

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

5.1 Einleitung

In diesem Kapitel werden Eigenschaften der Proteinumgebung der roten Zustände untersucht. Konformationsänderungen im Protein sind gleichzusetzen mit Reorganisationen der Atome. Die eingelagerten Pigmente erfahren diese Veränderungen als Fluktuationen in den lokalen Kopplungen, die stark abstandsabhängig sind. Dadurch werden die lokalen optischen Übergangsenergien verändert, was die Pigmente zu empfindlichen Sonden für Proteindynamik macht. In der Natur spielt dieser Mechanismus für einen Pigment-Protein-Komplex eine wichtige Rolle, um Funktionen zu modulieren oder Prozesse zu regulieren. Im Kapitel 4 wurde bereits festgestellt, dass die Fluoreszenz eines einzelnen PS I-Komplexes auch bei 1,4 K eine starke spektrale Dynamik zeigt. Diese wird in den folgenden Abschnitten eingehend untersucht. Da der Messaufbau Null-Null-Übergänge mit guter Genauigkeit spektral erfassen kann, wurde die spektrale Diffusion der emittierten ZPLs dazu genutzt, direkt Veränderungen in der lokalen optischen Übergangsenergie von roten Zuständen in ihrer Proteinbindungstasche zu verfolgen. Zunächst wird anhand individueller PS I-Komplexe untersucht, wie die Energieabstände der beteiligten Niveaus der roten Zustände mit entsprechenden Fluktuationsraten korrelieren. Anschließend wird gezeigt, dass die spektrale Dynamik in der Fluoreszenz durch die eingestrahlte Anregungsenergie beeinflusst wird. Im letzten Teil werden Lösungsmittelleffekte auf die einzelnen PS I-Komplexe analysiert.

5.2 Korrelation zwischen Fluktuationsrate und Energieänderung

5.2.1 PS I von *T. elongatus*

Die Dynamik in der Fluoreszenz eines einzelnen Emitters aus einem der roten Chlorophyll-Verbände kann dazu genutzt werden, über die individuelle Umgebung Informationen zu erhalten. Eine elementare Voraussetzung besteht darin, dass der Messprozess genügend schnell ist, um die Dynamik zumindest teilweise zu erfassen. In Abbildung 5.1 oben

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

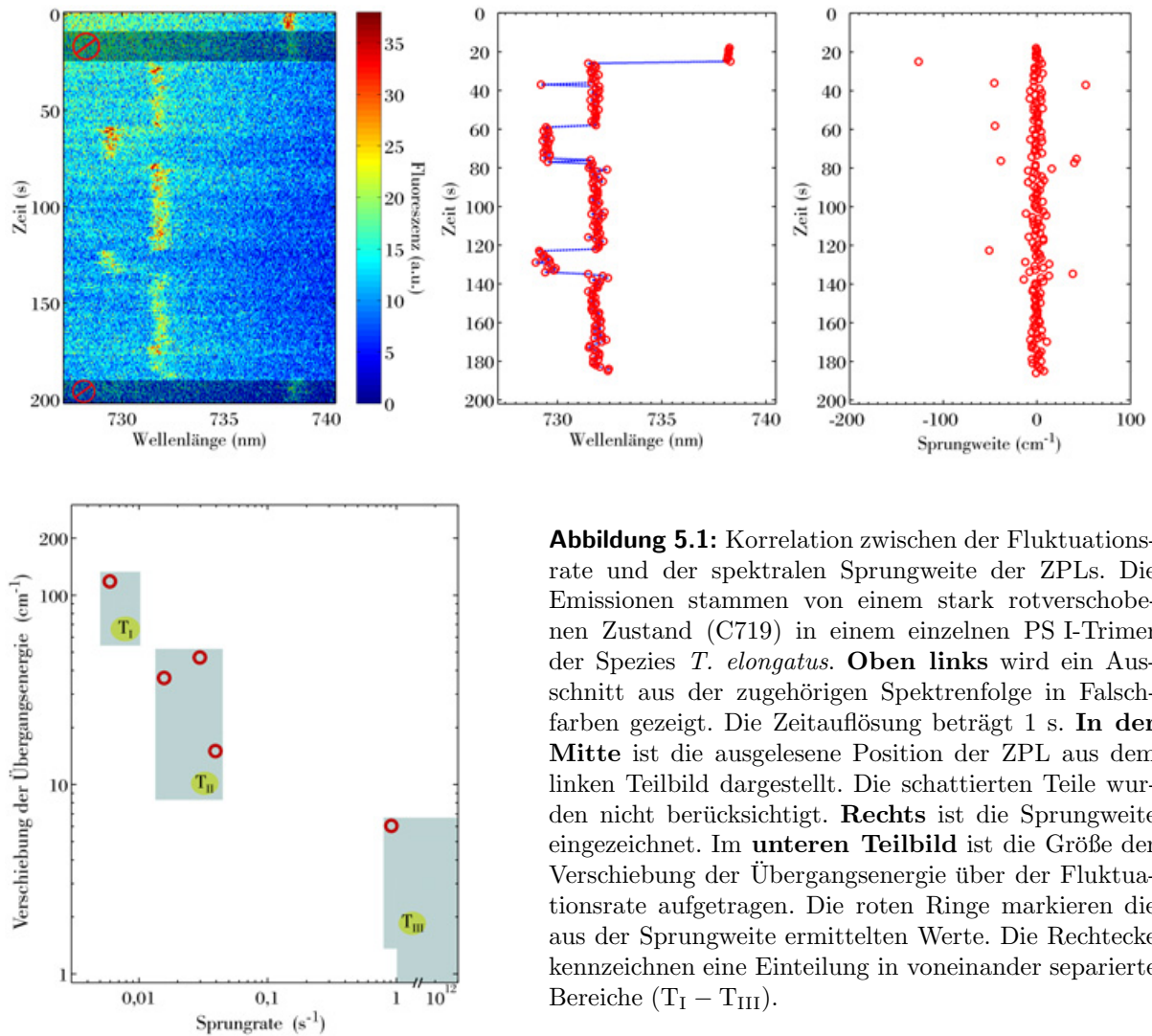


Abbildung 5.1: Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs. Die Emissionen stammen von einem stark rotverschobenen Zustand (C719) in einem einzelnen PS I-Trimer der Spezies *T. elongatus*. **Oben links** wird ein Ausschnitt aus der zugehörigen Spektrenfolge in Falschfarben gezeigt. Die Zeitauflösung beträgt 1 s. **In der Mitte** ist die ausgelesene Position der ZPL aus dem linken Teilbild dargestellt. Die schattierten Teile wurden nicht berücksichtigt. **Rechts** ist die Sprungweite eingezeichnet. Im **unteren Teilbild** ist die Größe der Verschiebung der Übergangsenergie über der Fluktuationsrate aufgetragen. Die roten Ringe markieren die aus der Sprungweite ermittelten Werte. Die Rechtecke kennzeichnen eine Einteilung in voneinander separierte Bereiche ($T_I - T_{III}$).

links wird auszugsweise der spektrale Zeitverlauf einer emittierten Null-Phononen-Linie (ZPL) eines einzelnen PS I-Trimers von *T. elongatus* gezeigt, die zur Fluoreszenz des C719-Verbands beiträgt. Die Intensität wird durch Falschfarben wiedergegeben. Wie im Abschnitt 4.3.3 beschrieben, wurden nur bei ca. 25 % der untersuchten Komplexe ZPLs beobachtet, die zur Fluoreszenz des C719 beisteuern. In der mittleren Teilabbildung sind die ausgelesenen spektralen Positionen aufgetragen. Jeder rot eingezeichnete Ring spiegelt dabei die mittlere Wellenlänge des Maximums der ZPL im Zeitintervall des entsprechend akkumulierten Spektrums wieder. Die schattierten Bereiche im linken Bild wurden aufgrund des schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht berücksichtigt. Im rechten Bild ist die Energieänderung in cm^{-1} aufgetragen, die sich von Position zu Position ergibt. Unterteilt man nun die Sprungweite in zehn Bereiche gleicher Energie und ordnet alle Sprünge ein, dann ergibt sich das unten dargestellte Bild. Die Auftragung zeigt, mit welcher Häufigkeit Sprünge im entsprechenden Energieintervall aufgetreten sind. Die ge-

5.2 Korrelation zwischen Fluktuationsrate und Energieänderung

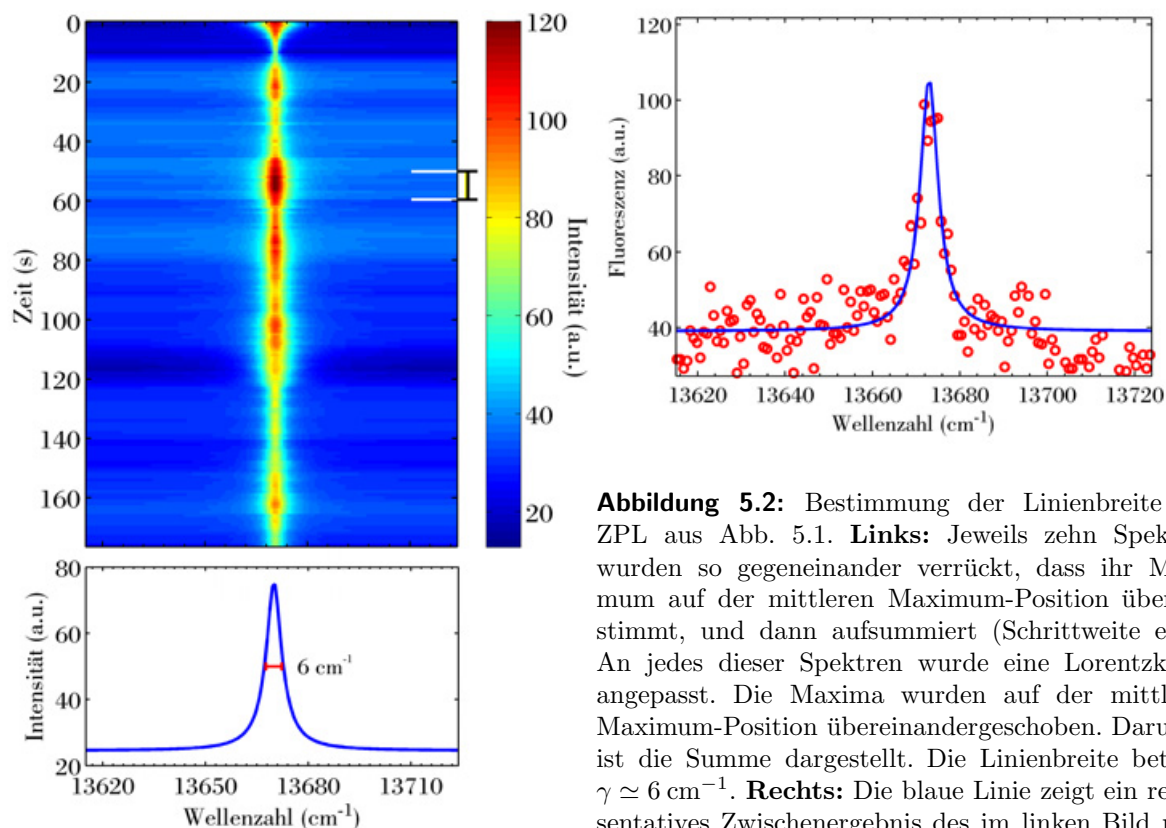


Abbildung 5.2: Bestimmung der Linienbreite der ZPL aus Abb. 5.1. **Links:** Jeweils zehn Spektren wurden so gegeneinander verrückt, dass ihr Maximum auf der mittleren Maximum-Position übereinstimmt, und dann aufsummiert (Schrittweite eins). An jedes dieser Spektren wurde eine Lorentzkurve angepasst. Die Maxima wurden auf der mittleren Maximum-Position übereinandergeschoben. Darunter ist die Summe dargestellt. Die Linienbreite beträgt $\gamma \simeq 6 \text{ cm}^{-1}$. **Rechts:** Die blaue Linie zeigt ein repräsentatives Zwischenergebnis des im linken Bild markierten Bereichs. Zusätzlich sind die Datenpunkte des zugehörigen Summenspektrums eingezeichnet.

wählten Achsenskalierungen sind logarithmisch. Analog zur Studie am LH2 von Hofmann *et al.* [Hof03] wurde eine Gliederung entsprechend der spektralen Sprungweite in voneinander separierte Bereiche vorgenommen. Sie sind als $T_I - T_{III}$ gekennzeichnet. Bei einer Verfeinerung der Einteilung auf z.B. 20 oder 30 Energiebereiche ergibt sich kein grundlegend anderes Bild, d.h. lediglich die Ausdehnung und Lage der eingezeichneten Bereiche werden leicht beeinflusst.

Die spektrale Diffusion, die schneller stattfindet als ein Messprozess, kann nicht direkt erfasst werden, d.h. in unserem Fall bei der hauptsächlich verwendeten Akkumulationszeit von 1 s sind die Sprünge betroffen, die häufiger als einmal pro Sekunde geschehen. Dieser Wert stellt eine untere Grenze der „schnellen“ Sprungrate dar. Die zugehörige obere Grenze der Sprungweite wird von der größten Linienbreite aller einzelnen Messprozesse gebildet. Im unteren Teil der Abbildung 5.1 wird dieser Punkt durch die linke obere Ecke des unteren Rechtecks T_{III} gekennzeichnet. Die obere Grenze der Sprungrate kann über die Frequenz-Zeit-Unschärfe anhand der Linienbreite γ abgeschätzt werden. Die Bestimmung von γ für obige ZPL wird in Abbildung 5.2 gezeigt. Um zunächst das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurde ein Fenster à zehn Spektren mit einer Schrittweite von eins über den Zeitverlauf bewegt. Bei jedem Schritt wurden die Spektren

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

so gegeneinander verschoben, dass ein gemeinsames mittleres Maximum der ZPL gebildet wurde. Das neu entstandene Fenster wurde jeweils zu einem Spektrum aufsummiert. An jedes dieser Summenspektren wurde eine Lorentzkurve angepasst. Die Maxima aller Lorentzkurven wurden ebenfalls auf eine mittlere Position verrückt. Das Ergebnis ist in Falschfarben dargestellt. Im unteren Teil kann aus der Projektion $\Delta\nu = \gamma \simeq 6,0 \text{ cm}^{-1}$ abgelesen werden, was einer maximalen Sprungrate von ca. $6/33 \text{ THz} \sim 10^{12} \text{ s}^{-1}$ entspricht. Im Zeit-Regime $t < 1 \text{ s}$ kann nicht zwischen kleinen spektralen Sprüngen langsamer Rate und schneller Rate unterschieden werden. Jedoch kann zumindest festgestellt werden, dass große spektrale Sprünge bei schneller Rate innerhalb des gewählten Messfensters nicht beobachtet wurden.

Zusätzlich zu schnellen Fluktuationen innerhalb $t < 1 \text{ s}$ wurden auch Sprünge mit Energieänderungen $\Delta\nu \leq 6 \text{ cm}^{-1}$ mit einer zugehöriger Rate von ca. $0,9 \text{ s}^{-1}$ festgestellt, d.h. spektrale Sprünge mit Energieänderungen, die der Linienbreite entsprechen, finden den schnellen Fluktuationen überlagert mit einer Häufigkeit nahe der Geschwindigkeit des Messprozesses statt. Diese werden durch einen Datenpunkt in dem als T_{III} deklarierten Bereichs repräsentiert. Sprünge mit einer Energieänderung zwischen ca. $\Delta\nu \geq 16 \text{ cm}^{-1}$ und $\Delta\nu \leq 48 \text{ cm}^{-1}$ treten mit einer Rate von ca. $1,5 \cdot 10^{-2} - 4 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ auf und werden dem Bereich T_{II} zugeordnet. Eine Energieänderung von $\Delta\nu \simeq 120 \text{ cm}^{-1}$ tritt mit der Rate von $6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ auf.

Die Abbildung 5.3 zeigt den spektralen Energiebereich, der häufig unter den gegebenen Messbedingungen roten Zuständen, die im Bereich um 708 nm fluoreszieren, zugänglich ist. Oben links ist ein Ausschnitt des spektralen Verlaufs einer ZPL der mittleren Wellenlänge von ca. $\lambda \simeq 706 \text{ nm}$ in Falschfarben dargestellt. Analog zur Abbildung 5.2 wird in der rechten Teilabbildung die mittlere Linienbreite auf ca. $\gamma \simeq 6,0 \text{ cm}^{-1}$ bestimmt. Die Werte γ der beiden hier gezeigten ZPLs aus verschiedenen Spektralbereichen stimmen demnach überein. Die untere Darstellung wurde mit dem gleichen Auswerteverfahren erstellt, wie in Abbildung 5.1 erklärt wurde. Auch für diesen Emittierer erscheint eine Gliederung der Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs in voneinander separierte Bereiche $T_{\text{I}} - T_{\text{III}}$ sinnvoll. Eine obere Abschätzung der Rate innerhalb T_{III} wird gemäß obiger Rechnung anhand der Linienbreite gegeben. Die untere Abschätzung liefert ein Datenpunkt bei einer Energie von ca. 3 cm^{-1} mit zugehöriger Rate von ca. $0,8 \text{ s}^{-1}$, d.h. die Sprungweite der Fluktuationen mit $t \geq 1 \text{ s}$ in T_{III} beträgt nur die Hälfte der Linienbreite und des entsprechenden Wertes beim im Bereich $> 719 \text{ nm}$ emittierenden Zustand bei leicht geringerer Rate. Die übrigen Bereiche liegen verglichen mit der Einteilung des Zustands aus Abbildung 5.1 dichter zusammen, d.h. der Energiebereich, der unter den Messbedingungen von dem emittierenden Zustand erschlossen wird, ist stärker begrenzt und die Sprunghäufigkeit innerhalb der Bereiche T_{I} und T_{II} ist höher. Zum mittleren Bereich T_{II} trägt ebenfalls nur ein Datenpunkt bei. Er entspricht einer Energie von ca. 9 cm^{-1} mit zugehöriger Rate von ca. $9 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Dem Bereich T_{I} sind Sprünge einer Energieänderung von ca. $15 \text{ cm}^{-1} \leq \Delta\nu \leq 50 \text{ cm}^{-1}$ zugeordnet. Die zugehörige Rate liegt zwischen ca. $5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $2,7 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

5.2 Korrelation zwischen Fluktuationsrate und Energieänderung

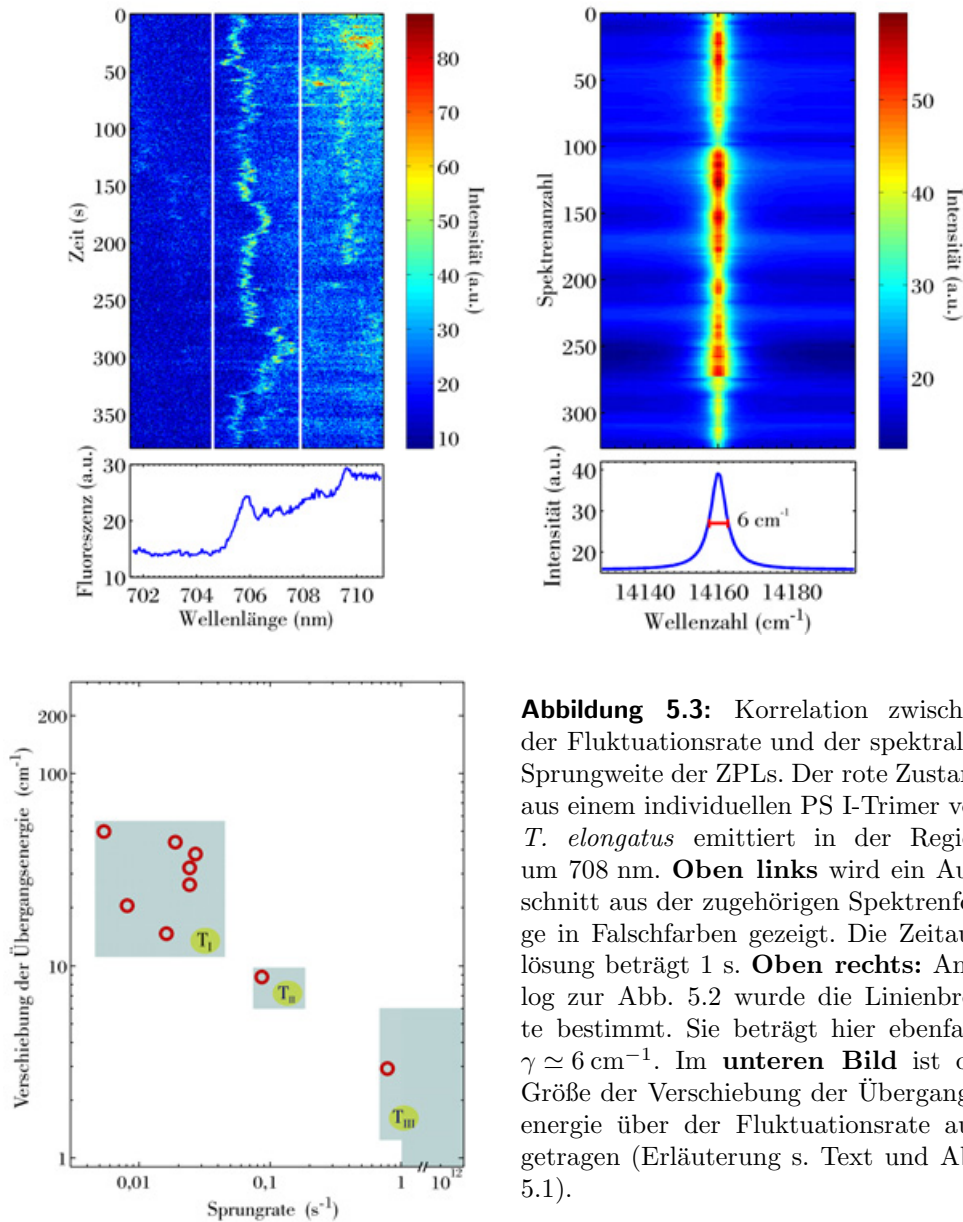


Abbildung 5.3: Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs. Der rote Zustand aus einem individuellen PS I-Trimer von *T. elongatus* emittiert in der Region um 708 nm. **Oben links** wird ein Ausschnitt aus der zugehörigen Spektrenfolge in Falschfarben gezeigt. Die Zeitauflösung beträgt 1 s. **Oben rechts:** Analog zur Abb. 5.2 wurde die Linienbreite bestimmt. Sie beträgt hier ebenfalls $\gamma \simeq 6 \text{ cm}^{-1}$. Im **unteren Bild** ist die Größe der Verschiebung der Übergangsenergie über der Fluktuationsrate aufgetragen (Erläuterung s. Text und Abb 5.1).

5.2.2 PS I von *Synechocystis*

An den vorangegangene Abschnitt anknüpfend wird im Folgenden analog die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs der roten Chlorophyll-Verbände des PS I vom Cyanobakterium *Synechocystis* untersucht. In Abbildung 5.4 links wird auszugsweise der spektrale Zeitverlauf zweier emittierter ZPLs gezeigt. Die spektralen Fluktuationen beider Linien korrelieren nicht miteinander. Die Linie mit der mittleren spektralen Lage bei ca. $\bar{\lambda} \simeq 704 \text{ nm}$ steuert zur Fluoreszenz des C706/C708-Verbands bei und die bei ca. $\bar{\lambda} \simeq 713 \text{ nm}$ zu der des C714-Verbands. Beim PS I der Spezies

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

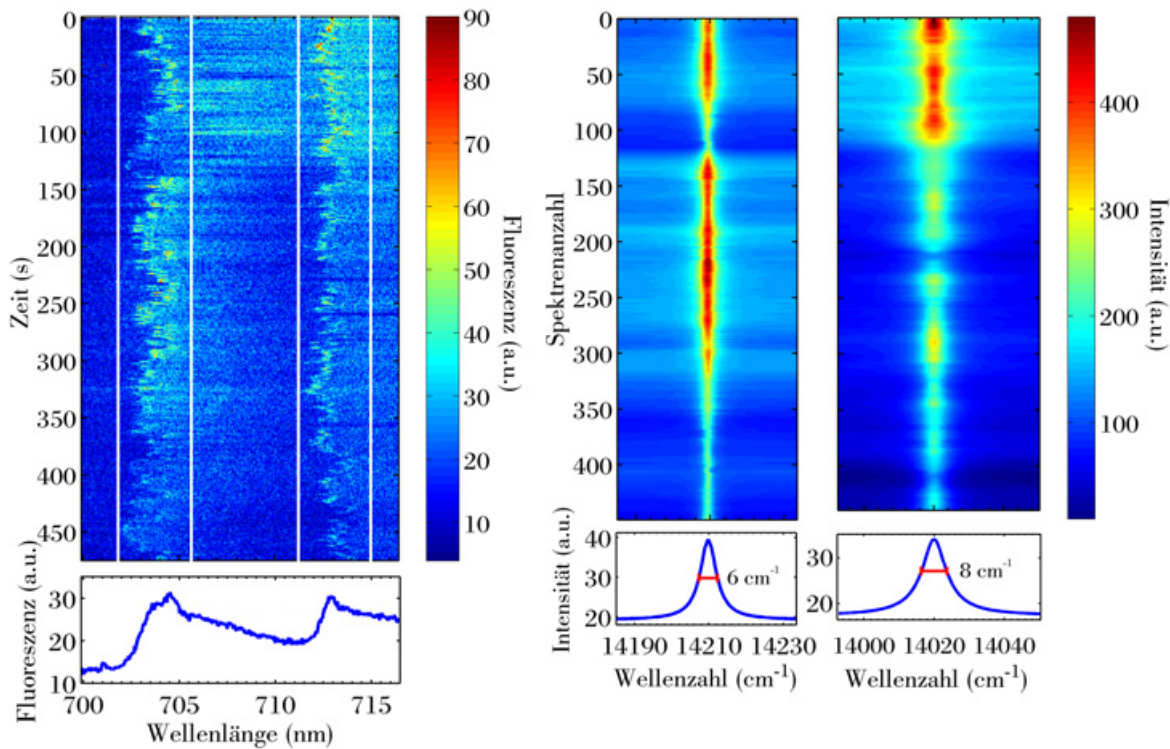


Abbildung 5.4: Fluktuation und Linienbreite zweier ZPLs in der Fluoreszenz eines individuellen PS I-Trimers der Spezies *Synechocystis*. Die spektralen Fluktuationen der Linien sind unkorreliert zueinander, d.h. die Linien werden zwei verschiedenen Emittlern zugeschrieben. Die Linie bei $\bar{\lambda} \simeq 704$ nm trägt zur Fluoreszenz des roten Chlorophyll-Verbands C706/C708 bei und die bei $\bar{\lambda} \simeq 713$ nm zu der des C714. **Links** wird ein Ausschnitt aus der zugehörigen Spektrenfolge in Falschfarben gezeigt. Die Zeitauflösung beträgt 1 s. Der **rechte** Teil zeigt die Bestimmung der jeweiligen Linienbreite analog zum Verfahren in Abb. 5.2, wobei einzelne Spektren aufgrund schlechtem Signal-zu-Rausch-Verhältnis nicht berücksichtigt wurden. Die Linienbreite der Linie bei $\bar{\lambda} \simeq 704$ nm beträgt $\gamma \simeq 6$ cm^{-1} und die der Linie bei $\bar{\lambda} \simeq 713$ nm liegt bei $\gamma \simeq 8$ cm^{-1} (FWHM).

Synechocystis wurden scharfe ZPLs, die über längere Zeiträume als $t \geq 200$ s stabil emittiert wurden, selten beobachtet. Die Fluktuationen von Linien über $t \geq 100$ s im Bereich zwischen 700 nm und 708 nm verhielten sich bei drei weiteren Stichproben von verschiedenen Komplexen ähnlich. In den beiden rechten Darstellungen der Abbildung 5.4 wurden, wie zuvor im Abschnitt 5.2.1 erklärt, die Linienbreiten auf $\gamma \simeq 6$ cm^{-1} für $\bar{\lambda} \simeq 704$ nm und $\gamma \simeq 8$ cm^{-1} für $\bar{\lambda} \simeq 713$ nm bestimmt. Über die Frequenz-Zeit-Unschärfe kann daraus die Größenordnung der oberen Grenze der Sprungrate auf $\sim 10^{12}$ s^{-1} abgeschätzt werden.

In Abbildung 5.5 sind für die beiden ZPLs jeweils die Sprungweite über der Fluktuationsrate aufgetragen. Wie für die einzelnen Emittter der roten Chlorophylle des PS I von *T. elongatus* wurden die Gesamtenergiebereiche der Sprungweiten in je zehn gleichgroße Bereiche eingeteilt, in die jeweils alle spektralen Sprünge einsortiert wurden. In der linken Teilabbildung wird das Ergebnis des zum C706/C708-Verband beitragenden Emitters ge-

5.2 Korrelation zwischen Fluktuationsrate und Energieänderung

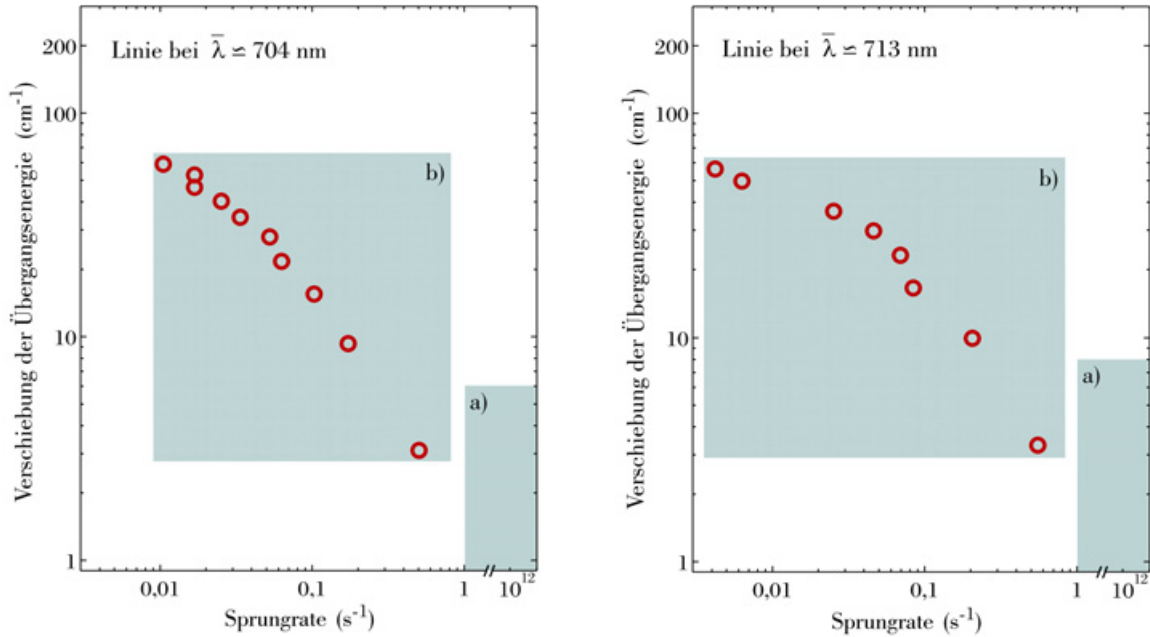


Abbildung 5.5: Auftragung der Sprungweite über der Fluktuationsrate für die beiden ZPLs aus Abb. 5.4. Wie im Abschnitt zuvor wurden die Gesamtenergiebereiche in je zehn gleichgroße Intervalle eingeteilt, in die jeweils alle spektralen Sprünge einsortiert wurden. Das **linke** Bild gehört zu der Linie bei $\bar{\lambda} \simeq 704$ nm und das **rechte** zu der bei $\bar{\lambda} \simeq 713$ nm. Im Vergleich zum Ergebnis der roten Chlorophylle des PS I von *T. elongatus* ergibt sich hier bei gleicher Gliederung eine eher fortlaufende Besetzung der Energiebereiche b), d.h. in der Verteilung zeichnen sich keine deutlich voneinander getrennten Bereiche ab. Die eingezeichneten Rechtecke a) basieren auf den in Abb. 5.4 bestimmten Linienbreiten (s. Abschnitt 5.2.1).

zeigt und in der rechten das entsprechende des zum C714-Verband beitragenden Emitters. Die schattierten Rechtecke a) basieren auf obiger Abschätzung aus den Linienbreiten. In den Rechtecken b) sind die aus den Linien sprüngen ermittelten Datenpunkte eingezeichnet. Für die Linie bei $\bar{\lambda} \simeq 704$ nm ergibt sich eine Kurve, deren Werte für den Energiebereich von ca. 3 cm^{-1} bis ca. 60 cm^{-1} reichen, mit einer zugehörigen Sprungrate von ca. $0,5 \text{ s}^{-1}$ bis ca. 10^{-2} s^{-1} . Die Datenpunkte der Linie bei $\bar{\lambda} \simeq 713$ nm liegen auf einer davon leicht abweichenden Kurve. Sie verläuft von ca. $0,4 \text{ s}^{-1}$ bis ca. $4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ mit den dazugehörigen Energiebereichen von ca. 3 cm^{-1} bis ca. 55 cm^{-1} . Im Vergleich zur Korrelation zwischen Fluktuationsrate und Sprungweite der ZPLs beim PS I von *T. elongatus* ergibt sich hier bei gleicher Gliederung eine fortlaufende Besetzung der Energiebereiche, d.h. in der Verteilung lassen sich keine deutlich voneinander getrennten Bereiche ausmachen, wie bei den roten Pigmenten des PS I von *T. elongatus*, bei dem jeweils auch bei dreimal feinerer Gliederung eine Separierung noch sinnvoll erscheint.

5.3 Auslöser der Fluoreszenzdynamik bei tiefer Temperatur

Trotz der vorherrschenden 1,4 K Probertemperatur zeigt die Fluoreszenz der roten Chlorophylle im PS I eine starke spektrale Diffusion. In der Abbildung 5.6 sind von oben nach unten Sequenzen von Fluoreszenzspektren dreier verschiedener, einzelner PS I-Trimere von *Synechocystis* dargestellt. Bei dem oberen und mittleren linken Bild befinden sich jeweils auf der rechten Seite die entsprechenden, eingezeichneten Ausschnittsvergrößerungen. Die Aufnahmen weisen horizontale, dunkle Bereiche auf, die sich jeweils über verschieden lange Zeiten einiger Sekunden erstrecken. Diese Bereiche stammen daher, dass die Anregung während dieser Zeiten jeweils vollständig unterbrochen wurde. Während der Beleuchtungszeiten treten deutlich sichtbare spektrale Sprünge der emittierten Null-Phononen-Linien (ZPLs) auf, die in der Ausschnittsvergrößerung oben rechts exemplarisch mit Hilfe von weißen Pfeilen markiert sind. Die senkrechten, roten Pfeile markieren jeweils die spektralen Linienpositionen vor dem Abschalten der Anregungsbeleuchtung und nach dem Wiedereinschalten. Bemerkenswert dabei ist, dass die Linien bei allen daraufhin untersuchten PS I-Komplexen (> 20) nach der Anregungspause wieder an der gleichen spektralen Position im Rahmen von maximal ca. $\pm 0,2$ nm angesetzt haben. Dabei ist wichtig zu beachten, dass die Dunkelphasen in der zeitlichen Länge variiert wurden. Die oben links abgebildete Spektrensequenz ist in dieser Hinsicht ein interessantes Beispiel. Von der betrachteten ZPL dieses PS I-Komplexes wird die spektrale Position bei ca. 696 nm stark bevorzugt. Die energetisch höher gelegene Position $< 695,6$ nm wird im Vorfeld nur wenige Male und für maximal 15 s eingenommen. Die drei Phasen, in denen der Laser ausgeschaltet war, dauerten jedoch jeweils länger als 25 s an. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass bei 1,4 K ohne die Zuführung von Anregungsenergie energetische Veränderungen der emittierenden Zustände von mehr als 4 cm^{-1} nicht stattfinden. Ein direkter Beweis ist nicht möglich, da ohne Anregung keine Fluoreszenzemission gemessen werden kann. Ferner führt eine sehr geringe Anregungsleistung bei erforderlicher kurzer Messdauer zu einem ungünstigen Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Insofern liefern die durchgeführten Experimente, bei denen der Laser jeweils für einige Sekunden abgeschaltet wurde, einen guten Kompromiss. Besonders eindrucksvoll erscheint dabei, dass bei einigen Komplexen beobachtet werden konnte, wie ein roter Zustand im offenbar ungünstigeren Energiezustand gefangen wurde. Dazu betrachte man beispielsweise den Ausschnitt oben rechts in der Abbildung 5.6. Hier wurde, ähnlich wie in [Rut06], der Laserstrahl immer dann unterbrochen, wenn die beobachtete ZPL gerade in eine höherenergetische Position gesprungen war. Beim Wiedereinschalten des Lasers erkennt man gerade noch, dass die spektrale Position erhalten blieb, bevor die Linie schließlich wieder aus einem niederenergetischeren Zustand emittiert wird.

5.3 Auslöser der Fluoreszenzdynamik bei tiefer Temperatur

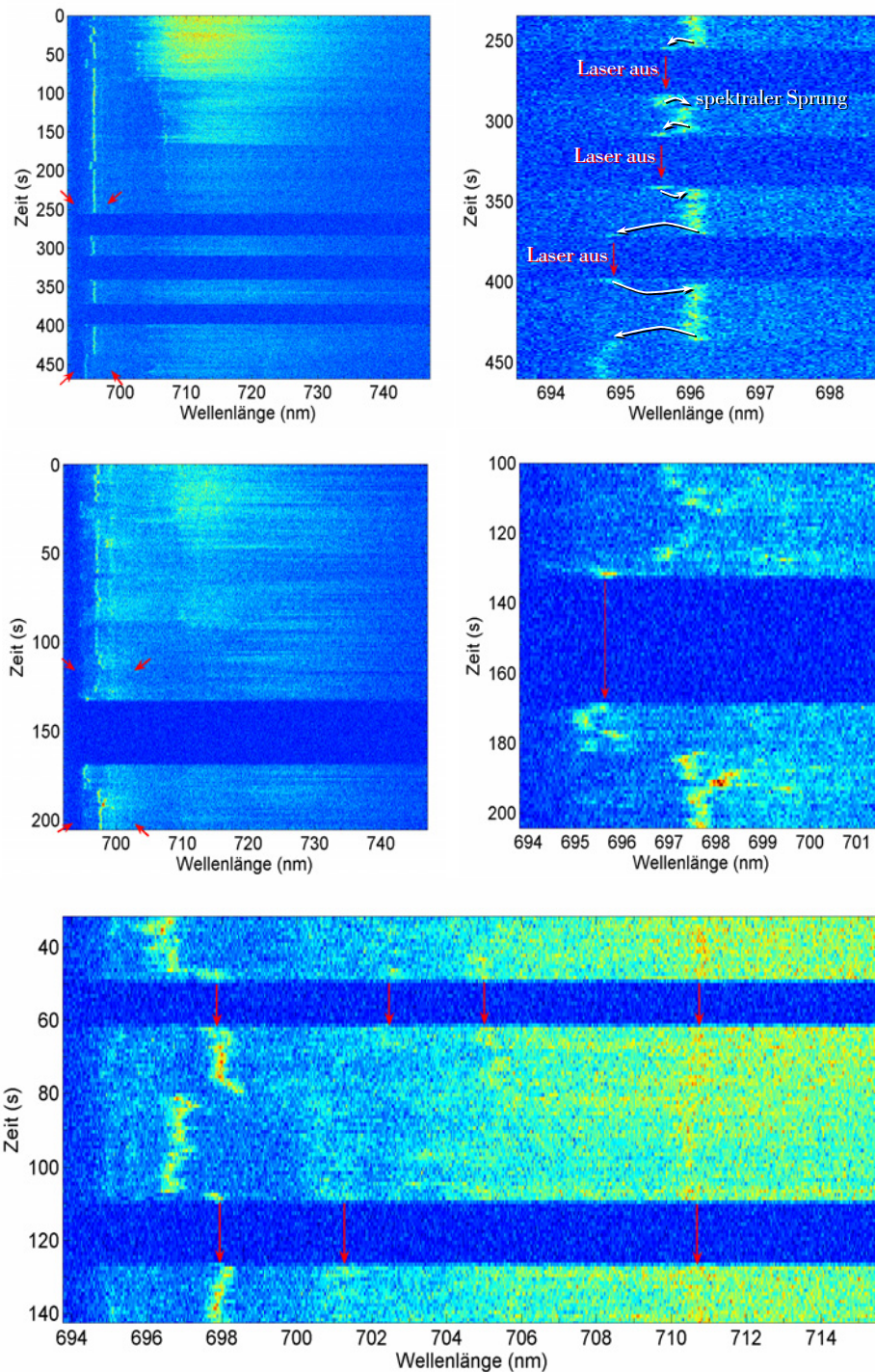


Abbildung 5.6: Einfluss der Anregung auf die Fluoreszenzdynamik einzelner PS I-Trimere von *Synechocystis*. Während der Spektren-Akquisition wurde die Anregung jeweils für mehrere Sekunden unterbrochen (horizontale, dunkle Bereiche). Bei dem Molekül oben und dem in der Mitte werden rechts jeweils die Ausschnittsvergrößerungen gezeigt. Die vertikalen roten Pfeile markieren jeweils die spektralen Linienpositionen vor dem Abschalten der Anregungsbeleuchtung und nach dem Wiedereinschalten. Deutlich zu erkennen ist, dass die jeweilige Linienposition nach der Anregungspause stets erhalten bleibt.

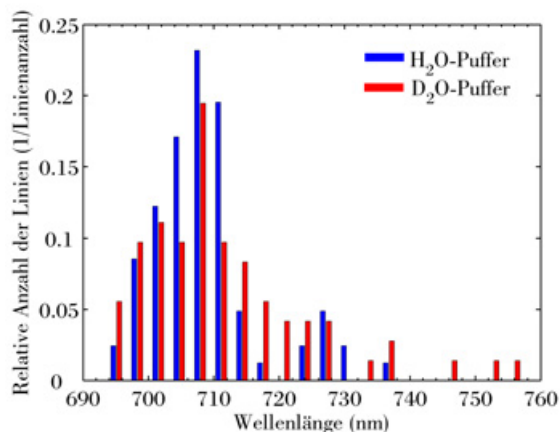


Abbildung 5.7: Statistik über die Anzahl der aufgetretenen Null-Phononen-Linien (ZPLs) im spektralen Bereich der roten Chlorophylle beim PS I von *T. elongatus* in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Die blauen Balken resultieren aus den Messungen in H₂O-Puffer und die roten gehören zu Messungen in D₂O-Puffer (s. Abschnitt 3.2.3). Die Verteilung wurde auf die Anzahl der insgesamt beobachteten Linien relativiert.

5.4 Auswirkung von schwerem Wasser im Lösungsmittel

In der Spektroskopie an Proteinkomplexen kann man sich zu Nutze machen, dass an bestimmten Gruppen in Proteinen ein Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium erfolgen kann, wodurch Eigenschaften des Proteins gezielt beeinflusst werden. In Proteinen sind die NH₂- und COOH-Gruppen wegen der Peptidbindung nicht titrierbar, so dass der Aminosäurerest für das Säure-Base-Verhalten entscheidend ist. Bei der Seitenkette hängt das Verhalten davon ab, ob sie selbst wieder als Protonenakzeptor oder -donator wirken kann. Aminosäuren mit titrierbarer Seitenkette sind z.B. Cystein, Tyrosin, Lysin, Arginin, Histidin. Rein theoretisch ist zunächst bei allen nicht an Kohlenstoff gebundenen Wasserstoffatomen ein Austausch gegen Deuterium nicht auszuschließen. Ob z.B. an einer bestimmten OH-Gruppe das Wasserstoffatom tatsächlich austauschen kann, hängt auch empfindlich vom pH-Wert der Lösung ab und davon, wie lange inkubiert wird. Ein Austausch, der bei der Präparation von PS I-Proben in D₂O-Puffer mit Sicherheit stattfindet, ist der Austausch von gebundenem Wasser. Das Ziel der Experimente mit Proben in D₂O-Puffer war, eine Veränderung der strukturellen Fluktuationen über eine Auswirkung auf die Fluoreszenzdynamik der roten Zustände als Sonde beobachten zu können.

5.4.1 Deuteriumeffekt beim PS I von *T. elongatus*

Die Fluoreszenz im spektralen Bereich der roten Chlorophylle wird durch Variation des Lösungsmittels, in dem die einzelnen PS I-Komplexe eingebettet sind, beeinflusst. Im Folgenden werden Ergebnisse in H₂O- und in D₂O-Puffer vorgestellt. In der Abbildung 5.7 wird die spektrale Verteilung der aufgetretenen ZPLs im interessanten Spektralbereich des PS I von *T. elongatus* gezeigt. Dafür wurden sämtliche beobachtete ZPLs in ein spektrales Raster eingeteilt und in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Verteilung wurde auf die jeweils aufgetretene Gesamtlinienanzahl relativiert. Man erkennt, dass sich bei den PS I-Komplexen in D₂O-Puffer insbesondere die Lücke im Spektralbereich

5.4 Auswirkung von schwerem Wasser im Lösungsmittel

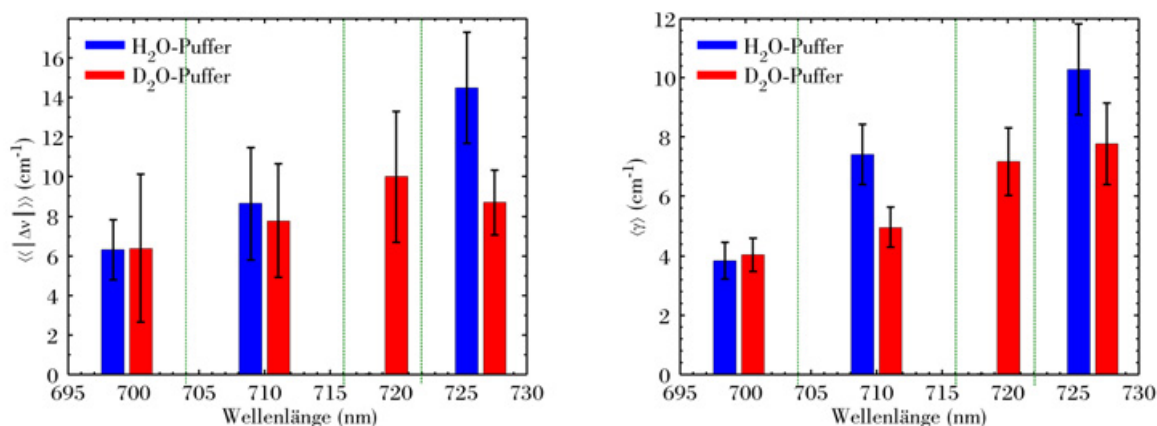


Abbildung 5.8: Statistik über das Sprungverhalten von ZPLs im spektralen Bereich der roten Chlorophylle beim PS I von *T. elongatus* in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Im **linken** Bild sind die absoluten Sprungweiten der ZPLs in den durch die gestrichelten Linien gekennzeichneten Spektralbereichen in einem Balkendiagramm aufgetragen. Dabei wurde jeweils über die mittleren Werte aller Moleküle gemittelt. Im **rechten** Bild wird eine entsprechende Darstellung der mittleren Linienbreiten in den verschiedenen Spektralbereichen gezeigt. Dafür wurde eine Lorentzkurve an jede ZPL auf den unterschiedlichen spektralen Positionen angepasst, wobei einige Spektren aufgrund ungünstigem Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Linie nicht berücksichtigt wurden (s. Abschnitt 5.2.1). Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung wieder.

$716 \text{ nm} \leq \lambda \leq 723 \text{ nm}$ füllt (vergl. Abb. 4.9) und einige Linien im stark rotverschobenen Bereich dazukommen. Dabei ist anzumerken, dass bei den PS I-Komplexen in H_2O -Puffer in der Region $716 \text{ nm} \leq \lambda \leq 723 \text{ nm}$ häufig Fluoreszenzintensität gemessen wurde, die jedoch Teil einer breiten Bande darstellt. Der Quotient aus dem Verhältnis aus Linienanzahl n_L zu Molekülanzahl n_M bei der Probe in H_2O -Puffer und dem entsprechenden Verhältnis bei der Probe in D_2O -Puffer beläuft sich auf $1,12/1,43$, d.h. bei letzterer Probe treten insgesamt deutlich mehr Linien auf.

In Abbildung 5.8 wird das Sprungverhalten der ZPLs hinsichtlich ihres unter den gegebenen Versuchsbedingungen zugänglichen Energiebereichs zusammengefasst. Um das linke Balkendiagramm zu erhalten, wurde für jede über einen Zeitraum von mindestens $t \geq 70 \text{ s}$ aufgetretene ZPL die mittlere absolute Sprungweite

$$\langle |\Delta\nu| \rangle = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^{N-1} |\nu_j - \nu_{j+1}|$$

ermittelt, wobei die ν_j für die N spektralen ZPL-Positionen der entsprechenden Messsequenz stehen. Die einzelnen Linienpositionen für jedes Spektrum wurden von einem Algorithmus ermittelt, der nach einem lokalen Maximum sucht. Die Linienform der scharfen Emissionslinien ist in der Regel sehr symmetrisch und bei der Anpassung einer Lorentzlinie weicht dessen Mitte nur in Ausnahmefällen vom gefundenen Maximum

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

ab. Als obere Grenze wird ein relativer Fehler der Methode von 10 % abgeschätzt. Alle untersuchten Linien wurden hinsichtlich ihrer mittleren Position in vier feste spektrale Regionen $\lambda^{(1)} \leq 704 \text{ nm}$, $704 \text{ nm} \leq \lambda^{(2)} \leq 716 \text{ nm}$, $716 \text{ nm} \leq \lambda^{(3)} \leq 722 \text{ nm}$ und $\lambda^{(4)} \geq 722 \text{ nm}$ eingeteilt. Der Bereich $\lambda^{(2)}$ beinhaltet ZPLs, die dem C708-Verband zugeschrieben werden, und der Bereich $\lambda^{(4)}$ ZPLs, die dem C719-Verband zugeordnet werden. Im Bereich $\lambda^{(3)}$ befinden sich nach Abbildung 4.9 bei der Probe in H_2O -Puffer keine scharfen Linien. Nach dieser Einteilung wurde jeweils über alle Linien innerhalb eines Intervalls gemittelt. Die aufgetragenen Balkenhöhen entsprechen also den über die mittleren absoluten Sprungweiten $\langle |\Delta\nu| \rangle$ in cm^{-1} der Linien innerhalb der markierten spektralen Bereiche gemittelten Werte $\langle\langle |\Delta\nu| \rangle\rangle$. Die blauen Balken gehören wie oben zu den Messergebnissen der PS I-Proben in H_2O -Puffer und die roten zu denen in D_2O -Puffer. Die Fehlerbalken beschreiben die jeweils zugehörigen Standardabweichungen

$$\sigma(\langle\langle |\Delta\nu_j| \rangle\rangle) = \sqrt{\frac{1}{n_L - 1} \sum_{j=1}^{n_L - 1} (\langle |\Delta\nu_j| \rangle - \langle\langle |\Delta\nu| \rangle\rangle)^2}$$

der entsprechenden Spektralbereiche. In der Region $\lambda^{(1)}$ betragen die mittleren absoluten Sprungweiten $\langle\langle |\Delta\nu| \rangle\rangle$ der ZPLs bei den PS I in beiden Lösungsmitteln zwischen 6 cm^{-1} und 7 cm^{-1} . Bei den ZPLs im Bereich $\lambda^{(2)}$ liegt der Wert um 8 cm^{-1} . Im Spektralbereich $\lambda^{(3)}$ wird beim PS I in D_2O -Puffer ein Wert von 10 cm^{-1} festgestellt. Oberhalb der beim PS I in H_2O -Puffer vorhandenen spektralen Lücke für scharfe Linien im Bereich $\lambda^{(4)}$ liegen die Werte für $\langle\langle |\Delta\nu| \rangle\rangle$ für die beiden Lösungsmittel mit ca. 8 cm^{-1} für D_2O -Puffer und ca. 14 cm^{-1} für H_2O -Puffer weiter auseinander. Bei Berücksichtigung der jeweils mittleren Standardabweichung beträgt der Unterschied ca. 1 cm^{-1} .

Die Sprünge, deren Sprungrate τ_{fluk}^{-1} viel höher lag als die Messrate τ_{exp}^{-1} , wurden analog zum Auswerteverfahren in Abschnitt 5.2.1 indirekt über die Linienbreite erfasst. Dazu wurden bei jeder ZPL die Spektren gegeneinander auf ein gemeinsames lokales Maximum verschoben. Dann wurden jeweils 20 Spektren aufaddiert, wobei die Schrittweite eins betrug. An jedes dieser Spektren wurde eine Lorentzkurve angepasst und jeweils die Breite FWHM notiert. Anschließend wurde für jede Linie die mittlere Breite bestimmt und in obiges spektrales Raster eingegliedert. Das Ergebnis wird in Abbildung 5.8 auf der rechten Seite präsentiert. Die Ausgleichungskurven stimmten in der Regel gut mit den Summenspektren überein. Ausnahmefälle mit schwachem Signal-zu-Rausch-Verhältnis innerhalb weniger Sequenzen wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Der Wert der mittleren Linienbreite $\langle\gamma\rangle$ für PS I in beiden Lösungsmitteln liegt im Spektralbereich $\lambda^{(1)}$ bei ca. 4 cm^{-1} . In den Regionen $\lambda^{(2)}$ und $\lambda^{(4)}$ wurden leichte Unterschiede zwischen den entsprechenden Werten in verschiedenen Lösungsmitteln festgestellt. Die Werte $\langle\gamma\rangle$ für PS I in H_2O -Puffer liegen um 7 cm^{-1} und 10 cm^{-1} und die für PS I in D_2O -Puffer um 5 cm^{-1} und 8 cm^{-1} . Bei letzteren Werten überschneiden sich die jeweiligen Standardabweichungen. Im Bereich des C708 beträgt die Abweichung bei Berücksichtigung der Standardabweichung ca. 1 cm^{-1} .

5.4 Auswirkung von schwerem Wasser im Lösungsmittel

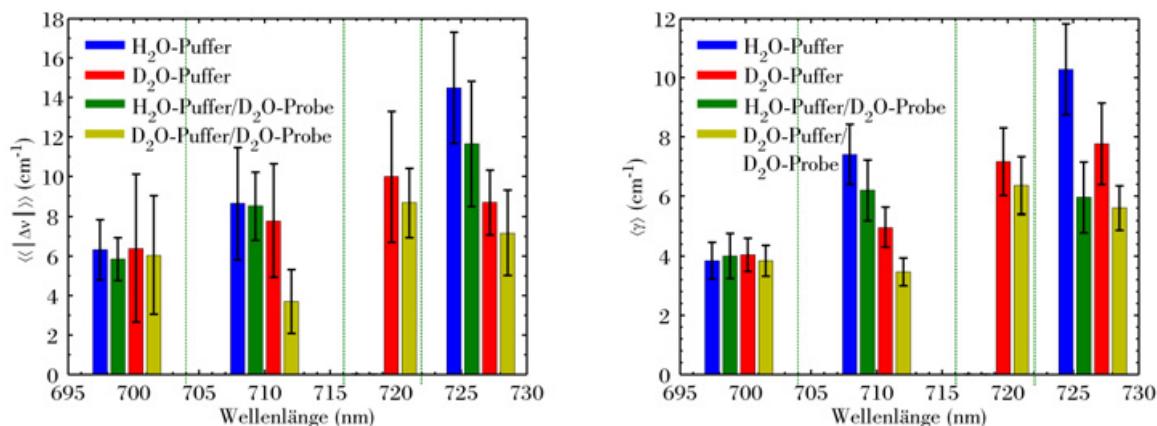


Abbildung 5.9: Statistik über das Sprungverhalten von ZPLs beim PS I von *T. elongatus*. Die Balkendiagramme sind analog zu denen aus Abb. 5.8, jedoch sind hier zusätzlich Ergebnisse einer volldeutერიerten PS I-Probe eingetragen: Die grünen Balken gehören zur volldeutერიerten Probe in H₂O-Puffer und die gelben Balken zur volldeutერიerten Probe in D₂O-Puffer.

Vom PS I des Cyanobakteriums *T. elongatus* stand auch eine volldeutერიerte Probe zur Verfügung. Bei dieser Probe befinden sich auch an Bindungsplätzen von Wasserstoffatomen, die durch die Präparation mit D₂O-Puffer nicht austauschbar sind, stattdessen Deuteriumatome. Die Dynamik in der Fluoreszenz dieser speziellen Probe wurde analog zur Auswertung oben untersucht. In Abbildung 5.9 sind die zugehörigen Ergebnisse zusammengetragen, wobei zum Vergleich nochmals die zuvor präsentierten Ergebnisse aus Abbildung 5.8 aufgeführt sind. Die mittlere absolute Sprungweite sowie die mittlere Linienbreite der ZPLs im Bereich $\lambda \leq 704$ nm beim volldeutერიerten PS I zeigen sowohl in H₂O- als auch in D₂O-Puffer nur geringe Abweichungen von der protonierten Probe. Die entsprechenden Werte liegen um ca. 6 cm^{-1} und 4 cm^{-1} . Im Spektralbereich des C708 weichen die Werte der volldeutერიerten Probe am deutlichsten von den anderen Werten ab. Sowohl $\langle\langle|\Delta\nu|\rangle\rangle$ als auch $\langle\gamma\rangle$ betragen weniger als 4 cm^{-1} . In der Region $\lambda^{(3)}$ fällt auf, dass auch die volldeutერიerte PS I-Probe in H₂O-Puffer dort keine scharfen Linien zeigt. Im Bereich des C719 sind die Werte der volldeutერიerten Probe im Vergleich zu denen der protonierten Probe kleiner. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen beträgt die Differenz zwischen den Linienbreiten für H₂O-Puffer knapp 2 cm^{-1} . Im Bereich der Verbände C708 und C719 nimmt die Sprunggeschwindigkeit der ZPLs der volldeutერიerten Probe in D₂O-Puffer im Vergleich zur protonierten Probe in H₂O-Puffer ab.

5.4.2 Deuteriumeffekt beim PS I von *Synechocystis*

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Fluoreszenzdynamik der roten Chlorophylle des PS I von *T. elongatus* auf Veränderungen hin untersucht, die durch den Austausch

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

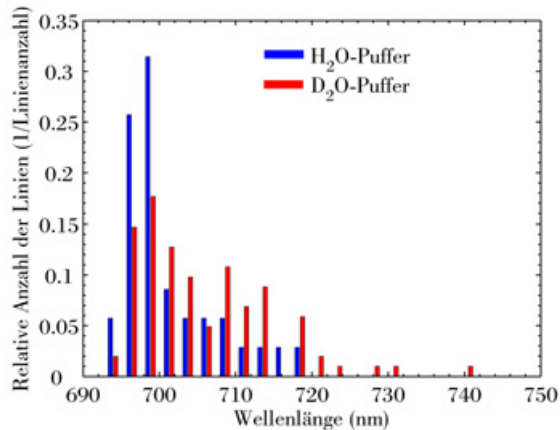


Abbildung 5.10: Statistik über die Anzahl der aufgetretenen Null-Phononen-Linien (ZPLs) im spektralen Bereich der roten Chlorophylle beim PS I von *Synechocystis* in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Die blauen Balken resultieren aus den Messungen in H₂O-Puffer und die roten gehören zu Messungen in D₂O-Puffer (s. Abschnitt 3.2.3). Die Verteilung wurde auf die Anzahl der insgesamt beobachteten Linien relativiert.

von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel entstehen. Daran anknüpfend werden nun nach dem gleichen Auswerteverfahren die Messdaten vom PS I von *Synechocystis* analysiert. Am PS I dieser mesophilen Spezies tritt der Effekt einer Verringerung der spektralen Diffusion, der im vorangegangenen Abschnitt am PS I der thermophilen Art *T. elongatus* vorgestellt wurde, in ausgeprägterer Form auf. In der Abbildung 5.10 wird die spektrale Verteilung der vorgekommenen ZPLs im spektralen Bereich der roten Chlorophylle gezeigt. Im gegenüber P700 rotverschobenen Spektralbereich $\lambda \geq 700$ nm wurden in D₂O-Puffer mehr als doppelt so häufig ZPLs beobachtet wie in H₂O-Puffer. Insbesondere treten in D₂O-Puffer in der Region $\lambda \geq 720$ nm scharfe Linien auf, wo in H₂O-Puffer nur Fluoreszenzintensität in der Form einer breiten Bande beobachtet wurde. Für den gesamten dargestellten Bereich beträgt der Quotient aus dem Verhältnis aus Linienanzahl zu Molekülanzahl bei der Probe in H₂O-Puffer und dem entsprechenden Verhältnis bei der Probe in D₂O-Puffer 0,79/1,07.

In Abbildung 5.11 wird, wie im Abschnitt 5.4.1 für das PS I von *T. elongatus* beschrieben wurde, das Sprungverhalten der ZPLs hinsichtlich ihres unter den gegebenen Versuchsbedingungen zugänglichen Energiebereichs zusammengefasst. In den vier eingeteilten spektralen Bereichen zeichnet sich eine Abnahme der entsprechenden Werte bei der Probe in D₂O-Puffer ab. Bei den ZPLs in der Region vor $\lambda \leq 703$ nm liegt die mittlere absolute Sprungweite beim PS I in H₂O-Puffer bei ca. 11 cm⁻¹. Im D₂O-Puffer ist der Wert mit ca. 5 cm⁻¹ auf weniger als die Hälfte reduziert. Im Spektralbereich bis $\lambda \leq 710,5$ nm liegen die entsprechenden Werte näher beieinander. Sie betragen ca. 8 cm⁻¹ und ca. 7 cm⁻¹. Bei den ZPLs im Bereich $\lambda \leq 718$ nm nehmen die Werte von ca. 15 cm⁻¹ auf ca. 8 cm⁻¹ ab und im Bereich $\lambda \geq 718$ nm von ca. 16 cm⁻¹ auf ca. 10 cm⁻¹. Im Vergleich zur Abbildung 5.8 stellt man beim PS I von *Synechocystis* fest, dass sich die spektrale Diffusion, insbesondere auch unter Berücksichtigung der Standardabweichungen, durch den Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel stärker verringert.

Im rechten Teil der Abbildung 5.11 wird die mittlere Linienbreite der einzelnen ZPLs präsentiert. In den beiden Bereichen vor $\lambda \leq 710,5$ nm verringert sich die Linienbreite durch die Präparation in D₂O-Puffer von ca. 5 cm⁻¹ auf ca. 3 cm⁻¹ und von ca. 7 cm⁻¹

5.5 Direkte Beobachtung von hierarchischen Rängen

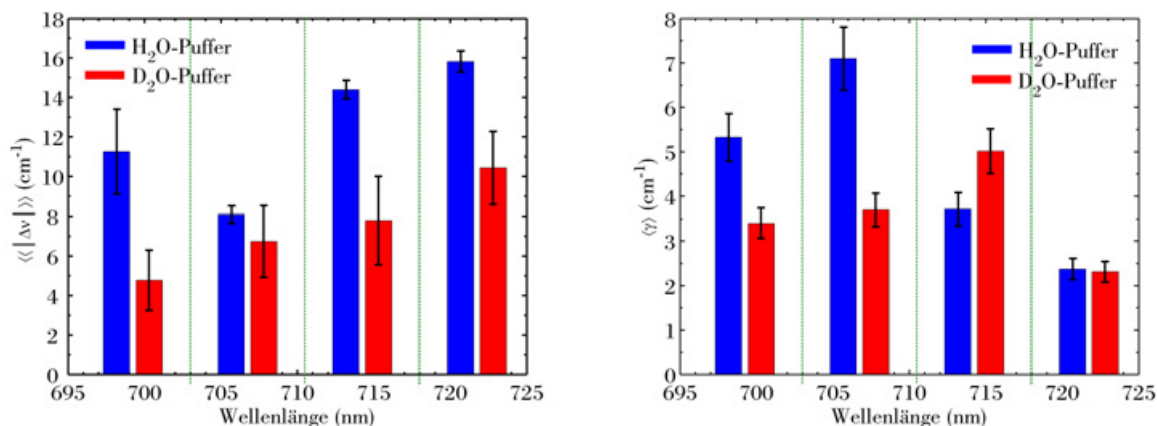


Abbildung 5.11: Statistik über das Sprungverhalten von ZPLs im spektralen Bereich der roten Chlorophylle beim PS I von *Synechocystis* in unterschiedlichen Lösungsmitteln in Analogie zur Abb. 5.8. Im **linken** Bild sind die mittleren absoluten Sprungweiten der ZPLs in den durch die gestrichelten Linien gekennzeichneten Spektralbereichen in einem Balkendiagramm aufgetragen. Im **rechten** Bild wird ein entsprechendes Diagramm der mittleren Linienbreiten in den verschiedenen Spektralbereichen gezeigt. Aufgetragen sind mittlere Lorentzbreiten (FWHM). Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung wieder.

auf ca. 4 cm^{-1} . Bei den ZPLs im spektralen Intervall $710,5 \leq \lambda \leq 718 \text{ nm}$ wurde ein umgekehrtes Verhalten ermittelt. Der zugehörige Wert erhöht sich durch die Präparation in D₂O-Puffer von ca. 4 cm^{-1} auf ca. 5 cm^{-1} . In der Region $\lambda \geq 718 \text{ nm}$ wurden im Verhältnis die kleinsten mittleren Linienbreiten gefunden, wobei sich die Werte im Bereich von knapp über 2 cm^{-1} für beide Lösungsmittel im Rahmen der Standardabweichungen decken.

5.5 Direkte Beobachtung von hierarchischen Rängen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass sich insbesondere beim PS I der Spezies *Synechocystis* eine Präparation in D₂O-Puffer stark auf die spektrale Dynamik in der Fluoreszenz der roten Chlorophyll-Verbände auswirkt. Daher bietet sich an, die Untersuchungen aus Abschnitt 5.2.2 zu wiederholen, um zu prüfen, ob die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs bei der modifizierten Proteinumgebung voneinander separierte Bereiche erkennen lässt. Dazu wird in Abbildung 5.12 die Fluoreszenz eines stark rotverschobenen Zustands präsentiert. Beim PS I in H₂O-Puffer wurden in diesem Energiebereich keine scharfen Linien gefunden, wie im Abschnitt 5.4.2 gezeigt wurde. Beim PS I in D₂O-Puffer stellen ZPLs in dieser Region keine Ausnahme dar. Zudem ist bei diesen Proben das Auftreten von zwei oder drei parallelen Linien im Abstand weniger Nanometer besonders auffällig. Dieses Phänomen wird im gesamten roten Spektralbereich häufig beobachtet. Im rechten Teil der Abbildung sind

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

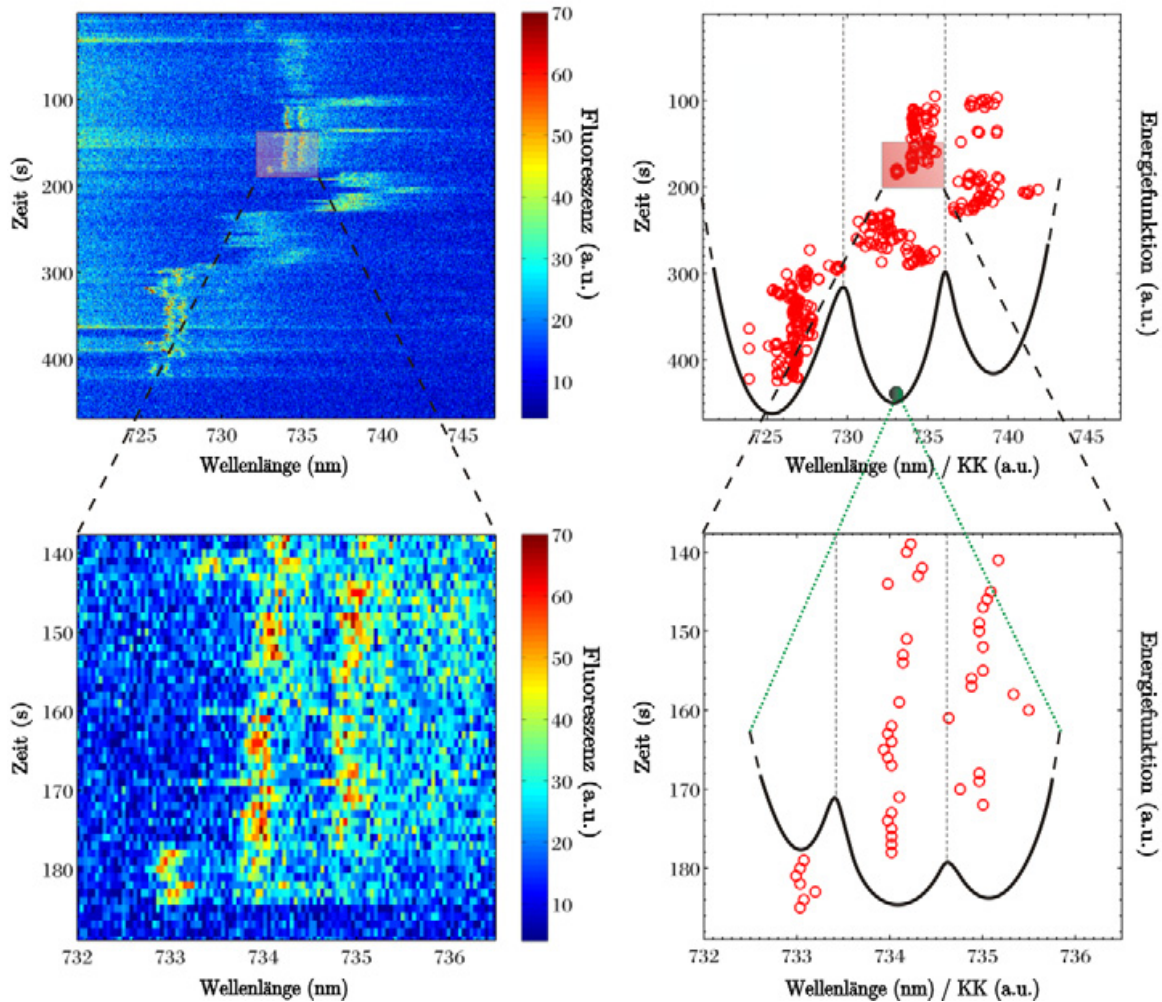


Abbildung 5.12: Darstellung der Fluoreszenz eines roten Pigments, in der sich die Konformationsänderungen (CCs) seiner Proteinumgebung widerspiegeln. Die Emissionen stammen von einem individuellen PS I-Trimer der Spezies *Synechocystis* in D₂O-Puffer. **Links oben** wird ein Ausschnitt der zugehörigen Abfolge von Spektren gezeigt. Die Akkumulationszeit betrug 1 s. **Links unten** wird der oben markierte Bereich vergrößert dargestellt. **Rechts** sind die ausgelesenen lokalen Maximumpositionen der ZPLs aufgetragen. Dem überlagert sind fiktive Energiefunktionen eingezeichnet. Die Barrierenhöhe richtet sich nach der Häufigkeit, mit der sie unter den Versuchsbedingungen überwunden wird, d.h. die Sprungweite sagt zunächst nichts über die Barrierenhöhe aus. Dennoch erkennt man in den Spektren direkt eine Hierarchie in der Größe der CCs, d.h. die selteneren CCs sind auch mit größeren Energieänderungen im Spektrum verbunden. Im oberen Teil ist der höchste Rang zu sehen, der beobachtet werden kann; darunter der zweithöchste. Bei der Bestimmung eines dritten und evtl. vierten Ranges stößt man an die Grenze der Auflösung des Spektrometers, so dass der in diesem Regime große relative Fehler die Feststellung diskreter CCs verhindert.

5.5 Direkte Beobachtung von hierarchischen Rängen

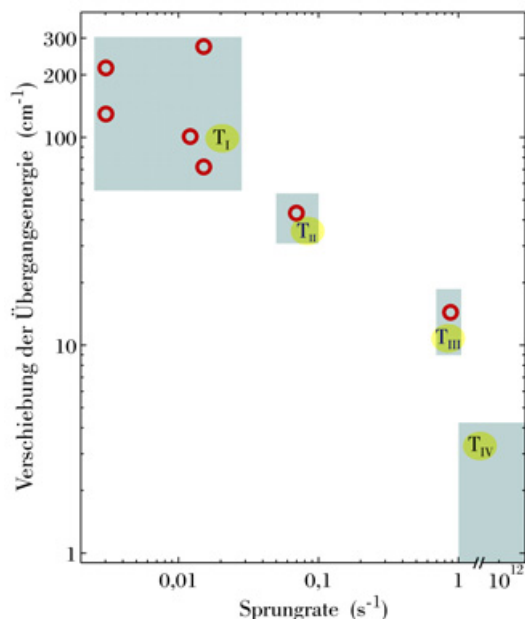


Abbildung 5.13: Auftragung der Sprungweite über der Fluktuationsrate für die ZPL aus Abb. 5.12. Die Darstellung wurde analog zum Verfahren in Abschnitt 5.2.1 erstellt. Im Vergleich zur Abb. 5.5 zeichnen sich bei einer in D₂O-Puffer präparierten PS I-Probe von *Synechocystis* hierarchische Ränge ab.

die ausgelesenen spektralen Positionen der lokalen Maxima der ZPL aufgetragen. Dabei wurde das im Abschnitt 5.2.2 beschriebene Verfahren angewendet. Man erkennt deutlich drei voneinander abgetrennte Aufenthaltsbereiche, deren mittlerer Abstand zwischen 5 – 6 nm beträgt. Aus dem unteren Teil der Abbildung wird klar ersichtlich, dass innerhalb des mittleren Bereichs wieder drei voneinander separierte Aufenthaltsbereiche der ZPL zu finden sind. Der mittlere Abstand beträgt jeweils ca. knapp 1 nm. Das System aus drei parallelen Linien wird in ähnlicher Form auf der höherenergetischen Position, in der Spektrensequenz nach ca. 290 s, beobachtet. Im niederenergetischen Bereich, in der Spektrensequenz nach ca. 190 s, wird eine schnellere Fluktuation festgestellt, die zur spektralen Vermischung der Linien führt, so dass die Linien teilweise nicht eindeutig voneinander separiert werden können. Schnellere Fluktuationen ereigneten sich in stärkerer Form auch im mittleren Spektralbereich nach ca. 240 s. Währenddessen sind keine klaren Linienpositionen mehr erkennbar. Anscheinend unterliegt das sensible Gesamtsystem noch einem weiteren überlagerten Prozess, der sich jedoch nur zeitweilig auswirkt und in der folgenden Betrachtung nicht berücksichtigt wird.

In die Darstellung ist eine fiktive Energiefunktion eingezeichnet, die qualitativ die Änderung der optischen Übergangsenergie des roten Emitters unter den gegebenen Versuchsbedingungen beschreibt. Die Barrierenhöhe richtet sich nach der Häufigkeit, mit der sie unter den Versuchsbedingungen überwunden wird, d.h. die Sprungweite sagt zunächst nichts über die Barrierenhöhe aus. Dennoch erkennt man in den Spektren direkt eine Hierarchie in der Größe der Konformationsänderungen, d.h. die selteneren Konformationsänderungen sind auch mit größeren Energieänderungen im Spektrum verbunden. Offenbar bewirkt die Präparation in D₂O-Puffer, dass sich in der Korrelation zwischen

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

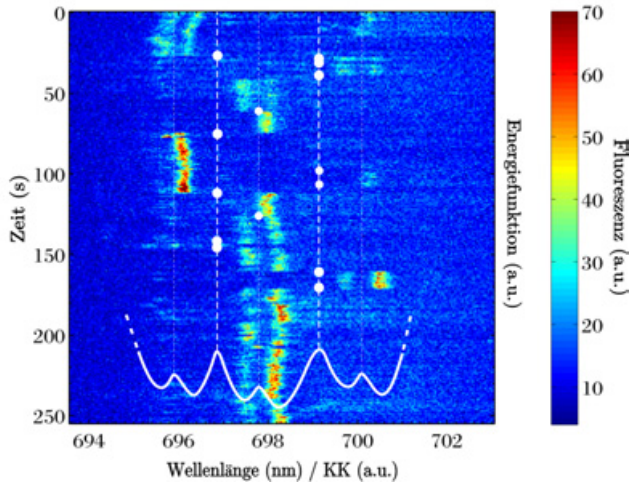


Abbildung 5.14: Ausschnitt aus den Fluoreszenzemissionen eines individuellen PS I-Trimers der Spezies *Synechocystis* in D₂O-Puffer. Die zeitliche Auflösung beträgt 1 s. Überlagert eingezeichnet ist eine fiktive Energiefunktion, die zwei hierarchische Ränge enthält. Man erkennt eine Bistabilität innerhalb einer Tristabilität. Letztere ist mit größeren Energieänderungen im Spektrum verbunden. Auf den gestrichelten Linien sind klar erkennbare Übergänge zwischen verschiedenen Linienpositionen markiert.

der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs voneinander separierte Bereiche abzeichnen. Diese Veränderung des Fluktuationsverhaltens wird auch nochmal in Abbildung 5.13 gezeigt. Hier ist die Sprungweite über der Fluktuationsrate für die ZPL aus Abbildung 5.12 aufgetragen. Insgesamt ergibt sich ein Bild, dass dem aus Abschnitt 5.2.1 vom PS I von *T. elongatus* in H₂O-Puffer ähnelt. Die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite konnte in vier hierarchische Ränge $T_I - T_{IV}$ gegliedert werden. Dem obersten Rang T_I sind Sprünge einer Energieänderung von ca. $70 \text{ cm}^{-1} \leq \Delta\nu \leq 280 \text{ cm}^{-1}$ zugeordnet. Die zugehörige Rate liegt zwischen ca. $3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Zum zweiten und dritten Rang trägt jeweils nur ein Datenpunkt bei. Sie entsprechen einer Energie von ca. 40 cm^{-1} und 14 cm^{-1} mit den zugehörigen Raten von ca. $7 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ und $0,9 \text{ s}^{-1}$. Der unterste Rang wird durch die mittlere Linienbreite von $\gamma \simeq 4,2 \text{ cm}^{-1}$ analog zur Vorgehensweise in Abschnitt 5.2.1 abgeschätzt.

In Abbildung 5.14 wird die Fluoreszenz eines Zustands aus einem anderen spektralen Bereich gezeigt. Die mittlere Position liegt bei knapp 698 nm, also nahe der Absorption von P700. Man erkennt ein System aus zwei parallelen ZPLs im Abstand von ca. 0,5 nm, das zwischen drei spektralen Positionen fluktuiert, die jeweils ca. 2 nm voneinander entfernt liegen. Während die ZPLs innerhalb des Systems auf den beiden Positionen teilweise antikorrelieren und teilweise korrelieren, zeigt sich zwischen den Intensitäten auf den drei Positionen des Systems ausschließlich eine Antikorrelation. Die Abweichung innerhalb des Systems wird auf die Zeitauflösung des Messprozesses zurückgeführt, d.h. die Fluktuationen innerhalb des Systems haben eine höhere Rate als 1 s^{-1} , während die Rate der größeren Sprünge von ca. 2 nm bei Werten $\ll 1 \text{ s}^{-1}$ liegt. In die Darstellung ist eine fiktive Energiefunktion eingezeichnet, die zwei hierarchische Ränge enthält. Der obere Rang entspricht einer Tristabilität, die der Pigment-Verband durch spektrale Sprünge mit einer Weite von ca. 40 cm^{-1} widerspiegelt. Der untere Rang beinhaltet eine Bistabilität, die im spektralen Verlauf schnelle Fluktuationen einer spektralen Verschiebung von ca. 10 cm^{-1} bewirkt. Innerhalb beider Ränge wurden die Zustände mit unterschied-

5.6 Entstehung der breiten roten Fluoreszenzbande

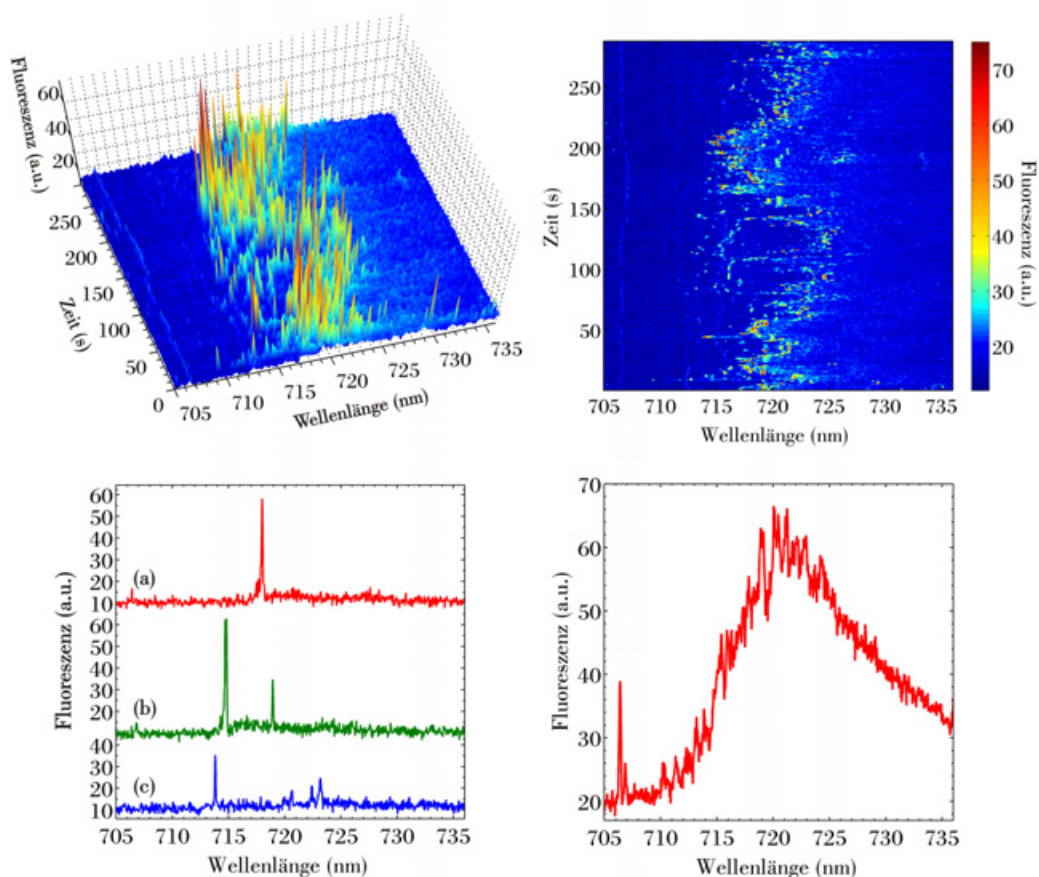


Abbildung 5.15: Die Formung der breiten roten Fluoreszenzbande. Die Emissionen stammen von einem individuellen PS I-Trimer von *Synechocystis* in D₂O-Puffer. Die Akkumulationszeit betrug 1 s. **Links oben** wird die Spektrensequenz ausschnittsweise in einer 3D-Darstellung gezeigt. **Rechts oben** ist die zugehörige 2D-Kontur dargestellt und **rechts unten** ihre zeitliche Projektion. **Links unten** sind drei selektierte Spektren über 1 s aus der Sequenz aufgetragen. Die Positionen sind (a) 23 s, (b) 203 s und (c) 98 s.

lichen Wahrscheinlichkeiten besetzt. Im oberen Rang war der Zustand begünstigt, der im Spektrum einen Aufenthalt der ZPL im mittleren Bereich bewirkt hat. Innerhalb der Bistabilität wurde der Zustand bevorzugt, der die niederenergetischere Linienposition zur Folge hatte.

5.6 Entstehung der breiten roten Fluoreszenzbande

Im Abschnitt 5.4.2 wurde berichtet, dass die spektrale Dynamik in der Fluoreszenz durch den Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel beim PS I von *Synechocystis* markant herabgesetzt wurde. Bei einigen individuellen Komplexen (ca. 10 %)

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

wurden durch diesen Effekt in der breiten Fluoreszenzbande im stark rotverschobenen Spektralbereich scharfe ZPLs beobachtet. Dabei zeigten die ZPLs in der Regel selbst eine starke spektrale Diffusion innerhalb der jeweiligen Region der Bande. In einem Fall von insgesamt 62 untersuchten PS I-Komplexen konzentriert sich die Intensität fast vollständig in einer oder mehreren ZPLs, so dass in einem Spektrum mit einer Akkumulationszeit von 1 s keine breite Bande erkennbar ist. Die Emissionen dieses Trimers sind in Abbildung 5.15 dargestellt. Man erkennt deutlich eine „S“-förmige Diffusionsbewegung der Hauptintensität über den Zeitraum von über 280 s, die eine spektrale Ausdehnung von über 13 nm bzw. 250 cm^{-1} im Bereich von ca. 714 – 727 nm besitzt. Aus diesem Grundmuster finden viele spektrale Ausreißer der ZPLs statt, die den gesamten überstrichenen Spektralbereich erfassen. Links unten sind drei Beispielspektren dargestellt, die aus der Sequenz darüber entnommenen wurden. Die Gesamtintensität bleibt im Wesentlichen unverändert, wobei die Anzahl der spektralen Aufenthaltsorte der Linien variiert. Das Spektrum (c) zeigt mindestens vier ZPLs. Im Spektrum (a) hingegen wird nur eine ZPL, bzw. im Spektrum (b) werden zwei ZPLs beobachtet. Die Addition über alle 287 Spektren ergibt das mittlere Spektrum im Bild rechts unten. Man erkennt eine breite rote Bande mit einem spektralen Schwerpunkt bei ca. $\lambda_M = (721 \pm 1) \text{ nm}$ wie bei dem Spektrum (b) aus Abbildung 4.2, d.h. um ca. 6 nm rotverschoben gegenüber der über alle Komplexe gemittelten Lage. Die spektrale Form der Bande entspricht der typischen Struktur der breiten roten Bande, die insbesondere an den PS I-Komplexen von *Synechocystis* in H_2O -Puffer häufig beobachtet wurde (vergl. Abb. 4.2).

5.7 Diskussion

Experimente mit der Methode des spektralen Lochbrennens in Kombination mit einer Hochdruckzelle haben am LH2 von *Rhodospseudomonas acidophila* ergeben, dass relative Abstandsänderungen $\Delta R/R$ von ca. 0,01 % bis ca. 1 % zu spektralen Verschiebungen der B800-Absorption von $1 - 100 \text{ cm}^{-1}$ führen [Zaz02a]. Durch diesen experimentellen Befund gestützt, interpretieren wir die spektrale Diffusion in der Fluoreszenz der roten Chlorophyll-Verbände einzelner PS I-Komplexe als Folge von Modulationen der Pigment-Protein-Wechselwirkungen in der Umgebung der einzelnen roten Pigment-Verbände. Dabei spielt die wechselnde Anordnung von Wasserstoffbrückenbindungen, eine entscheidende Rolle [Fow92, Ols94]. Am LH2-Komplex wurde mit der Methode der Einzelmolekül-Spektroskopie in Fluoreszenzanregung eine ähnliche spektrale Dynamik auf längerer Zeitskala festgestellt [Hof03]. Die Zeit für ein gerastertes Spektrum betrug 15 s. Hofmann *et al.* haben zur Erklärung den im Abschnitt 1.2.3 erläuterten Ansatz des Modells der Energielandschaft aus [Fra91] angewendet. In Abbildung 1.8 wurde eine solche Energielandschaft vereinfacht dargestellt, wobei eine willkürliche Konformationskoordinate gewählt wurde. Beim PS I von *Synechocystis* in D_2O -Puffer konnte teilweise direkt in den Spektrensequenzen beobachtet werden, dass sich die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs in voneinander separierte Bereiche aufteilen lässt.

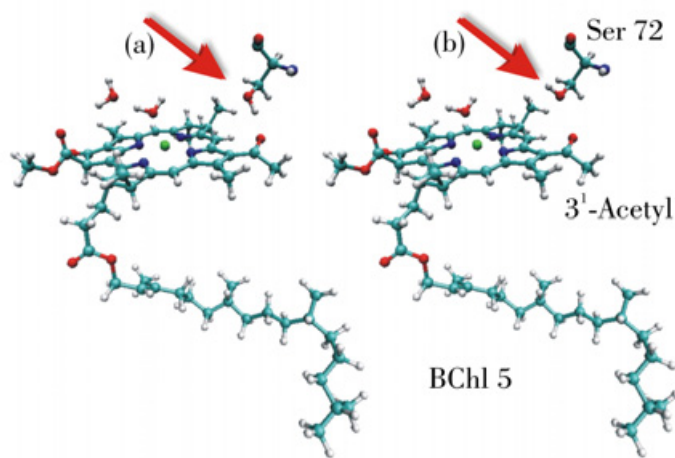


Abbildung 5.16: Teil der Proteinbindeungstasche von dem Bakteriochlorophyll (BChl 5) im Fenna-Matthews-Olson-Protein (FMO) [Fen75]. Im Fall (a) bildet das Ser 72 eine Wasserstoffbrücke zum 3¹-Acetyl. Im Fall (b) ist das markierte Proton „umgeklappt“ und die Bindung aufgebrochen. Die Darstellung stammt von Thomas Renger.

In den Abbildungen 5.12 und 5.14 ist jeweils ein Beispiel dargestellt. Man erkennt deutlich, dass ein System, innerhalb dem eine ZPL zwischen zwei oder drei Linienpositionen wechselt, im Ganzen auf verschiedene spektrale Positionen springt. Zwischen den Raten der beiden unterschiedlichen Prozesse liegen Größenordnungen. Dieses Ergebnis passt sehr schön zum Bild einer in hierarchischen Rängen organisierten Energielandschaft, in der die mittlere Barrierenhöhe von oben nach unten abnimmt, wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben wurde.

Energielandschaft der roten Pigmente im PS I von *T. elongatus*

Zunächst werden die Ergebnisse vom PS I der Spezies *T. elongatus* diskutiert. Die Abbildungen 5.2 und 5.3 zeigen die Relationen zwischen den erschlossenen Energiebereichen der Null-Null-Übergänge und den zugehörigen Zeitskalen für einen roten Zustand in der Region > 719 nm und einen in der um 708 nm von zwei individuellen PS I-Komplexen. Wir vermuten, dass das Sprungverhalten der ZPLs die „Abtastung“ eines Ausschnitts der Energielandschaft der Proteinumgebung widerspiegelt. Der beobachtbare Ausschnitt wird unter anderem durch die gegebenen Versuchsbedingungen begrenzt. In den aufgetragenen Datenpunkten beider roter Zustände zeichnet sich eine Hierarchie von Rängen ab, in der die durchschnittliche Höhe der Energiebarrieren von oben nach unten abnimmt. Beim Emitter im Bereich > 719 nm fallen in den obersten und zweitobersten Rang Sprünge zwischen wenigen diskreten spektralen Positionen, wie in Abbildung 5.1 zu sehen ist. Wir vermuten, dass ihm spezielle Konstellationen der Proteinatome zugrunde liegen. In diesem Fall bildet die Proteinumgebung eine Bi- bzw. Tristabilität aus. Übergänge zwischen diesen Niveaus bewirken im Fluoreszenzspektrum energetische Verschiebungen von bis zu mehr als 115 cm^{-1} im obersten bzw. von ca. $16 - 50 \text{ cm}^{-1}$ im zweitobersten Rang und treten unter den gegebenen Versuchsbedingungen mit einer Rate von ca. $6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bzw. ca. $2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ auf.

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

In Abbildung 5.16 ist ein Szenario einer Bistabilität dargestellt, das eine große Verschiebung in der lokalen optischen Übergangsenergie des Chromophors in seiner Proteinbindungstasche bewirkt. Bei dem abgebildeten Molekül handelt es sich allerdings nicht um ein Chlorophyll a (Chl a) innerhalb von PS I, sondern um das Bakteriochlorophyll BChl 5 im Fenna-Matthews-Olson-Protein (FMO) [Fen75]. An diesem System wurden kürzlich bislang unveröffentlichte Rechnungen in der Arbeitsgruppe von Thomas Renger durchgeführt. Unter alleiniger Berücksichtigung der Elektrostatik ergaben sich für das markierte Proton an der OH-Gruppe der Aminosäure Serin Ser 72 zwei stabile Minima, die durch eine Barriere voneinander getrennt sind. Aufgrund der Höhe dieser Barriere wird das eingezeichnete „Umklappen“ des Protons für sehr unwahrscheinlich gehalten. Nichtsdestotrotz wurde der Unterschied in der zugehörigen optischen Übergangsenergie für dieses Beispiel ausgerechnet. Er beträgt über 300 cm^{-1} . Das Dimer A38-A39, das gemäß unserer Vermutung in Ref. [Bre07] in der Region $> 719 \text{ nm}$ emittiert, befindet sich innerhalb des PS I in einer ganz ähnlichen Situation. Über den Sauerstoff an der Ketogruppe des Chl a A38 besteht eine Wasserstoffbrücke zur OH-Gruppe des Ser 426. Eine Möglichkeit wäre, dass sich die Bindungslänge zwischen Proton und Wasserstoffbrückendonator ändert, d.h. dass das Proton auf der Verbindungslinie zwischen den beiden Sauerstoffatomen seine Position verändert. Auch bei diesem Mechanismus sind Veränderungen der optischen Übergangsenergie in der Größenordnung von 100 cm^{-1} denkbar. Gegenwärtig existieren jedoch keine konkreten Zahlen, so dass eine Zuordnung des roten Zustands aus Abbildung 5.1, der ein auffällig diskretes Sprungverhalten mit hoher Energiedifferenz zeigt, zu einem der Kandidaten aus Ref. [Jor01], wie z.B. dem Dimer A38-A39, nicht möglich ist.

Die Überwindung von Barrieren des untersten Rangs bewirkt im Pigment Veränderungen der optischen Übergangsenergie von bis zu ca. 6 cm^{-1} . In diesem Regime finden sowohl schnelle spektrale Sprünge innerhalb $t \leq 1 \text{ s}$ als auch langsame mit einer Rate nahe der reziproken Akkumulationszeit von 1 s^{-1} statt. Die durch schnelle Konformationsänderungen ausgelösten spektralen Verschiebungen wurden indirekt anhand der Linienbreite der ZPLs nach oben abgeschätzt. Die zugehörige Rate wurde mittels der Energie-Zeit-Unschärfe auf 10^{12} s^{-1} taxiert. Der Wechsel zwischen den zugehörigen Mikrozuständen der Proteinumgebung wirkt sich schwächer auf die optischen Übergangsenergie aus und spiegelt somit nicht Fluktuationen in der Stärke einer Wasserstoffbrückenbindung wieder, wie z.B. der aus Abbildung 5.16 oder der zwischen der Aminosäure Threonin β -Thr-23 und der C_2 -Acetyl-Gruppe im BChl a [Ger93]. Von elektrostatischen Wechselwirkungen mit Wassermolekülen oder anderen polaren Gruppen in einiger Entfernung von der Chl a-Bindungstasche kann angenommen werden, dass sie die spektralen Eigenschaften des Pigments aufgrund ihrer starken Abstandsabhängigkeit sehr schwach beeinflussen. Folglich sind entweder nicht unmittelbar angrenzende oder lokale andersartige strukturelle Veränderungen für diese spektralen Fluktuationen des roten Zustands verantwortlich.

Auch die Energielandschaft der Proteinumgebung der roten Zustände in der spektralen Region um 708 nm lässt eine Hierarchie von Rängen erkennen. Im Vergleich zu den stark rotverschobenen Zuständen ist die spektrale Weite der Fluktuationen geringer und die Ra-

te höher, so dass die Ränge dichter beieinander liegen. Die größte Sprungweite im obersten Rang beträgt nur etwa 50 cm^{-1} , und die Rate reicht bis über $2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Aufgrund der kleineren Abstufungen und der höheren Raten sind in den zeitlichen Verläufen der ZPLs keine diskreten spektralen Positionen zu erkennen. Die Energielandschaften in den beiden Spektralbereichen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Barrierenhöhen und haben verschieden großen Einfluss auf die optischen Übergangsenergie des jeweiligen Emitters.

Eine statistische Auswertung des spektralen Sprungverhaltens der ZPLs zeigt, dass sowohl langsame Fluktuationen, deren Rate τ_{fluk}^{-1} kleiner als die Messrate τ_{exp}^{-1} von ca. 1 s^{-1} ist, als auch die schnellen Fluktuationen mit $\tau_{\text{fluk}}^{-1} > \tau_{\text{exp}}^{-1}$ der Emissionen im Bereich $\lambda > 719 \text{ nm}$ größer sind als in der Region um 708 nm . Dieses über alle Komplexe gemittelte Ergebnis spricht dafür, dass die Proteinumgebung eines Zustands, der im Bereich $\lambda > 719 \text{ nm}$ emittiert, im Mittel größere Verschiebungen der optischen Übergangsenergie bewirkt als die eines Zustands, der im Bereich um 708 nm emittiert. Das kann entweder bedeuten, dass die Pigment-Protein-Kopplung ersterer roter Zustände stärker ist, oder dass die Schwingungsfreiheitsgrade in der Umgebung eines Emitters aus dem C708-Verband stärker eingeschränkt sind.

Die gleiche Auswertung an einer in D_2O -Puffer präparierten Probe hat ergeben, dass der Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel im Mittel eine Verkleinerung der Fluktuationen bewirkt. Bei den ZPLs im Spektralbereich um 708 nm ist der Effekt bei den Fluktuationen mit $\tau_{\text{fluk}}^{-1} < \tau_{\text{exp}}^{-1}$ jedoch vernachlässigbar gering im Rahmen der Standardabweichungen. In der Region $716 \text{ nm} < \lambda < 722 \text{ nm}$, in der in H_2O -Puffer nur unstrukturierte Fluoreszenz beobachtet wurde, bewirkte der Austausch das Auftreten von ZPLs. Insgesamt wird angenommen, dass nur in manchen Komplexen ein effektbringender Austausch von austauschbarem Wasser gegen schweres Wasser stattgefunden hat. Dabei könnten auch zufällig nur ein oder mehrere Spektralbereiche betroffen sein. Bei einer volldeuterierten PS I-Probe in D_2O -Puffer wird ein gesteigerter Effekt der Verkleinerung der Fluktuationen festgestellt. Der Deuteriumeffekt ist auf die größere Masse eines Deuterons im Vergleich zu der eines Protons zurückzuführen. Die Veränderung der dadurch bedingten strukturellen Fluktuationen spiegelt sich in der Veränderung der Fluktuationen der optischen Übergangsenergien der roten Zustände wider. Offenbar spielen Positionsänderungen von Protonen für die beobachteten Fluktuationen eine wichtige Rolle.

Im Kapitel 4 wurde festgestellt, dass pro PS I-Monomer drei rote Zustände emittieren und dass bei verschiedenen individuellen Komplexen im Bereich beider prognostizierter Verbände C708 und C719 zwei Emissionsbeiträge auftreten können. Während im spektralen Bereich um 708 nm häufig scharfe ZPLs beobachtet wurden, zeigten sich in der Region des C719 nur ca. bei einem Viertel der Komplexe scharfe ZPLs, stattdessen jedoch häufig eine breite Bande. Bei einigen Komplexen überlagerten sich beide spektralen Formen der Emissionen. Dies trat bei unterschiedlichen Komplexen sowohl im Bereich um 708 nm als auch im stark rotverschobenen Bereich auf. Die gewonnenen Informationen über die Energielandschaft des im Bereich $> 719 \text{ nm}$ fluoreszierenden Emitters beziehen sich

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

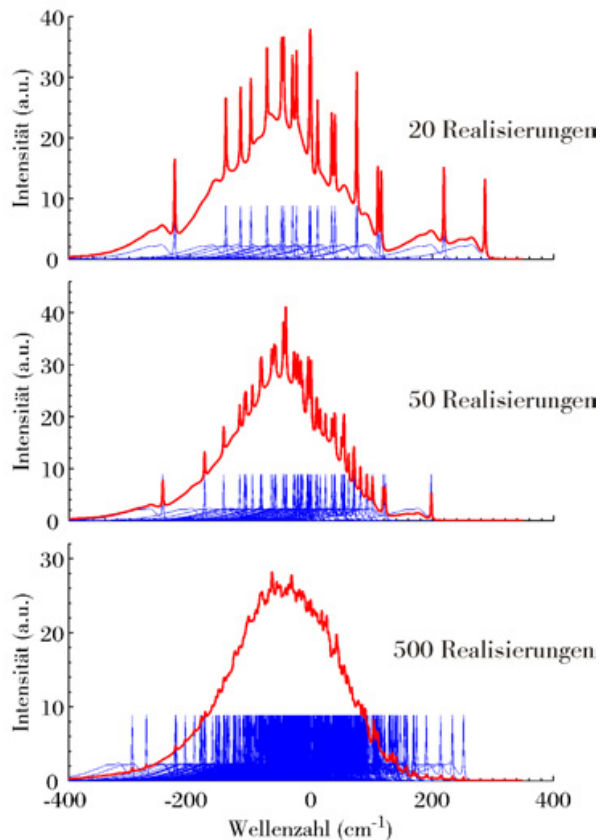


Abbildung 5.17: Simulation zur Entstehung einer breiten Fluoreszenzbande. Die Linienform der blau eingezeichneten Einzelspektren wurde gemäß der Theorie aus Abschnitt 2.2.4 ausgerechnet. Dafür wurde ein Huang-Rhys-Faktor von $S = 2$ und eine mittlere Schwingungsfrequenz von $\omega_m = 20 \text{ cm}^{-1}$ mit zugehöriger Phononbreite von $\Gamma = 20 \text{ cm}^{-1}$ angenommen. Dieser Huang-Rhys-Faktor entspricht dem in der Literatur für den C714 im PS I von *Synechocystis* vorgeschlagenen Wert [Zaz02b]. Die Realisierungen der Einzelspektren sind spektral jeweils zufällig normalverteilt. Die rot eingezeichneten Summenspektren wurden jeweils antiproportional zur Anzahl der Linienpositionen normalisiert. (Im Spektralbereich der roten Pigmente entsprechen 200 cm^{-1} ca. 10 nm .)

nur auf rote Zustände, von denen scharfe Linien detektiert wurden. Die Energielandschaft eines roten Zustandes, der eine breite Bande emittiert, bleibt unzugänglich. Um die Entstehung der breiten Bande zu verstehen, wird an dieser Stelle ein Ergebnis vom PS I von *Synechocystis* verwendet. Beim PS I dieser Spezies ist der Deuteriumeffekt ausgeprägter als beim PS I von *T. elongatus*, d.h. die spektrale Diffusionsgeschwindigkeit der Fluoreszenz wird stärker reduziert. In einem exemplarischen Fall von 62 Komplexen konnte die Bildung einer typischen breiten Bande schrittweise auf der Sekundenzeitskala verfolgt werden. Der Prozess wird in Abbildung 5.15 gezeigt. Vermutlich setzt sich ein Großteil der Fluoreszenz aus einer ZPL mit mehreren diskreten Realisierungen zusammen, deren Emissionen sich innerhalb der Akkumulationszeit von 1 s überlagern, wie im Abschnitt 4.3.2 erläutert wurde. Dafür sprechen die drei aus der Sequenz entnommenen Beispielspektren in der Teilabbildung unten links. Die Gesamtintensität bleibt im Wesentlichen unverändert, wobei die Anzahl der ZPLs variiert. Das Spektrum (c) zeigt mindestens vier Aufenthaltsorte. Im Spektrum (a) hingegen wird nur eine ZPL, bzw. im Spektrum (b) werden zwei ZPLs beobachtet. Eine Zusammensetzung aus jeweils z.B. vier ZPLs ist unwahrscheinlich, wobei die Beiträge von 2 – 3 ZPLs nicht ausgeschlossen werden können. Dies gilt insbesondere, da es sich bei der Probe um PS I in trimerer Form handelt. Aus Kapitel 4 ging jedoch hervor, dass der tiefste Zustand in einem Monomer auch wenig rotverschoben emittieren oder sich in einem Dunkelzustand befinden kann, so dass eben-

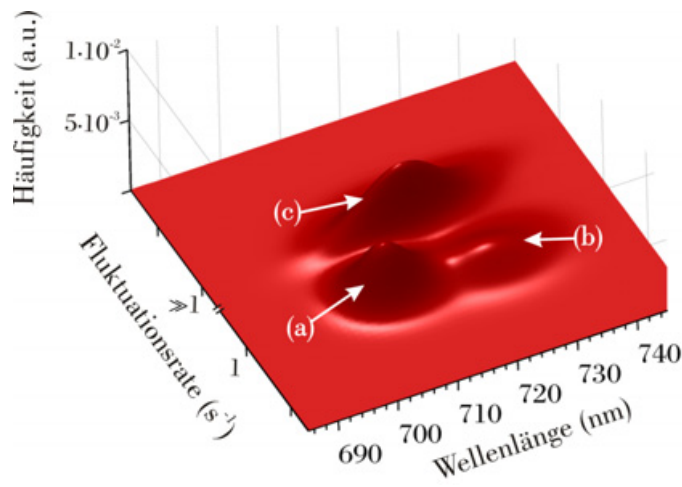


Abbildung 5.18: 3D-Schema für einen möglichen Zusammenhang zwischen den spektralen Regionen der roten Zustände und den zugehörigen Fluktuationsgeschwindigkeiten der Fluoreszenz im PS I von *T. elongatus*. Die Verteilung bei (a) spiegelt das typische Verhalten im Bereich um 708 nm wieder. Der Großteil der Fluktuationen findet dort im Sekunden-Regime statt. Diese Region wird jedoch auch von der Verteilung (c) erfasst, die schnelle Fluktuationen mit Raten $\gg 1 \text{ s}^{-1}$ beinhaltet. Sie reicht von ca. 700 nm bis $>735 \text{ nm}$. Die Verteilung bei (b) umfasst langsame Fluktuationen im stark rotverschobenen Spektralbereich, die dort seltener auftreten als im Bereich um 708 nm.

so die Möglichkeit besteht, dass die Bande von nur einer einzigen ZPL aufgebaut wird. Der angenommene Verbreiterungsprozess für den Fall der Beteiligung von nur einer ZPL wird in Abbildung 5.17 in drei Beispielen simuliert. Man erkennt, dass bei der Annahme eines Huang-Rhys-Faktors von $S = 2$, wie in Ref. [Zaz02b] für den C714 des PS I von *Synechocystis* angegeben wird, bereits < 500 Realisierungen ausreichen, um eine ähnliche breite Bande zu produzieren, wie sie in typischen PS I-Spektren gemessen wurde (vergl. Abb. 4.1, 4.2 und 5.15).

Die durch den Deuteriumeffekt am PS I von *Synechocystis* über die breite Emissionsbande gewonnenen Erkenntnisse werden nun im nächsten Schritt auf die Fluoreszenz des PS I von *T. elongatus* übertragen, d.h. auch hier wird erwartet, dass breite Banden durch schnell fluktuierende Emissionen mit Raten $\gg 1 \text{ s}^{-1}$ entstehen, deren Profile sich aus ZPL und PSB zusammensetzen. Dabei zeigt das Bsp. aus Abbildung 5.15, dass die PSB keinen großen Anteil an der Gesamtintensität beinhalten muss. In Abbildung 5.18 wird ein 3D-Schema gezeigt, das den angenommenen Zusammenhang zwischen den spektralen Regionen der roten Zustände des PS I von *T. elongatus* und den zugehörigen Fluktuationsgeschwindigkeiten der Fluoreszenz veranschaulicht. Aufgetragen ist die Häufigkeit oder Intensität über der Wellenlänge und der Fluktuationsrate. An der Verteilung bei (a) kann abgelesen werden, dass im Bereich um 708 nm der Großteil der Fluktuationen auf der Sekundenzeitskala stattfindet. Die Verteilung (c) überschneidet diesen Spektralbereich zusätzlich, d.h. mit geringerer Häufigkeit tritt dort Fluoreszenz mit schnellen Fluktuationen mit Raten $\gg 1 \text{ s}^{-1}$ auf. Im stark rotverschobenen Spektralbereich überwiegen schnelle Fluktuationen, wobei auch Fluktuationen mit Raten $< 1 \text{ s}^{-1}$ vorkommen, die von der Verteilung (b) wiedergespiegelt werden. Welche der drei Emitter sich in welchem Bereich aufhalten können, bleibt unklar.

Energielandschaft der roten Pigmente im PS I von *Synechocystis*

Im Vergleich zum PS I von *T. elongatus* wird in der Energielandschaft der roten Chlorophylle vom PS I von *Synechocystis* keine klar abgestufte Hierarchie von Rängen festgestellt. In Abbildung 5.5 sind die Relationen zwischen den erschlossenen Energiebereichen der Null-Null-Übergänge und den zugehörigen Zeitskalen für einen roten Zustand in der spektralen Region des C706- bzw. C708-Verbands und einen in der des C714-Verbands dargestellt. Man erkennt bei gleicher Einteilung jeweils eine fortlaufende Besetzung der Intervalle. Für die ZPL in der spektralen Region des C706- bzw. C708-Verbands ergibt sich eine Kurve, deren Werte für den Energiebereich von ca. 3 cm^{-1} bis ca. 60 cm^{-1} reichen mit einer zugehörigen Sprungrate von ca. $0,5 \text{ s}^{-1}$ bis ca. 10^{-2} s^{-1} . Bei der ZPL im spektralen Bereich des C714-Verbands wird eine leicht davon abweichende Kurve ermittelt, die von ca. 3 cm^{-1} bis ca. 55 cm^{-1} mit einer Rate von ca. $0,4 \text{ s}^{-1}$ bis ca. $4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ verläuft.

Im Mittel treten unter den gleichen Bedingungen beim PS I der Spezies *Synechocystis* im Bereich $\lambda > 695 \text{ nm}$ weniger ZPLs auf als beim PS I von *T. elongatus*. Die Verhältnisse von Linienanzahl zu Molekülanzahl betragen 0,79 und 1,12. Eine statistische Auswertung des Sprungverhaltens der ZPLs, die analog zu der beim PS I von *T. elongatus* durchgeführt wurde, zeigt, dass ZPLs im Spektralbereich des C714-Verbands mit Raten $\leq 1 \text{ s}^{-1}$ stärker fluktuieren als in der Region des C706- bzw. C708-Verbands, während sich für die Fluktuationen mit Raten $\geq 1 \text{ s}^{-1}$ das umgekehrte Verhalten ergibt. Ein Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel bewirkt, dass die Fluktuationen kleiner werden. Als Folge nimmt die Zahl der aufgetretenen ZPLs, insbesondere der im stark rotverschobenen Bereich, auf insgesamt im Mittel 1,07 Linien pro Molekül zu, wie in Abbildung 5.11 gezeigt wurde. Das wird so gedeutet, dass Fluoreszenz, die beim PS I in H_2O -Puffer als breite Bande detektiert wird, häufiger als scharfe ZPL zeitlich aufgelöst werden kann. Die mittleren absoluten Sprungweiten der ZPLs nehmen im Spektralbereich $\lambda > 700 \text{ nm}$ ab. Bei den in der Linienbreite enthaltenen Fluktuationen mit Raten $\geq 1 \text{ s}^{-1}$ zeigt sich in der Region des C706- bzw. C708-Verbands ebenfalls eine Reduktion, während im Bereich des C714-Verbands nur ein schwacher Effekt festgestellt wird, wobei die Linienbreite leicht zunimmt.

Da der Deuteriumeffekt die spektrale Diffusion von ZPLs teilweise stark verringert hat, wurde die Energielandschaft individueller PS I-Komplexe auch in D_2O -Puffer untersucht. Die Ergebnisse wurden in Abschnitt 5.5 präsentiert. Die Reduktion der Fluktuationen bewirkt, dass eine Hierarchie von Rängen beobachtet wird, die der bei den roten Chlorophyllen vom PS I von *T. elongatus* in H_2O -Puffer ähnelt. Der stark rotverschobene Zustand aus Abbildung 5.12 verschiebt dabei seine optischen Übergangsenergie bis zu $\leq 280 \text{ cm}^{-1}$. Im höchsten und im zweithöchsten Rang zeigen sich jeweils drei Konformationssubzustände. Bei dem Emitter aus Abbildung 5.14 im Bereich um 700 nm beinhaltet der höchste Rang ebenfalls drei Mikrozustände, von denen jeder in zwei Mikrozustände des zweithöchsten Rangs aufspaltet. Ein interessanter Bestandteil des Deuteriumeffekts

beim PS I von *Synechocystis* besteht in der häufigen Bildung von Bi- und Tristabilitäten. Vermutlich spielt der Austausch von Protonen durch Deuteronen an den polaren Aminosäureseitenketten in der Umgebung der roten Chlorophylle die entscheidende Rolle für die spektrale Veränderung. Einen möglichen Ansatz zur Erklärung einer Bistabilität (Tristabilität) bietet folgende Annahme: Ausgangspunkt ist ein Zwei-Niveau-System (*two level system*: TLS), wie in Abbildung 5.19 gezeigt wird. Die zugrundeliegende Situation in der Proteinbindungstasche könnte z.B. ähnlich wie bei dem in Abbildung 5.16 dargestellten (BChl 5) sein. Ein Proton geht über eine Wasserstoffbrücke eine Bindung mit einem in der Nähe koordinierten Sauerstoff ein. Ganz in der Nähe befindet sich noch ein zweiter Sauerstoff, so dass das Proton zwischen zwei möglichen Koordinationen wechseln kann. Die Barriere in der Potentialhyperfläche für den elektronischen Grundzustand Φ_G ist jedoch bei tiefer Temperatur unüberwindbar. Hingegen kann die Barriere in der Potentialhyperfläche für den elektronisch angeregten Zustand Φ_A durch Anregung höherer Schwingungsniveaus überwunden werden, wie der Pfeil (p_1) andeutet. Außer einer durch Einstrahlung Arrhenius-aktivierten Ladungsverschiebung im Protein sind auch Tunnelprozesse denkbar. Über Protonen-Tunneln in einem Enzym wird erstmals in Ref. [Cha89] berichtet. Im Fall der in Abbildung 5.19 gezeigten Potentialhyperfläche für Φ_A wird nun angenommen, dass die Tunnelwahrscheinlichkeit für das Proton hoch ist, so dass sich die ursprüngliche Konformation wieder einstellt, wie der Pfeil (p_2) andeutet. Das lokale Minimum der Gesamtenergie für Φ_A ist nicht stabil. Ein elektronischer Übergang mit der Energie β ist sehr unwahrscheinlich. In Abschnitt 1.2.3 wurden die Auswirkungen beim Austausch des Protons durch ein Deuteron beschrieben. Gemäß Gleichung 1.2 hängt die Tunnelwahrscheinlichkeit reziprok exponentiell von der Wurzel der Masse des tunnelnden Teilchens ab. Ist nun an der Stelle des Protons stattdessen ein Deuteron koordiniert, wird die Tunnelwahrscheinlichkeit für den durch den Pfeil (p_2) markierten Prozess so stark herabgesetzt, dass elektronische Übergänge der Energie β wahrscheinlich werden. Nach erneuter elektronischer Anregung kann durch Anregung höherer Schwingungszustände die Barriere im Zustand Φ_A vom Deuteron überwunden werden, so dass wieder elektronische Übergänge mit der Energie α stattfinden können. Im Spektrum wird dadurch eine Doppellinie bewirkt, wobei eine der Positionen stärker bevorzugt sein kann, wie z.B. beim roten Zustand aus Abbildung 5.14 zu sehen ist.

Die nachgewiesenen zeitabhängigen Veränderungen der optischen Übergangsenergien der roten Chlorophylle zeigt, dass bei einer Proben temperatur von 1,4 K Konformationsänderungen stattfinden können, d.h. dass ein bestimmtes Maß an Freiheitsgraden im Protein erhalten bleibt. Im Abschnitt 5.3 wurde am PS I von *Synechocystis* untersucht, was unter kryogenen Bedingungen die starke spektrale Fluoreszenzdynamik mit Fluktuationen von bis zu $\sim 280 \text{ cm}^{-1}$ hervorruft. Die beobachtete Dynamik ähnelt der aus einer Einzelmolekül-Studie am bakteriellen Lichtsammelkomplex LH2 unter physiologischen Bedingungen [Rut05]. In dieser wurden spektrale Verschiebungen des Fluoreszenzmaximums beobachtet, deren Weite und Häufigkeit linear von der Anregungsleistung abhängen. Die Autoren führen die Sprünge auf lichtinduzierte Konformationsänderungen des Proteins zurück. Da die Sprünge in den meisten Fällen reversibel waren, also keine

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

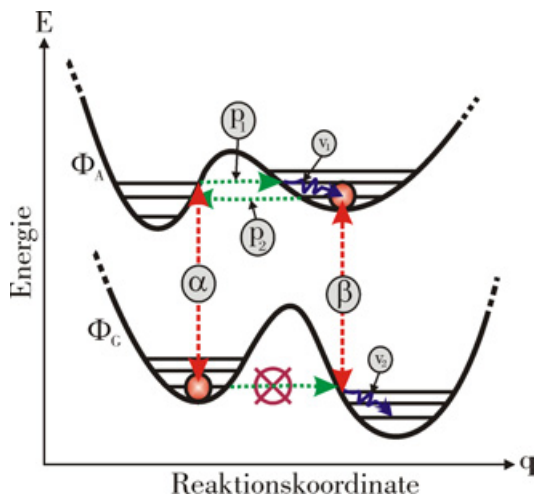


Abbildung 5.19: Energiehyperflächen entlang einer Reaktionskoordinate für zwei elektronische Zustände zur Beschreibung eines intramolekularen Protonentransfers. Für den einfachen Fall, dass in einem System aus Pigment und Proteinbindungstasche sich nur die Kernkoordinate eines Protons, das zwischen zwei Positionen wechselt, ändert, wie in Abb. 5.16 gezeigt, entsteht für die Gesamtenergie ein Zwei-Niveau-System (TLS). Die Barriere im elektronischen Grundzustand Φ_C kann bei tiefer Temperatur nicht überwunden werden. Im elektronisch angeregten Zustand Φ_A kann die Barriere vom Proton nach Anregung eines vibronischen Zustands überwunden werden (a). Die Energien der elektronischen Übergänge α und β unterscheiden sich. v_1 und v_2 kennzeichnen Schwingungsrelaxationsprozesse.

Zerstörung der Aggregate signalisiert wurde, schließen die Autoren des weiteren darauf, dass die starke Anregung konformative Zustände herbeiführt, die im Dunkeln weniger zugänglich, wenn auch dem System intrinsisch sind. In unserem Fall wird bei ca. 680 nm angeregt und das Emissionsmaximum liegt je nach Spezies im Bereich von ca. 725 nm, d.h. unter der Voraussetzung, dass nichtstrahlende Prozesse außer dem Energietransfer vernachlässigt werden können, erhält der Protein-Komplex pro eingefangenen Photon einen Wärmeeintrag von ca. $\sim 900 \text{ cm}^{-1}$. Wie oben beschrieben, wird angenommen, dass die lokale Proteinumgebung der roten Chlorophyll-Verbände für die Fluktuationen der jeweiligen optischen Übergangsenergie entscheidend ist. Demnach gibt die Größe der Stokesverschiebung der roten Zustände an, wieviel vibronische Energie ins Protein fließt. Die Stokesverschiebung des C719 aus dem PS I von *T. elongatus* wurde beispielsweise auf $\sim 200 \text{ cm}^{-1}$ bestimmt [Pål96] und die des C708 aus dem PS I von *Synechocystis* auf $\sim 120 \text{ cm}^{-1}$ [Gob94]. Diese Energien liegen um ca. zwei Größenordnungen über $k_B T$. Aus den Experimenten, in denen der Anregungslaser vorübergehend ausgeschaltet wurde, geht hervor, dass die bei tiefer Temperatur beobachteten spektralen Sprünge scheinbar durch Energieeintrag ausgelöst werden, d.h. im Spektrum deutlich sichtbare Konformationsänderungen, wie in [Rut06] bei physiologischer Temperatur, unter Tieftemperatur-Bedingungen erst durch Lichteinstrahlung wahrscheinlich werden. Durch die kontinuierliche Laseranregung wird permanent thermische Energie an das Protein abgegeben. Am einfachen Beispiel eines TLS, wie in Abbildung 5.19 dargestellt ist, können die lichtinduzierten spektralen Sprünge in den optischen Übergangsenergien aus Abbildung 5.6 erklärt werden. Zunächst wird über den elektronisch angeregten Zustand eine Konformationsänderung ermöglicht, so dass sich die Gesamtenergie des Systems ändert. Die Energie des elektronischen Übergangs (β) liegt gegenüber (α) deutlich blauverschoben. Die Anregungsquelle wird abgeschaltet. In dieser Zeit reicht die vibronische Energie des Proteins nicht aus, um damit die Konformation erneut zu ändern, so dass die elektronischen Zustände „gefangen“ bleiben. Beim Reaktivieren der Anregungsquelle wird die

Wahrscheinlichkeit für die inverse Konformationsänderung stark erhöht, so dass diese nach kurzer Zeit stattfindet. Das System nimmt in diesem Fall wieder seine Ausgangsenergie ein. Bei den in Abbildung 5.6 dargestellten Fällen genügt die Wahrscheinlichkeit jeweils, damit auf der Sekundenzeitskala eine Konformationsänderung stattfindet. Da in der Fluoreszenzdynamik der roten Chlorophylle in keinem Fall auf größere Fluktuationen als 10 cm^{-1} ($\hat{=} 0,5 \text{ nm}$) ohne Anregungsenergie geschlossen werden kann, scheinen Tunnelprozesse von Protonen in der Proteinumgebung der roten Pigmente ohne elektronische Anregung keine ausschlaggebende Rolle zu spielen. Anders als beim Elektronen-Tunneln ist der Nachweis von Protonen-Tunneln im Protein stark eingeschränkt [Scr99].

5.8 Zusammenfassung

Die bereits im Kapitel 4 festgestellte spektrale Diffusion der ZPLs wurde systematisch untersucht. Sie wird auf strukturelle Fluktuation in der Proteinbindungstasche der roten Chlorophylle zurückgeführt, die zu Veränderungen in der Stärke der lokalen Wechselwirkungen führen und somit zu Fluktuationen der optischen Übergangsenergie. Beim PS I von *T. elongatus* wurde sowohl im Bereich um 708 nm als auch in der Region oberhalb $> 719 \text{ nm}$ festgestellt, dass sich die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs in voneinander separierte Bereiche aufteilen lässt. Das Ergebnis passt zum Bild einer in hierarchischen Rängen organisierten Energielandschaft, in der die mittlere Barrierenhöhe von oben nach unten abnimmt, wie z.B. in Ref. [Fra91] beschrieben wird. Im direkten Vergleich wurden hingegen beim PS I der Spezies *Synechocystis* zunächst keine voneinander separierten Bereiche in der Korrelation zwischen Fluktuationsrate und spektraler Sprungweite der ZPLs gefunden. Bei den PS I beider Organismen nimmt die mittlere spektrale Sprungweite der ZPLs mit wachsender Rotverschiebung zu.

Der Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel hat bei den PS I beider Organismen zu einem signifikanten Deuteriumeffekt geführt. Er äußerte sich in einer Verringerung der spektralen Fluktuationen in der Fluoreszenz. Vom PS I von *T. elongatus* wurden zusätzlich volldeuterierte Proben untersucht. Dabei wurde eine Steigerung des Effekts beobachtet. Die Auswirkung des Austauschs spricht dafür, dass die Positionsänderung von Protonen einer der Hauptprozesse ist, mit denen im PS I die lokalen optischen Übergangsenergien der Pigmente feinabgestimmt werden. Ein interessanter Bestandteil des Deuteriumeffekts beim PS I von *Synechocystis* ist die häufige Erzeugung von Bi- bzw. Tristabilitäten. Diese können durch die herabgesetzte Tunnelwahrscheinlichkeit eines Deuterons im Vergleich zu der eines Protons erklärt werden. Durch einen indirekten Nachweis wurde gezeigt, dass spektrale Sprünge von ZPLs über 10 cm^{-1} bei 1,4 K erst durch die Einstrahlung von Energie wahrscheinlich werden. Daher scheinen unter kryogenen Bedingungen Tunnelprozesse von Protonen in der unmittelbaren Proteinumgebung der roten Pigmente ohne äußere Anregung sehr unwahrscheinlich. Durch den Austausch

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel ließ sich beim PS I von *Synechocystis* die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs, wie beim PS I von *T. elongatus* ohne entsprechenden Austausch, in voneinander separierte Bereiche aufteilen.

Unter Ausnutzung des Deuteriumeffekts konnte beim PS I von *Synechocystis* zeitlich aufgelöst werden, wie eine breite Fluoreszenzbande durch die Fluktuation von einer oder mehreren ZPLs schrittweise erzeugt wird. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Fluktuationen ein wichtiger Faktor für die Form und Breite von den typischerweise auf der Sekundenskala beobachteten breiten Banden sind. Mit Hilfe dieser Information konnte für das PS I von *T. elongatus* ein 3D-Schema entwickelt werden, das für die drei roten Zustände einen möglichen Zusammenhang zwischen spektralem Emissionsbereich und der Zeitskala der spektralen Fluktuationen herstellt. Danach sind im gesamten Spektralbereich der roten Zustände sowohl langsame ($< 1 \text{ s}^{-1}$) als auch schnelle Fluktuationen ($\gg 1 \text{ s}^{-1}$) mit einer von der spektralen Lage abhängigen Wahrscheinlichkeit möglich.