

Einleitung

Die Natur birgt eine große Ideensammlung, von der wir lernen können. Die im Zuge der Evolution hervorgebrachten effektiven biochemischen Systeme beinhalten funktionelle Gruppen, deren Mechanismen im Detail vielfach noch unverstanden sind. Die Biophysik befindet sich gegenwärtig in der Situation, dass häufig sogar Grundprinzipien noch nicht erschlossen sind. Dies betrifft auch an der Photosynthese beteiligte Systeme, die in der Lage sind, aus Sonnenlicht Energieressourcen zu schaffen, ohne die höher entwickelte Leben auf der Erde undenkbar ist. Laut *Worldwatch Institute* hat sich der Energieverbrauch der Weltbevölkerung in den letzten 50 Jahren verfünffacht. Die Energiebilanz der heutigen Technik zur Nutzung regenerativer Energien fällt sehr gering aus. Die Maschinerie der Natur hingegen besitzt eine hohe Effizienz. Um die brillante Entwicklungsarbeit der Natur nutzen zu können, müssen die beteiligten Systeme im Detail verstanden werden. Ein wichtiges molekulares Solar-Kraftwerk ist das Photosystem I (PS I). Seine Hauptaufgabe besteht darin, Sonnenlicht einzufangen und damit eine stabile Ladungstrennung herbeizuführen, ähnlich einer Halbleiter-Solarzelle. Zum Lichtsammeln dienen dem PS I Antennenpigmente, die ihre Anregungsenergie an ein Reaktionszentrum (RC) weitergeben, um die Ladungstrennung einzuleiten. Eine spezielle Gruppe dieser Pigmente übernimmt eine Schlüsselrolle in der PS I-Forschung. Ihre optischen Übergangsenergien liegen gegenüber der erforderlichen Anregungsfrequenz des RCs rotverschoben. Sie werden daher allgemein als „rote Chlorophylle“ bezeichnet. Sowohl über ihre Funktion, als auch über den Mechanismus, der zu ihrer Rotverschiebung führt, wird aktuell noch diskutiert. Ihre Anwesenheit hat großen Einfluss auf den Energietransfer und wirkt sich auch stark auf die Fluoreszenzeigenschaften von PS I aus. Eine Einführung zum Thema PS I, insbesondere im Hinblick auf die roten Chlorophylle, wird im Kapitel 1 geboten.

Die spektralen Eigenschaften der roten Chlorophylle sind eingehend mit konventionellen Spektroskopiemethoden in Absorption, Emission und Fluoreszenzanregung untersucht worden. Die gewonnenen Informationen sind durch die Mittelung über ein Ensemble von PS I-Komplexen stark inhomogen verbreitert. Detailliertere Kenntnisse sind mit den verfeinerten Methoden der energiselektiven Fluoreszenzspektroskopie und des Lochbrennens erlangt worden, die jedoch immer noch über ein großes Teilensemble mitteln. Die einzige Technik, die eine Ensemble-Mittelung vollständig vermeidet, ist die Einzelmolekülspektroskopie (SMS). Mittlerweile kann man sie zu den etablierten Methoden zählen, auch wenn sie noch nicht so weit verbreitet ist. Die optische SMS nutzt die Fluoreszenz einzelner Moleküle als Sonde. Für die technische Realisierung wird die Anordnung eines konfokalen Mikroskops genutzt. Um das schwache Fluoreszenzsignal eines einzelnen

Einleitung

Moleküls zu detektieren, bestehen hohe Anforderungen an alle optischen Komponenten, insbesondere an das Objektiv und die Detektoren. Wichtige Aspekte zur Photophysik von Makromolekülen und zur konfokalen Mikroskopie werden in Kapitel 2 beleuchtet.

Um mit der Methode der optischen SMS bei der Klärung offener Fragen zu den roten Chlorophyllen des PS I beizutragen, war das erste Ziel meiner Arbeit, ein Einzelmolekül-Spektrometer zu bauen. Eine detaillierte Beschreibung der Apparatur findet man in Kapitel 3. Unter physiologischen Bedingungen ist die Fluoreszenzquantenausbeute von PS I für die SMS zu gering, da es seine primäre Funktion der Ladungstrennung erfüllt. Die roten Chlorophylle können dabei Anregungsenergie nur durch zusätzliche Absorption von vibronischer Energie aus der Proteinmatrix auf das RC übertragen. Dies kann man sich für ein SMS-Experiment zu Nutze machen, indem man durch kryogene Temperaturen den größten Teil der vibronischen Energie einfriert. Dadurch werden die roten Chlorophylle für die Anregungsenergie zur Falle und ihre Fluoreszenzquantenausbeute wird stark angehoben. Mein Ziel war es daher, insbesondere Messungen bei tiefen Temperaturen zu ermöglichen. Für den optischen Zugang bei Temperaturen unter dem Heliumsiedepunkt ist die Umspülung der Probe mit suprafluidem Helium notwendig. Experimente an schockgefrorenen PS I-Proben haben gezeigt, dass sowohl der Energietransfer vom Antennensystem zum RC als auch Teilprozesse der Ladungstrennung funktionieren, d.h. ein Elektronentransfer bis zum A_1 , teilweise sogar bis zum F_B [Sch98]. Somit erscheint die Annahme vernünftig, dass die Integrität von PS I im schockgefrorenen Zustand zumindest für den interessierenden Teil gewährleistet ist.

Meine Arbeit leistet zu folgenden Fragestellungen wissenschaftliche Beiträge:

- Die Anzahl roter Chlorophylle im PS I ist relativ klein. Aus Ergebnissen der Ensemble-Spektroskopie wird angenommen, dass die Menge in den PS I verschiedener Organismen variiert. Ein Ziel war es, die genaue Anzahl der roten Emitter zu bestimmen. Besonders interessant ist dabei das cyanobakterielle PS I der Spezies *Thermosynechococcus elongatus*, da von ihm die bisher genaueste Röntgenstruktur (2,5 Å) vorliegt.
- Welche homogenen spektralen Eigenschaften sind für die roten Zustände charakteristisch? Unklar ist bisher, wie ausgeprägt die spektrale Heterogenität eines bestimmten roten Zustands in verschiedenen PS I-Komplexen ist und wie die einzelnen roten Zustände zu den aus der Literatur bekannten Ensemble-Spektren beitragen. Wie sieht die homogene Linienform eines einzelnen roten Zustands aus?
- Bisher wird davon ausgegangen, dass für die starke Rotverschiebung der roten Chlorophylle eine ausgeprägte Elektron-Phonon-Kopplung notwendig ist, d.h. die zugehörigen elektronischen Übergänge koppeln stark an die vibronischen Freiheitsgrade des Proteins. Dies wird in der Literatur durch das Beimischen von Ladungstransferzuständen zu den exzitonisch gekoppelten Zuständen erklärt. Ist eine starke Elektron-Phonon-Kopplung essentiell für die starke Rotverschiebung der roten Chlorophylle?

- Gibt es einen effizienten Energietransfer zwischen verschiedenen roten Zuständen innerhalb eines Monomers? Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde auch ermittelt, wie die Übergangsdipolmomente der einzelnen roten Zustände im PS I von *T. elongatus* zueinander räumlich orientiert sind.
- Die roten Chlorophylle stellen im Wirkungsgefüge aus Antennen und Protein spezielle Sonden dar, die sehr sensibel auf strukturelle Veränderungen reagieren und diese im optischen SMS-Experiment weitergeben. Gibt es Hinweise darauf, was für Konformationsänderungen bei 1,4 K noch stattfinden können und unter welchen Voraussetzungen? Am bakteriellen Lichtsammelkomplex LH2 sind bei 1,4 K Konformationsänderungen im Protein nachgewiesen worden [Hof03]. Kann am PS I ein ähnliches Verhalten beobachtet werden? Wie ist die Energielandschaft der Proteinumgebung der roten Zustände organisiert?
- Beim nicht-photochemischen Lochbrennen wird vorausgesetzt, dass sich die Potentialhyperflächen im elektronischen Grund- und elektronisch angeregten Zustand unterscheiden. Details sind bisher keine bekannt. Mit Hilfe von Experimenten an teildeutierten Proben konnte der Frage nachgegangen werden, ob Protonentunneln bei 1,4 K möglich ist und welche Rolle dabei der elektronische Zustand spielt. PS I diene diesbezüglich als Modellsystem. Die hierzu in Kapitel 5 entwickelten Ideen können vermutlich auch auf andere Proteinkomplexe übertragen werden.