

Zusammenfassung

Im Antennensystem von Photosystem I (PS I) existiert eine kleine Gruppe Chlorophylle, deren optische Übergangsenergien gegenüber der erforderlichen Anregungsfrequenz des Reaktionszentrums (RC) rotverschoben liegen. Sie werden daher allgemein als „rote Chlorophylle“ bezeichnet. Sie übernehmen eine Schlüsselrolle in der PS I-Forschung. Weder ihre Funktion in der Natur, noch der Mechanismus, der zu ihrer Rotverschiebung führt, sind endgültig geklärt. Bei kryogener Temperatur stellen die roten Chlorophylle für die Anregungsenergie eine Falle dar, denn zum Energieübertrag auf das RC fehlt die vibronische Energie in der Proteinmatrix, die unter physiologischen Bedingungen genutzt wird. Die Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute ermöglicht der Einzelmolekül-Spektroskopie (SMS) den Zugang zum System. Ihr Vorteil gegenüber konventionellen Spektroskopiemethoden besteht darin, dass die Mittelung über ein Ensemble vermieden wird. Um mit SMS die roten Pigmente im PS I zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein konfokales Spektrometer aufgebaut, das die Fluoreszenz einzelner Moleküle bei 1,4 K messen kann. Als Proben für die Ergebnisse in dieser Schrift dienten cyanobakterielle PS I-Komplexe der Organismen *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*), *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Synechococcus* sp. PCC 7002. In der Literatur wurden die roten Chlorophylle der PS I von *T. elongatus* und *Synechocystis* mittels Gaußscher Zerlegung der Ensemble-Absorptionsspektren in Pigment-Verbände unterteilt. Entsprechend den spektralen Positionen der Maxima bei 708 nm und 719 nm wurden die Verbände im PS I von *T. elongatus* als C708 und C719 bezeichnet und analog im PS I von *Synechocystis* als C706/C708 und C714. Ein Ergebnis dieser Arbeit ist die Bestimmung der Anzahl der roten Emitter im PS I von *T. elongatus*. Diese konnte mit Hilfe einer spektral aufgelösten Polarisationsanalyse der Fluoreszenz von Monomeren auf drei festgelegt werden. Mindestens einer dieser roten Zustände kann je nach selektiertem Komplex im Spektralbereich des C708- oder des C719-Verbands emittieren. Bei den PS I aller drei Spezies wurden im Spektralbereich der jeweiligen roten Chlorophylle scharfe Null-Phononen-Linien (ZPLs) beobachtet. Demnach konnten erstmals ZPLs beim PS I von *Synechocystis* beobachtet werden. Dadurch wurden die Schlussfolgerungen einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, in der das Auftreten von ZPLs bestritten wurde, widerlegt. Während die ZPLs vom PS I von *T. elongatus* zwei spektral voneinander getrennte Bänder in den spektralen Regionen der Verbände C708 und C719 bilden, treten die ZPLs vom PS I von *Synechocystis* in den Bereichen der Verbände C706/C708 und C714 auf, ohne klare Separation voneinander. Beim PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002 liegt der größte Teil der aufgetretenen ZPLs in einem Band mit mittlerer Lage bei $\lambda \simeq 698$ nm.

Zusammenfassung

Der zugehörige Chlorophyll-Verband wurde daher als F698 bezeichnet. Für die ZPLs der PS I aller drei Spezies ist eine starke spektrale Diffusion charakteristisch. 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 Übergangsenergien. Beim PS I von *T. elongatus* wurde festgestellt, dass sich die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs in voneinander separierte Bereiche aufteilen lässt. Dieses Ergebnis passt zum Bild einer in hierarchischen Rängen organisierten Energielandschaft, in der die mittlere Barrierenhöhe von oben nach unten abnimmt. Im 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. 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. Das 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 von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel ließ sich interessanterweise 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. Ein Auswerteverfahren zum Ausgleich von spektraler Diffusion wurde dazu genutzt, um einen großen Teil der zeitlichen Mittelung im Fluoreszenzsignal einzelner PS I-Komplexe zu eliminieren. Dadurch konnten aus den Spektrensequenzen der PS I aller drei Spezies spektrale Profile von roten Zuständen nahe der homogenen Linienformen exzerpiert werden. Theoretisch lässt sich die Linienform eines Pigments in einem Proteinkomplex durch die Spektraldichte beschreiben. Zur Simulation der Linienform wurde ein Algorithmus verwendet, der die Pigment-Protein-Kopplung mit der Näherung, dass die Fluktuation der Übergangsenergie linear von der Auslenkung der Kerne aus ihrer Gleichgewichtslage abhängt, und mit der Annahme einer lorentzförmigen Spektraldichte iterativ berechnet. Bei den PS I aller drei oben genannten Spezies wurden selbst für stark rotverschobene Zustände überraschend kleine Huang-Rhys-Faktoren festgestellt, was bedeutet, dass die elektronischen Übergänge nur schwach an die inter- und intramolekularen vibronischen Freiheitsgrade koppeln. Dieses Ergebnis erweitert das Bild der roten Zustände auf die Weise, dass für ihre starke Rotverschiebung keine starke Elektron-Phonon-Kopplung notwendig ist. Als alternative Ursache wurde die Anhebung der exzitonischen Aufspaltung

durch einen hohen Beitrag des Dextermechanismus vorgeschlagen. Um zu untersuchen, ob verschiedene rote Zustände innerhalb eines PS I-Komplexes über Energietransfer (ET) miteinander in Verbindung stehen, wurde das Korrelationsverhalten der Fluoreszenz von unterschiedlichen roten Emitttern analysiert. Mehrfach aufgetretene Antikorrelationen bei sowohl dem PS I von *T. elongatus* als auch dem PS I von *Synechocystis* weisen darauf hin, dass die roten Zustände jeweils entweder direkt über ET miteinander verbunden sind, oder dass sie getrennt voneinander über ET mit einem Pigment-Verband aus den Antennenpigmenten verbunden sind. Auch eine Mischung aus beiden Konfigurationen ist denkbar. Beim PS I von *T. elongatus* wurde zusätzlich mittels einer Polarisationsanalyse an einzelnen Monomeren festgestellt, dass die Übergangsdipolmomente der Emitter vom C708 und C719 in einem Winkel nahe 90° zueinander stehen. Demnach würde man im Falle eines direkten ETs zwischen den beiden Verbänden erwarten, dass bei einer Anregung mit linear polarisiertem Licht mit einer Wellenlänge von ~ 712 nm die Polarisation der Fluoreszenz einen großen Anteil enthält, der nicht der Polarisation des eingestrahlten Lichts entspricht. Dieses Verhalten geht aus einer Anisotropiestudie am Ensemble hervor. Daher wird ein effizienter direkter ET zwischen Zuständen des C708- und C719-Verbands innerhalb eines Monomers für wahrscheinlich gehalten.

Zusammenfassung

Ausblick

Mit Hilfe des aufgebauten Einzelmolekül-Spektrometers wurden im Rahmen meiner Arbeit eine Reihe weiterer Experimente durchgeführt, die in dieser Schrift keine Berücksichtigung fanden. Insbesondere drei davon werden hier vorab kurz erwähnt:

- In Abschnitt 3.2.4 wurden zwei spezielle Probenhalter vorgestellt, die für orientierungsabhängige Einzelmolekül-Messungen entwickelt wurden. Ähnlich wie am Ensemble [vA88, Sch05] wird eine Teilorientierung der Probe durch Zusammenpressen eines Gels erreicht. Messungen mit Komprimierungs-Richtung parallel und senkrecht zur optischen Achse wurden an einzelnen PS I-Trimeren der Spezies *T. elongatus* durchgeführt. Die Auswertung dieser Experimente hat ergeben, dass die Probe, bei der die optische Achse bevorzugt in der Membranebene liegt, im Mittel deutlich kleinere Winkel $\ll 90^\circ$ zwischen den Übergangsdipolmomenten verschiedener Emitter aufweist als die Probe, bei der die optische Achse bevorzugt senkrecht auf die Membranebene zeigt. Bei dieser wurden häufig Winkel nahe 90° ermittelt. In Ref. [Sch05] wird aus Experimenten mittels Lineardichroismus darauf geschlossen, dass die Übergangsdipolmomente der roten Chlorophylle in der Membranebene ausgerichtet sind. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Ergebnis meiner Arbeit.
- Bei NPHB-Experimenten wurde unter Ausnutzung des Stark-Effekts an den roten Chlorophyllen die Lochbreite in Abhängigkeit von der äußeren Feldstärke bestimmt. Um eine Stark-Verschiebung beim Einzelmolekül-Experiment nachzuweisen, wurde eine spezielle Mimik eines Probenhalters gestaltet, bei dem das Feld zwischen einer Drahtspitze hinter der Probe und dem Objektiv angelegt wurde. Die Versuche sind an der Bildung von Funkenstrecken durch das suprafluide Helium gescheitert, d.h. die erreichten Feldstärken bis zur Zerstörung des Objektivs und der Probe waren zu gering, um einen Effekt zu messen.
- Durch Einstrahlen einer resonanten Mikrowelle kann eine Änderung der effektiven Triplet-Zerfallsrate bewirkt werden, was zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität führt. Ein solches ODMR-Experiment (Optisch Detektierte Magnetische Resonanz) kann an bestimmten Systemen auch am einzelnen Molekül einen Effekt nachweisen [JK93, JW93]. Dafür wurde eigens ein Probenstab für die Einspeisung von Mikrowellen in die Probe entwickelt, der den Kältezyklus von Raumtemperatur bis 1,4 K schadlos und zuverlässig übersteht. Am PS I wurde kein eindeuti-

Ausblick

ger Effekt beobachtet. Vermutlich ist die Triplettausbeute zu gering, um mit der ODMR-Methode am einzelnen PS I-Komplex einen Effekt zu messen.

Die Polarisationsanalyse an einzelnen Monomeren aus Abschnitt 4.4.1 hat erstmals eine direkte und zuverlässige Bestimmung der Anzahl von roten Emittlern im PS I von *T. elongatus* ermöglicht. Für ein klares Ergebnis sind Komplexe in monomerer Form notwendig. Interessant wären ähnliche Studien an PS I-Monomeren anderer Organismen, um z.B. insbesondere quantitativ zu klären, wieviel weniger rote Emitter das PS I von *Synechocystis* enthält und wieviel mehr das PS I von *Arthrospira*. Am PS I von *Synechocystis* in monomerer Form würde eine Polarisationsanalyse zusätzlich aufdecken, ob die Übergangsdipolmomente der zu den Verbänden C706/C708 und C714 gehörigen Emitter parallel zueinander stehen. Daraus ließe sich ableiten, ob die Schlussfolgerung aus den Ref. [Hsi04, Ril07], dass ein effizienter direkter Energietransfer zwischen C706 und C714 stattfindet, mit den Messungen aus Ref. [Gob94] vereinbar sind. Dort wird in einer Anisotropieuntersuchung festgestellt, dass bei einer Anregung mit linear polarisiertem Licht mit Wellenlängen von > 704 nm die Polarisation der Fluoreszenz im Wesentlichen der Polarisation des eingestrahnten Lichts entspricht.

In einer Studie am LH2 wurden Messungen an einzelnen Komplexen in Abhängigkeit von der Anregungsleistung bei Raumtemperatur durchgeführt [Rut05]. Danach nimmt die Häufigkeit und die Größe der Bewegung des Fluoreszenzmaximums linear mit der Anregungsintensität zu. Beim PS I sind sowohl die spektralen Eigenschaften als auch das Photobleichverhalten stark heterogen. Eine Untersuchung des Sprungverhaltens in Abhängigkeit von der Anregungsintensität fand in dieser Arbeit nur qualitativ an wenigen Komplexen statt. Eine systematische Studie dieses Zusammenhangs erscheint lohnend.