Are the kinetics of excited state decay trap-limited or transfer-limited? *Biophys.J.*, in press