

# Photosynthetische Wasseroxidation:

Über Liganden und Zwischenprodukte

von

**Dipl.-Biol. Jürgen Clausen**

**Dem Fachbereich Biologie/Chemie der**



zur Verleihung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
vorgelegte Dissertation



**Osnabrück, im Juni 2004**

Für meine Eltern

Labor omnia vincit improbus

(Vergil)



## I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis .....	1
II.	Abkürzungsverzeichnis .....	4
III.	Einleitung .....	6
III.1	Untersuchungen zum Mechanismus der photosynthetischen Wasseroxidation ..	16
IV.	Material und Methoden .....	19
IV.1	Beschreibung der verwendeten Stämme von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 .....	19
IV.2	Mutagenese .....	20
IV.3	Anzucht der Bakterien .....	22
IV.4	Verwendete Medien .....	23
IV.5	Ernte der Hauptkulturen .....	26
IV.6	Steriles Ernten von Stammkulturen .....	27
IV.7	Präparation von PSII-Kernkomplexen .....	27
IV.7.1	Präparation von PSII-Kernkomplexen aus <i>Synechocystis</i> mit Säulenschritt ...	28
IV.7.2	Präparation von PSII-Kernkomplexen aus <i>Synechocystis</i> ohne Säulenschritt	30
IV.8	Präparation von Thylakoiden aus <i>Synechocystis</i> .....	30
IV.9	Präparation von PSII-angereicherten Membranfragmenten (BBY) .....	31
IV.10	Präparation von PSII-Kernkomplexen aus Spinat ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) .....	31
IV.11	Chlorophyllbestimmung .....	31
IV.12	Messung der lichtinduzierten Sauerstoffabgabe im Dauerlicht .....	32
IV.12.1	Ermittlung der Elektronentransportrate (ETR) .....	33
IV.12.2	Bestimmung des pH-Optimums der Kernkomplexe .....	34
IV.13	Hemmung und Inaktivierung von PSII-Kernkomplexen .....	34
IV.14	Messung der lichtinduzierten Sauerstoffabgabe im Einzelblitz .....	35
IV.15	Blitzlichtphotometrie .....	37
IV.15.1	Blitzlichtphotometrische Messungen im Mikrosekundenbereich .....	38
IV.15.2	Laserphotometrische Absorptionsmessungen im Nanosekundenbereich .....	42
IV.15.3	Spektroskopische Messungen unter erhöhtem Sauerstoffpartialdruck .....	46
IV.16	Messung des Absorptionsspektrums von PSII-Kernkomplexen .....	50
IV.17	Gelelektrophorese .....	50
IV.18	Proteinkonzentrationen .....	52
IV.19	Spektroskopische Geräte .....	52
IV.20	Zentrifugen und Rotoren .....	52
IV.21	Verwendete Software .....	53
V.	Charakterisierung der PSII-Kernkomplexe .....	54
V.1	Einleitung .....	54
V.2	Polypeptidzusammensetzung der PSII-Kernkomplexe .....	54
V.3	Anzahl der Chlorophylle pro PSII-Kernkomplex .....	56
V.4	Absorptions- und Fluoreszenzspektren der PSII-Kernkomplexe .....	58
V.5	Sauerstoffmessungen im Dauerlicht .....	59
V.5.1	Bestimmung des pH-Optimums der PSII-Kernkomplexe .....	60
V.5.2	Hemmung der Sauerstoffproduktion durch DCMU .....	61
V.5.3	Inaktivierung der PSII-Kernkomplexe .....	61
V.5.4	Haltbarkeit der PSII-Kernkomplexe aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 .....	62
V.6	Oszillation der S-Übergänge .....	63
V.7	Diskussion zur Charakterisierung der Kernkomplexe .....	67

VI. Einfluß der Punktmutationen D1-E189K, R und Q auf das Elektronentransfergeschehen an der Donatorseite von PSII.....	76
VI.1 Einleitung .....	76
VI.2 Ergebnisse .....	78
VI.2.1 Halbwertszeiten der S-Übergänge in D1-E189Q, D1-E189K, D1-E189R und WT* PSII Kernkomplexen.....	78
VI.2.2 Halbwertszeiten der Reduktion von $P_{680}^{+\bullet}$ durch $Y_Z$ und $Q_A^{\bullet}$ in D1-E189K, D1-E189R, D1-E189Q und WT* PSII-Kernkomplexen .....	83
VI.3 Diskussion .....	85
VI.3.1 Diskussion der Ergebnisse im Zusammenhang mit aktuellen Literaturdaten .	87
VII. Zeitaufgelöste Sauerstoffentwicklung in PSII .....	89
VII.1 Einleitung .....	89
VII.2 Ergebnisse .....	91
VII.2.1 Korrektur polarographischer Signale mit hoher Zeitauflösung.....	91
VII.2.2 Arrheniusdiagramme der Verzögerungsphasen und der ansteigenden polarographischen Signale .....	97
VII.2.3 Arrhenius-Diagramm der UV-Transienten bei 360 nm .....	99
VII.2.4 Vergleich polarographischer Signale mit spektroskopischen Transienten ...	101
VII.3 Diskussion .....	101
VII.3.1 Betrachtung der kinetischen Kompetenz der zentrifugierbaren Sauerstoffelektrode .....	102
VII.3.2 Die Halbwertszeit der Sauerstoffentwicklung und ihre Temperaturabhängigkeit .....	104
VII.3.3 Betrachtung der Verzögerungsphase mit Hinblick auf ein kurzlebiges Intermediat der Wasseroxidation .....	106
VIII. Erste Identifizierung von Intermediaten der Wasser-spaltung durch erhöhten Sauerstoffpartialdruck .....	107
VIII.1 Einleitung .....	107
VIII.2 Ergebnisse .....	109
VIII.2.1 Unterdrückung der sauerstofffreisetzenden Reaktion durch erhöhten $O_2$ -Partialdruck .....	110
VIII.2.2 Redoxtitration des Überganges $S_4 \rightarrow S_0$ .....	118
VIII.2.3 Auswertung der Titration mit Sauerstoff .....	122
VIII.2.4 Reduktion von $P_{680}^{+\bullet}$ unter erhöhtem $p(O_2)$ .....	131
VIII.2.5 Messung des Differenzspektrums unter erhöhtem $p(O_2)$ .....	137
VIII.3 Diskussion .....	144
VIII.3.1 Definition des Meßsystems .....	144
VIII.3.2 Vergleich der Ergebnisse mit Literaturwerten .....	149
VIII.3.3 Diskussion der vorgeschlagenen Reaktionsschemata zum Mechanismus der Wasserspaltung .....	155
VIII.3.4 Konsequenzen und Ausblick.....	167
IX. Zusammenfassung .....	169
X. Literaturverzeichnis.....	170
XI. Anhänge .....	198
XI.1 Spektrum eines DUG11-Filters.....	198
XI.2 Ermittlung der optimalen Bedingungen zur Bestimmung der Elektronentransportraten mit PSII-Präparationen.....	199
XI.3 Haltbarkeit von DCBQ und anderen Elektronenakzeptoren .....	200
XI.4 Theorie von Lavorel zur Diffusionslimitierung der Sauerstoffmessung mit einer Pt-Elektrode .....	200
XI.5 Sauerstoffpartialdruck bei 18.9 bar $N_2$ (hochrein) .....	201

XI.6	Kinetische Analyse von Folgereaktionen.....	202
XI.7	Spektren der S-Übergänge.....	205
XI.8	Berechnung von $\Delta X$ (siehe VIII.2.2.1) aus den Simulationen.....	205
XI.9	Publikationsliste .....	206
XI.10	Lebenslauf .....	207
XI.11	Eidesstattliche Versicherung .....	208
XI.12	Danksagung .....	209

## II. Abkürzungsverzeichnis

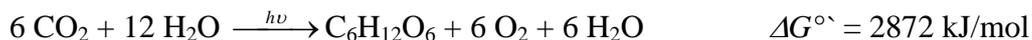
A	Absorption
A & H	Abtast- und Halteverstärker
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β-DM	N-Dodecyl-β-D-Maltosid
BBY	PSII angereichert Membranfragmente nach [Berthold <i>et al.</i> 81]
Bis-Tris	Bis-(2-Hydroxyethyl)-amino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BW	<i>Band-width</i> ; Elektrische Bandbreite des Tiefpaßfilters
CAPSO	3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxy-propansulfonsäure
Chl	Chlorophyll
d	Optische Weglänge des Meßlichts in der Probe
D1/D2	Untereinheiten von Photosystem II; Träger der Kofaktoren des photosynthetischen Elektronentransports
D1-E189K,R,Q	Punktmutanten des D1-Polypeptids von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, s. IV.1
D1-H332D	Punktmutante des D1-Polypeptids von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, s. IV.1
DCBQ	2,5-Dichloro- <i>p</i> -benzochinon
DCPIP	2,6-Dichlor-phenolindophenol
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethyl-harnstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylen-diamin-N,N,N',N'-tetra-Acetat
ESR	Elektronenspinresonanz
ETR	Elektronentransportrate
EXAFS	<u>Extended X-ray absorption fine structure</u>
Ferricyanid	Kaliumhexacyanoferrat(III), K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]
Ferric	Ammoniumeisen-(III)-citrat
Ferrocyanid	Kaliumhexacyanoferrat(II), K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]
FMN	Flavinmononukleotid
FWHM	Halbwertsbreite ( <u>full width at half maximum</u> )
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
I	Intensität
IF	Interferenzfilter
IR	Infrarot
kDa	Kilodalton
LHC-II	Lichtsammelkomplex II
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NADPH/NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (red./ox.)
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge X

<i>OEC</i>	Wasseroxidierender Komplex ( <u>o</u> x <u>y</u> gen <u>e</u> volving <u>c</u> omplex)
OGP	N-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid
P <sub>680</sub>	Primärer Elektronendonator von PSII
P <sub>700</sub>	Primärer Elektronendonator von PSI
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBC	Phenyl- <i>p</i> -Benzochinon
PCC	Pasteur culture collection
PEG-6000	Polyethylenglykol Standard 6000
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PQ	Plastochinon
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
Q <sub>A</sub> , Q <sub>B</sub>	Plastochinon A und B
RZ	Reaktionszentrum
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
S <sub>n</sub>	Oxidationszustand i des wasseroxidierenden Komplexes
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethyl-ethylendiamin
TES	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure
TRICIN	N-(Tris(hydroxymethyl))glycin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
UE	Untereinheit
UPM	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
WT*	Veränderter Wildtyp, siehe Abschnitt IV.1
Y <sub>Z</sub>	Tyrosin 161 des D1-Proteins
Y <sub>D</sub>	Tyrosin 160 des D2-Proteins

### III. Einleitung

Das Leben nahezu aller heterotrophen Organismen beruht auf der Biomasse, die durch Photosynthese der höheren Pflanzen, Algen und Bakterien zur Verfügung gestellt wird. Die globale Biomasse von ca. 2500 Mrd. Tonnen Kohlenhydraten wird heutzutage durch eine photosynthetische Primärproduktion bereitgestellt, die jährlich ca. 260 Mrd. Tonnen Sauerstoff (O<sub>2</sub>) in die Atmosphäre entläßt. Im Vergleich dazu erscheint die durch chemolithoautotrophe Bakterien erzeugte Biomasse vernachlässigenswert gering. Nur in der Tiefsee existieren heiße Quellen und Ökosysteme, deren primäre Biomasseproduktion nicht auf Photosynthese, sondern ausschließlich auf Chemolithoautotrophie beruht.

Die Sauerstoffentwicklung durch oxygene Photosynthese hat vor ca. 3.5 Mrd. Jahren begonnen. Vor dieser Zeit ist die Photosynthese auf anaerobe, anoxygene Bakterien beschränkt gewesen, die anorganische (z.B. H<sub>2</sub>S, Fe<sup>2+</sup>) oder organische Verbindungen als Elektronen- und Protonendonatoren genutzt haben, um anorganisches Kohlenstoffdioxid in reduzierte Kohlenhydrate umzuwandeln. Der große Sprung in der Evolution hat eingesetzt, als die Cyanobakterien begonnen haben, Wasser (H<sub>2</sub>O) als primären Donator zu verwenden. Die Nettogleichung dieser oxygenen Photosynthese lautet:



Die Verwendung des in nahezu unbegrenzten Mengen zur Verfügung stehenden H<sub>2</sub>O als Wasserstoff- und Elektronenquelle für die Photosynthese hat weitreichende Konsequenzen für die bis dahin anaerobe Erdatmosphäre gehabt. Für die bis zu diesem Zeitpunkt existierenden Lebewesen bedeutete sie eine Umweltkatastrophe, weil die meisten keinen Sauerstoff vertrugen und abstarben. Auf der anderen Seite hat das Vorhandensein großer Mengen an Sauerstoff erst die Entwicklung des Lebens auf der Erde, wie wir es heute kennen, ermöglicht. Mit O<sub>2</sub> als Oxidationsmittel ließ sich die energetische Nutzung organischer Kohlenstoffverbindungen auf das etwa Zehnfache steigern. Dies ist die thermodynamische Voraussetzung für die Entstehung höherer Pflanzen und Tiere gewesen. Darüber hinaus konnte sich erst nach der Akkumulation großer Mengen O<sub>2</sub> die vor UV-Strahlung schützende Ozonschicht bilden, die die Entwicklung des Lebens außerhalb des Wassers ermöglicht hat.

#### a) *Evolution oxygener, photosynthetischer Organismen*

Die Cyanobakterien (früher „Blualgen“) stellen heutzutage die ursprünglichsten Organismen mit oxygener Photosynthese dar. Ein besonders ursprünglicher Vertreter dieser Gruppe ist das Cyanobakterium *Gloebacter violaceus* PCC 7421 [Nakamura *et al.* 03; Rivas *et al.* 04]. Es ist bisher der einzige gefundene Organismus, dessen Photosyntheseapparat nicht in den Thylakoiden (siehe unten) organisiert ist sondern in der Cytoplasmamembran.

In höheren Pflanzen und Algen sind die Thylakoide und damit die Komponenten des Photosyntheseapparates in den Chloroplasten lokalisiert. Chloroplasten sind Zellorganellen mit begrenzter genetischer Selbständigkeit. Die interne Grundsubstanz des Chloroplasten, das Stroma, enthält neben den Thylakoiden lösliche Proteine (z.B. des Calvin-Zyklus) und die Komponenten des eigenen genetischen Replikations- und Expressionsapparates. Nach der Endosymbiontentheorie handelt es sich bei den Chloroplasten der Algen und Pflanzen

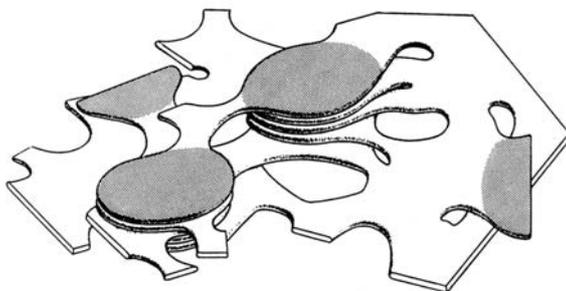
ursprünglich um Cyanobakterien, die durch Phagozytose aufgenommen und domestiziert worden sind. Dabei sind die Chloroplasten wahrscheinlich monophyletischen Ursprungs [van den Hoek *et al.* 93]. 16 S-rRNA bzw. 18 S-rRNA-Analysen bekräftigen die biochemischen Anzeichen einer derartigen Entstehung der Chloroplasten. Es wird postuliert, daß ein ursprünglicher Vertreter der Glaucophyta ein Cyanobakterium phagozytiert hat. Dieses Geschehen bezeichnet man als primäre Endosymbiose. Im Laufe der Evolution bildete sich dieser Endosymbiont um, und es entstanden daraus die Rhodophyta (Rotalgen) und Chlorophyta (Grünalgen). Die Rhodophyta sind neben den Glaucophyta die einzigen eukaryontischen Organismen, die noch Phycobilisomen (s.u.) haben, die ansonsten ein typisches Merkmal der Cyanobakterien sind. Außerdem liegen nur in diesen drei Gruppen die Thylakoide ungestapelt vor (s.u.).

Bei den Chlorophyta ist es zur Umwandlung von Chlorophyll *a* in Chlorophyll *b* und dem darauf folgenden Aufbau von membranintegralen Antennen aus beiden Chlorophyllen gekommen. Diese membranintegralen Chlorophyllantennen haben sich gegenüber den Phycobilisomen durchgesetzt, so daß die Thylakoide nicht mehr einzeln liegen mußten, sondern sich in Stapeln (s.u.) anordnen konnten. Aus den Chlorophyta entwickelten sich die Moose und Gefäßpflanzen.

Alle übrigen Algengruppen sind nach heutiger Auffassung Produkte sekundärer Endosymbiosen, bei denen ein heterotropher Eukaryont eine eukaryontische Alge aus einer der drei o.g. Gruppen „verschluckt“ hat. Diese Theorie gibt auch eine Erklärungsmöglichkeit dafür, warum bei den einzelnen Algengruppen die Anzahl der Hüllmembranen der Chloroplasten zwischen 2 und 4 variiert. Wenn ein heterotropher Eukaryont einen photoautotrophen Eukaryonten phagozytiert, so werden die Thylakoide letztlich von zwei Zellmembranen und zwei phagozytotischen Membranen umhüllt. Oftmals werden jedoch einzelne dieser Membranen nachträglich aufgelöst, so daß bei sekundärer Endosymbiose nicht zwangsläufig vier Membranen den Thylakoiden umgeben müssen.

#### b) Organisation der Komponenten des Photosyntheseapparates

Die Elementarprozesse der oxygenen Photosynthese spielen sich in den Thylakoiden ab. Thylakoide sind abgeflachte Membranvesikel. In den höheren Pflanzen teilen sich die Thylakoide in unterschiedliche Bereiche auf. Die Granathylakoide sind übereinandergeschichtete Bereiche, die Stromathylakoide hingegen liegen einzeln im Stroma (Abbildung 1). Die Thylakoide eines Chloroplasten bilden jedoch stets ein einziges geschlossenes Membransystem, dessen Innenraum, das Thylakoidlumen, ein Kontinuum



**Abbildung 1: Schematische Darstellung von Grana- und Stromathylakoiden höherer Pflanzen. Die gestapelten Granathylakoide sind grau schraffiert.** aus [Sitte *et al.* 91].

darstellt [Schönknecht *et al.* 90]. In Cyanobakterien liegen die Thylakoide einzeln und in der Regel als konzentrisch angeordnetes Netzwerk im Bereich der Zellperipherie vor (Abbildung 2).

In den Thylakoidmembranen sind vier Multienzymkomplexe an der Photosynthese beteiligt: Photosystem I (PSI), Photosystem II (PSII), der Cytochrom  $b_6f$ -Komplex (Cyt  $b_6f$ ) und die ATP-Synthase. In den Thylakoiden der Cyanobakterien liegen zusätzlich noch die Komponenten der Atmungskette. Eine schematische Darstellung des Photosyntheseapparates



c) Aufbau von PSII

Photosystem II ist ein Multiproteinkomplex aus knapp 30 Untereinheiten [Kashino *et al.* 02b] (siehe Tabelle 1). Im nativen Zustand liegt PSII als Dimer in der Thylakoidmembran vor und die PSII-Dimere (inklusive der mit ihnen verbundenen Phycobilisomen) sind in

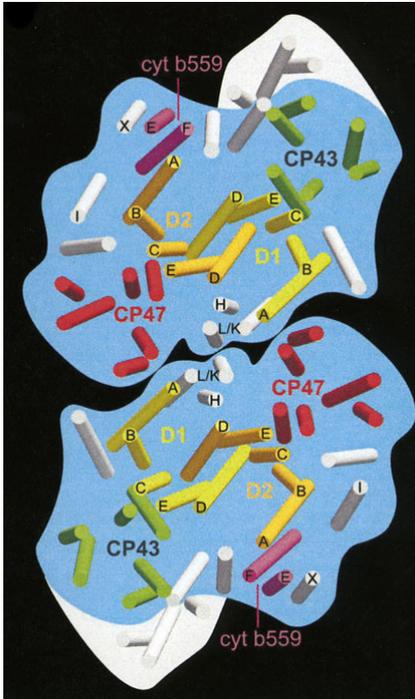


Abbildung 4: Supramolekulare Struktur eines dimeren PSII-Komplexes von *Thermosynechococcus elongatus* (aus [Hankamer *et al.* 01]). Die Aggregation von Monomeren zu Dimeren geht wahrscheinlich mit einer Erhöhung der Aktivität einher. Aggregationen der PSII-Komplexe können somit, neben anderen Mechanismen, eine Möglichkeit eröffnen, die Aktivität der Photosynthese zu regulieren [Mörschel 99]. Der weiß schraffierte Bereich kennzeichnet Helices, die nicht in PSII-Dimeren von höheren Pflanzen vorhanden sind.

Cyanobakterien in langen Reihen in der Membran angeordnet [Kuhl *et al.* 99]. Eine Übersichtsabbildung, die auf der 3.8 Å Röntgenkristallstruktur von *Thermosynechococcus elongatus* beruht, ist in Abbildung 4 dargestellt. Die dimeren PSII-Kernkomplexe der Cyanobakterien haben eine räumliche Ausdehnung von 205 Å in der Länge, 110 Å in der Breite und eine Tiefe von 105 Å (45 Å innerhalb der Membran) [Ferreira *et al.* 04]. Die Angaben für das Molekulargewicht der PSII-Dimere aus unterschiedlichen Cyanobakterien schwanken zwischen 460 und 650 kDa [Ferreira *et al.* 04; Kashino *et al.* 02b; Kuhl *et al.* 99; Kuhl *et al.* 00; Shen und Kamiya 00].

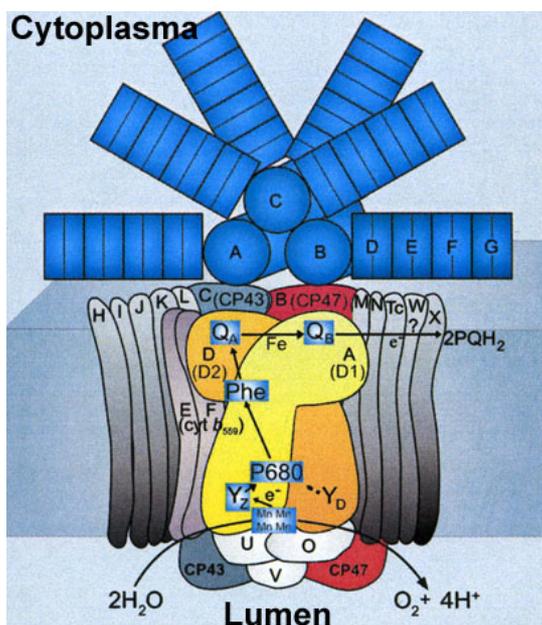
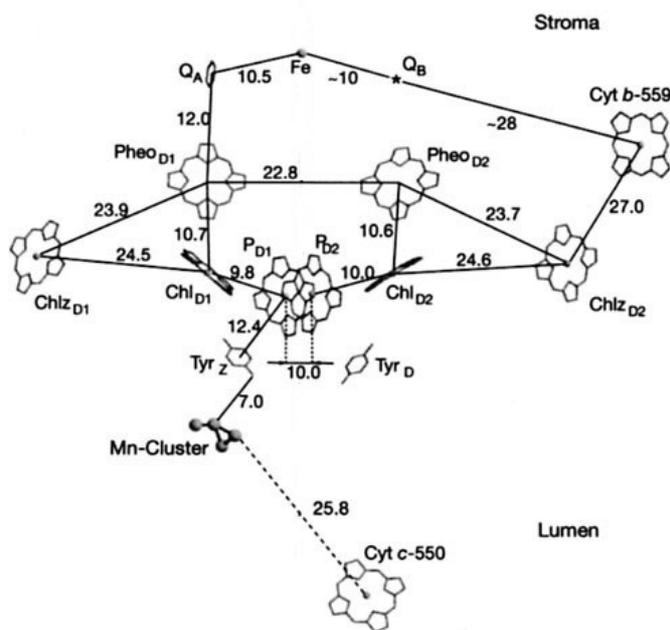


Abbildung 5: Schematische Darstellung von PSII in Cyanobakterien in der Thylakoidmembran. Die Pfeile geben den Weg des Elektronentransfers an. Die kleinen UE wurden mit dem letzten Buchstaben des Namens (Tabelle 1) abgekürzt. Das Phycobilisom (dunkelblau) sitzt dem PSII von der cytoplasmatischen Seite auf: A, B und C sind Allophycocyanin-Stäbchen und D, E, F und G sind flache Scheiben anderer Phycobiliproteine. Die extrinsischen Proteine wurden weiß-grau dargestellt. Abbildung aus [Hankamer *et al.* 01].

Das Kernstück von PSII ist das Reaktionszentrum (RZ). Hier kommt es auf Grund der Absorption eines Lichtquants zur primären Ladungstrennung. Das Reaktionszentrum umfaßt bei Cyanobakterien die Untereinheiten D1, D2, Cyt  $b_{559}$  ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit) und zwei niedermolekulare Proteine (PsbI und PsbL; siehe Abbildung 5). In Präparationen, die nur das RZ enthalten, kann die primäre Ladungstrennung noch ablaufen, aber die Sauerstoffentwicklung nicht [Barry *et al.* 94]. Für die Sauerstoffproduktion sind mindestens noch die großen Untereinheiten CP47 und CP43 notwendig [He und Malkin 98]. Neben den transmembranen Proteinen (Abbildung 5) gibt es drei weitere extrinsische Proteine, die PSII auf der lumenalen Seite aufliegen. Die Zusammensetzung der extrinsischen Proteine unterscheidet sich ebenfalls bei Cyanobakterien, Algen und höheren Pflanzen (siehe Tabelle 1).

Das D1/D2-Heterodimer im Zentrum von PSII bindet alle photochemisch relevanten Kofaktoren (Abbildung 6) und stellt den Großteil der Liganden für den wasserspaltenden Komplex (*oxygen evolving complex, OEC*; siehe unten) bereit. Daneben komplexiert auch die UE CP43 den *OEC* [Ferreira *et al.* 04], aber nicht die extrinsischen Proteine. Letztere schirmen den *OEC* von äußeren Einflüssen ab, stabilisieren den *OEC* und erhöhen die Affinität für  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen [Barber 02b; Debus 92; Hendry und Wydrzynski 03; Rivas *et al.* 04].



**Abbildung 6: Anordnung der am Elektronentransfer beteiligten Kofaktoren des D1/D2-Heterodimers und der Häm-Gruppe von Cyt  $c_{550}$ . Blickrichtung entlang der Membranebene. Die Abstände wurden in Angström angegeben. Durchgezogene Linien geben die Abstände von Zentrum zu Zentrum an ( $\pm 1$  Å). Der Stern kennzeichnet die mutmaßliche  $\text{Q}_\text{B}$ -Bindestelle (aus [Zouni *et al.* 01b]).**

Die PSII-Dimere aus Cyanobakterien sind bedeutend kleiner als diejenigen der höheren Pflanzen; denn ihnen fehlen die äußeren Antennenproteine CP24, CP26 und CP29 und auch die trimeren Lichtsammelkomplexe (*light harvesting complexes, LHC*). Statt dessen besitzen Cyanobakterien die o.g. Phycobilisomen. Phycobilisomen sind Aggregate von Phycobiliproteinen (Phycocyanin, Allophycocyanin und Phycoerithrin) und einigen farblosen Polypeptiden, die der Thylakoidmembran aufsitzen (siehe Abbildung 5) und im direkten Kontakt zum photosynthetischen Reaktionszentrum stehen. In den Antennenproteinen erfolgt der Großteil der Absorption des einfallenden Lichts und die Weiterleitung der absorbierten Energie über z.T. beträchtliche Entfernungen zum PSII. Der Vorteil dieser Arbeitsteilung ist eine flexible Anpassung an die jeweils herrschenden Lichtbedingungen durch Variation der Antennenchromophore oder Reorganisation der ganzen Antennenproteine, unter Beibehaltung des eigentlichen, kompliziert aufgebauten PSII-Reaktionszentrums.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen höheren Pflanzen und Cyanobakterien ist, daß der Großteil der Cyanobakterien ausschließlich Chlorophyll *a* neben den Biliproteinen und Carotinoiden als photosynthetisch aktive Pigmente besitzt. Lediglich einige wenige Vertreter besitzen neben Chlorophyll *a* noch Chlorophyll *b* und andere Chlorophylle. Diese Organismen sind früher in der Gruppe der Prochlorophyten („primitive Grünlinge“) zusammengefaßt worden, um ihre mutmaßliche Nähe zu den Grünalgen (Chlorophyta) anzudeuten. Inzwischen hat sich jedoch herausgestellt, daß es sich bei dieser Gruppe um ein Paraphylum handelt. Nach neueren Erkenntnissen ist Chlorophyll *b* mehrmals unabhängig voneinander im Laufe der Evolution der Cyanobakterien entstanden [van den Hoek *et al.* 93].

**Tabelle 1: Polypeptidzusammensetzung des PSII von Cyanobakterien und höheren Pflanzen**

#	Genname	Proteinname (falls abweichend vom Gennamen)	Apparentes Molekulargewicht [kDa] <sup>a, b, d, e</sup>	Tatsächliches Molekulargewicht [kDa] <sup>e, f, g</sup>	Anmerkung
1	<i>psbA</i>	D1	32	39.3	
2	<i>psbB</i>	CP47	47	56.3	
3	<i>psbC</i>	CP43	43	50.1	
4	<i>psbD</i>	D2	34	39.4	
5	<i>psbE</i>	Cyt <i>b</i> <sub>559</sub> α	7.8	9.3	
6	<i>psbF</i>	Cyt <i>b</i> <sub>559</sub> β	4.9	4.8	
7	<i>psbG</i>				offen
8	<i>psbH</i>		5.7	7	
9	<i>psbI</i>		4.6	4.3	
10	<i>psbJ</i>		4.0	4.1	
11	<i>psbK</i>		3.6	5.1	
12	<i>psbL</i>		4.6	4.5	
13	<i>psbM</i>		3.8	3.9	
14	<i>psbN</i>				= <i>psbT<sub>c</sub></i> ? <sup>a</sup>
15	<i>psbO</i>	Mn stabilisierendes Protein	33	26.5	extrinsisches „33 kDa-Protein“
16	<i>psbP</i>		23	20.2	extrinsisches Protein der höheren Pflanzen
17	<i>psbQ</i>		17	16.5	extrinsisches Protein der höheren Pflanzen
18	<i>psbR</i>		10.2	10.2	nicht in Cyanobakterien
19	<i>psbS</i>		22	21.7	
20	<i>psbT<sub>c</sub></i>		4.2	3.9	
21	<i>psbU</i>		10		extrinsisches Protein der Cyanobakterien
22	<i>psbV</i>	Cyt <i>c</i> <sub>550</sub>	15		extrinsisches Protein der Cyanobakterien
23	<i>psbW</i>		6.1	5.9	nicht in Cyanobakterien
24	<i>psbX</i>		3.8	4.2	
25	<i>psbY</i>		3.6	4.2	
26	<i>psbZ</i>		4.9		
27	<i>psb27</i>		9.1		
28	<i>psb28</i>		10		
29	<i>sll1414</i>		24		bisher unbestimmt <sup>a</sup>
30	<i>sll1252</i>		24		bisher unbestimmt <sup>a</sup>
31	<i>sll1390</i>		21		bisher unbestimmt <sup>a</sup>
32	<i>sll1638</i>		11		= <i>psbQ</i> ? <sup>a</sup>
33	<i>sll1130</i>		10		bisher unbestimmt <sup>a</sup>

<sup>a</sup> [Funk 00], <sup>b</sup> [Ramesh *et al.* 02], <sup>d</sup> [Barber *et al.* 97], <sup>e</sup> [Raghavendra 98], <sup>e</sup> [Szabo *et al.* 01], <sup>f</sup> [Szabo *et al.* 01], <sup>g</sup> [Barber *et al.* 97]

d) Ablauf der blitzinduzierten Ladungstrennung in PSII

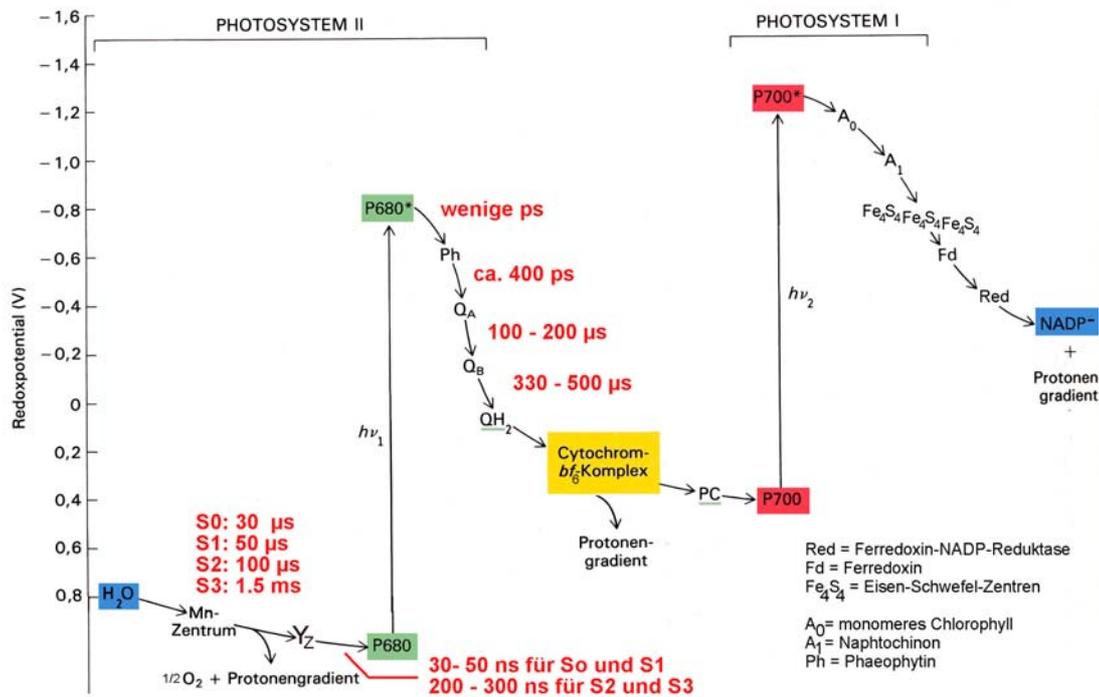


Abbildung 7: Schematischer Weg der Elektronen in der Thylakoidmembran. Auf der Y-Achse ist das elektrochemische Standardmittelpotential (pH 7, 25°C) der einzelnen Verbindungen angedeutet. Freibewegliche Komponenten sind grün unterstrichen. Mit rot wurden die Halbwertszeiten der Elektronenübergänge in PSII aufgelistet. Abbildung verändert nach [Stryer 96].

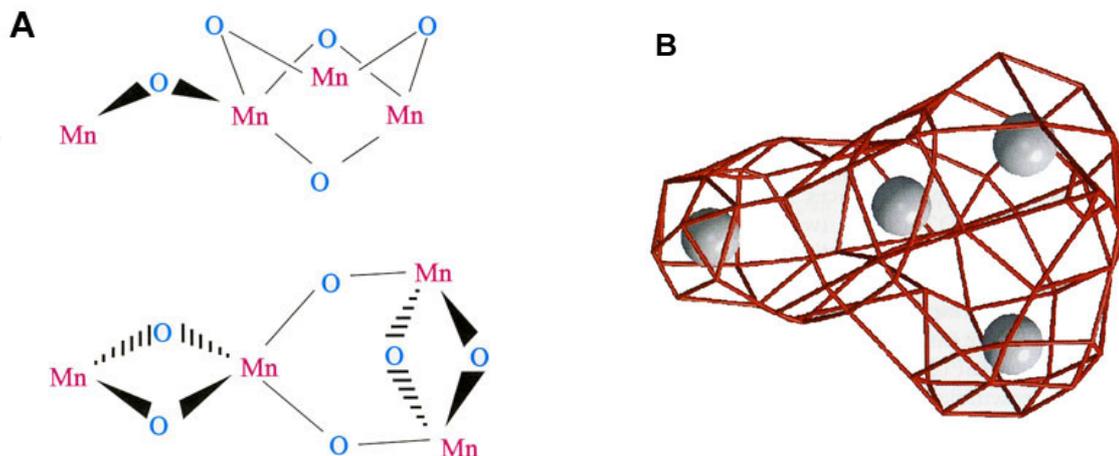
Der schematische Ablauf der blitzinduzierten Ladungstrennung ist in Abbildung 7 dargestellt. Der primäre Elektronendonator wird als  $P_{680}$  bezeichnet. Nach jüngsten Erkenntnissen handelt es sich bei  $P_{680}$  wahrscheinlich um ein Ensemble aus vier Chlorophyllmolekülen, das die Chlorophylle  $Chl_{D1}$ ,  $P_{D1}$ ,  $P_{D2}$  und  $Chl_{D2}$  umfaßt [Barber 02a; Barter *et al.* 03; Dismukes 01; Durrant *et al.* 95; Vacha *et al.* 02] (Abbildung 6).  $P_{680}$  wird durch Absorption eines Photons angeregt und geht in einen Zustand mit stark negativem Redoxpotential über. Aus diesem angeregten Zustand kann im Sinne des Redoxgefälles unter Freisetzung von Energie das Elektron über Phaeophytin *a* auf  $Q_A$  (ein fest gebundenes Plastochinon-9-Molekül) übertragen werden, so daß die Ladungstrennung im Zustand  $P_{680}^+Q_A^-$  stabilisiert wird.  $Q_A^-$  reduziert, vermittelt über ein nicht-Häm  $Fe^{2+}$ , ein zweites Plastochinonmolekül,  $Q_B$ , welches im Gegensatz zu  $Q_A$  ein zwei-Elektronen-Akzeptor ist. Einhergehend mit der Reduktion von  $Q_B$  geht die Protonierung zum Plastohydrochinon  $PQH_2$ .  $PQH_2$  überträgt die aufgenommenen Protonen und Elektronen auf die übrigen Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette (siehe unten).

Auf der Donatorseite von PSII wird das kationische Radikal  $P_{680}^+$  durch das redoxaktive Tyrosin Z ( $Y_Z$ , D1-Tyr161 nach *Synechocystis*-Nomenklatur, siehe Abbildung 11) reduziert und ein neutrales Tyrosinradikal entsteht. Nach seiner Bildung oxidiert  $Y_Z^{ox}$  den wasserspaltenden Komplex (*oxygen evolving complex*, *OEC*, siehe unten). Nachdem vier Oxidationsäquivalente im *OEC* gespeichert worden sind, wird molekularer Sauerstoff freigesetzt (siehe Punkt e).

Auf der Akzeptorseite diffundiert PQH<sub>2</sub> zum Cytochrom b<sub>6</sub>f-Komplex. Dieser Komplex katalysiert die Elektronenübertragung vom Plastohydrochinon zum Plastocyanin und pumpt dabei Protonen durch die Thylakoidmembran. P<sub>700</sub> wird ebenfalls durch Licht in einen angeregten Zustand mit stark negativem Redoxpotential überführt und kann durch eine Folge schneller, exergonischer Reaktionen Elektronen über Ferredoxin auf NADP<sup>+</sup> übertragen. Durch Bindung von Protonen an reduziertes NADP trägt dieser Schritt ebenfalls zum Aufbau des Protonengradienten bei. Das vom P<sub>700</sub> abgegebene Elektron wird vom Plastocyanin ersetzt. Es findet also ein vektorieller Elektronentransport statt, der die Thylakoidmembran elektrisch auflädt. Außerdem wird das Thylakoidlumen saurer gegenüber dem Stroma (bei Algen und Pflanzen) bzw. Cytoplasma (bei Cyanobakterien), so daß sich neben der elektrischen Aufladung ein pH-Gradient aufbaut. Die in der Literatur angegebenen Werte für den pH-Wert im Thylakoidlumen reichen von pH ≈ 5 [Siggel 75] bis ≈ pH 6 [Raghavendra 98]. Die ATP-Synthase nutzt das elektrochemische Potential zur Bildung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P<sub>i</sub>). ATP wird für die meisten biochemischen Synthesen und Arbeitsschritte in den Zellen der Lebewesen benötigt und ist unerlässlich für das Leben auf der Erde.

Nur durch Verknüpfung zweier Photosysteme und zweier Lichtreaktionen ist es möglich, Elektronen vom Redoxpotential des Wassers (E<sub>0</sub> = 0.82 V) auf das Redoxpotential von NADPH (E<sub>0</sub> = -0.32 V) anzuheben und gleichzeitig die Ladungstrennungen ausreichend zu stabilisieren.

e) Der wasserspaltende Komplex (OEC) und der Kok-Zyklus



**Abbildung 8:** A) Darstellung zweier Strukturen aus einer Vielzahl von Vorschlägen, die sich aus EXAFS-Messungen für den Mn-Komplex ergeben [DeRose *et al.* 94; Messinger *et al.* 01; Yachandra *et al.* 87; Yachandra *et al.* 93] und in Übereinstimmung mit B) der Elektronendichteverteilung der Röntgenkristallstruktur bei 3.8 Å [Fromme *et al.* 02; Zouni *et al.* 01a; Zouni *et al.* 01b] sind. Eine mögliche Lokalisation der vier Mn-Ionen in der 3D-Struktur ist abgebildet worden.

Als OEC wird eine Einheit bezeichnet, die aus einem Mn-Komplex, möglicherweise einer weiteren oxidierbaren Gruppe (ggf. ein Aminosäureligand), einem Ca<sup>2+</sup>-Ion, einem Cl<sup>-</sup>-Ion, den gebundenen Substrat-Wassermolekülen und dem redoxaktiven Y<sub>Z</sub> besteht.

Das Herz des OEC bildet der Komplex aus vier Mn-Ionen. Vor dem Vorhandensein der ersten höher aufgelösten Röntgenkristallstrukturen, ist die Struktur des Mn-Komplexes aus EXAFS-Messungen abgeleitet worden. Mit den ermittelten Ergebnissen ergab sich eine Vielzahl möglicher Anordnungen [DeRose *et al.* 94; Robblee *et al.* 01; Yachandra *et al.* 87; Yachandra *et al.* 93; Yachandra *et al.* 96]. Die EXAFS-Messungen ergeben, daß im

Zustand  $S_1$  und  $S_2$  jeweils zwei Mn-Paare, durch zwei oder drei di- $\mu$ -oxo-Brücken verbunden, im Abstand von 2.7 Å voneinander vorliegen. Die beiden Mn-Paare sind über eine mono- $\mu$ -oxo-Brücke mit einem Abstand von 3.3 Å miteinander verbunden. Der Abstand Mn-Ca beträgt 3.4 Å. Nach Erscheinen der ersten 3D-Kristallstruktur von PSII mit 0.38 nm [Zouni *et al.* 01b] ist jedoch klar geworden, daß viele bisherige Modelle, die nach den EXAFS-Messungen vorgeschlagen worden sind, mit der Elektronendichteverteilung des Mangankomplexes in der 3.8 Å Struktur nicht verträglich sind. Abbildung 8 A zeigt zwei aus den EXAFS-Messungen resultierende Modelle, die mit der gefundenen Elektronendichteverteilung bei 3.8 Å (Abbildung 8 B) [Zouni *et al.* 01a; Zouni *et al.* 01b] und ESR-Spektren (diskutiert in [Carrell *et al.* 02]) im Einklang sind. In der jüngst veröffentlichten Röntgenkristallstruktur aus *T. elongatus* mit 3.5 Å Auflösung [Ferreira *et al.* 04] ist auch die Position des  $Ca^{2+}$  zugewiesen worden (im Gegensatz zu Abbildung 8 B). Eine sichere Bewertung der unterschiedlichen Strukturmodelle ist heute noch nicht möglich.

Wie bereits unter Punkt *d* beschrieben, wird der *OEC* durch die Absorption von vier Lichtquanten schrittweise oxidiert. Ob alle Oxidationen ( $S_n$ -Zustände, siehe unten) innerhalb des Mn-Komplexes gespeichert werden, ist noch in der Diskussion. Eine kürzlich erschienene Abhandlung befaßt sich mit dem Für und Wider von Mn- bzw. Liganden-zentrierten Oxidationen [Messinger *et al.* 01]. Die vorgeschlagenen Oxidationszustände für die einzelnen Mn-Ionen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

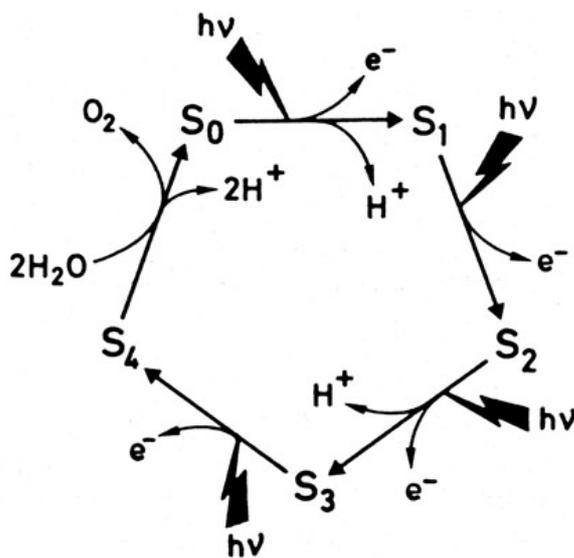


Abbildung 9: Kok-Zyklus: Schema der schrittweisen Oxidation des wasserspaltenden Komplexes (aus [Rutherford 89]). Im Laufe der blitzinduzierten Oxidation werden vier Elektronen vom *OEC* abgegeben, die durch die Wasserspaltung im letzten Schritt dem System wieder zugeführt werden. Die Blitzabhängigkeit der Protonenfreisetzung ist ebenfalls angedeutet.

1969 haben Joliot *et al.* [Joliot *et al.* 69] (bzw. Kok *et al.*, 1970 [Kok *et al.* 70]) entdeckt, daß bei dunkeladaptiertem, sauerstoffproduzierendem Material vier aufeinanderfolgende Lichtblitze zur Freisetzung von Sauerstoff führen. Jeder einzelne Blitz oxidiert dabei  $P_{680}$  und letztlich den *OEC* (siehe Punkt *d*). Die einzelnen Intermediate der fortschreitenden Oxidationszustände werden seitdem als  $S_n$ -Zustände im sog. Kok-Zyklus bezeichnet (Abbildung 9), wobei  $S_n$  Werte von 0 – 4 annimmt und die Anzahl der im *OEC* gespeicherten Oxidationsäquivalente wiedergibt. In Abbildung 9 ist der Kok-Zyklus schematisch dargestellt. Der Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  führt zur Sauerstofffreisetzung (siehe Kapitel VIII).  $S_4$  steht stellvertretend für alle Zwischenzustände und besitzt bisher keine andere nachgewiesene Bedeutung, als diejenige des, durch den vorherigen  $S_3$ -Zustand des *OEC* und das frisch erzeugte Tyrosinradikal beschriebenen, „Einstiegs-Zustands“ ( $S_3Y_Z^{OX}$ ) für die zu erwartende Reaktionsfolge bis hin zum freien Sauerstoff [Rappaport *et al.* 94; Renger *et al.* 94].

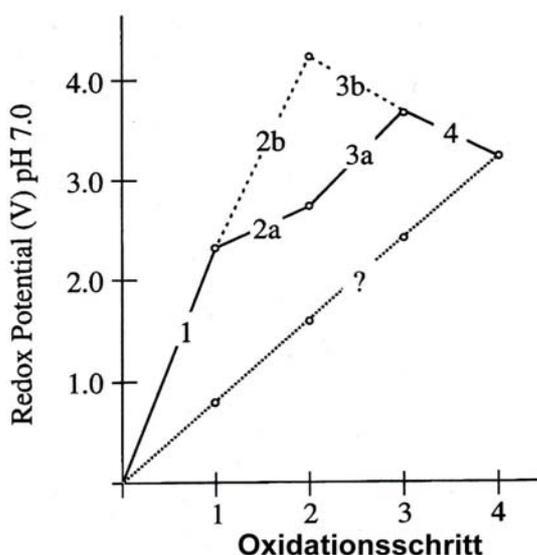
**Tabelle 2: Elektronische Konfiguration der Redoxzustände  $S_n$  des *OEC* aus [Messinger *et al.* 01; Renger 01]**

Redoxzustand $S_n$	Elektronische Konfiguration	Alternative
$S_0$	L[Mn(II) Mn(III), Mn(IV), Mn(IV)]	L[Mn(III) Mn(III), Mn(III), Mn(IV)]
$S_1$	L[Mn(III) Mn(III), Mn(IV), Mn(IV)]	
$S_2$	L[Mn(III) Mn(IV), Mn(IV), Mn(IV)]	
$S_3$	L <sup>ox</sup> [Mn(III) Mn(IV), Mn(IV), Mn(IV)]	L[Mn(IV) Mn(IV), Mn(IV), Mn(IV)]

L = eventuell redoxaktiver Ligand

### f) Thermodynamik der Wasserspaltung

Vier Oxidationsäquivalente werden im *OEC* gespeichert, bevor es zur Bildung von Sauerstoff kommt. Die Reaktionsgleichung der Halbzelle lautet:  $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$ . Die schrittweise Oxidation des *OEC* beruht auf der schrittweisen Photooxidation von  $P_{680}$ . Das Chlorophyllensemble  $P_{680}$  absorbiert Photonen bis zu einer Wellenlänge von 680 nm. Die Energie eines 680 nm Photons beträgt 1.8 eV. Für die Abstraktion eines Elektrons aus  $\text{H}_2\text{O}$  müssen bei pH 7 durchschnittlich 0.82 V/e<sup>-</sup> aufgewendet werden. Das Interessante an dieser Reaktion ist, daß die Abstraktion des ersten Elektrons aus Wasser tatsächlich einen viel höheren Energiebedarf von 2.3 V/e<sup>-</sup> hat. Das 680 nm Photon liefert also nicht genügend Energie, um diese Oxidation durchführen zu können. Die eigentliche Funktion des *OEC* ist es also, die 1-Elektronenschritte über eine Serie von oxidierten Intermediaten zu umgehen, für die das 680 nm Photon ausreichende Energie liefert. Wenn die ersten Oxidationen im *OEC* gespeichert werden, so kann in den letzten Schritten der Wasserspaltung eine konzertierte Wasseroxidation als zwei-Elektronen-Schritt durchgeführt werden, die das energetisch ungünstige Hydroxylradikal umgeht. Die hier beschriebene Betrachtung ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.



**Abbildung 10: Redoxmittenpotentiale (pH 7) der Oxidation von Wasser zu Sauerstoff in wässriger Lösung. Die durchgezogene Linie und die gestrichelte Linie laufen beide über ein energetisch ungünstiges Hydroxylradikal ab. Die gepunktete Linie mit einem durchschnittlichen Aufwand von 0.82 V/e<sup>-</sup> könnte den Weg im *OEC* beschreiben, der das ungünstige Hydroxylradikal umgeht. Aus [Britt 96; Radmer und Cheniae 77].**



Außerdem haben energetische Berechnungen zur Wasserspaltung ergeben, daß mindestens im Übergang  $S_3 \Rightarrow S_4$  ein starker Protonenakzeptor in das Oxidationsgeschehen involviert sein muß [Krishtalik 90]. Als attraktiver Kandidat ist  $Y_Z$  vorgeschlagen worden [Britt 96; Hoganson und Babcock 97], das damit über seine ursprüngliche Funktion eines einfachen Elektronenvermittlers zwischen dem *OEC* und  $P_{680}^{+\bullet}$  hinausgehend als Bestandteil des *OEC* angenommen worden ist.

### III.1 Untersuchungen zum Mechanismus der photosynthetischen Wasseroxidation

In dieser Arbeit wurde mit dem chroococcalen (einzellige Stäbchen und Kokken) Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gearbeitet. In Abbildung 2 ist eine schematische Darstellung dieses Organismus zu sehen, in der einige wichtige zelluläre Bestandteile eingezeichnet sind.

Als Grundvoraussetzung für die spektroskopischen Messungen mußte eine Präparationsvorschrift etabliert werden, um hochaktive PSII-Kernkomplexe aus Wildtyp- und Mutantenzellen zu präparieren. Die Herstellung der Mutanten wurde in Abschnitt IV.2 zusammengefaßt.

Alle Mutationen wurden im D1-Protein von PSII durchgeführt. Abbildung 11 zeigt die Primärstruktur und die hypothetische Sekundärstruktur des D1-Proteins und Aminosäuren (AS), die in *Synechocystis* sp. PCC6803 durch ortsgerichtete Mutagenese ausgetauscht worden sind (z.B. [Chu *et al.* 95a; Chu *et al.* 95b]). Die konservierten Aminosäuren sind

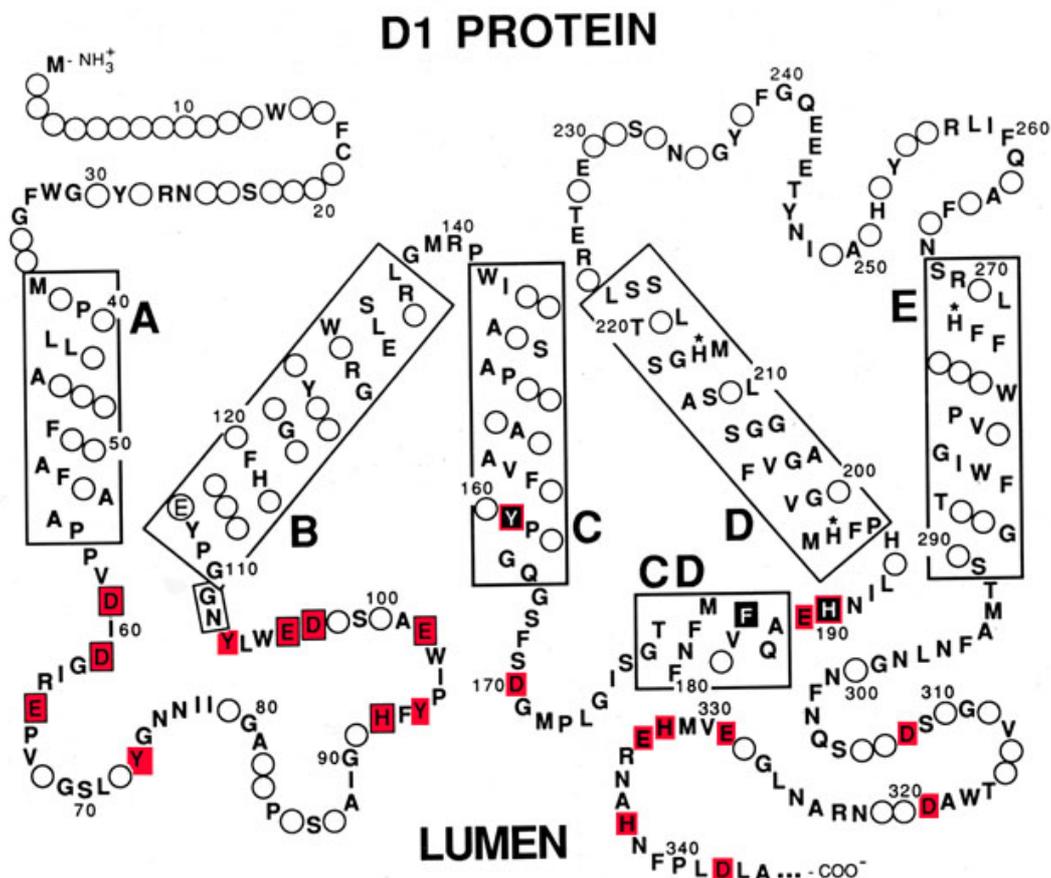


Abbildung 11: Hypothetisches Modell für die Faltung des D1-Polypeptids nach Computerberechnungen aus der Primärsequenz (basierend auf der Kristallstruktur der L-Untereinheit des bakteriellen Reaktionszentrums) [Svensson *et al.* 90]. Die konservierten AS sind mit Buchstaben extra gekennzeichnet. Nicht konservierte AS sind durch leere Kreise dargestellt. Farblich gekennzeichnet sind AS, die durch ortsgerichtete Mutagenese ausgetauscht worden sind [Barry *et al.* 94]. Tyr 161, Phe 186 und His 190 sind durch weiße Buchstaben mit schwarzem Hintergrund hervorgehoben. Aminosäuren, die an der Manganbindung beteiligt sein könnten, sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Röntgenkristallstruktur bei 3.7 Å zeigt [Kamiya und Shen 03], daß Helix B tatsächlich nicht gekippt ist, dafür aber Helix E.

mit Buchstaben gekennzeichnet. Viele der konservierten Aminosäurereste sind substituiert worden. Die Idee ist hierbei, daß nur solche Aminosäurereste im Laufe der Evolution konserviert bleiben, die eine wichtige Funktion in der Photosynthese haben. Solche Punktmutanten sollen dann weitere Aufschlüsse über den Mechanismus der Photosynthese, insbesondere der Wasserspaltung, geben (siehe Punkt *a*). Es sind jedoch auch schon konservierte Aminosäurereste gefunden worden, deren Austausch keine Beeinträchtigung der Photosynthese zeigt [Chu *et al.* 95b].

In Kapitel V werden die PSII-Kernkomplexe biochemisch charakterisiert. In Kapitel VI wird die Funktion des konservierten AS-Restes D1-Glu189 untersucht und die Kapitel VII und VIII behandeln direkt den Mechanismus der Wasseroxidation und der Bildung von Sauerstoff.

*a) Einfluß von Punktmutationen an Position D1-189 auf den Elektronentransfer im photosynthetischen Reaktionszentrum*

Im zweiten Teil der Arbeit (Kapitel VI) wurde der Frage nachgegangen, inwieweit der AS-Rest D1-E189 am Protonentransport beteiligt ist und welche Konsequenzen dies für den postulierten Protonenakzeptor von  $Y_Z$  D1-His190 hat.

Dazu einige Vorüberlegungen: Nach der Oxidation durch  $P_{680}^{+\bullet}$  (siehe Punkt III *d*) liegt Tyrosin Z als neutrales Radikal vor [Ayala *et al.* 99; Babcock *et al.* 89; Barry *et al.* 90; Rodriguez *et al.* 87]. Die zwingende Notwendigkeit eines starken Protonenakzeptors (vgl. Punkt III *f*) hat einige Gruppen dazu veranlaßt,  $Y_Z^{ox}$  in jedem Schritt als Protonenabstraktor des Substrat-Wassers zu behandeln (*hydrogen abstractor model*) [Gilchrist *et al.* 95; Hoganson *et al.* 95; Tommos *et al.* 98a; Tommos und Babcock 98; Tommos und Babcock 00]. Als Konsequenz muß das phenolische Proton nach jeder Oxidation von  $Y_Z$  aus dem Reaktionszentrum entfernt werden. Als Akzeptor des phenolischen Protons ist der AS-Rest D1-H190 vorgeschlagen worden [Babcock *et al.* 97; Britt 96; Diner und Babcock 96; Hays *et al.* 98; Hoganson *et al.* 95; Hoganson und Babcock 97; Svensson *et al.* 96; Tommos und Babcock 98]. Für den AS-Rest D1-E189 ist postuliert worden, daß er das phenolische Proton von D1-His190 übernimmt und zum Lumen weiter transportiert [Babcock 95; Tommos und Babcock 98; Tommos und Babcock 00].

Gegen dieses Modell sprechen verschiedene Tatsachen: 1. Die Anzahl der freigesetzten Protonen ist abhängig vom S-Zustand (Übersicht in [Junge *et al.* 02]). Nach dem *hydrogen abstractor model* muß aber in jedem S-Übergang ein Proton freigesetzt werden. 2. Durch Isotopenaustauschversuche ist gezeigt worden, daß noch im letzten Zustand vor der Wasserspaltung ( $S_3$ ) beide Substratwassermoleküle ausgetauscht werden können [Hendry und Wydrzynski 02; Hillier *et al.* 98a; Hillier *et al.* 98b; Hillier und Wydrzynski 00; Hillier und Wydrzynski 01; Radmer und Ollinger 86]. Im *hydrogen abstractor model* sind in diesem Zustand bereits drei Protonen aus dem *OEC* abstrahiert worden. 3. Elektrochrome Bandenverschiebungen von Chlorophyllen belegen, daß nach der Oxidation von  $Y_Z$  eine Ladung in der Nähe von  $Y_Z^{ox}$  bestehen bleibt [Haumann *et al.* 97a; Karge *et al.* 97; Rappaport *et al.* 94]. Dies ist mit dem *hydrogen abstractor model* nicht vereinbar.

Auf Grund der elektrochromen Verschiebungen ist ein Modell entwickelt worden (*proton rocking model*) [Mino *et al.* 93; Rodriguez *et al.* 87], in dem das phenolische Proton in der Nähe von  $Y_Z^{ox}$  verbleibt und nur innerhalb einer bereits bestehenden Wasserstoffbrückenbindung mit einer benachbarten Base (evtl. D1-His190; siehe oben) verschoben wird [Ahlbrink *et al.* 98]. Das phenolische Proton ist bereits vor der Oxidation in Richtung der benachbarten, starken Base verlagert, was den schnellen Elektronentransfer von  $Y_Z$  zu  $P_{680}^{+\bullet}$  erlaubt. Dieses Modell trägt sowohl den Ergebnissen

zum neutralen  $Y_Z^{\text{ox}}$ -Radikal als auch den elektrochromen Messungen Rechnung. Darüber hinaus steht es nicht im Widerspruch zur blitzabhängigen Protonenfreisetzung mit der Stöchiometrie von 1:0:1:2 (beginnend mit dem Übergang  $S_0 \rightarrow S_1$ ) [Junge *et al.* 02].

Als weitere Alternative ist ein Modell vorgeschlagen worden, bei dem Tyrosin Z im Grundzustand als negativ geladenes Tyrosinat  $Y_Z^-$  vorliegt [Candeias *et al.* 98; Haumann *et al.* 99] und nur im letzten Übergang  $S_3 \Rightarrow S_4$  als Protonenabstraktor fungiert [Mulکیدjianian 99]. Eine vergleichende Abschätzung der einzelnen Modelle ist in [Rappaport und Lavergne 01] durchgeführt worden.

Durch Untersuchung der Elektronentransferreaktionen vom Mn-Komplex zum  $Y_Z^{\text{ox}}$  und vom  $Y_Z$  zu  $P_{680}^{+\bullet}$  mit PSII-Kernkomplexen, in denen durch ortsgerichtete Mutagenese der wahrscheinlich negativ geladene AS-Rest D1-Glu189 gegen neutral oder positiv geladene AS-Reste ausgetauscht worden war, wurde untersucht, ob D1-E189 in der Nähe vom OEC liegt und als Protonenakzeptor, wie oben postuliert, in Frage kommt.

### b) Mechanismus der photosynthetischen Wasseroxidation

Eine Vielzahl an Mechanismen zum Ablauf der photosynthetischen Wasseroxidation ist in der Literatur vorgeschlagen worden (z.B. [Aullon *et al.* 02; Blomberg und Siegbahn 03; Haumann und Junge 99; Hillier und Wydrzynski 01; Messinger *et al.* 01; Pace und Ahrling 04; Renger 01; Siegbahn 02; Tommos 02; Vrettos *et al.* 01; Vrettos und Brudvig 02]). Dabei werden unterschiedliche Oxidations- und Protonierungszustände, sowie Konformationsänderungen in den einzelnen S-Zuständen des Kok Zyklus berücksichtigt. Gemein ist diesen Modellen, daß sie für den Übergang von  $S_3$  nach  $S_0$  (siehe Punkt III e) einen Zwischenzustand  $S_4$  postulieren.  $S_4$  ist ein instabiler, aktivierter Komplex, der bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte mit Ausnahme einer Zuweisung zu  $S_3Y_Z^{\text{ox}}$  [MacLachlan *et al.* 94; Rappaport *et al.* 94; Renger *et al.* 94].

In der Literatur ist postuliert worden, daß im Oxidationszustand  $S_3$  ein redoxisomeres Gleichgewicht zwischen den beiden Redoxzuständen  $S_3(\text{I})$  und  $S_3(\text{II})$  vorliegt, wovon letzterer bereits einen Peroxidcharakter hat [Haumann *et al.* 97a; Haumann und Junge 99; Renger 97; Renger 01]. Dem Postulat zufolge bewirkt die Oxidation von  $Y_Z$  eine sofortige Verschiebung des redoxisomeren Gleichgewichts zu  $S_3(\text{II})$  von wo aus allein die sauerstofffreisetzende Reaktion weiterläuft. Bei der Temperaturabhängigkeit des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  ist mit spektroskopischen Messungen bei einer charakteristischen Temperatur eine Änderung der Aktivierungsenergie dieses Übergangs beobachtet worden [Karge *et al.* 97; Koike *et al.* 87; Renger und Hanssum 92]. Dieses Umschalten von einer ratenlimitierenden Reaktion zur anderen ist mit dem redoxisomeren Gleichgewicht in Zusammenhang gebracht worden [Karge *et al.* 97; Koike *et al.* 87; Renger und Hanssum 92]. In Kapitel VII wurde durch temperaturabhängige Messungen der Sauerstofffreisetzung mit einer zentrifugierbaren Platinelektrode versucht, diese Änderung der Aktivierungsenergie wiederzufinden und anhand einer erstmalig beschriebenen Verzögerungsphase beim polarographischen Signal einen Hinweis auf ein Intermediat des terminalen S-Übergangs zu finden.

Im letzten Kapitel dieser Arbeit (Kapitel VIII) wurde direkt versucht, ein Intermediat des Reaktionsschrittes  $S_4 \rightarrow S_0$  durch Verschiebung des Gleichgewichts zu stabilisieren. Wie in Abbildung 9 zu sehen, wird im letzten Schritt  $S_4 \rightarrow S_0$  ein Sauerstoffmolekül frei. Durch Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes über der Reaktionslösung und damit der Erhöhung der Konzentration an gelöstem  $O_2$  sollte die Bildung des Sauerstoffs verhindert werden und die Reaktion auf der Stufe der Edukte oder, wünschenswerterweise, auf der Stufe eines Intermediates angehalten werden.

## IV. Material und Methoden

### IV.1 Beschreibung der verwendeten Stämme von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Alle Arbeiten wurden an folgenden Stämmen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 durchgeführt:

1. *Synechocystis* sp. PCC 6803 pRD1031 Km<sup>r</sup> *apcE*<sup>-</sup> PSI<sup>-</sup>
2. *Synechocystis* sp. PCC 6803 pRD1031 Km<sup>r</sup> *apcE*<sup>-</sup> PSI D1-E189K
3. *Synechocystis* sp. PCC 6803 pRD1031 Km<sup>r</sup> *apcE*<sup>-</sup> PSI D1-E189R
4. *Synechocystis* sp. PCC 6803 pRD1031 Km<sup>r</sup> *apcE*<sup>-</sup> PSI D1-E189Q
5. *Synechocystis* sp. PCC 6803 pRD1031 Km<sup>r</sup> *apcE*<sup>-</sup> PSI D1-H332D
6. *Synechocystis* sp. PCC 6803 pRD1031 Km<sup>r</sup> *apcE*<sup>-</sup> PSI D1-D61N
7. *Synechocystis* sp. PCC 6803 pRD1031 Km<sup>r</sup> *apcE*<sup>-</sup> PSI D1-D61A
8. *Synechocystis* sp. PCC 6803 pRD1031 Km<sup>r</sup> *apcE*<sup>-</sup> PSI D1-E65Q
9. *Synechocystis* sp. PCC 6803 pRD1031 Km<sup>r</sup> *apcE*<sup>-</sup> D1-Q165E
10. *Synechocystis* sp. PCC 6803 pRD1031 Km<sup>r</sup> *apcE*<sup>-</sup> D1-Q165A

Alle Mutanten sind gegen Spectinomycin, Chloramphenicol und Kanamycin resistent. Die Mutanten 1 – 8 waren zusätzlich gegen Gentamycin und Tetracyclin (siehe IV.2 b) resistent.

Bei 1. handelt es sich um eine Mutante, die ein unverändertes *psbA-2*-Gen enthält, sich vom WT aber durch das Fehlen anderer Gene unterscheidet. Neben *psbA-1* und *psbA-3* wurde das Gen für das ApcE-Protein aus dieser Mutante entfernt. Dieses Protein bewirkt die Bindung der Phycobilisomen an die Thylakoidoberfläche und an PSII [Sidler 94]. Die Entfernung des ApcE-Proteins erleichtert die Trennung von Phycobilisomen und Kernkomplexen bei der Präparation. Außerdem wurde dieser Mutante PSI entfernt, um Verunreinigungen der PSII-Kernkomplexe mit PSI auszuschließen. *Diese Mutante wird in der weiteren Arbeit als WT\* bezeichnet.*

Bei 2.- 8. handelt es sich um Mutanten, die die gleichen Eigenschaften wie die oben genannte WT\*-Mutante besitzen. Zusätzlich wurde im *psbA-2* Gen eine Punktmutation eingesetzt. Diese Mutationen führten dazu, daß bei der Expression des Gens die ursprünglichen Aminosäuren (z.B. bei Nr. 5: Histidin an Position 332) im D1-Protein durch eine andere Aminosäure gezielt ausgetauscht wurde (im Beispiel Aspartat). Zur Vereinfachung werden diese Mutanten im weiteren Text verkürzt gekennzeichnet. Bei diesem Beispiel: D1-H332D.

Bei Nr. 9 und 10. handelt es sich um Mutanten, denen das PSI-Gen nicht entfernt worden war.

## IV.2 Mutagenese

### a) Abriß

Alle Mutanten wurden vom Labor von Prof. Dr. R. J. Debus, University of California, Riverside, zur Verfügung gestellt. *Synechocystis* sp. PCC 6803 besitzt drei Gene (*psbA-1*, *psbA-2*, *psbA-3*), die für das D1-Protein des Photosyntheseapparates kodieren [Jansson *et al.* 87]. Die Entfernung dieser drei natürlichen Gene wird bei Debus *et al.* [Debus *et al.* 88; Debus *et al.* 90] beschrieben.

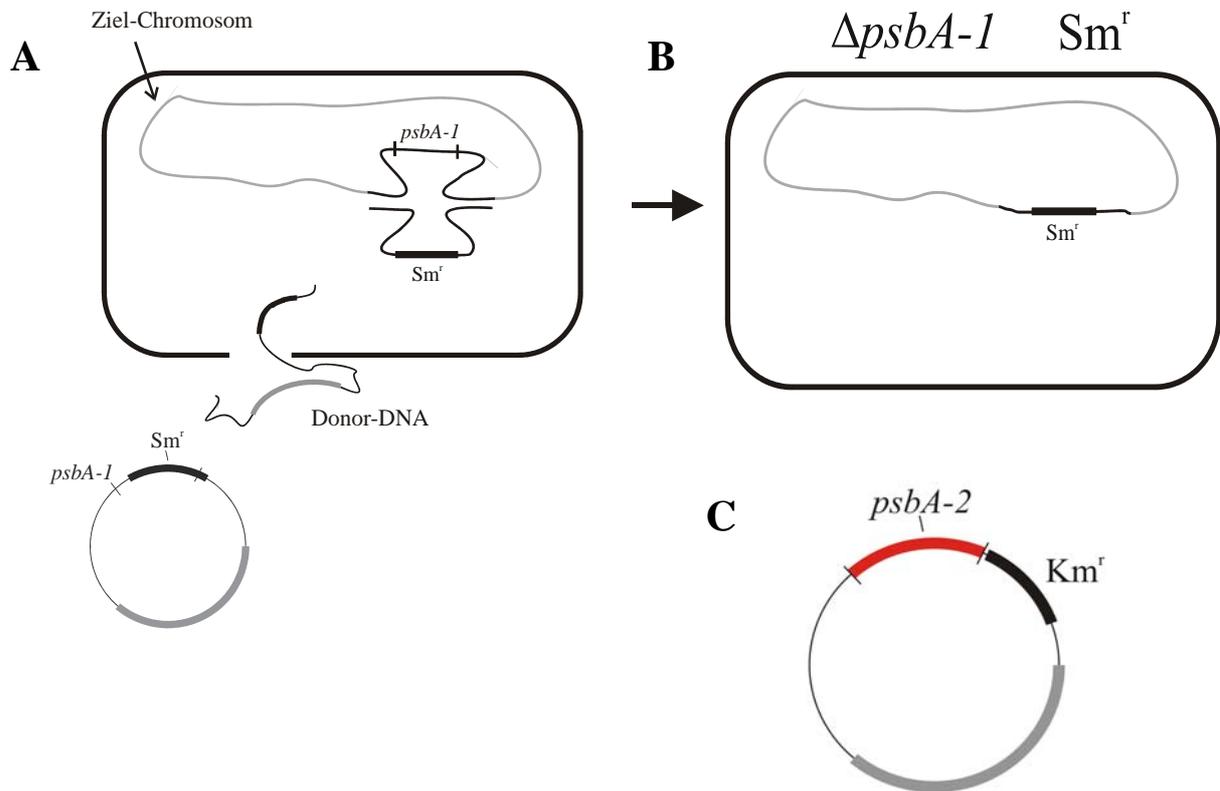
Die Herstellung des Plasmids pRD1031 ist bei [Debus *et al.* 88; Debus *et al.* 90] und [Chu *et al.* 94b] erläutert. Die Transformation dieses Plasmids in einen Stamm, dem das ApcE-Protein und das PSI fehlen, ist bei Chu *et al.* [Chu *et al.* 95c] erklärt. Die Identität jeder Mutante und die Abwesenheit unerwünschter Mutationen werden, wie bei Chu *et al.* ([Chu *et al.* 94b; Chu *et al.* 95a; Chu *et al.* 95c; Debus *et al.* 90] und [Chu *et al.* 94a]) beschrieben, durch *Southern-Blot*-Restriktions-Analyse und Sequenzanalyse überprüft. Eine allgemeine Übersicht zur Herstellung von *Synechocystis*-Mutanten findet sich bei Williams [Williams 88]. Für eine genaue Beschreibung der Mutagenese siehe Punkt b.

### b) Detaillierte Beschreibung der Mutagenese von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (basierend auf Williams, J.G.K, 1988) [Williams 88]

*Synechocystis* sp. PCC 6803 hat zwei wichtige Eigenschaften, die die Herstellung von Mutanten ermöglichen bzw. erleichtern, und die man in wenigen anderen Cyanobakterien findet. 1.) Ein natürliches Transformationssystem (Aufnahme von DNA und Fähigkeit zur homologen Rekombination). Die Aufnahme von DNA geht wahrscheinlich mit der Umwandlung von doppelsträngiger DNA zu einzelsträngiger DNA einher. Die Umwandlung wird von einer Calcium-abhängigen Nuklease, die in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, vollzogen [Barten und Lill 95]. 2.) Die Fähigkeit, heterotroph auf Glucose zu wachsen, ist die Voraussetzung für das Wachstum von Mutanten, deren Photosysteme inaktiviert sind. In einigen Stämmen von *Synechocystis* wirkt Glucose toxisch auf die Zellen in Konzentrationen von > 0.2 mM, wenn PSII aktiv ist. Für die unten beschriebene Mutagenese ist ein Stamm ausgewählt worden, auf den Glucose auch in hohen Konzentrationen bei gleichzeitiger PSII-Aktivität nicht toxisch wirkt.

*Synechocystis* sp. PCC 6803 besitzt drei nicht identische Kopien des *psbA*-Gens. Bevor ein Gen, das die Information für ein mutiertes D1-Protein enthält, wirksam in die Zelle transformiert werden kann, müssen die drei unveränderten Kopien (*psbA-1*, *psbA-2* und *psbA-3*) entfernt werden (Abbildung 12). Die einzelnen *psbA*-Gene werden durch Antibiotikaresistenzen ersetzt [Debus *et al.* 90]: 90% von *psbA-1* durch ein Gen für Spectinomycinresistenz ( $Sm^r$ ), 85% von *psbA-2* durch eine Erythromycinresistenz ( $Em^r$ ) und 85% von *psbA-3* durch ein Gen für Chloramphenicolresistenz ( $Cm^r$ ). Zur Entfernung von PSI werden 28% von *psaA* und 15% von *psaB* durch eine Gentamycinresistenz ( $Gm^r$ ) ersetzt [Chu *et al.* 95c]. Die PsaA- und PsaB-Proteine bilden den Kern von PSI. Das Gen für das ApcE-Protein wird zu ca. 50% durch das Gen für Tetracyclinresistenz ( $Tet^r$ ) ersetzt [Chu *et al.* 95c]. Durch die Deletionen ist aus dem WT eine  $Cm^r/Em^r/Sm^r/Gm^r/Tet^r$ -Transformante hergestellt worden, die als Wirt für mutierte *psbA2*-Gene geeignet ist.

Durch ortsgerichtete Mutagenese werden Punktmutationen in das *psbA-2*-Gen eingeführt [Debus *et al.* 88]. Die mutierten *psbA-2*-Gene werden über das Plasmid pRD1031 Km<sup>r</sup> [Debus *et al.* 88] von der o.g. Wirtszelle aufgenommen [Chu *et al.* 94b; Debus *et al.* 90]. Neben dem mutierten *psbA-2*-Gen liegt auf dem Plasmid eine Kanamycinresistenz (Km<sup>r</sup>) [Abbildung 12 C]. Durch homologe Rekombination wird die Erythromycinresistenz gegen das mutierte *psbA-2*-Gen plus Kanamycinresistenz ausgetauscht. Durch Transformation der o.g. Wirtszelle mit dem natürlichen *psbA-2*-Gen, eingebaut in das Plasmid pRD1031 Km<sup>r</sup>, entsteht der WT\* (Cm<sup>r</sup>/Km<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup>/Gm<sup>r</sup>/Tet<sup>r</sup>). Die Transformation von *Synechocystis* ist



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Transformation von *Synechocystis* sp. PCC 6803. A) Deletion der natürlichen Gene am Beispiel von *psbA-1*: Unten: Ein großes Stück originaler *Synechocystis*-DNA (dünne, schwarze Linie) ist in den Vektor pUC119 (dicke, graue Linie) eingesetzt worden. Das *psbA-1*-Gen (angedeutet durch zwei Längsstriche) ist durch Restriktionsenzyme zu 90% herausgeschnitten und durch ein Gen für Spectinomycinresistenz (Sm<sup>r</sup>, dicke, schwarze Linie) ersetzt worden. Die homologe Rekombination mit der Donor-DNA verläuft um so besser, je größer das begleitende Stück Original-DNA auf der Donor-DNA ist. Oberer Teil: Der Vektor wird von der Zelle aufgenommen und die homologe Gensequenz durch Rekombination in das Bakterienchromosom eingebaut. B) Zelle nach der Transformation. Das *psbA-1*-Gen ist durch die Spectinomycinresistenz zu 90% ersetzt worden. Auf diese Art und Weise werden auch die Gene *psbA-2* ( $\rightarrow$  Em<sup>r</sup>), *psbA-3* ( $\rightarrow$  Cm<sup>r</sup>), *apcE* (Tet<sup>r</sup>), *psaA* ( $\rightarrow$  Gm<sup>r</sup>) und *psaB* ( $\rightarrow$  Gm<sup>r</sup>) ersetzt (siehe Text). C) Schematische Darstellung des Plasmids pRD1031 Km<sup>r</sup>. Dieses Plasmid wird verwendet, um in  $\Delta psbA1-3$ -,  $\Delta psaA$ -,  $\Delta psaB$ - und  $\Delta apcE$ - Zellen ein mutiertes *psbA-2*-Gen einzusetzen. Im Falle des WT\* wird ein unverändertes *psbA-2*-Gen transformiert. Farbcode wie in A und B. (Verändert nach [Williams 88])

schematisch in Abbildung 12 dargestellt.

Die einzelnen Transformanten ( $\Delta psbA-1$ ,  $\Delta psbA-2$ ...) können anhand der Antibiotikaresistenzen durch Wachstum auf Agarplatten, die das jeweilige Antibiotikum enthalten, identifiziert werden. Zur Erleichterung der Trennung von Transformanten und unveränderten Zellen wird den Agarplatten Atrazin oder 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethyl-harnstoff (DCMU) hinzugegeben. DCMU und Atrazin hemmen die Photosynthese und eliminieren Vorteile von Zellen mit noch intakten PSII-Genen. Da

*Synechocystis* 6 – 8 Kopien des Bakterienchromosoms enthält, müssen Transformanten über mehrere Generationen immer wieder neu ausgestrichen werden, bis man homozygote Mutanten erhält.

Durch *Southern-Blot*-Analyse von Restriktionsmustern und Sequenzanalyse der mutierten *psbA-2*-Gene in den Mutanten wird die homologe Rekombination überprüft [Chu *et al.* 94b; Chu *et al.* 95c].

### IV.3 Anzucht der Bakterien

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Steriles Animpfen von Flüssigmedien und Agarplatten wurde an der Sterilbank durchgeführt. Glasgeräte wurden für 3 bis 6 Stunden bei 180 °C im Trockenschrank sterilisiert. Lösungen wurden bei 121 °C für 30 – 60 min autoklaviert. Glucosestammlösungen und die 10 l BG11-Medium für die Hauptkulturen wurden sterilfiltriert. Für alle Sterilfiltrationen wurde eine Schlauchpumpe verwendet (Millipore, Easy-Load Masterflex XX80 80 ELO 05). Ansatzstellen von Schläuchen und Filtern wurden mit Ethanol gereinigt.

#### **Anzucht vom WT\*: *Synechocystis* sp. PCC 6803 km<sup>F</sup> *apcE*<sup>-</sup> PSI:**

Ca. 500 µl in Glycerin eingefrorener Zellen wurden auf Agarplatten mit Glucose (siehe IV.4) aufgetragen und wuchsen dann für 1 ½ bis zwei Wochen. Das Wachstum erfolgte bei Raumtemperatur und unter Belichtung von oben durch zwei Neonröhren (Sylvania standard F36w/ 129 – 78). Um einer Schädigung durch zu viel Licht vorzubeugen, wurden die Platten noch mit einer Lage Zellstoffpapier abgedeckt.

Wenn sich ein ausgeprägter grüner Zellrasen auf den Platten gebildet hatte, wurden die Platten abgeerntet und mit einer Platin-Impföse auf 200 ml BG11-Medium (s. IV.4) übertragen. Die Vorkulturen wuchsen dann vier Tage lang im Schüttler bei 100 Umdrehungen pro Minute (UPM) und 31 °C. Dabei erfolgten Begasung mit sterilfiltrierter Raumluft (0.2 µm Einmalfilter von Schleicher & Schuell) und durchgehende Beleuchtung von oben durch acht Neonröhren (6 \* Osram L 18W/21-840, 2 \* Sylvania GRO-Lux F18W/GRO). Alle Kolben wurden mit einer Lage Zellstoff abgedeckt.

Danach wurden je zwei der 200 ml Vorkulturen in einen sterilisierten 10-l-Bottich überführt. Die 10-l-Kolben wurden mit einer Lage Zellstoff abgedeckt. Die Zusammensetzung des Mediums in den 10-l-Bottichen ist unter IV.4 vermerkt. Diese Hauptkulturen wurden in der Regel nach fünf Tagen geerntet; in seltenen Fällen schon bereits nach vier Tagen. Die OD<sub>740</sub> ergab dabei Werte von 0.8 – 1.2. Das Wachstum erfolgte ab dem ersten Tag unter Beleuchtung von vier Osram L 18W/21-840 Neonröhren. Ab dem zweiten Tag wurden 4 weitere dieser Neonröhren hinzugeschaltet. Die Lampen waren als Rondell um die 10-l-Bottiche angebracht. Die Hauptkulturen wuchsen bei 31 °C und wurden mit Magnetrührern (100 UPM) gerührt. Es erfolgte eine gezielte 4%ige CO<sub>2</sub>-Begasung mit Hilfe eines Gasmischers der Firma Witt-Gasetechnik (Gasmischer KM60-2SE). Mit Sterilfiltern der Firma Sartorius (Midisart 2000, mit 0,2 µm Porengröße) wurde die Sterilität der Begasung gewährleistet.

#### **Anzucht der Mutanten**

Die photoautotrophen Mutanten D1-E189K, D1-E189R, D1-E189Q, D1-D61N, D1-D61E und D1-E65Q wurden wie der WT\* angezogen (siehe oben).

Nicht photoautotrophe Mutanten (D1-H332D) wuchsen unter folgenden Bedingungen:

Die Anzucht erfolgte in weiten Teilen ähnlich wie beim WT\*. Es wurden die gleichen Medien und Aufbauten verwendet. Die Vorkulturen wuchsen jedoch 5 Tage lang und abgedeckt mit einer Lage Zellstoffpapier. Die 10 l Bottiche wurden mit einer Lage Zellstoffpapier abgedeckt und bis zur Ernte nur mit vier Neonröhren belichtet. Die OD<sub>740</sub> dieser Mutante bei der Ernte betrug 0.65 – 1.1. Das Wachstum erfolgte auf „IS•“-Platten (siehe IV.4).

Mutanten, denen PSI nicht entfernt worden war (photoautotrophe Mutanten), wurden auf sog. „IIS“-Platten angezogen (siehe IV.4), die zusätzlich Chloramphenicol und Spectinomycin, aber keine Glucose und kein DCMU enthielten. Die weiteren Schritte entsprachen der Anzucht vom WT\* (siehe oben).

Die Anzucht von *Synechocystis* sp. PCC 6803 und seinen Mutanten wurde in unserem Labor von Dr. Monika Hundelt etabliert.

## IV.4 Verwendete Medien

Alle aufgeführten Medien wurden sowohl für den WT\* als auch für die anderen Mutanten benutzt. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Bei Ethanol handelte es sich immer um 99.8%igen Ethanol (p.a.).

### a) Flüssigmedium-Stocklösung („100x BG11“):

Herstellung einer **100fach** konzentrierten Stocklösung:

149.58 g/l	NaNO <sub>3</sub>
7.49 g/l	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
3.6 g/l	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
0.6 g/l	Citrat

Zusätzliche Zugabe von 0.56 ml einer 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA-Lösung (pH 8) und 100 ml der Spurenelemente-Lösung (siehe b).

Die fertige Lösung (schwach violette Färbung) konnte über Monate bei Raumtemperatur gelagert werden.

### b) Spurenelemente-Lösung:

Zusammensetzung einer **1000fach** konzentrierten Spurenelemente-Stocklösung:

2.86 g/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
1.8 g/l	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
0.222 g/l	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0.39 g/l	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
0.079 g/l	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O
0.0494 g/l	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O

Die fertige Lösung konnte über Monate bei Raumtemperatur gelagert werden.

**c) BG-11 Flüssigmedium zur Anzucht von *Synechocystis* sp. PCC 6803:**

Die Vorschrift für die Zusammensetzung des BG11-Flüssigmediums findet sich bei Rippka [Rippka 88].

**Zusammensetzung von 1 l BG11-Lösung:**

- a) 10 ml der 100fach konzentrierten Flüssigmedium-Stocklösung (siehe  
10 ml einer 1 M N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-  
aminoethansulfonsäure-Stocklösung (TES-Lösung); pH 8  
1 ml einer 189 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung  
1 ml einer 175 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung  
1 ml Ammoniumeisen-(III)-citrat-Lösung (Ferric-Lsg.) [6mg/ml]

Diese Lösung wurde mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

**d) Weitere Lösungen**Glucose-Stammlösung:

2 M Glucose wurde sterilfiltriert (Filter: Sartorius, Sartolab V 500). Die Glucoselösung kann nicht autoklaviert werden, da es zur Karamelbildung kommen würde. Die Glasflaschen wurden extra autoklaviert und unter der Sterilbank mit der Glucoselösung befüllt. Lagerung bei 8 °C.

Cycloheximid-Stammlösung: 7.5 mg/ml in Ethanol gelöst. Lagerung bei Raumtemperatur.

Kanamycin-Stammlösung: 20 mg/ml sterilfiltriert (Schleicher & Schuell, Einmalfiltrationsgerät VACUFLO, 0.2 µm Membranfilter, 125 ml) in autoklavierte Eppendorfgefäße. Lagerung bei -20 °C. Für die Hauptkulturen wurden höherkonzentrierte Lösungen mit 50 mg/ml eingefroren.

Spectinomycin-Stammlösung:

20 mg/ml sterilfiltriert (Schleicher & Schuell, Einmalfiltrationsgerät VACUFLO, 0.2 µm Membranfilter, 125 ml) in autoklavierte Eppendorfgefäße. Lagerung bei -20 °C.

Chloramphenicol-Lösung: 10 mg/ml in Ethanol gelöst. Lagerung bei -20 °C.

Ferric-Stammlösung:

Die Ferric-Lösung (6mg/ml) wurde autoklaviert und bei 8 °C gelagert.

DCMU-Stammlösung: 10 mM DCMU in Ethanol gelöst. Lagerung bei 8 °C.

Die 1 M TES-Stocklösung, die 189 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und die 175 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung wurden sterilfiltriert (TES: Sartorius, Sartolab V 500; die Salzlösungen mit Schleicher & Schuell, Einmalfiltrationsgerät VACUFLO, 0.2 µm Membranfilter, 125 ml) und bei Raumtemperatur gelagert.

**e) Vorbereitung des BG11-Mediums für 200 ml Vorkulturen**

Zur BG11-Lösung wurden unter der Sterilbank 1.5 ml der 2 M Glucoselösung hinzugegeben, so daß sich eine Glucoseendkonzentration von 15 mM ergab.

Für 200 ml Vorkulturen wurden außerdem 50 µl einer sterilfiltrierten Kanamycin-Lösung und 500 µl Cycloheximidlösung (Stamm = 7.5 mg/ml in Ethanol gelöst) hinzupipettiert, so daß sich Endkonzentrationen von 5 µg/ml bzw. 18.75 µg/ml einstellten.

**f) Vorbereitung des BG11-Mediums für 10 l Hauptkulturen**

Zusammensetzung:

100 ml	1 M TES pH 8
100 ml	Flüssigmedium-Stocklösung (siehe a)
0.2 g	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
0.4 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O
10 ml	Ammoniumeisen-(III)-citrat-Lösung (Ferric-Lsg.) [6mg/ml]

Der Ansatz wurde mit bidestilliertem Wasser auf 5 l aufgefüllt. Da mit unseren Geräten kein Autoklavieren von 10 l Flüssigmedium möglich war, wurden die 5 l BG11-Medium der Hauptkulturen sterilfiltriert (Filter: Sartorius Sartobran 300, Porengröße 0.45 ± 0.2 µm). Anschließend wurden ein weiteres Mal 5 l bidestilliertes Wasser in den Kolben filtriert (Endvolumen 10 l). Dabei mußte berücksichtigt werden, daß Ferric die Poren der Filter verstopfen würde. Es wurde deshalb extra autoklaviert und nachträglich unter der Sterilbank in die 10 l Medium hinzupipettiert. Außerdem Zugabe (unter der Sterilbank ) von 75 ml der 2 M Glucoselösung (Endkonzentration 15 mM) bei PSI-freien Mutanten und 1 ml der 50 mg/ml Kanamycin-Lösung (Endkonzentration 5µg/ml) bzw. 5 ml einer Cycloheximidlösung (Endkonzentration 3.75 µg/ml) bei allen Zellen.

Bei PSI-haltigen Mutanten wurden nur 25 ml Glucoselösung hinzupipettiert (5 mM Endkonzentration) oder gar keine Glucose (wenn die Mutanten photoautotroph waren).

**g) Herstellung der Agarplatten (Rezeptur für 20 Platten):**

Zur Herstellung der Agarplatten wurden 2 x 1 l Erlenmeyerkolben benötigt.

1. Kolben: 1.5 % (w/v) Select-Agar (15 g, GibcoBRL) + 500 ml bidestilliertes Wasser und ein Rührfisch. Der Kolben wurde mit Alufolie versiegelt.

2. Kolben (Salzlösung): 3 g Natriumthiosulfat + 500 ml bidestilliertes Wasser + 10 ml der Flüssigmedium Stocklösung („100x BG11“, siehe a) + 10 ml 1 M TES pH 8.0. Der Kolben wurde mit Alufolie verschlossen.

Beide Kolben wurden autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 – 60 °C wurde an der Sterilbank weitergearbeitet. Die Salzlösung wurde durch langsames Gießen mit der Agarlösung vereinigt. Danach wurden 250 µl sterile Kanamycinlösung (5 µg/ml Endkonzentration), 1 ml sterile K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (0,175 mM Endkonzentration), 1 ml sterilfiltrierte Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (0.185 mM Endkonzentration), 7.5 ml sterilfiltrierte Glucoselösung (15 mM Endkonzentration) sowie das sterile Ferric (6 mg/l

Endkonzentration) hinzugegeben. Die Lösung wurde langsam (um Schaumbildung zu vermeiden) gerührt. Dann wurden die Platten gegossen und über Nacht trocknen gelassen.

Vor der unmittelbaren Verwendung wurden 100 µl Cycloheximidlösung (Stamm = 7.5 mg/ml in Ethanol gelöst) auf die Platten pipettiert und mit einem abgeflamten Drigalski-Spatel verstrichen. Cycloheximid hemmt die Proteinsynthese von Eukaryonten und half gegen Kontaminationen durch Hefen.

*Synechocystis* ist empfindlich, was die Wahl des Agars angeht. Am besten wuchsen alle Zellen auf Select-Agar der Firma GibcoBRL.

Bei nicht photoautotrophen Mutanten, die kein PSI enthielten, wurden zusätzlich 10 µM DCMU (in Ethanol gelöst) nach dem Abkühlen auf  $\approx 50 - 60$  °C hinzugegeben (siehe IV.1, IV.3). DCMU hemmt die Photosynthese. Durch seine Zugabe sollten Kontaminationen durch WT-Zellen bzw. das Wachstum von Revertanten eingeschränkt werden, die durch ein funktionsfähiges PSII einen Wachstumsvorteil gehabt hätten („IS•“-Platten).

Photoautotrophe Mutanten mit PSI wuchsen entweder auf IS•-Agarplatten oder auf „IIS“-Platten, die keine Glucose und kein DCMU, aber zusätzlich die Antibiotika Spectinomycin und Chloramphenicol enthielten (Endkonzentrationen 20 µg/ml und 2.5 µg/ml).

## IV.5 Ernte der Hauptkulturen

Die Arbeiten wurden bei möglichst wenig Licht und 4 °C durchgeführt. Alle Geräte wie Zentrifugenbecher und Bechergläser und Medien/Chemikalien waren eisgekühlt. Die 10-l-Kulturen wurden durch Zentrifugationen (6 min, 9000\*g und 4 °C, Rotor JA-10 oder GS-3) aufkonzentriert. Der Überstand wurde größtenteils abgegossen, nur ein kleiner Teil wurde auf Eis gelagert aufbewahrt. Mit dem aufbewahrten Überstand wurden die einzelnen Niederschläge in den Zentrifugenbechern in möglichst geringem Volumen resuspendiert. Die einzelnen Resuspensionen wurden dann in zwei weiteren Zentrifugenbechern vereinigt und erneut zentrifugiert (15 min, 9000\*g und 4°C, Rotor JA-10 oder GS-3). Der entstandene Niederschlag wurde wieder mit möglichst geringem Volumen des aufbewahrten Überstandes resuspendiert. Nach der Resuspension wurde das gleiche Volumen an Puffer F (s.u.) zur Resuspension hinzugegeben und für 10 min gerührt. Danach wurde die mit Puffer F versehene Resuspension portioniert und in flüssigem Stickstoff für 2 min schockgefroren. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Zusammensetzung des Puffer F:

40 mM 2-Morpholino-ethansulfonsäure (MES)  
-NaOH (pH 6.35)  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
50% Glycerin (v/v)

Lagerung bei -20 °C.

## IV.6 Steriles Ernten von Stammkulturen

Um Stammkulturen anzulegen, die in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, wurde eine sterile Art der Ernte durchgeführt.

Es wurden 200 ml Kulturen angesetzt (siehe IV.4 e), die bei einer  $OD_{740}$  von 1 – 1.5 geerntet wurden. Die Kulturen wurden unter der Sterilbank in sterile Zentrifugenbecher überführt und bei  $1700 \times g$  für 5 min zentrifugiert ( $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Tischzentrifuge Model TJ-6 Centrifuge, Beckman). Ein Teil des Überstandes wurde zur Resuspension der aufkonzentrierten Zellen aufbewahrt. Die Resuspension wurde mit 80%iger Glycerinlösung versetzt (Endkonzentration 15% Glycerin). Darauf wurde die mit Glycerin versetzte Resuspension in 1-ml-Volumina portioniert und in flüssigem Stickstoff eingelagert. Das Einfrieren in flüssigem Stickstoff ermöglichte eine lange Lagerung reiner Bakterienkulturen.

Zur Herstellung der 80%igen Glycerinlösung wurde Glycerin steril in ein autoklaviertes Gefäß hineinfltriert.

## IV.7 Präparation von PSII-Kernkomplexen

Als Grundlage für die Entwicklung dieser als „C-Präparation“ bezeichneten Präparationsmethode dienten die Vorschriften von Kirilovsky *et al.* [Kirilovsky *et al.* 92], Tang & Diner [Tang und Diner 94] und Hays *et al.* [Hays *et al.* 98].

Als Ausgangsmaterial wurden sowohl eingefrorene Zellen ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , siehe IV.5) als auch frisch geerntete Zellen verwendet. Da fast ausschließlich mit eingefrorenem Material gearbeitet wurde, wurde die Präparation mit diesem Material im weiteren Text beschrieben. Bei der Präparation mit frischem Material entfiel der erste Schritt des Auftauens und Aufkonzentrierens.

Alle Arbeiten wurden mit möglichst wenig Licht oder bei völliger Dunkelheit durchgeführt. Alle verwendeten Geräte und Gefäße sowie Lösungen wurden auf Eis gekühlt. Es wurden ca. 50 - 80 ml der eingefrorenen Zellen verwendet ( $\approx 240\text{ }\mu\text{M Chl}$ ).

Verwendete Puffer und Lösungen:

Puffer A: 20 mM MES-NaOH (pH 6.35), 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 25% (v/v) Glycerin

Puffer B50: 50 mM MES-NaOH (pH 6.35), 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 25% (v/v) Glycerin

Puffer R5: 50 mM MES-NaOH (pH 6.35), 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 25% (v/v) Glycerin, 0.03%  $\beta$ -DM (w/v)

Puffer R50: 50 mM MES-NaOH (pH 6.35), 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM  $\text{MgSO}_4$ , 25% (v/v) Glycerin, 0.03%  $\beta$ -DM (w/v)

10%ige (w/v)  $\beta$ -DM Stammlösung in Puffer B50 gelöst

40%ige PEG-6000 Lösung in Puffer B50 gelöst

Modifizierter Puffer A: Wie Puffer A, aber zusätzlich 50  $\mu\text{g/ml}$  DNase und folgende Proteasenhemmer: 1 mM Capronat, 1 mM PMSF (Stammlösung in Dimethylsulfoxid [DMSO] gelöst) und 1 mM Benzamidin

## IV.7.1 Präparation von PSII-Kernkomplexen aus *Synechocystis* mit Säulenschritt

### a) Präparationsmethode für PSI-freie Zellen (vgl. IV.1):

*Diese Präparationsmethode lieferte das Material für fast alle Messungen mit PSII-Kernkomplexen. Ausnahmen mit Kernkomplexen, die nach IV.7.1 b) präpariert worden waren, wurden im weiteren Text extra hervorgehoben.*

Die in Puffer F eingefrorenen Zellen wurden aufgetaut und für 15 min bei 4° C und 15000\*g (Rotor JA-20) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in modifiziertem Puffer A resuspendiert. Zum Aufbrechen der Zellen mit rotierenden Glaskugeln wurde der resuspendierte Niederschlag in eine sog. *Beadbeater*-Kammer (BioSpec Products, Inc.) von 100 ml Volumen überführt. Dabei wurde gut die erste Hälfte der Kammer mit der Resuspension gefüllt und das restliche Volumen mit den Glasperlen ( $\varnothing = 500 \mu\text{m}$ ). Bevor mit dem Zellaufbruch begonnen wurde, wurde der Ansatz geschüttelt und eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte mit 8 Zyklen. Ein Zyklus bestand dabei aus 22 s, in denen der *Beadbeater* rotierte, und einer dreiminütigen Ruhephase. Durch anschließende Filtration mit einer Filternutsche (Porösität 2, Schott) und Waschen mit Puffer A wurden Glasperlen und der Zellaufbruch voneinander getrennt. Die Filtration erfolgte mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe. Bei stark konzentrierten Proben verstopfte die Nutsche, so daß auf eine neue Filternutsche mit einer größeren Porengröße (Porösität 1, Schott) umgestellt wurde. Zur Entfernung von restlichen Glassplittern und unaufgeschlossenen Zellen wurde eine fünfminütige Zentrifugation bei 2000\*g und 4°C (Rotor JA-10) angeschlossen. Der Niederschlag wurde verworfen und der Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Bei der anschließenden Ultrazentrifugation bei 179000\*g, 4°C und 25 min (Ti70 Rotor) wurden die Phycobilisomen von den Membranen getrennt. Außerdem wurde der übrigbleibende Membran-Niederschlag von Puffer A befreit. Um die Entfernung von Puffer A und den Phycobilisomen sicher zu gewährleisten, wurde noch ein zweiter Waschschritt angeschlossen. Der Niederschlag wurde in Puffer B50 resuspendiert und erneut zentrifugiert (179000\*g, 4°C und 25 min, Ti70 Rotor). Der höhere Anteil von  $\text{CaCl}_2$  im Puffer B50 diente dazu, die Phycobilisomen besser zu entfernen. Von den Überständen beider Ultrazentrifugationen wurden jeweils kleine Proben aufbewahrt, um die Entfernung der Phycobilisomen optisch verfolgen zu können. Der Überstand nach der ersten Ultrazentrifugation war in der Regel eine dicke, trübe, tief blaue Lösung, die stark violett fluoreszierte. Nach der zweiten Ultrazentrifugation war der Überstand nur noch schwach hellblau und fluoreszierte nicht mehr. Das war ein Zeichen dafür, daß die Phycobilisomen erfolgreich entfernt worden waren. Der Niederschlag wurde nun wiederum in Puffer B50 bis zu einer Chlorophyllkonzentration von 50 – 100  $\mu\text{M}$  resuspendiert. Darauf erfolgte eine zehnminütige Detergenzinkubation mit N-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (Endkonzentration = 1%  $\beta$ -DM (w/v)), um die Membranproteine aus den Membranen herauszulösen. Nach der Inkubation wurde die Probe erneut zentrifugiert (164000\*g, 4°C und 55 min, Ti70). Der Überstand wurde auf eine 40-ml-Anionenaustauschersäule (DEAE Toyopearl 650s, Tosoh Corporation) aufgetragen. Zum Entfernen nicht erwünschter Bestandteile der Präparation wurde die Säule mit ca. 750 ml Puffer R5 gewaschen, bis das Eluat nur noch schwach gelb gefärbt war. Dieses Eluat hatte zuerst eine dunkle, rot fluoreszierende Farbe und später eine gelbe Farbe. Anschließend wurde das PSII mit ca. 70 ml Puffer R50 eluiert und in 5-ml-Fractionen portioniert. Die einzelnen Fractionen wurden auf ihren Chlorophyllgehalt bei 675 nm (siehe IV.11) untersucht. Die Fractionen, die ausreichend Chlorophyll enthielten, wurden vereinigt. Um die vereinigte Probe einzuengen, wurde diese in Centriprep-50 Zentrifugenkonzentratoren

überführt (Centriprep-50 Centrifugal Concentrators, Amicon, Inc.) und für 2 – 4 Stunden bei 4°C und 1500\*g (JA-10 Rotor mit Adapter für Centriprep-50 Röhrchen) zentrifugiert, bis die Probe auf das gewünschte Volumen eingengt war. Nach der anschließenden Chlorophyllbestimmung (157 – 1200 µM) wurde die Probe in 500-µl-Portionen aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80°C gelagert.

#### **b) Präparationsmethode für Zellen mit PSI (siehe IV.1):**

Nur einige der ersten Messungen wurden noch mit PSII-Kernkomplexen durchgeführt, die aus PSI-haltigen Zellen isoliert worden waren. Die Präparationsvorschrift findet sich in [Hundelt *et al.* 98a].

Wenn diese Kernkomplexe verwendet wurden, wurde dies im weiteren Text extra vermerkt. Findet sich kein solcher Extrahinweis, so wurden die Messungen mit nach IV.7.1 a) präparierten Kernkomplexen durchgeführt.

#### **Vorbereitung und Regeneration der Säule**

Vor Gebrauch stand die Säule von der letzten Reinigung her auf 20% Ethanol. Zur Entfernung des 20%igen Ethanols wurde die Säule mit ca. 140 ml bidestilliertem Wasser gespült und mit Puffer R5 (siehe IV.7) äquilibriert.

Zur Reinigung der Säule wurde sie mit 120 ml bidestilliertem Wasser und 40 ml 70%igen Ethanol gespült. Anschließend wurde sie mit 120 ml 20%igem Ethanol gespült und so gelagert bis zur nächsten Verwendung (siehe oben).

Eine aufwendigere Regeneration der Säule wurde nach 6 – 7 Präparationen durchgeführt. Hierfür wurde die Säule mit folgenden Lösungen hintereinander gewaschen:

1. 0.2 N HCl
2. Bidestilliertes Wasser
3. 0.2 N NaOH
4. 0.3 M NaCl
5. Bidestilliertes Wasser

Mit Ausnahme des letzten Schrittes wurde mit dem dreifachen Säulenvolumen gespült. Im letzten Schritt wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Eluats wieder neutral war (pH-Universalindikator 1-10, Merck).

#### **Regeneration der Filternutsche**

Nach jeder Präparation wurden die Glasperlen und die Filternutsche von Präparationsrückständen gereinigt. Dazu wurde die Filternutsche mit den Glasperlen an Saugflasche und Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Die Glasperlen wurden mit jeweils 100 ml 1 N Salzsäure und 1 N Natronlauge gewaschen und anschließend mit VE-Wasser nachgespült, bis der pH wieder neutral war (pH-Universalindikator 1-10, Merck). Bei hartnäckigen Verunreinigungen wurde noch mit Isopropanol gewaschen, bis die letzten sichtbaren Präparationsrückstände entfernt waren. Anschließend wurden die Glasperlen für 1 ½ Stunden im Trockenschrank bei 70°C getrocknet und waren danach zur Wiederverwendung bereit.

## IV.7.2 Präparation von PSII-Kernkomplexen aus *Synechocystis* ohne Säulenschritt

Bei dieser verkürzten Präparation war der Ablauf bis zur Detergenzinkubation identisch. Es wurde aber bei einer Chlorophyllkonzentration von 90 – 100  $\mu\text{M}$  mit  $\beta$ -DM inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand direkt ohne vorhergehenden Säulenschritt mit einer 40%igen PEG-6000-Lösung versetzt. Dabei wurden ebenfalls 3 ml PEG-Lösung pro 6 ml Probe hinzugegeben. Es folgte eine Ultrazentrifugation für 25 min bei 171000\*g und 4° C (Ti70). Der Niederschlag wurde mit wenig Puffer R5 resuspendiert. Die Chlorophyllkonzentration wurde bestimmt (224 – 687  $\mu\text{M}$ ) und die Probe in 500  $\mu\text{l}$  Portionen aufgeteilt. Die Portionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

## IV.8 Präparation von Thylakoiden aus *Synechocystis*

Die Präparation von sauerstoffentwickelnden Membranen aus *Synechocystis* (sog. T-Präparationen) basierte auf der Vorschrift von Burnap *et al.* [Burnap *et al.* 89], wurde aber leicht modifiziert. Alle Schritte wurden bei 4 °C und möglichst wenig Licht oder absoluter Dunkelheit durchgeführt. 20 ml eingefrorener Zellen wurden für 15 min bei 20000\*g (Rotor JA20) abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in Puffer HMCS resuspendiert; Inkubation für 1 h im Dunkeln auf Eis. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 20000\*g für 15 min. Der Niederschlag wurde resuspendiert in 40 ml Puffer modifiziertem HMCS (mod.). Die Suspension wurde in eine *Beadbeater*-Kammer überführt und mit 50 ml Glasperlen ( $\varnothing = 0.5$  mm) versetzt. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte im Dunklen mit 5 Zyklen im *Beadbeater*. Jeder Zyklus bestand aus 22 s Aufbrechen der Zellen und 3 min Pause. Die Glasperlen wurden durch Zentrifugation bei 2000\*g (JA-10 Rotor) für 5 Minuten abgetrennt und der Überstand in ein JA-10 Röhrchen überführt. Der Niederschlag wurde noch zwei weitere Male mit Puffer HMCS resuspendiert und zentrifugiert. Alle drei Überstände wurden in einem JA-10 Röhrchen vereinigt. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 8000\*g (JA-10 Rotor) für 12 min zum Abtrennen nicht aufgebrochener Zellen, großer Zelltrümmer und restlicher Glassplitter. Danach wurden die Thylakoide durch 30 min Zentrifugation bei 150000\*g (Ti70 Rotor) abgetrennt, in Puffer HMCS resuspendiert und die Chl-Konzentration bestimmt (siehe IV.11). Das Einfrieren erfolgte in flüssigem N<sub>2</sub>. Lagerung bei –80 °C.

Verwendete Lösungen und Puffer:

HMCS: 50 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES) pH 7.2, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 M Saccharose

HMCS (mod.): 40 ml Puffer HMCS versetzt mit 2.5 mg DNase I (Endkonzentration 50  $\mu\text{g/ml}$ ) + 6  $\mu\text{l}$  Capronsäure (Endkonzentration 1 mM) + 7.9 mg Benzamidin (Endkonzentration 1 mM) + 50  $\mu\text{l}$  PMSF-Lösung (Stammlösung 1 M in DMSO gelöst; Endkonzentration im Puffer HMCS [mod.] = 1 mM). Anschließend wird gerührt und mit HMCS Puffer auf 50 ml aufgefüllt.

## IV.9 Präparation von PSII-angereicherten Membranfragmenten (BBY)

Diese Präparation beruhte auf der Präparationsvorschrift von Berthold *et al.* [Berthold *et al.* 81]. BBY-Präparationen nutzen die Tatsache aus, daß sich Photosystem II bei höheren Pflanzen überwiegend im Bereich der Granathylakoide befindet, während Photosystem I sich im Bereich der Stromathylakoide anhäuft. Bei Verwendung des Detergens Triton X werden nur die Stromabereiche solubilisiert. Durch anschließende Zentrifugation werden die Granabereiche, und damit PSII-haltige Membranen, aufkonzentriert.

Spinat wurde frisch gekauft und präpariert. Die vollständige Präparationsvorschrift für die Spinat-BBY-Präparation findet sich in van Leeuwen *et al.* [van Leeuwen *et al.* 91]. Bei der Präparation von BBY aus Erbsen wurden Modifikationen nach [Bögershausen 97] angewendet.

## IV.10 Präparation von PSII-Kernkomplexen aus Spinat (*Spinacia oleracea* L.)

Als Ausgangsmaterial für PSII-Kernkomplexe aus Spinat dienten die unter Punkt IV.9 angeführten BBY. Die vollständige Präparationsvorschrift ist in der Doktorarbeit von Dr. R. Ahlbrink zu finden [Ahlbrink 02]. Sie basiert auf der von Leeuwen entwickelten Präparationsmethode für PSII-Kernkomplexe aus Spinat [van Leeuwen *et al.* 91; van Leeuwen 93].

## IV.11 Chlorophyllbestimmung

Die Chlorophyllbestimmung wurde nach Lichtenthaler [Lichtenthaler 87] durchgeführt. Je nach Konzentration wurden 10, 30 oder 100 µl der zu messenden Probe mit Methanol (p.A.) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf 1000 µl aufgefüllt. Die Probe wurde gut geschüttelt und für 3 min bei 4 °C und 14000 UPM zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5402). Die Absorption des Überstandes wurde bei 665.5 nm und 720 nm gemessen (Spektralphotometer Hitachi 150-20) und die Chlorophyllkonzentration nach folgender Formel errechnet:

$$[Chl_a]_{mg/ml} = \frac{(A_{665,5} - A_{720}) \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{79,24}$$

Mit einem Molekulargewicht für Chlorophyll *a* von 900 g/mol ergab dies die Konzentration des Chlorophylls in mmol/l:

$$[Chl_a]_{mM} = [Chl_a]_{mg/ml} \cdot \frac{1000}{900}$$

Zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration einer fertigen Probe im Anschluß an eine Messung (siehe IV.15.3 a) wurden 200 µl der Probe mit 800 µl Methanol (p.a.) vermengt

und wie oben beschrieben vermessen. Es wurde überprüft, ob die Anwesenheit des Puffers DB1 und des Elektronenakzeptors 2,5-DCBQ keinen Einfluß auf die Chl-Bestimmung hatte.

## IV.12 Messung der lichtinduzierten Sauerstoffabgabe im Dauerlicht

Die Sauerstoffproduktion im Dauerlicht wurde mit einer temperierbaren Clark-Elektrode gemessen. Die Clark-Elektrode bestand aus zwei Halbzellen, einer polarisierten Platinelektrode und einer Silber/Silberchloridelektrode als Referenzelektrode. In gesättigter KCl-Lösung beträgt das Mittenpotential der Referenzelektrode  $\approx 200$  mV. Das Meßsignal zeigte die Reduktion des produzierten Sauerstoffs der an einer Platinfläche (Katalysator) reduziert wurde (Polarographie). Zwischen der Platin- und der Silberchloridelektrode lag eine Polarisierungsspannung von  $-600$  mV an. Die Proben wurden im Dunkeln vorbereitet und dann mit sättigendem weißen Dauerlicht belichtet. Die dabei entstehenden Signale wurden mit einem X-Y-Schreiber (Servogor 210, Metrawatt) festgehalten. Die Schreibergeschwindigkeit betrug 6 cm/min. Die Messungen wurden bei 21 °C durchgeführt. Bei dieser Temperatur ist die Konzentration des in Wasser gelösten Sauerstoffs  $\approx 0.25$  mM. Mit diesem Wissen konnte die Strecke ermittelt werden, mit der sich die Meßkurven des X-Y-Schreibers auswerten ließen. Zum Kalibrierungspuffer wurden 20  $\mu$ l der Flavinmononukleotidlösung (FMN) hinzupipettiert. Bei Belichtung dieser Probe wurde der gesamte Sauerstoff im Probenvolumen verbraucht, weil FMN unter Belichtung Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduziert. Somit ergab sich eine Kalibrierungsstrecke, die dem Verbrauch von  $\approx 0.25$  mM Sauerstoff im Probenvolumen entsprach. Diese Strecke konnte mit der Sauerstoffproduktion der Kernkomplexe ins Verhältnis gesetzt werden (siehe IV.12.1). Die Schreiberempfindlichkeit betrug 100 mV bei der Kalibrierung. Bei den Messungen der Sauerstoffproduktion wurde die Schreiberempfindlichkeit auf 5 oder 10 mV eingestellt (abhängig von der Größe des Signals). Die Probenkammer war durch eine sauerstoffdurchlässige Teflonmembran (Dicke = 12.5  $\mu$ M) von den Elektroden getrennt.

Die Auswertung der Meßergebnisse und die Ermittlung der Elektronentransportrate ist unter IV.12.1 beschrieben. Die genaue Menge von in Wasser gelöstem Sauerstoff unter Luft beträgt unter Standardbedingungen (20 °C, 1 bar) 0.285 - 0.287 mM ([Estabrook 67] und Tabellen der American Public Health Association). Die vollständige Reduktion des Sauerstoffes durch FMN konnte mit Glucose-Oxidase bestätigt werden. Die Kalibrierungsstrecke war gleich groß beim Einsatz von FMN oder 100  $\mu$ l einer Glucose-Oxidase Stammlösung (1 mg/ml) mit 10 mM Glucose.

### Messung der Sauerstoffproduktion von PSII-Kernkomplexen

Die Sauerstoffproduktion der PSII-Kernkomplexe wurde bei einer Chlorophyllkonzentration von 1.5  $\mu$ M in Puffer DB1 gemessen. Als Elektronenakzeptor für PSII diente 2,5-Dichloro-p-benzochinon (DCBQ), das in einer Konzentration von 1 mM vorlag.

### Messung der Sauerstoffproduktion von BBY

BBY wurden mit 12  $\mu$ M Chl und 100  $\mu$ M 2,5-DCBQ in Puffer BTS-400 vermessen.

Messung der Sauerstoffproduktion von Thylakoiden und ganzen Zellen

Es wurden 5 µM Chl in Puffer DB1 mit Thylakoiden und 5-15 µM Chl mit ganzen Zellen eingesetzt. Als Elektronenakzeptoren wurden 2 mM 2,5-DCBQ zusammen mit 2 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sup>6</sup>, Ferricyanid] verwendet.

**Verwendete Puffer und Lösungen:**

Gesättigte KCl-Lösung als Stromschlüssel zwischen den beiden Halbzellen

Puffer DB1: 50 mM MES (pH 6.6), 1 M Saccharose, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 1 M Glycin-Betain

Kalibrierungspuffer: 50 mM TRICIN; pH 8

100 mM FMN-Lösung (gelöst in bidestilliertem Wasser)

250 mM 2,5-DCBQ-Lösung (in Dimethylsulfoxid [DMSO] gelöst)

Puffer BTS-400 (nur für BBY): 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 400 mM Saccharose, 20 mM Bis-(2-Hydroxyethyl)-amino-tris-(hydroxymethyl)-methan (Bis-Tris) pH 6.5

*Bei älteren Messungen wurde Puffer D anstelle von Puffer DB1 verwendet. Puffer D: 1 M Saccharose, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl + 50 mM MES (pH 6.5). Wenn Puffer D verwendet wurde, so wurde dies im weiteren Text extra angemerkt.*

**IV.12.1 Ermittlung der Elektronentransportrate (ETR)**

Mittels graphischer Extrapolation der Kalibrierungsmessung wurde die Strecke bestimmt, die einem Sauerstoffverbrauch von 0.25 mM Sauerstoff im Probenvolumen entsprach. Ebenfalls durch graphische Extrapolation wurde die Meßstrecke der Sauerstoffproduktion bei der Kernkomplexprobe ermittelt. Division der gemessenen Strecke durch die Eichstrecke unter Berücksichtigung des Empfindlichkeitsfaktors des Schreibers ergab die im Zeitraum entstandene Menge an Sauerstoff. Der Empfindlichkeitsfaktor ist der Quotient aus der Empfindlichkeit des Schreibers bei der Kalibrierungsmessung dividiert durch die Empfindlichkeit bei der Probenmessung. Mit der Annahme, daß pro Mol Sauerstoff vier Elektronen transportiert wurden, errechnete sich, wie viele Elektronen im gewählten Zeitraum transportiert wurden. Abschließendes Dividieren des erhaltenen Wertes durch die eingesetzte Chlorophyllkonzentration ergab die Elektronentransportrate, also die Anzahl der Elektronen, die pro Zeiteinheit und pro Mol Chlorophyll transportiert wurden. Die ganze Rechnung läßt sich in folgender Formel zusammenfassen:

$$ETR = \frac{\left( \frac{\text{Gemessene Strecke}}{1l \cdot \text{Kalibrierungsstrecke} \cdot \text{Empfindlichkeitsfaktor}} \right)}{\text{Zeit}[s] \cdot \text{Chlorophyllkonzentration}[\text{mol} / l]}$$

**Gleichung 1**

in (mmol Elektronen/ mol Chlorophyll\*s)

Mit einem Molekulargewicht von ca. 900 g/mol für Chlorophyll ist der erhaltene Wert identisch mit der in der Literatur oft gebräuchlichen Einheit  $\mu\text{mol Sauerstoff}/\text{mg Chlorophyll}\cdot\text{h}$ .

Die Bestimmung der ETR wurde auch mit Mn-verarmten und durch DCMU gehemmten Kernkomplexen durchgeführt (siehe IV.13).

### IV.12.2 Bestimmung des pH-Optimums der Kernkomplexe

Zur Bestimmung des pH-Optimums dieser Kernkomplexe wurde die pH-Abhängigkeit der Sauerstoffproduktion im Dauerlicht gemessen (modifiziert nach [Schlodder und Meyer 87]). Die ETR wurde, wie im Abschnitt IV.12 beschrieben, bestimmt. Die als Puffer D beschriebene Pufferlösung wurde im pH-Wert und in der puffernden Substanz variiert. Alle übrigen Parameter blieben gleich.

Die zu messende Probe setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

1 mM DCBQ  
1.5  $\mu\text{M}$  Chlorophyll

Um die verschiedenen gewünschten pH-Werte einzustellen, wurde der Puffer D modifiziert:

Puffer D (mod.): 1 M Saccharose, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM NaCl + 50 mM der jeweiligen Puffersubstanz:

<u>Puffersubstanz</u>	<u>eingestellte pH-Werte</u>	<u>pK des Puffers</u>
Glycylglycin	3.5/ 4	3.1
Succinat	4/ 4.5/ 5.1	4.16
MES	5.5/ 6/ 6.25/ 6.5/ 6.75	6.2
HEPES	6.72/ 7/ 8	7.58
TRICIN	8/ 8.5/ 9	8.15
CAPSO	9	9.6

### IV.13 Hemmung und Inaktivierung von PSII-Kernkomplexen

DCMU bindet an die  $Q_B$ -Bindestelle und blockiert damit den Elektronentransport. Das bewirkt im Endeffekt, daß die Wasserspaltung nicht mehr ablaufen kann. Um die Hemmbarkeit dieser Kernkomplexe zu überprüfen, wurde die Sauerstoffabgabe (siehe IV.12) bei unterschiedlichen Konzentrationen von DCMU bestimmt.

Für einige Messungen war es erforderlich, das Mangan aus den Kernkomplexen zu entfernen. Eine Möglichkeit, den Mn-Komplex zu entfernen, ist das Titrieren der Kernkomplexe auf hohe pH-Werte [Ahlbrink *et al.* 98; Cole *et al.* 86]. Die zu messende

Probe wurde im Dunkeln auf einen pH von 9.5 – 10 titriert und 5 min inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert wieder auf 6.5 – 6.6 heruntertitriert. Elektronenakzeptoren wurden nach der pH-Titration hinzugegeben, da sie ansonsten bei hohen pH-Werten ausfallen würden.

## IV.14 Messung der lichtinduzierten Sauerstoffabgabe im Einzelblitz

Für diese Messungen wurde eine spezielle Sauerstoffelektrode (siehe Abbildung 13) entwickelt, basierend auf der von Dr. Michael Haumann entwickelten zentrifugierbaren Sauerstoffelektrode [Haumann 96]. Der Körper der Elektrode bestand zu einem großen



**Abbildung 13: Zentrifugierbare und temperierbare Sauerstoff-Einzelblitz-Elektrode. Links im zerlegten Zustand, rechts zusammengesetzt.**

Anteil aus Kupfer und V2A-Stahl, um eine gute Temperierbarkeit im Wasserbad zu gewährleisten. Die zu vermessenden Proben wurden direkt auf die Platinelektrode zentrifugiert. Um eine höhere zeitliche Auflösung zu erreichen, wurde keine Teflonmembran verwendet. Das bedingte wiederum, daß keine

zusätzlichen Elektronenakzeptoren bei den Messungen verwendet

werden konnten, da diese direkt mit den Elektroden reagiert hätten. An der Platin-Kathode lag eine negative Spannung von  $-800$  mV gegenüber der Anode (Ag/AgCl) an. Die Spannung wurde 1 Minute vor der eigentlichen Messung angelegt. Die gesamte Elektrode war an einem Strom-Spannungs-Verstärker (Eigenbau der Elektronikwerkstatt) angeschlossen. Die Halbwertszeit des Verstärkers wurde über einen induzierten Spannungs-Sprung mit  $\tau_{1/2} = 100$   $\mu$ s bestimmt. Der Lichtblitz (Xenon-Blitzlampe mit Filter RG 610, Eigenbau Elektronikwerkstatt mit 8 - 15  $\mu$ s FWHM, Xenon- Blitzröhre Polytec FX249) wurde über einen Lichtleiter direkt auf die Probe gelenkt. Die Messungen wurden mit einem digitalen Speicherozilloskop (Nicolet Pro 30 oder Nicolet Pro 92) aufgezeichnet.

### Messung der Sauerstoffproduktion durch einzelne Lichtblitze:

Alle Schritte wurden in völliger Dunkelheit durchgeführt. Die Proben wurden in Puffer HMCS-HSB1 (50 mM HEPES pH 7.2, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M Saccharose und 1 M Glycinbetain) aufgenommen. In der Regel wurden 30  $\mu$ l einer 2.7 - 5.4  $\mu$ M Probe (Thylakoide aus *Synechocystis*, siehe IV.8) oder einer 10  $\mu$ M BBY-Probe (siehe IV.9) auf die Platinelektrode hinabzentrifugiert (1700\*g, 10 min, 14 °C. Beckman TJ6 centrifuge mit Ausschwenkrotor). Später wurde eine neue Zentrifuge (Beckman Allegra 25R Hochleistungstischzentrifuge) mit Kühlung und Schwenkbecherrotor (Typ TS-5.1-500) angeschafft, und es konnte bei 4 °C und 1700\*g für 5 min zentrifugiert werden. Die Probe wurde entweder sofort bei Raumtemperatur vermessen, oder es folgte ein zwanzigminütige Temperierung der gesamten Elektrode im Wasserbad (Kälte-Umwälzthermostat Julabo F31-C). Die Temperatur wurde direkt in der Probe mit einem

Molybdän-Meßelement (Digitalthermometer GTH 175/MO, Greisinger electronic) kontrolliert.

Einzelblitzmessungen mit ganzen Zellen wurden mit leichten Modifikationen durchgeführt (nach [Clausen *et al.* 01b]): 25  $\mu\text{M}$  Chl wurden in 20 mM HEPES pH 7.2, 20 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  aufgenommen und in 20  $\mu\text{l}$  Portionen auf die Platinoberfläche pipettiert. Die übrigen Schritte waren identisch.

### Kinetische Messungen:

Mit jeder Probe wurde nur eine Meßserie aufgenommen. Eine Serie bestand aus drei Blitzen im Abstand von 1 s. Die Zeitauflösung des Speicheroszilloskops betrug 20  $\mu\text{s}$ /Punkt (50  $\mu\text{s}$ /Punkt bei ganzen Zellen).

### Sauerstoffproduktion in Abhängigkeit von der Blitznummer:

Mit jeder Probe wurden zwei Meßserien aufgenommen. Eine Serie bestand aus 15 Blitzen im Abstand von 1 s. Der Abstand zwischen den beiden Serien betrug 10 min. Nur die zweite Serie wurde abgespeichert. Die Zeitauflösung des Speicheroszilloskops betrug 500  $\mu\text{s}$ /Punkt. Die blitzabhängige Sauerstoffproduktion ergibt sich aus der Fläche unter dem polarographischen Signal. Das erhaltene Oszillationsmuster ist jedoch identisch mit dem Oszillationsmuster, bei dem man nur die maximale Amplitude des jeweiligen polarographischen Signal gegen die Blitznummer aufträgt [Hundelt *et al.* 98a; Hundelt 99]. Letztgenannte Art der Auftragung wurde für die Bestimmung der Kok-Parameter (s.u.) gewählt.

Die freigesetzte Menge an Sauerstoff ist bei dunkeladaptierten Proben abhängig von der Blitznummer. Sie hat ihr Maximum auf dem dritten Blitz und danach wieder auf jeden vierten Blitz (7. Blitz, 11. Blitz usw.), bis durch Fehlanregungen ( $\alpha$ ) bzw. Doppelanregungen ( $\beta$ ) das Vierer-Oszillationsmuster derartig gedämpft ist, daß die Sauerstoffproduktion auf jeden Blitz nahezu gleich ist [Joliot *et al.* 69; Kok *et al.* 70]. Diese Abhängigkeit der Sauerstoffproduktion wurde genutzt, um die sog. „Kok-Parameter“  $\alpha$ ,  $\beta$  und den dunkeladaptierten Anteil von Zentren im Zustand  $S_1$  zu bestimmen. Die Wahrscheinlichkeit für  $\alpha$  und  $\beta$  wurde für jeden S-Übergang konstant gehalten.

Die Meßdaten wurden mit folgender Gleichung angepaßt (Programmierung des Programms Oxi2 von Olaf Marx) (aus [Hundelt 99]):

$$\begin{pmatrix} S_0^n \\ S_1^n \\ S_2^n \\ S_3^n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha & 0 & \beta & \gamma \\ \gamma & \alpha & 0 & \beta \\ \beta & \gamma & \alpha & 0 \\ 0 & \beta & \gamma & \alpha \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} S_0^{n-1} \\ S_1^{n-1} \\ S_2^{n-1} \\ S_3^{n-1} \end{pmatrix}$$

$\alpha$  = Fehlanregungswahrscheinlichkeit

$\beta$  = Doppelanregungswahrscheinlichkeit

$\gamma = 1 - \alpha - \beta$  = Anteil der Reaktionszentren, die genau einmal angeregt wurden

n = Blitznummer

## IV.15 Blitzlichtphotometrie

Bei der Blitzlichtabsorptionsspektroskopie wird die photosynthetisch aktive Probe durch einen sättigenden Laser- oder Lichtblitz angeregt. Auf Grund der Photochemie kommt es zu Absorptionsänderungen intrinsischer und extrinsischer Moleküle. Die zeitliche Auflösung von Elektronentransferschritten erfolgt durch Messung dieser Absorptionsänderungen durch nicht anregendes, annähernd monochromatisches Meßlicht [Junge 76].

Licht wird beim Durchgang durch Materie absorbiert. Quantitativ beschreibt das Lambert-Beer-Gesetz diesen Vorgang für wäßrige Lösungen. Dieses Gesetz sagt aus, wie sich die Intensität elektromagnetischer Strahlung in einem Probenvolumen der Länge (d) in Abhängigkeit von der Konzentration (c) und dem Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) eines absorbierenden Stoffes im Probenvolumen verändert. Es gilt dann:

$$I = I_0 \cdot 10^{-A} \text{ mit der Absorption } A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

**Gleichung 2**

Dabei ist  $I_0$  die Lichtintensität vor der Probe und  $I$  die Lichtintensität nach der Probe. Bei der Blitzlichtabsorptionsspektroskopie wird die zeitliche Änderung der Intensität des Meßlichtes hinter der Probe gemessen ( $\Delta I$ ). Die relative Änderung der Intensität ( $\Delta I/I$ ) steht mit der Änderung der Absorption  $\Delta A$  in folgendem Zusammenhang:

Für die Intensität des Meßlichtes hinter der Probe gilt:

$$\frac{\Delta I_{(t)}}{I_0} = 10^{-\Delta A_{(t)}} - 1$$

Für hinreichend kleine Absorptionsänderungen ( $\Delta A \ll 1$ ) liefert die Taylorreihenentwicklung hieraus folgende Gleichung:

$$\frac{\Delta I_{(t)}}{I_0} = -\ln 10 \cdot \Delta A \approx -2.3 \cdot \Delta A$$

**Gleichung 3**

Für Absorptionsänderungen, die kleiner sind als 0.043, liefert diese Näherung Ergebnisse mit einem Fehler, der geringer als 5% ist. Somit stellt diese Formel eine wichtige Vereinfachung zur Auswertung von Meßergebnissen.

Durch Mittelwertbildung wird das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert:

Durch Addition von  $N$  gleichartigen Signalen wird das Signal  $N$ -fach verstärkt. Das Rauschen dahingegen beruht auf Zufallsschwankungen, die sich teilweise aufheben. Erstellt man nun das Verhältnis zwischen Signal  $S$  und Rauschen  $R$ , so verbessert es sich um den Faktor  $\sqrt{N}$ :

$$\frac{S}{R} = (N) \propto \frac{N}{\sqrt{N}} = \sqrt{N}$$

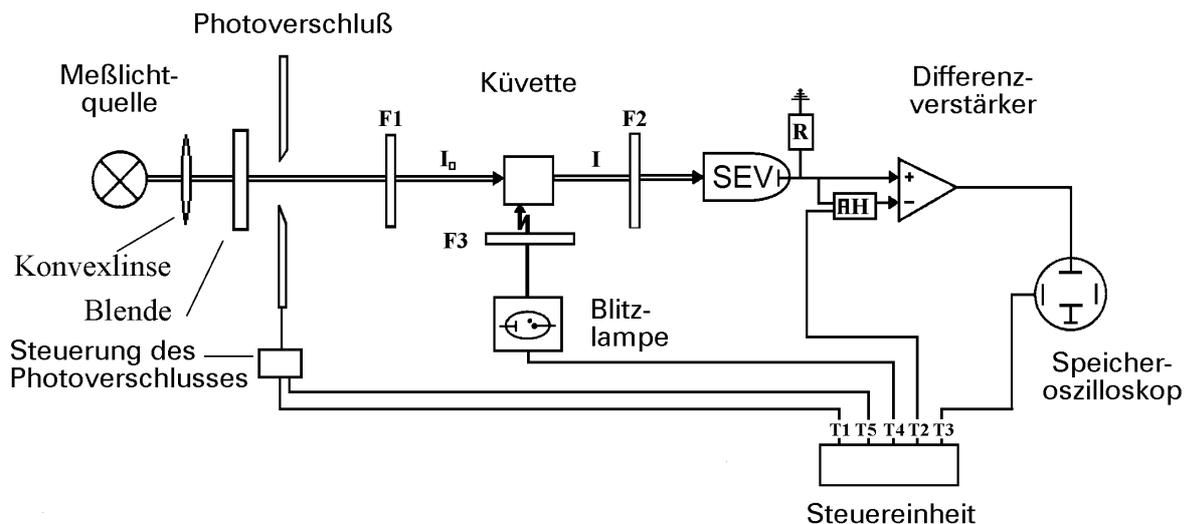
Die spektroskopischen Messungen wurden unter drei verschiedenen Anregungsbedingungen durchgeführt, die in den einzelnen Kapiteln genauer definiert werden und an dieser Stelle nur grob aufgelistet sind:

Langzeit-dunkeladaptierte oder einfach dunkeladaptierte Messungen: Messungen mit Proben, die bis zur Messung immer in vollständiger Dunkelheit gelagert wurden; ohne Wiederholungen.

Repetierend-semidunkeladaptierte Messungen: Proben, die wiederholt durch Blitzserien angeregt wurden mit Dunkelphasen von  $> 1$  min (zwischen den Blitzserien).

Repetierend-dunkeladaptierte oder einfach repetierende Messungen: Proben, die wiederholt durch Blitzserien angeregt wurden mit Dunkelphasen von  $< 1$  min (zwischen den Blitzserien).

#### IV.15.1 Blitzlichtphotometrische Messungen im Mikrosekundenbereich



**Abbildung 14:** Schematische Darstellung des Aufbaus zur Blitzlichtspektralphotometrie:  $F_x$  = Filter, SEV = Sekundärelektronenverstärker,  $R$  = Abschlußwiderstand, AH = Abtast- und Halteverstärker; nach [Polle und Junge 86] verändert. Bei einigen Messungen wurde anstelle der Blitzlampe mit einem Nd:YAG Laser angeregt (siehe Text).

In Abbildung 14 ist der schematische Aufbau der Meßanlage dargestellt. Die Anlage war auf einem schwingungsgedämpften Meßtisch aufgebaut. Dies sollte erschütterungsbedingte Störungen der kleinen Meßsignale verringern. Die Probe befand sich stets in einer Glasküvette mit optischer Weglänge von 1 cm. Die Küvetten (Firma Helma) bestanden aus Quarzglas, so daß Messungen im UV-Bereich durchgeführt werden konnten.

Zur Anregung wurden zwei unterschiedliche Lichtquellen verwendet.

- Bei fast allen Messungen wurden die Proben durch einen Laserblitz angeregt. Es handelte sich um einen frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (Quantel 532 nm,  $Q$ -switch, FWHM 6 ns,  $150 \text{ mJ/cm}^2$ ).

- b) Um die Anregungswellenlänge auswählen zu können, wurde eine Xenon-Blitzlampe (Eigenbau Elektronikwerkstatt mit 8 - 15  $\mu\text{s}$  FWHM, Xenon- Blitzröhre Polytec FX249) verwendet. Durch Wahl entsprechender Filter konnten bestimmte Bereiche des Spektrums ausgewählt werden. In der Regel wurde mit einem Langpaßfilter (RG610, Schott), der nur langwelliges Licht mit einer Wellenlänge  $\geq 610$  nm durchließ (F3, Abbildung 14) angeregt. Nachteilig bei Blitzlampen war die lange Halbwertsbreite des Blitzes (10 – 15  $\mu\text{s}$ ), die Messungen mit einer Zeitauflösung  $< 20$   $\mu\text{s}$ /Punkt verbot. Außerdem war die optische Dichte der Filter bei unerwünschten Wellenlängen oft nicht hoch genug, so daß auch außerhalb des gewünschten Bereiches etwas angeregt wurde. Eine Kombination mehrerer Filter war oft nicht möglich, weil die Sättigung der Probe durch das anregende Licht stets gewährleistet sein mußte.

Als Meßlichtquelle diente eine 200 W Halogenlampe (Osram 64380), die von einem spannungsstabilisierenden Netzgerät (Heinzinger TNs 65-2600,  $\Delta U/U \leq 10^{-6}$ ) versorgt wurde. Die gewünschte Wellenlänge des Meßlichtes wurde mit Interferenzfiltern (F1), die zwischen Probe und Meßlicht angebracht waren, eingestellt. Die einzelnen variierenden Filterkombinationen werden direkt bei den unterschiedlichen, unter IV.15.1.1 bzw. IV.15.1.2 näher erläuterten Meßmethoden aufgeführt. Um Anregung der Probe durch das Meßlicht zu vermeiden, wurde die Meßlichtintensität möglichst niedrig gehalten. Außerdem wurde versucht, durch die richtigen Filterkombinationen Anregung durch das Meßlicht auszuschließen. Weitere Filter wurden direkt vor dem Sekundärelektronenverstärker (SEV) angebracht (F2), um Streulicht des Anregungsblitzes und Fluoreszenzlicht aus der Probe zu verringern.

Der Sekundärelektronenverstärker (Thorn-EMI 9801 QB, 6 Dynoden) detektierte die Veränderung der Meßlichtintensität. Er wurde ebenfalls mit einem stabilisierten Hochspannungsnetzgerät (Heinzinger HNCs 2000-15) betrieben. Die am Abschlußwiderstand R (10 k $\Omega$ ) abfallende Spannung  $U_0$  lag zwischen 300 und 1000 mV. Die Spannung wurde durch Anpassen der Meßlichtintensität und durch Regulierung der Hochspannung am SEV eingestellt. Zwischen einzelnen Messungen wurde die Spannung am SEV nachreguliert, so daß Abweichungen  $> 5\%$  vermieden wurden.

Die Ausgangsspannung  $U_0$  wurde vom Abtast- und Halteverstärker (AH, Eigenbau Elektronikwerkstatt) vor dem Anregungsblitz gemessen und auf den negativen Eingang des Differenzverstärkers (Stanford Research Systems, Model SR 560; bei einigen Messungen Tektronix AM 502 mit TM 501 Power Module) gelegt. Der Anregungsblitz führte zu Absorptionsänderungen in der Probe. Dadurch veränderte sich die Intensität des Meßlichtes, was Spannungsänderungen am SEV von wenigen mV hervorrief ( $U_t$ ). Dieses Signal wurde auf den positiven Eingang des Differenzverstärkers gelegt. Der Differenzverstärker ermittelte dann aus  $U_t - U_0$  die Spannungsdifferenz  $\Delta U_t$ , die als eigentliches auswertbares Meßsignal durch den Differenzverstärker verstärkt und in seiner Bandbreite begrenzt wurde. Die Begrenzung der Bandbreite durch einen Tiefpaßfilter diente der Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses. Sie wurde der Zeitauflösung der Messung entsprechend angepaßt nach folgender Formel:  $BW = 0.35/\text{Zeitauflösung}$  (Zeitauflösung = Digitalisierungszeit des Speicheroszilloskops). Das verstärkte Meßsignal wurden anfangs mit dem digitalen Speicheroszilloskop Nicolet Pro 30 (max. Bandbreite 70 MHz) aufgezeichnet, später mit dem besseren Modell Nicolet Pro 92 (4 Kanäle, 2 x 8 bit, 200 MHz und 2 x 12 bit, 20 MHz).

### **Zeitlicher Ablauf einer Messung**

Die Komponenten der Meßapparatur wurden zu unterschiedlichen Zeiten gestartet. Da es sich dabei um sehr geringe zeitliche Abstände handelte, wurde der gesamte Meßablauf

automatisiert, indem die einzelnen Komponenten durch eine programmierbare Steuereinheit (Eigenbau Elektronikwerkstatt) aktiviert wurden (Abbildung 14). Dadurch waren identische Meßabläufe für jede Messung gewährleistet. Zu Beginn der Messung wurde der Photoverschluß (Compur) geöffnet. Dadurch wurde gewährleistet, daß nur während der Messung das Meßlicht auf die Küvette fiel. Durch das Öffnen des Photoverschlusses traf das Meßlicht  $I_0$  auf die Probe. Es verließ die Küvette wieder mit der Intensität  $I$  und traf auf den SEV. Ca. 100 ms nach dem Öffnen des Photoverschlusses hatte sich die Spannung am SEV stabilisiert, so daß die Steuereinheit den Abtast- & Halteverstärker aktivierte. Dieser maß nun die Spannung  $U_0$ , also die Spannung am SEV vor dem photochemischen Ereignis und behielt diese als Referenz. Dieser Abtast- und Halteverstärker benötigte auch wiederum ca. 100 ms, bis er stabil war. Als nächste Komponente die Steuereinheit das Speicheroszilloskop, bevor der Lichtblitz als viertes von der Steuereinheit ausgelöst wurde. Durch die Aktivierung des Speicheroszilloskops vor dem Lichtblitz wurde erreicht, daß der Vorlauf vor dem eigentlichen photochemischen Ereignis aufgezeichnet wurde. Mit Hilfe dieser Basislinie konnte das eigentliche Signal bei der Computerauswertung entdriftet werden. Die Absorptionsänderungen, die am SEV in einer Spannungsänderung resultierten, wurden gemessen und verstärkt. Nach Ablauf der Messung wurde der Photoverschluß wieder geschlossen.

Bei Messungen mit dem Nd:Yag-Laser löste die Steuereinheit als erstes diesen aus, da systembedingt zwischen Auslösung des Lasers und tatsächlicher Abgabe des Laserblitzes 9 s lagen. Aus dem Laserstrahl wurde über eine schräg gestellte Glasplatte ein geringer Anteil auf eine *Trigger*-Photodiode, die das Speicheroszilloskop auslöste (vgl. IV.15.2), ausgekoppelt. Die anderen Schritte liefen so wie oben beschrieben ab.

#### IV.15.1.1 Bestimmung der Anzahl von Chlorophyllen pro Kernkomplex bei 317 nm

Bei diesen Messungen wurde direkt vor die Küvette ein Interferenzfilter ( $\lambda = 317$  nm, FWHM 6 nm, Schott) installiert. Vor dem Photoverschluß wurde ein DUG11-Bandpaßfilter ( $280 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$ ; siehe Anhang XI.1) angebracht. Das Bandpaßfilter blockte auch die doppelte Wellenlänge des Interferenzfilters ( $\approx 640$  nm). Neben dem Wärmeschutz bewirkte das Bandpaßfilter deshalb auch zusätzlichen Schutz vor Anregung durch das Meßlicht. Angeregt wurde mit einer Blitzlampe (Eigenbau Elektronikwerkstatt mit 8 - 15  $\mu\text{s}$  FWHM, Xenon- Blitzröhre Polytec FX249). Vor dem Anregungslicht war ein Langpaßfilter angebracht worden (RG610, Schott), so daß die Proben nur mit Wellenlängen  $\lambda > 610$  nm angeregt wurden.

Bei 317 nm wurde die Absorptionsänderung von  $Q_A$  gemessen, worüber die Anzahl an Chlorophyllen pro Kernkomplex bestimmt wurde.

Meßbedingungen:

$U_0$  wurde auf 800 mV eingestellt. Am Speicheroszilloskop wurde eine Zeitauflösung von 20  $\mu\text{s}$ /Punkt eingestellt. Die Bandbreite des Tiefpaßfilters betrug 30 kHz. Die Gesamtmeßzeit betrug 100 ms. Wegen der hohen Zeitauflösung wurde das Oszilloskop nicht über die Steuereinheit aktiviert, sondern direkt über eine Photodiode. Sobald diese den Blitz detektierte, wurde das Oszilloskop ausgelöst. Pro Messung wurde ein Blitz gemessen und repetierend bis zu 90 Blitze pro Probe. Der zeitliche Abstand zwischen den Messungen betrug dabei 1 s. Vor der eigentlichen Messung wurden zwei Blitze manuell ausgelöst, um keine dunkeladaptierten PSII-Kernkomplexe zu messen.

Zusammensetzung der Probe:

Puffer  $M^+$ : 20 mM MES (pH 6,5), 20 mM  $CaCl_2$ , 5 mM  $MgCl_2$  und 25% (v/v) Glycerin.  
0,03 %  $\beta$ -DM  
100  $\mu$ M DCBQ (Stammlösung DMSO gelöst) oder 50  $\mu$ M Ferricyanid  
4  $\mu$ M Chlorophyll

Auswertung der Meßergebnisse:

Mit Gleichung 3, Seite 37 ließ sich die Anzahl an Chlorophyllen pro PSII-Kernkomplex errechnen:

$\Delta I_{(t)}/I_0$  wurde 1000fach verstärkt gemessen. Die Absorptionsänderungen waren ausreichend klein, so daß der Fehler bei der Auswertung weit unter 1% lag (siehe IV.15). Mit  $A = \epsilon \cdot c \cdot d$  wurde die  $Q_A$ -Konzentration ermittelt.  $\epsilon$  ist der Extinktionskoeffizient von  $Q_A^-/Q_A$ , der bei 325 nm einen Wert von  $13 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  hat [van Gorkom 74]. Dieser Wert wurde auch für diese Messungen bei 317 nm eingesetzt. Da pro PSII nur ein  $Q_A$  vorkommt, ließ sich die  $Q_A$ -Konzentration mit der Konzentration an PSII-Kernkomplexen in der Probe gleichsetzen. Damit ließ sich durch Division der eingesetzten Chlorophyllkonzentration durch die Konzentration an PSII-Kernkomplexen das Verhältnis von Chlorophyllen pro Kernkomplex bestimmen.

#### IV.15.1.2 Messung der Absorptionsänderungen bei 360 nm

Die S-Übergänge wurden durch Messung der Absorptionsänderungen bei 360 nm beobachtet. Um bei ca. 360 nm messen zu können, wurde direkt vor die Küvette ein Interferenzfilter ( $\lambda = 358.8 \text{ nm}$ , FWHM 6 nm, Schott) installiert.

*Messungen unter erhöhtem Sauerstoffdruck wurden extra unter Punkt IV.15.3 aufgeführt.*

#### Messung der Absorptionsänderungen bei 360 nm in Abhängigkeit von der Blitznummer

Die Zeitauflösung der Messung wurde auf 1 ms/Punkt am Speicheroszilloskop eingestellt. Die Bandbreite des Tiefpaßfilters wurde auf 100 Hz eingestellt, obwohl damit überfiltert wurde. Die Probe wurde mit 9 Blitzen im Abstand von 100 ms angeregt. Vor dem SEV befand sich ein DUG11-Bandpaßfilter.  $U_0$  wurde auf 800 mV eingestellt. Vor dem Photoverschluß wurden zwei DUG11-Bandpaßfilter ( $280 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$ ) und vor dem Anregungslicht ein Langpaßfilter (RG610, Schott) angebracht, so daß die Proben nur mit Wellenlängen  $\lambda > 610 \text{ nm}$  angeregt wurden.

Es wurden sowohl Messungen mit langzeit-dunkeladaptierten Proben und repetierend-semidunkeladaptierten Proben als auch mit repetierend-dunkeladaptierten Proben durchgeführt. Bei langzeit-dunkeladaptierten Messungen wurden die Proben in völliger Dunkelheit angesetzt und jede Probe wurde nur mit einer Blitzserie angeregt. Bei repetierend-semidunkeladaptierten Proben war die Pause zwischen den Meßreihen  $> 1 \text{ min}$  (gewöhnlich 2 min). Repetierend-dunkeladaptierte Proben wurden mit bis zu 15 Blitzserien angeregt (Xenon-Blitzlampe, s.o.), die im Abstand von 25 bzw. 60 s gegeben wurden. Die Chlorophyllkonzentration betrug 4  $\mu$ M im Probenvolumen.

Verwendete Lösungen:

Puffer M<sup>+</sup>: 20 mM MES (pH 6.5), 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% (v/v) Glyzerin

Puffer M<sup>-</sup>: 20 mM MES (pH 6.5), 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

2% β-DM, Endkonzentration 0.03 %

0.1 M DCBQ (in DMSO gelöst), Endkonzentration 200 μM

### Messung der Kinetik von S<sub>3</sub> zu S<sub>0</sub> (360 nm)

Die Zeitauflösung wurde auf 50 μs/Punkt eingestellt. Die Bandbreite des Tiefpaßfilters betrug 10 kHz. Es wurden 5 Blitze aufgezeichnet, deren Pulsabstand 100 ms betrug. Als Filter F1 (siehe Abbildung 14) wurde ein DUG11-Filter eingesetzt. Vor dem SEV befanden sich zwei DUG11 Bandpaßfilter. U<sub>0</sub> wurde auf 1 V eingestellt. Die Chlorophyllkonzentration in der Küvette betrug in der Regel 8 μM. Bei repetierend-semidunkeladaptierten Messungen betrug der Abstand zwischen den einzelnen Messungen 2 min.

Verwendete Lösungen:

Puffer DB1: 50 mM MES pH 6.6, 1 M Saccharose, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 1 M Glycinbetain

2% β-DM, Endkonzentration 0.06 %

0.1 M DCBQ (in DMSO gelöst), Endkonzentration 200 μM

### Messung der Kinetik S<sub>1</sub> ⇒ S<sub>2</sub> und S<sub>2</sub> ⇒ S<sub>3</sub>

Diese Messungen wurden repetierend-semidunkeladaptiert durchgeführt. Die Zeitauflösung betrug 10 μs/Punkt. Die Bandbreite des Tiefpaßfilters wurde auf 100 kHz eingestellt. Pro Meßreihe wurde die Probe dreimal mit 100 ms Blitzabstand angeregt. Nach 2 min folgte die nächste Meßreihe, und insgesamt wurden 5 bis 10 Meßreihen pro Küvette gemessen. Die Chl-Konzentration betrug 8 μM.

Verwendete Lösungen:

Puffer DB1: 50 mM MES pH 6.6, 1 M Saccharose, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 1 M Glycinbetain

2% β-DM, Endkonzentration 0.06 %

0.1 M DCBQ (in DMSO gelöst), Endkonzentration 200 μM

## IV.15.2 Laserphotometrische Absorptionsmessungen im Nanosekundenbereich

Das erste photochemische Ereignis im Reaktionszentrum ist die Oxidation von P<sub>680</sub>. Das Kationenradikal P<sub>680</sub><sup>+</sup> besitzt, wie alle Chlorophyllkationen, bei 820 nm ein breites Absorptionsmaximum mit einem Absorptionskoeffizienten von 6000 – 7000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> [Haumann *et al.* 96; Mathis und Setif 81; Mathis und Verméglio 75]. Die Reduktion des Kationenradikals konnte also gut bei 820 nm verfolgt werden. Hierzu wurde die in Abbildung 15 schematisch dargestellte Meßapparatur verwendet. Diese Apparatur war von

Dr. W. Drevenstedt konstruiert und von Dr. R. Ahlbrink verbessert worden. Die gesamte Anlage war ebenfalls auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut, um der hohen Empfindlichkeit der Laserdiode Rechnung zu tragen, die schon auf geringe Störungen mit Instabilitäten reagierte.

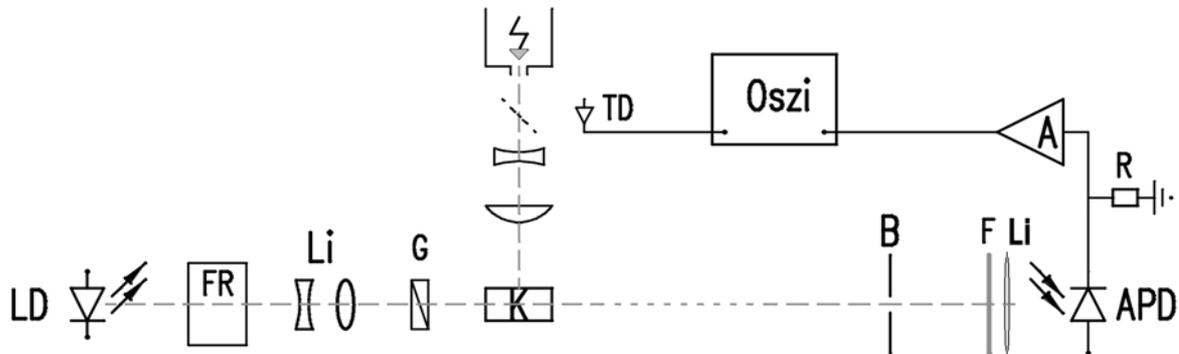


Abbildung 15: Schematischer Aufbau der Meßapparatur zur Messung der Reduktion von  $P_{680}^{++}$ . LD = Laserdiode 827, FR = Faraday-Rotator, Li = Linsensystem, G = Graukeil, K = Küvette, B = Blende, F = Filter, APD = Avalanche-Photodiode, (Anregungslaser) = Anregungslaser, TD = Trigger-Photodiode, Oszi = Speicheroszilloskop, A = Breitbandverstärker, R = Abschlußwiderstand; Zeichnung entnommen aus der Diplomarbeit von Ralf Ahlbrink (1997, Universität Osnabrück), und verändert.

Als Anregungslichtquelle diente ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (Coherent infinity, 532 nm, Pulsbreite 3 ns FWHM), dessen anregender Laserblitz senkrecht zum Meßlicht einfiel. Die maximal verwendete Energie des Laserblitzes betrug 300 mJ im IR-Bereich (1064 nm). Für 532 nm betrug die Energie ungefähr  $400 \text{ mJ/cm}^2$  mit einem Durchmesser des Laserblitzes von ca. 0.6 cm. Der Laserstrahl wurde durch ein Linsensystem aufgeweitet, um die Küvette optimal ausleuchten zu können, so daß die maximale Anregungsenergie bei einer Füllhöhe der Küvette von ca. 1 cm dann bei ungefähr  $80 \text{ mJ/cm}^2$  lag. Gesteuert wurde der Laser durch ein Steuerkästchen (Eigenbau Elektronikwerkstatt), an dem die Blitzanzahl, die Anzahl der Zyklen und der Abstand zwischen den Zyklen einprogrammiert wurden.

Die Absorption der angeregten Probe bei 820 nm ist gering. Um das Meßsignal zu vergrößern, wurde der Weg des Meßlichtes durch die Probe verlängert. Deshalb wurde eine Küvette (Helma, Quarzglas) mit 5 cm Kantenlänge und 5 mm Tiefe verwendet. Das ist möglich, weil die nicht angeregte Probe bei 820 nm so gut wie gar nicht absorbiert.

Eine *single mode* Laserdiode (Sharp LTO15MDO, 827 nm, bei 25 °C und 30 mW) diente als Meßlichtquelle. Der Laserdiodenkopf (Melles Griot 06DLL503) regulierte mit Peltier-Elementen die Temperatur der Laserdiode auf 25 °C. Der Meßlichtstrahl, der von der Laserdiode ausgesendet wurde, hatte ein elliptisches Profil. Mittels einer Kollimatoroptik mußte der divergente Strahl gebündelt werden. Die Steuerung der Temperaturregulation und die Stromversorgung wurden vom Laserdiodentreiber (Melles Griot 06DL203) gewährleistet.

Destabilisierungen der Laserdiode führten zu vermehrtem Auftreten von Modensprüngen. Daraus resultierten Intensitätsschwankungen. Um diese zu verhindern, wurde ein Faraday-Rotator (Gsänger FR800; 30 dB Dämpfung in Rückrichtung) eingesetzt.

Zur Feinjustage des Meßlichtes befanden sich hinter dem Faraday-Rotator eine Konkav- und eine Konvexlinse (Spindler & Hoyer; Brennweite  $-150$  und  $+160$  mm). Der Fokus lag ca. 90 cm hinter der Probe in einer Blendenöffnung. Der große Abstand bewirkte eine räumliche Filterung, in dem das Streulicht von der Blendenöffnung weggestreut wurde und auch nur ein geringer Teil des in alle Richtungen ausgesandten Fluoreszenzlichtes die Blendenöffnung ( $\varnothing 2$  mm) erreichte.

Bei dieser Meßapparatur konnten die Spannungsversorgung des Detektors und die Stromversorgung für die Laserdiode nicht variiert werden. Aus diesem Grund wurde die Meßlichtintensität mit einem Graukeil im Strahlengang reguliert.

Um die Probe in der Küvette vor störendem Raumlicht zu schützen, befand sich die Küvette in einem schwarzen Kasten. An beiden Längsenden des Kastens befanden sich Öffnungen für das Meßlicht. Diese Öffnungen waren mit Rotglasfiltern (RG9, Schott) versehen. Zusätzlich befand sich in einer Seite des Kastens noch eine weitere Öffnung für den anregenden Laserblitz.

Hinter der Blende folgten ein Interferenzfilter für 830 nm und ein dünn polierter Rotglasfilter (RG830, Schott), wodurch gewährleistet werden sollte, daß nur Licht mit der Meßlichtwellenlänge den Detektor erreichte. Das Interferenzfilter wurde so schräg zum Strahlengang gestellt, daß sich das Transmissionsmaximum auf 827 nm verschob (*angle tuned*).

Hinter der Blende befand sich eine Sammellinse, die das Licht auf eine Avalanche-Photodiode (Advanced Photonix SD-6123, aktive Fläche vom  $\varnothing$  1.5 mm, Betriebsspannung 120 V) mit einer Ansprechzeit von 0.5 ns lenkte.

Das detektierte Signal wurde mit einem Breitbandverstärker (Comlinear Corporation CLC100; DC-500 MHz) zehnfach verstärkt.

Die Aufzeichnung des Meßsignals erfolgte mit einem Oszilloskop (Tektronix DSA602, Einschub 11A33 mit 20, 50 oder 150 MHz Bandbreite oder Einschub 11A72 mit 1 GHz Bandbreite). Das Speicheroszilloskop wurde durch eine Photodiode optisch aktiviert, die den Blitz im Küvettenkasten detektierte. Dieses Signal wurde in den 1 GHz-Einschub (11A72) des Speicheroszilloskops eingespeist.

Genauere Details zum Aufbau dieser Anlage finden sich bei Drevenstedt [Drevenstedt 97] und in der Doktorarbeit von Dr. Ralf Ahlbrink [Ahlbrink 02].

*Messungen unter erhöhtem Sauerstoffdruck wurden separat unter Punkt IV.15.3 aufgeführt.*

### **Repetierende Messungen zur Bestimmung der Reduktion von $P_{680}^{+\bullet}$**

Es wurden repetierende Messungen mit unbehandelten PSII-Kernkomplexen und Mn-verarmten Kernkomplexen durchgeführt. Die Zeitauflösung am Speicheroszilloskop wurde auf 4 ns/Punkt eingestellt. Gemessen wurde über einen Zeitraum von 4  $\mu$ s. Das Signal wurde mit einer Bandbreite von 150 MHz oder 1 GHz mit dem Speicheroszilloskop aufgezeichnet. Pro Zyklus wurde die Probe mit 50 Laserblitzen im Abstand von 10 – 100 ms angeregt. Insgesamt wurde jede Probe mit maximal 200 Laserblitzen angeregt. Zwischen den Zyklen lagen 2 min Dunkelphase. Die Messungen wurden bei einer Chlorophyllkonzentration von 15  $\mu$ M – 30  $\mu$ M durchgeführt. Die Anregungsenergie des Lasers lag zwischen 100 und 300 mJ im IR.

Verwendete Lösungen:

Puffer DB1: 50 mM MES (pH 6.6), 25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM NaCl, 1 M Saccharose, 1 M Glycinbetain

2%  $\beta$ -DM, Endkonzentration 0.06%

100 mM DCBQ (in DMSO gelöst); Endkonzentration 1 mM

**Ermittlung des Verhältnisses von Chlorophyllen pro  $P_{680}^{+\bullet}$** 

Für die Bestimmung der Konzentration von  $P_{680}^{+\bullet}$  bei der eingesetzten Chlorophyllkonzentration wurden dieselben apparativen Meßbedingungen eingestellt wie bei den o.g. repetierenden Messungen zur Bestimmung der  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion. Die Laserenergie wurde auf 300 mJ im IR (= 210 mJ bei 532 nm) eingestellt, um möglichst sättigend anzuregen. Die Chl-Konzentration betrug 15  $\mu$ M. Gemessen wurde ausschließlich bei einer Bandbreite von 150 MHz.

Die Konzentration von  $P_{680}^{+\bullet}$  errechnete sich mit den unter IV.15 beschriebenen Formeln folgendermaßen:

Es wurde die Maximalamplitude des Meßsignals bestimmt, die  $-\Delta I/I$  entsprach. Daraus errechnete sich die Konzentration von  $P_{680}^{+\bullet}$ . Division der eingesetzten Gesamtchlorophyllmenge durch die ermittelte  $P_{680}^{+\bullet}$ -Konzentration ergab das Verhältnis von Chlorophyllen pro  $P_{680}^{+\bullet}$  und damit gleichbedeutend das Verhältnis von Chlorophyllen pro PSII.

Verwendete Lösungen:

Puffer  $M^+$ : 20 mM MES (pH 6.5), 20 mM  $CaCl_2$ , 5 mM  $MgCl_2$ , 25% (v/v) Glycerin  
2%  $\beta$ -DM, Endkonzentration 0.03%  
100 mM DCBQ (in DMSO gelöst); Endkonzentration 1 mM

**Messung der Abhängigkeit der Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  von der Blitznummer in Mn-verarmten Kernkomplexen.**

An langzeit-dunkeladaptierten Kernkomplexen, aus denen das Mangan entfernt worden war (siehe IV.13), wurde die Rekombination von  $P_{680}^{+\bullet}$  mit  $Q_A^{\bullet-}$  spektroskopisch bei 827 nm verfolgt.

Die Anregungslaserenergie betrug 210 mJ (= 300 mJ im IR). Dies war nötig, um möglichst sättigend anzuregen. Die Bandbreite des Speicheroszilloskops wurde auf 20 MHz eingestellt, da mit einer Zeitauflösung von 10  $\mu$ s/Punkt gemessen wurde. Die Chlorophyllkonzentration betrug 15  $\mu$ M in der Probe. Mit jeder Küvettenfüllung wurde nur eine Messung durchgeführt. Die Probe wurde mit vier Laserblitzen im Abstand von 10 ms angeregt. Es wurde bei absoluter Dunkelheit gearbeitet.

Verwendete Lösungen:

Puffer  $M^+$ : 20 mM MES (pH 6.5), 20 mM  $CaCl_2$ , 5 mM  $MgCl_2$ , 25% (v/v) Glycerin  
2%  $\beta$ -DM, Endkonzentration 0.03%  
100 mM DCBQ (in DMSO gelöst); Endkonzentration 1 mM

**Messung der Rate der Rekombination zwischen  $P_{680}^{+\bullet}$  und  $Q_A^{\bullet-}$** 

Es wurden Mn-verarmte (siehe IV.13) PSII-Kernkomplexe verwendet, die nach IV.7.1 b präpariert worden waren. Die Probe wurde mit 50 Zyklen angeregt. Jeder Zyklus bestand aus zwei Blitzen im Abstand von 20 ms. Zwischen jedem Zyklus lagen 500 ms. Nur der zweite Blitz eines jeden Zyklus wurde aufgezeichnet, da im zweiten Blitz  $P_{680}^{+\bullet}$  fast ausschließlich durch Rekombination mit  $Q_A^{\bullet-}$  reduziert wird. Die Chl-Konzentration betrug

50  $\mu\text{M}$ . Die Bandbreite des Speicheroszilloskops wurde auf 20 MHz eingestellt (Zeitauflösung 4  $\mu\text{s}$ /Punkt).

Verwendete Lösungen:

Puffer: 20 mM HEPES pH 8.0, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$

200  $\mu\text{M}$  DCBQ (Endkonzentration)

1 mM Ferricyanid (Endkonzentration)

### IV.15.3 Spektroskopische Messungen unter erhöhtem Sauerstoffpartialdruck

Für Messungen unter erhöhtem Sauerstoff- oder Stickstoffdruck wurde im Rahmen der



**Abbildung 16: Druckzelle für spektroskopische Messungen unter erhöhtem Druck. Ansicht auf das Saphirglasfenster für den anregenden Laserblitz. Der nach links oben herausragende Aufsatz trägt den Drucksensor.**

Doktorarbeit eine neuartige Druckzelle konstruiert (Abbildung 16), die eine 1-cm-Kuvette aufnehmen konnte. Die Druckzelle wurde im Strahlengang an diejenigen Stellen platziert, an denen in Abbildung 14 und Abbildung 15 die Kuvetten abgebildet wurden. Der Deckel der Druckkammer trug den Drucksensor und das Ventil (Omnifit, *small manual rotary 4-port valve*), über welches Proben und Elektronenakzeptoren in die Kuvette injiziert werden konnten. Die Begasung der Kammer erfolgte über ein seitlich angebrachte Kipphebel- oder Kugelhahnventil (B.E.S.T. Ventil + Fitting GmbH; das Ventil ist in dieser Abbildung nicht sichtbar). Die Gläser der Kammer für den Durchgang des Meßlichts und für das Anregungslicht bestanden aus Saphirglas (Bieg, Badische Industrie-Edelstein-Gesellschaft mbH), das eine noch höhere Transmission für UV-Licht hat als Quarzglas (85% bei 360 nm). Die Kammer wurde aus V2A-Stahl gefertigt.

Folgende Drucksensoren wurden verwendet:

Drucktransmitter Typ 691, 0 – 40 bar absolut (Huba Control AG)

Drucktransmitter Typ 691, 0 – 40 bar relativ (Huba Control AG)

Transmitter PRI0250A0NCQ-SQ01787, 0 – 20 bar absolut (Sensortechnics GmbH).

Aus Sicherheitsgründen wurde immer mit Schutzvisier (Gesichtsvollschutz) und einstellbarem

Rückschlag- und Überstromventil gearbeitet. Das Überstromventil war in Reihe mit dem Begasungsventil geschaltet und öffnete bei Drücken > 30 bar.

### Vorbereitung der Probe:

50 ml Puffer DB1 wurden in die Pufferkammer gefüllt. Das Volumen wurde zweimal mit reinem Sauerstoff gespült. Dann wurde der gewählte Druck eingestellt und der Puffer für mindestens 40 Minuten unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Pufferkammer möglichst schnell geöffnet und das errechnete Volumen DB1 Puffer wurde möglichst schnell ohne Druck in die Quarzglasküvette gefüllt, die sich in der Druckzelle (Abbildung 16) befand. Die Druckzelle wurde versiegelt und zweimal mit Sauerstoff gespült. Der gewünschte Sauerstoffdruck wurde eingestellt und anschließend wurde der Puffer für weitere 10 Minuten unter diesem Sauerstoffdruck begast.



**Abbildung 17: Pufferkammer zur Vorinkubation des Meßpuffers DB1. Nach rechts ragt das Kugelhahnventil zur Begasung der Kammer heraus. In rot ist der Drucksensor zu erkennen.**

In fast völliger Dunkelheit (nur eine abgeblendete Grünlichtlampe diente als verbleibende Lichtquelle) wurde die errechnete Menge an Kernkomplexen mit einer Hamilton-Spritze aufgenommen (typischerweise um die 50  $\mu\text{l}$ ) und gegen den Druck in der Druckzelle in die Küvette injiziert (dreimaliges Spülen). Die Probe wurde dann für weitere 20 Minuten unter diesem Druck inkubiert. Anschließend wurden 160  $\mu\text{l}$  DCBQ-Lösung mit einer Hamilton-Spritze injiziert (dreimaliges Spülen) und die fertige Lösung für 5 Minuten stehen gelassen (2 Minuten mit Rühren, 3 Minuten ohne). Die Vorbereitung der Probe war damit abgeschlossen und die Druckzelle wurde in den optischen Meßstand eingebaut.

#### IV.15.3.1 Messung der S-Übergänge bei 360 nm unter erhöhtem Sauerstoffdruck

Die S-Übergänge wurden durch Messung der Absorptionsänderungen bei 360 nm beobachtet. Um bei ca. 360 nm messen zu können, wurde direkt vor die Küvette ein Interferenzfilter ( $\lambda = 358.8$  nm, FWHM 6 nm, Schott) installiert. Vor der Küvette befand sich 1 DUG11-Filter und vor dem SEV befanden sich zwei DUG11-Filter. Die Anregung erfolgte mit einem Nd:YAG Laser (Quantel 532 nm, *Q-switch*, FWHM 6 ns,  $150 \text{ mJ/cm}^{-2}$ ). Die Meßapparatur war dieselbe wie sie in Abschnitt IV.15.1 beschrieben wurde.

##### a) Messung des S-Übergangs $S_4 \rightarrow S_0$

Die Zeitauflösung betrug 50  $\mu\text{s}$ /Punkt,  $U_0 = 1$  V und die Bandbreite des Tiefpaßfilters 10 kHz. Es wurde eine Blitzserie bestehend aus 5 Blitzen mit 100 ms Abstand mit einer langzeit-dunkeladaptierten Probe aufgezeichnet. Die Chl-Konzentration variierte systembedingt. Die Probenmenge ließ sich mit der Hamilton-Spritze im Dunklen nicht mikrolitergenau einstellen. Es wurde versucht, diejenige Menge an Chl-Lösung aufzunehmen, die einer Endkonzentration von 8  $\mu\text{M}$  entsprechen würde. Zur Kontrolle wurde am Ende der Messung von jeder Probe ein Chl-Bestimmung (siehe IV.11) durchgeführt. Die Chlorophyllbestimmungen ergaben eine Streuung der eingesetzten Chl-Menge von 7 bis 15.2  $\mu\text{M}$ .

Verwendete Lösungen:

Puffer DB1: 50 mM MES pH 6.6, 1 M Saccharose, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 1 M Glycinbetain  
2% β-DM, Endkonzentration 0.06 %  
0.1 M DCBQ (in DMSO gelöst) wurden 1:25 verdünnt in DB1. Endkonzentration 200 μM

### **b) Messung der S-Übergänge S<sub>1</sub> ⇒ S<sub>2</sub> und S<sub>2</sub> ⇒ S<sub>3</sub> bei erhöhtem Sauerstoffdruck**

Im wesentlichen identisch zu IV.15.3.1 a).

Einstellungen: Zeitauflösung = 10 μs/Punkt, Bandbreite des Tiefpaßfilters 100 kHz, U<sub>0</sub> = 1 V. drei Blitze pro Meßserie. Es wurden langzeit-dunkeladaptierte Messungen aufgezeichnet (eine Meßserie / Probe) und repetierend-semidunkeladaptierte Messungen (fünf Meßserien / Probe; 2 min Dunkelphase zwischen jeder Meßserie).

Verwendete Lösungen und eingesetzte Chl-Menge wie oben (IV.15.3.1 a).

### **IV.15.3.2 Messung der blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei 827 nm unter erhöhtem Sauerstoffdruck**

Die Meßapparatur war identisch mit der in Abschnitt IV.15.2 beschriebenen Anlage. Da unter erhöhtem Sauerstoffdruck nur Küvetten mit 1 cm Kantenlänge benutzt werden konnten, mußten die Konzentrationen in den Lösungen erhöht werden, um ein ausreichend gutes Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten.

### **a) Repetierende Messungen zur Bestimmung der Reduktion von P<sub>680</sub><sup>+</sup> unter erhöhtem Sauerstoffdruck**

Es wurden repetierende Messungen mit PSII-Kernkomplexen aufgenommen. Die Zeitauflösung am Speicheroszilloskop wurde auf 4 ns/Punkt eingestellt. Gemessen wurde über einen Zeitraum von 4 μs. Das Signal wurde mit einer Bandbreite von 1 GHz (Einschub 11A72) mit dem Speicheroszilloskop aufgezeichnet. Pro Zyklus wurde die Probe mit 50 Laserblitzen im Abstand von 100 ms angeregt. Insgesamt wurde eine Probe maximal mit 200 Laserblitzen angeregt. Zwischen den Zyklen lagen 2 min Dunkelphase. Die Messungen wurden bei einer Chlorophyllkonzentration von 35 μM durchgeführt. Die eingesetzte Chl-Menge variierte (siehe IV.15.3.1 a) und wurde nach IV.11 im Anschluß an die spektroskopische Messung bestimmt. Die Anregungsenergie des Lasers betrug 300 mJ im IR (effektiv ≈ 150 mJ im IR, da ein Strahlteiler in den Strahlengang eingesetzt war).

Verwendete Lösungen:

Puffer DB1: 50 mM MES (pH 6.6), 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 1 M Saccharose, 1 M Glycinbetain  
2% β-DM, Endkonzentration 0.08%  
250 mM DCBQ (in DMSO gelöst); Endkonzentration 1.3 mM

**b) Messung der Abhängigkeit der Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  von der Blitznummer unter erhöhtem Sauerstoffdruck.**

Messungen mit langzeit-dunkeladaptierten Kernkomplexen. Die Anregungsenergie des Lasers betrug  $\approx 150$  mJ (= 300 mJ im IR, plus eingesetztem Strahlteiler). Die Bandbreite des Speicheroszilloskops wurde auf 20 MHz eingestellt, da mit einer Zeitauflösung von 10  $\mu$ s/Punkt gemessen wurde. Um das Signal/Rausch Verhältnis zu verbessern, wurde bei späteren Messungen zwischen Oszilloskop und Verstärker (siehe Abbildung 15) ein parallel geschalteter Kondensator (92 nF) eingesetzt. Damit wurde die Bandbreite auf 76 kHz verringert. Die Chlorophyllkonzentration betrug  $\approx 35$   $\mu$ M in der Probe (zur Ungenauigkeit der eingesetzten Chl-Menge siehe IV.15.3.1 a). Mit jeder Küvettenfüllung wurden ein bis vier Messungen durchgeführt. Eine Messung bestand aus neun Laserblitzen im Abstand von 10 ms. Es wurde bei absoluter Dunkelheit gearbeitet. Nur die Injektion der Probe in die Druckzelle erfolgte bei abgeblendetem Grünlicht.

Puffer DB1: 50 mM MES (pH 6.6), 25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM NaCl, 1 M Saccharose, 1 M Glycinbetain

2%  $\beta$ -DM, Endkonzentration 0.08%

250 mM DCBQ (in DMSO gelöst); Endkonzentration 1.3 mM

**IV.15.3.3 Messung der blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei anderen Wellenlängen unter erhöhtem Sauerstoffdruck**

Die Meßapparatur war identisch mit der im Abschnitt IV.15.1 beschriebenen. Angeregt wurde mit einem Nd:YAG Laser (Quantel 532 nm, *Q-switch*, FWHM 6 ns, 150 mJ/cm<sup>2</sup>). Die Chl-Injektion erfolgte mit einer Hamilton-Spritze. Die eingesetzte Chl-Menge variierte (siehe IV.15.3.1 a) und wurde nach IV.11 im Anschluß an die spektroskopische Messung bestimmt.

Einstellungen: Zeitauflösung 10  $\mu$ s/Punkt, Bandbreite des Tiefpaßfilters 100 kHz,  $U_0 = 1$  V. Drei Blitze pro Meßserie. Es wurden langzeit-dunkeladaptierte Messungen aufgezeichnet (Eine Meßserie/Probe) und repetierend-semidunkeladaptierte Messungen (fünf Meßserien/Probe; 2 min Abstand zwischen jeder Meßserie).

Verwendete Lösungen:

Puffer DB1: 50 mM MES pH 6.6, 1 M Saccharose, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM NaCl, 1 M Glycinbetain

2%  $\beta$ -DM, Endkonzentration 0.06 %

0.1 M DCBQ (in DMSO gelöst) wurden 1:25 verdünnt in DB1. Endkonzentration 200  $\mu$ M

Folgende Filter wurden verwendet:

**Tabelle 3: Filterkombinationen für Messungen der blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei unterschiedlichen Wellenlängen.**

Wellenlänge	Filter vor der Küvette	Filter hinter der Küvette
673 nm	IF 673	RG610, IF 671
465 nm	IF 460.9	IF 469.7, DT Blau
425 nm	IF 425	DT Blau
402 nm	IF 401.8	DT Blau
295 nm	IF 294.1	

## IV.16 Messung des Absorptionsspektrums von PSII-Kernkomplexen

Um einen Hinweis auf die Reinheit der präparierten PSII-Kernkomplexe zu bekommen, wurden von den verschiedenen Präparationstypen Absorptionsspektren von 300 bis 800 nm gemessen. Dazu wurden die aufkonzentrierten PSII-Kernkomplexe im Puffer B50 verdünnt und das Spektrum mit einem Spektralphotometer (DW-2000 UV-VIS Spectrophotometer, SLM·Aminco, SLM Instruments, Inc.) gemessen.

Puffer B50: 50 mM MES-NaOH (pH 6.35), 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 25% (v/v) Glycerin

## IV.17 Gelelektrophorese

Die Polypeptidzusammensetzung der PSII-Kernkomplexe wurde mit einer SDS-PAGE in Gegenwart von 1 M Harnstoff analysiert. Dafür wurde ein 10 – 20%iges Gradientengel benutzt, wie es von Chua [Chua 80] beschrieben wird. Die Proben wurden in 1.6%igem SDS-Probenpuffer für 1 min bei 100 °C gekocht und dann 10 –15 min ohne weiteres Erhitzen stehen gelassen. Das Gel lief 19 h bei Raumtemperatur und 40 V (Heinzinger TNs 300 – 120). Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R - 250. Das Gel war 1.5 mm dick mit einer Größe von 11 \* 15 cm. Die Gelapparatur (V16 – 2) stammte von Bethesda Research Laboratories, Life Technologies, Inc.

Zusammensetzung der Lösungen:

Zwanzigfach konzentrierter Kathodenpuffer (oberes Reservoir):

0.04 M TRIS; pH 8.64 mit Borsäure eingestellt  
 0.04 M Borat  
 2% SDS (w/v)

Lagerung bei 4 – 8 °C. Vor der Verwendung wurde der Puffer zwanzigfach verdünnt. In den einfach konzentrierten Puffer wurde dann 1 M Harnstoff eingewogen.

Vierfach konzentrierter Sammelgelpuffer:

0.05 M TRIS (pH 6.1)  
0.03 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Fünffach konzentrierter Anodenpuffer (gleichzeitig Trenngelpuffer):

0.42 M TRIS (pH 9.18)  
0.03 M HCl

Lagerung bei 4 – 8 °C. Vor der Verwendung wurde der Puffer verdünnt. In den einfach konzentrierten Puffer wurde 1 M Harnstoff eingewogen.

Probenpuffer (nach Laemmli [Laemmli 70]):

1.6% SDS  
1 M Harnstoff  
12.5% Glyzerin (w/v)  
50 mM TRIS/HCl (w/v) ; pH 7.6  
0.0013% Bromphenolblau (w/v)  
1% β-Mercaptoethanol (v/v)

Für das Trenngel wurden eine 20%ige und eine 10%ige Acrylamidlösung hergestellt. Mit einem Gradientenmischer (Eigenbau feinmechanische Werkstatt) wurde der Gradient erzeugt.

Zusammensetzung und Pipettierschema des Gradientengels (Endvolumen = 45 ml):

	<u>20% Acrylamid</u>	<u>10% Acrylamid</u>
40% Acrylamid – 1.06% Bisacrylamid	22.5 ml	11.25 ml
5fach konz. Trenngelpuffer	9 ml	9 ml
60%ige Saccharoselösung (w/v)	12.9 ml	3.8 ml
10% SDS (w/v)	0.45 ml	0.45 ml
H <sub>2</sub> O	-	20.35 ml
TEMED	10 µl	20 µl
10% APS (w/v)	0.15 ml	0.15 ml

Zusammensetzung und Pipettierschema des Sammelgels (Endvolumen = 20 ml):

	<u>6% Acrylamid</u>
40% Acrylamid – 1.06% Bisacrylamid	3 ml
4fach konz. Sammelgelpuffer	5 ml
10% SDS (w/v)	0.2 ml
H <sub>2</sub> O	11.6 ml
TEMED	20 µl
10% APS (w/v)	0.2 ml

Das Gel wurde ½ bis 1 Stunde in der Färbelösung auf einer Wippe inkubiert. Danach wurde es vorsichtig mit Wasser abgespült und über Nacht in der Entfärbelösung auf der Wippe entfärbt.

Zusammensetzung der Färbelösung:

0.5% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R – 250 (BioRad)  
50% (v/v) Methanol  
5% (v/v) Essigsäure  
Bidestilliertes Wasser

Zusammensetzung der Entfärbelösung:

25% Methanol  
5% Essigsäure  
Bidestilliertes Wasser

## IV.18 Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde nach Pierce (Pierce Chemical Company, 1989) mit BCA-Bestimmungsreagenz (Best.-Nr. 23225) durchgeführt.

## IV.19 Spektroskopische Geräte

Shimadzu UV-2501 PC

zur detaillierten Aufnahme von Absorptions- und Transmissionspektren

SLM Aminco DW-2000 UV-VIS Spectrophotometer

zur detaillierten Aufnahme von Absorptions- und Transmissionspektren

HP 8453E UV-visible Spectroscopy System

zur schnellen Aufnahme von Absorptions- und Transmissionspektren

Hitachi 150-20 Spectrophotometer

zur Bestimmung von Chl- und Proteinkonzentration bei einzelnen Wellenlängen

SLM Aminco 8100 Fluoreszenzspektroskop mit zwei MC400 Monochromatoren für Fluoreszenzmessungen

## IV.20 Zentrifugen und Rotoren

Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments  
mit den Rotoren SS-34 und GS 3

Model TJ-6 Centrifuge + Model TJ-R Refrigeration Unit, Beckman

Avanti J-30 I Centrifuge, Beckman

mit Rotoren JA-10 und JA-20

L5-65 B Ultracentrifuge, Beckman

mit den Rotoren Ti70 und Ti 45

Allegra 25R Hochleistungstischzentrifuge mit Kühlung  
mit Schwenkbecherrotor Typ TS-5.1-500

Eppendorf Centrifuge 5402

## IV.21 Verwendete Software

GRAFWFT (K. Lakomiak) zur Konvertierung von Datendateien in ein X-Y-Format

ORIGIN 5.0 (Microcal) zur Auswertung und Darstellung von Daten

Mathcad 2100i Professional zur Simulation von Reaktionsmodellen und Entfaltung der polarographischen Messungen

Reference Manager Professional Network Edition Version 10 zur Verwaltung der Literatur und zur Erstellung des Literaturverzeichnisses.

SLM Spectrum Processor 1.1a (SLM Instruments, Inc.) zur Bearbeitung von Daten des Spektralphotometers (Siehe IV.12).

Adobe Photoshop 4.0 (Adobe) zur Bearbeitung von Graphiken

Word 7.0 (Microsoft) zur Verfassung dieser Arbeit

## V. Charakterisierung der PSII-Kernkomplexe

### V.1 Einleitung

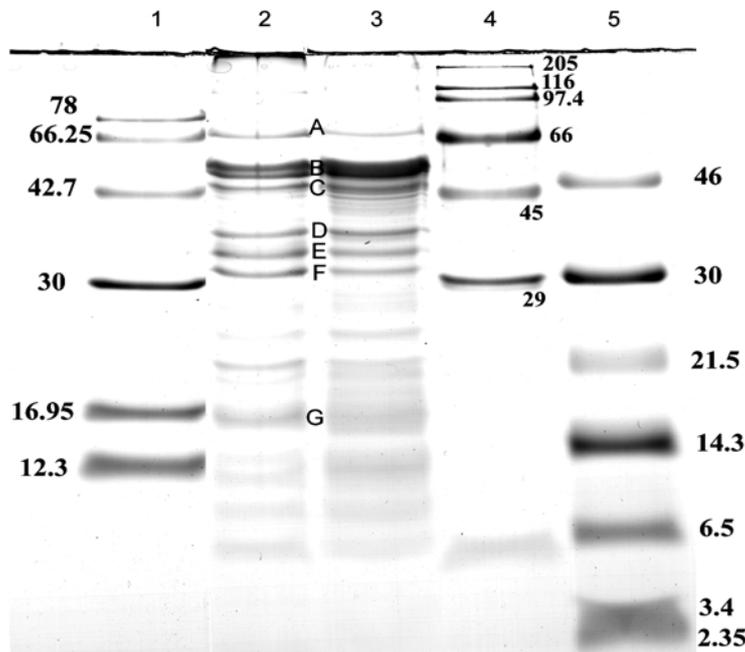
Für spektroskopische Messungen sind Präparationen von PSII-Kernkomplexen wesentlich besser geeignet als Messungen an ganzen Zellen oder Präparationen von Thylakoiden bzw. Thylakoidfragmenten. Kernkomplexe liefern das beste Signal-Rausch-Verhältnis der o.g. möglichen Proben, bedingt durch das niedrige Chl/PSII-Verhältnis und die geringe Streuung des Meßlichtes. Auf der anderen Seite bedeutet die Präparation von PSII-Kernkomplexen, daß die Präparate nicht mehr in ihrer natürlichen Umgebung (der Thylakoidmembran, die wiederum im Chloroplasten-Stroma liegt) vorliegen. Das Milieu bei isolierten Kernkomplexen ist also ein anderes als *in vivo* und die natürlichen Elektronenakzeptoren sowie andere Proteine, die die Aktivität von PSII regulieren, fallen weg. Im Zuge der Präparation wurden die Phycobilisomen (die Antennen für PSII bei Cyanobakterien) weitgehend entfernt und darüber hinaus auch andere Komponenten der Elektronentransportkette, die ebenfalls die Aktivität von PSII beeinflussen. Deshalb können sich durch die Präparation die biochemischen und spektroskopischen Eigenschaften der isolierten Kernkomplexe von PSII-Kernkomplexen in Thylakoidmembranen unterscheiden. Um herauszufinden, unter welchen Bedingungen die besten Ergebnisse erzielt werden können, wurden verschiedene biochemische und biophysikalische Messungen zur Charakterisierung der Kernkomplexe durchgeführt. Die Ergebnisse wurden dann teilweise sowohl mit Ergebnissen von Thylakoiden aus *Synechocystis* bzw. ganzen *Synechocystis*-Zellen als auch mit PSII-Kernkomplexen und Thylakoidfragmenten (sog. BBY [Berthold *et al.* 81]) aus Spinat (*Spinacia oleracea* L.) und Erbsen (*Pisum sativum* L., cv. Kleine Rheinländerin) verglichen.

Zur Präparation von PSII-Kernkomplexen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde eine neue Präparationsvorschrift entwickelt, die auf den Vorschriften von Kirilovsky *et al.* [Kirilovsky *et al.* 92], Hays *et al.* [Hays *et al.* 98] und Tang & Diner [Tang und Diner 94] basierte. Ausgangsmaterial waren in der Regel Zellen, die kein PSI besaßen, was die Präparation von reinen PSII-Kernkomplexen erleichterte und die Ausbeute gegenüber Präparationen mit PSI-haltigen Zellen entscheidend verbesserte.

### V.2 Polypeptidzusammensetzung der PSII-Kernkomplexe

Die Polypeptidzusammensetzung der gereinigten PSII-Kernkomplexe wurde durch eine SDS-PAGE analysiert (Abbildung 18). In den Bahnen 1, 4 und 5 liefen verschiedene MW-Standards, die eine möglichst gute Zuordnung der Polypeptidbanden zu den apparenten Molekulargewichten in den Spuren 2 und 3 gewährleisten sollten. In Spur 2 und 3 waren PSII-Kernkomplexe (jeweils 45 µg Protein) zu sehen, die mit Säulenschritt (IV.7.1, Bahn

2) und ohne Säule (IV.7.2, Bahn 3) präpariert worden waren. Die Verunreinigungen waren in Bahn 2 geringer als in Bahn 3.



**Abbildung 18: SDS-PAGE-Profil verschiedener PSII-Kernkomplexpräparationen. Die Zahlen geben die Molekulargewichte in kDa an. Bahn 1 = Molekulargewichtsstandard 1, Bahn 2 = PSII-Kernkomplexe mit Säule, Bahn 3 = PSII-Kernkomplexe ohne Säule, Bahn 4 = MW-Standard 2, Bahn 5 = MW-Standard 3. A = PSII-Aggregate, B = CP47, C = CP43, D = D2, E = Manganstabilisierendes Protein (33-kDa-Protein), F = D1, G = Cyt  $c_{550}$ .**

In Gegenwart von 1 M Harnstoff ließen sich sechs der Polypeptidbanden in den Bahnen 2 und 3 Proteinen aus dem PSII zuordnen (Abbildung 18). Hinzu kam eine 7. Bande in Höhe des 66.25 kDa Standards, die aus PSII-Aggregaten besteht [Tang und Diner 94]. Die PSII-Kernkomplexe setzten sich zusammen aus CP47, CP43, dem 33-kDa-Protein (Manganstabilisierendes Protein), D1, D2 und dem Cytochrom  $c_{550}$ . Die Zuordnung erfolgte anhand anderer Publikationen [Kirilovsky *et al.* 92, Barry *et al.* 94; Funk 00; Kashino *et al.* 02a; Kashino *et al.* 02b; Kirilovsky *et al.* 92; Shen *et al.* 95; Sugiura *et al.* 99; Tang und Diner 94] und der Molekulargewicht-Standards. Andere Polypeptide der PSII-Kernkomplexe mit geringen Molekulargewichten wie das *psbI*-Genprodukt (5 kDa apparentes Molekulargewicht) konnten mit diesem Gel nicht oder nur unzureichend aufgelöst werden. Die kleinen Polypeptide ließen sich wegen des geringen Gehalts an Cystein (Silberfärbung) bzw. wegen des geringen Gehalts an Lysin (Coomassie-Färbung) [Irrgang, persönliche Mitteilung] schlecht anfärben. Die schwache Bande in Bahn 2 (Abbildung 18) unterhalb des 12.3 kDa Standards könnte Psb28 [Kashino *et al.* 02b] oder PsbU entsprechen [Barry *et al.* 94; Kashino *et al.* 02b]. Die einzelnen identifizierten Komponenten sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Zusätzlich wurden die errechneten Molekulargewichte angegeben. Das errechnete Molekulargewicht der Apoproteine wurde anhand der Basensequenz aus dem *Synechocystis*-Genom [Kaneko *et al.* 96a; Kaneko *et al.* 96b] bestimmt (<http://www.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>). Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß manche Proteine noch posttranslationale Modifikationen erfahren, so daß das Molekulargewicht des Apoproteins vom tatsächlich in der Zelle vorzufindendem („reifen“ oder „prozessierten“) Protein abweichen kann. So wird beispielsweise der N-terminale Methioninrest des PsbE-Proteins aus PS II nach der Translation bei *Thermosynechococcus vulcanus* [Kashino *et al.* 02a; Koike *et al.* 89] abgespalten. Auch das D1-Protein aus Spinat wird posttranslational prozessiert, indem neun AS-Reste vom C-Terminus entfernt werden [Minami und Watanabe 85; Nixon *et al.* 92; Takahashi *et al.* 88]. Posttranslationale Prozessierung des D1-Proteins läuft auch in der Grünalge *Scenedesmus obliquus* ab [Diner *et al.* 88]. Eine Prozessierung des Apoproteins zum reifen

Protein beinhaltet aber nicht nur Abspaltungen einzelner AS oder Oligopeptide sondern umfaßt auch Modifizierungen wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen.

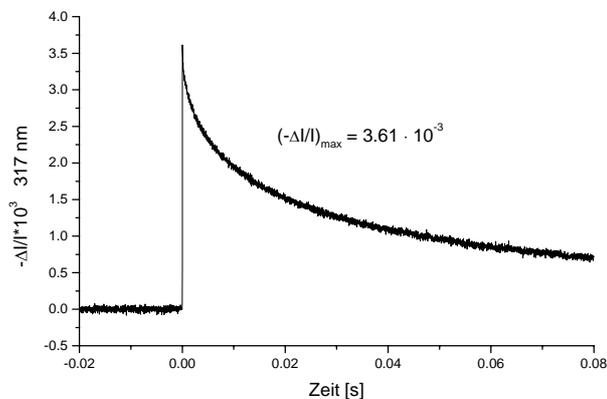
**Tabelle 4: Aufgelöste Polypeptide der PSII-Kernkomplexe (aus Abbildung 18)**

Gen	Buchstabe in Abbildung 18	Protein	Apparentes Molekulargewicht	Errechnetes Molekulargewicht
<i>psbA</i>	F	D1	32 kDa	39.8 kDa
<i>psbB</i>	B	CP47	47 kDa	55.9 kDa
<i>psbC</i>	C	CP43	43 kDa	51.7 kDa
<i>psbD</i>	D	D2	34 kDa	39.5 kDa
<i>psbV</i>	G	Cyt <i>c</i> <sub>550</sub>	15 kDa	17.9 kDa
<i>psbO</i>	E	33 kDa	33 kDa	29.9 kDa

### V.3 Anzahl der Chlorophylle pro PSII-Kernkomplex

Mit blitzlichtphotometrischen Messungen [Junge 76] können einzelne Elektronentransferschritte in den PSII-Kernkomplexen aufgelöst werden. Absorptionsänderungen oxidierter bzw. reduzierter Komponenten während des Elektronentransports machen dies möglich.

Messungen bei 317 nm Wellenlänge liefern das Verhältnis von Chlorophyllmolekülen pro



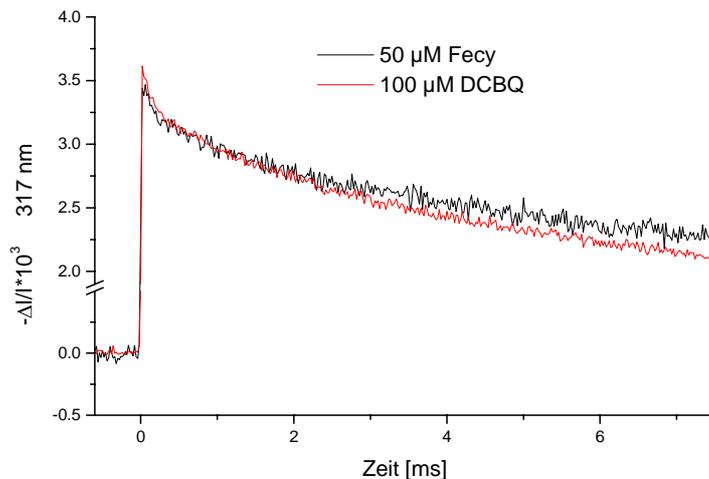
**Abbildung 19: Blitzinduzierte Absorptionsänderung bei 317 nm zur Bestimmung der Anzahl von Chlorophyllen pro PSII-Kernkomplex. Repetierende, sättigende Anregung mit 1 s Blitzabstand und 4  $\mu$ M Chlorophyll. Mittelwert aus 180 Messungen mit 100  $\mu$ M 2,6-DCBQ. Angegeben wurde die Amplitude der  $Q_A$ -Reduktion.**

Konzentration an  $Q_A$  bestimmt (s. IV.15, IV.15.1.1). Der molare, differentielle Extinktionskoeffizient von  $Q_A/Q_A^{\bullet}$  beträgt  $13 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  bei 325 nm [Dekker *et al.* 84c].  $Q_A^{\bullet}$  gibt sein Elektron schnell an den künstlichen Elektronenakzeptor DCBQ weiter, aber dessen Differenzspektrum gleicht bei dieser Wellenlänge dem von  $Q_A^{\bullet}$  [Bensasson und Land 73; Bögershausen 97; Dekker *et al.* 84d], so daß diese Reaktion die Amplitude des Signals nicht beeinflusste. Durch die DCBQ-Dismutation [Bögershausen 97; Rich und

PSII-Kernkomplex. Die Probe wurde durch einen sättigenden Lichtblitz angeregt, so daß ein Elektron über Zwischenschritte von  $P_{680}$  auf  $Q_A$  überging. Die Reduktion des  $Q_A$  zum  $Q_A^{\bullet}$  bewirkt eine große Absorptionsänderung bei 317 nm [Dekker *et al.* 84c; Gerken *et al.* 89; van Gorkom 74]. Sie verläuft so schnell ( $\tau_{1/2} < 1 \text{ ns}$  [Rutherford 89]), daß sie mit der gewählten Zeitauflösung von 20  $\mu$ s/Punkt nicht aufgelöst werden konnte und nur als Sprung sichtbar war (Abbildung 19, Abbildung 20). Über die Amplitude dieser Absorptionsänderung ( $-\Delta I/I = 3.61 \cdot 10^{-3}$ ) wurde die

Bendall 80] nimmt das Signal dann wieder ab. Die Differenzsignale von  $P_{680}/P_{680}^{+\bullet}$  und  $Y_Z/Y_Z^{ox}$  sind bei dieser Wellenlänge vernachlässigbar klein [Gerken *et al.* 89].

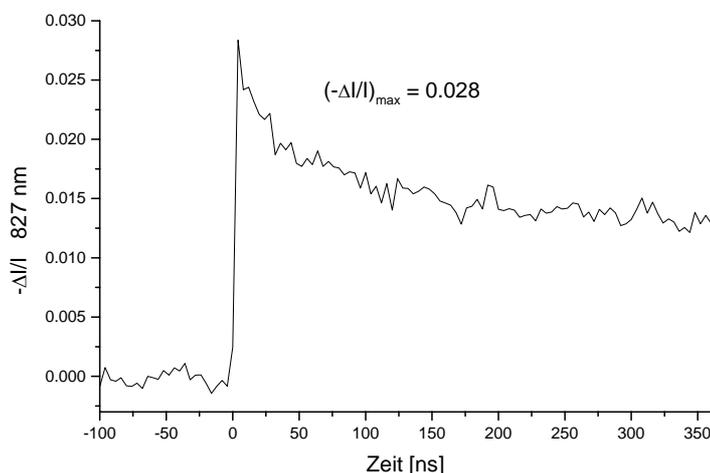
Der Absorptionsänderung durch die Reduktion von  $Q_A$  sind noch weitere Signale aufgelagert, die auch zeitlich aufgelöst wurden. Hierbei handelt es sich um Absorptionsänderungen, die aus den Übergängen zwischen den verschiedenen S-Zuständen resultieren. Bei dieser Wellenlänge von Bedeutung sind lediglich die Übergänge  $S_1 \Rightarrow S_2$ ,  $S_2 \Rightarrow S_3$  und  $S_4 \rightarrow S_0$ , da der S-Übergang  $S_0 \Rightarrow S_1$  bei dieser Wellenlänge kein Differenzspektrum zeigt [Dekker *et al.* 84d], [Dekker 85] und [Lavergne 91]. Der Anteil der S-Übergänge an der Absorptionsänderung ließ sich jedoch durch die langsamere Kinetik ( $\tau_{1/2} = 50 \mu\text{s} - 1.5 \text{ ms}$  [Clausen *et al.* 01a; Clausen *et al.* 01b; Rutherford 89]) von der Amplitude des  $Q_A$ -Signals trennen.



**Abbildung 20:** Vergleich der Absorptionsänderung bei 317 nm mit 50 µM Ferricyanid (Mittelwert aus 60 Messungen) und mit 100 µM DCBQ (Mittelwert aus 180 Messungen; siehe Abbildung 19). Repetierende, sättigende Anregung, 1 Hz, 4 µM Chlorophyll.

In Abbildung 19 wurde das Meßsignal dargestellt, welches sich bei den Proben mit 100 µM DCBQ ergab. Abbildung 20 zeigt die Signale mit 50 µM Ferricyanid (schwarz) und 100 µM DCBQ (rot) im Vergleich. Die Amplitude mit Ferricyanid ( $-\Delta I/I = 3.44 \cdot 10^{-3}$ ) war etwas kleiner als mit DCBQ ( $-\Delta I/I = 3.61 \cdot 10^{-3}$ ). Dies resultierte wahrscheinlich aus leichten Unterschieden in der Chlorophyllkonzentration bei den vermessenen Proben.

Die Anzahl an Chlorophyllen pro PSII wurde auch bei 827 nm bestimmt (Abbildung 21). Die maximale Amplitude betrug 0.028. Hieraus berechnete sich die Konzentration von  $P_{680}^{+\bullet}$  und schließlich die Anzahl von Chlorophyllen pro PSII (IV.15.2). Der molare, differentielle Extinktionskoeffizient von  $P_{680}^{+\bullet}$  bei 827 nm liegt in der Größenordnung von



**Abbildung 21:** Absorptionsänderung bei 827 nm durch Oxidation von  $P_{680}^{+\bullet}$ . Repetierende Anregung mit 100 ms Blitzabstand und 15 µM Chl. Mittelwert aus 20 Messungen. Die maximale Amplitude des Signals wurde eingetragen. Die Messungen fanden in Gegenwart von 1 mM 2,6-DCBQ statt.

6000 – 7000  $M^{-1}cm^{-1}$  [Haumann *et al.* 96; Mathis und Setif 81]. Hier wurde der Wert von 6000  $M^{-1}cm^{-1}$  gewählt, weil er näher bei den

**Tabelle 5: Anzahl an Chlorophyllen pro PSII-Kernkomplex**

$\lambda$ [nm]	Akzeptor	Chlorophylle / PSII
317	50 $\mu$ M Ferricyanid	35
317	100 $\mu$ M 2,6- DCBQ	33
827	1 mM DCBQ	37

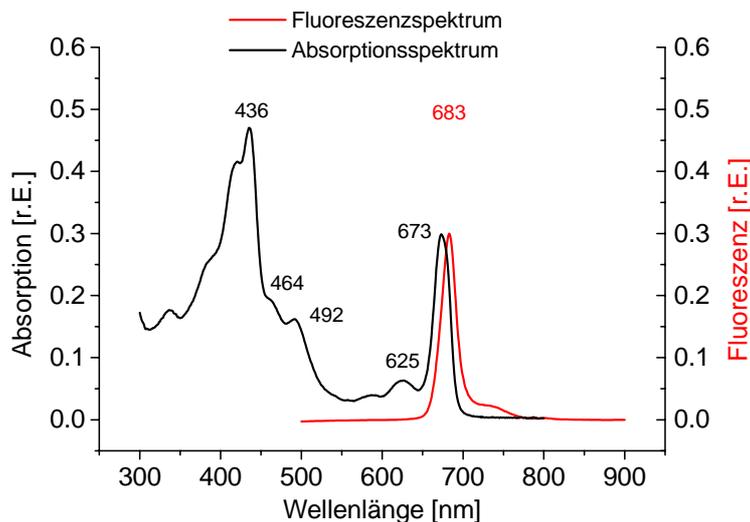
Ergebnissen der 317 nm – Messungen lag und direkt aus Messungen von  $P_{680}^{+\bullet}$  stammt [Haumann *et al.* 96]. Der Wert von 7000  $M^{-1}cm^{-1}$  ist mit isoliertem Chl *a* ermittelt worden [Mathis und Setif 81].

Die Ergebnisse der einzelnen Messungen bei unterschiedlichen Wellenlängen und mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren wurden in Tabelle 5 zusammengefasst. *Als Mittelwert ergibt sich eine Anzahl von 35 Chlorophyllmolekülen pro PSII-Kernkomplex.*

Der Wert von 35 Chl pro PSII wurde für die spektrale Dekomposition des Absorptionsspektrums eingesetzt und lieferte gute Ergebnisse (siehe unten).

## V.4 Absorptions- und Fluoreszenzspektren der PSII-Kernkomplexe

Die schwarze Kurve in Abbildung 22 zeigt das Absorptionsspektrum der PSII-Kernkomplexe aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 in Puffer DB1; die rote Kurve das entsprechende Fluoreszenzspektrum bei einer Anregungswellenlänge von 436 nm. Das Maximum der Fluoreszenzemission lag bei 683 nm. Deutlich waren bei der schwarzen



**Abbildung 22:** Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von PSII-Kernkomplexen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 bei 25 °C. 3.6  $\mu$ M Chl in Puffer DB1. Die Amplitude der Fluoreszenzmessung wurde auf die Absorptionsamplitude bei 673 nm normiert. Die Wellenlängen der Absorptions- bzw. Fluoreszenzmaxima wurden eingetragen.

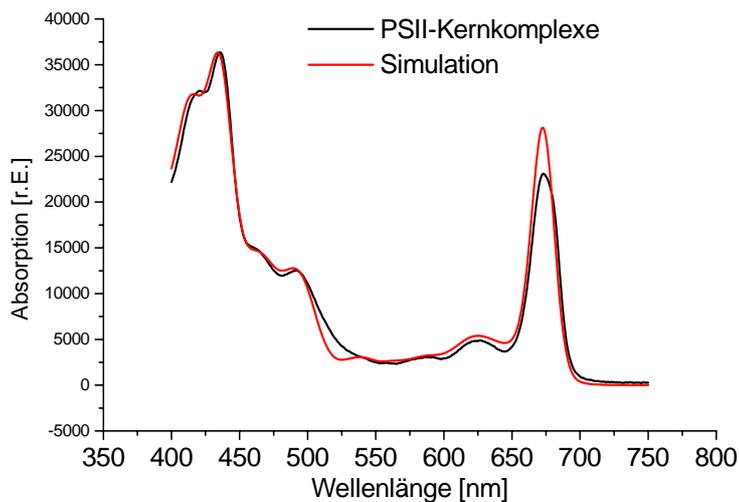
Kurve Absorptionsspitzen bei 436, 464, 492, 625, 673 nm und eine Schulter bei 422 nm zu erkennen. Das Maximum bei 673 nm resultierte allein aus der Absorption von Chlorophyll *a* ( $Q_Y$ -Bande). Diese Spitze wird auch für Kernkomplexe aus höheren Organismen bei der gleichen Wellenlänge gefunden [Sugiura *et al.* 99]. Die anderen Maxima resultierten aus Chlorophyll *a* (die Schulter bei 423 und die Spitzen bei 436 und 625 nm) und anderen Pigmenten (464 und 492 nm; s.u.). Ein reines Absorptionsspektrum von Chlorophyll *a* in Diethylether findet man z.B. bei Scheer [Scheer 91]. Die Absorptionsspitzen liegen hier

bei 410, 430, 615 und 662 nm. Die leichte Verschiebung der Maxima in Abbildung 22 resultierte zum einen aus den Verunreinigungen, im wesentlichen aber wohl daraus, daß es sich nicht um freies Chlorophyll *a* handelte, sondern um solches, das im Protein eingelagert war, wodurch sich das Absorptionsverhalten veränderte.

Die beiden Absorptionsspitzen bei 464 und 492 nm sind charakteristisch für Carotinoide [Lichtenthaler 87]. Während des Waschens der Probe an der Säule wurde ein großer Anteil rotoranger Pigmente eluiert, wobei es sich vermutlich um Carotinoid-Bindeproteine handelt. Wahrscheinlich produziert der WT\* zusätzliche Carotinoid-Bindeproteine zum Lichtschutz, da ihm PSI fehlt und die Zellen somit empfindlicher gegen Licht sind [Hays *et al.* 98].

Mit Hilfe des Programms zur spektralen Analyse von Absorptionsspektren von Prof. Dr. Trissl (<http://www.biologie.uni-osnabrueck.de/biophysik/trissl/kinetics/sp/MainPage.asp>) wurde das Absorptionsspektrum analysiert. Mit dieser spektralen Analyse konnte das Absorptionsspektrum der Kernkomplexe (Abbildung 23, schwarze Kurve) fast hundertprozentig simuliert werden. Die einzige größere Abweichung lag im Bereich der Q<sub>y</sub>-Bande des Chl *a* (673 nm). Die Simulation (Abbildung 23, rote Kurve) ergab folgende Farbstoff-Stöchiometrie pro PSII-Kernkomplex:

35 Chl *a*, 2 Phaeophytin *a*, 11 Carotinoide (3x  $\beta$ -Carotin, 8x Lutein [ein Xanthophyll]), 0.7 Phycoerythrin-Hexamere.



**Abbildung 23: Simulation der spektralen Komposition des Absorptionsspektrums von PSII-Kernkomplexen. Schwarze Kurve: Absorptionsspektrum in Puffer DB1. Rote Kurve: Simulation des Absorptionsspektrums mit folgenden Komponenten: 35 Chl *a*, 2 Phaeophytin, 11 Carotinoide und 0.7 Phycoerythrin-Hexamere.**

## V.5 Sauerstoffmessungen im Dauerlicht

Die Elektronentransportrate (siehe IV.12) wurde gemessen, um einen Hinweis auf die Aktivität der Kernkomplexe zu bekommen. Die für die ETR ermittelten Werte schwankten. Für die WT\*-Kernkomplexe wurden Raten von 2200 bis 3800 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub>·s gemessen. Der Mittelwert lag bei 2900 ( $\sigma_n = 500$ ) mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub>·s. Die Elektronentransportrate von Präparationen ohne Säulenschritt war nicht höher als bei Kernkomplexen, die mit Säulenschritt gereinigt worden waren. Die Elektronentransportrate von Spinat-Kernkomplexen (IV.10) betrug 1000 –1600 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub>·s.

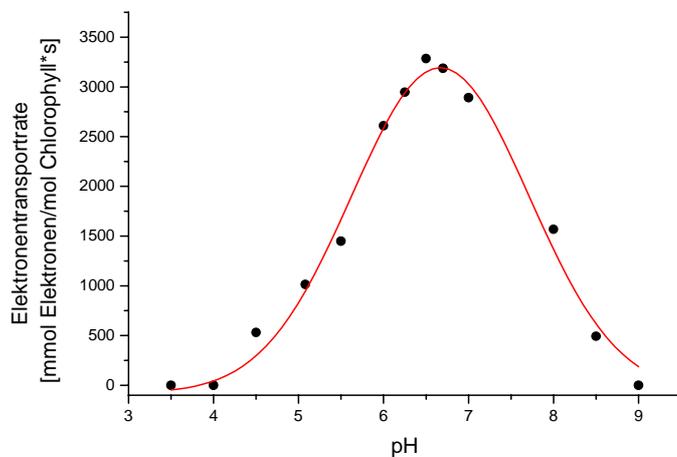
Die ETR wurde auch mit Proben bestimmt, die mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren worden waren. Dabei blieb die ETR unverändert, so daß Gewißheit bestand, daß die Kernkomplexe durch diese Prozedur nicht geschädigt wurden. So mußten die Proben nach einmaligem Auftauen nicht verworfen werden, sondern konnten zu späteren Zeitpunkten für weitere Messungen verwendet werden, wenn sie zwischenzeitlich bei  $-80\text{ °C}$  gelagert wurden.

Die systembedingte Streuung der Elektronentransportraten einer einzelnen Probe lag bei  $\pm 300\text{ mmol Elektronen/mol}_{\text{Chl}}\cdot\text{s}$ .

Die höchsten Elektronentransportraten wurden mit Puffer DB1 und 2,5-DCBQ als Elektronenakzeptor gemessen. Die Messungen wurden in der Regel mit PSII-Kernkomplexen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 durchgeführt; andernfalls wurde dies im Text extra erwähnt. Weitere Ergebnisse mit WT\*-Zellen, -Kernkomplexen und -Thylakoiden sind in Anhang XI.2 zusammengefaßt.

### V.5.1 Bestimmung des pH-Optimums der PSII-Kernkomplexe

Über die ETR wurde das pH-Optimum der PSII-Kernkomplexe bestimmt (präpariert nach IV.7.1). Es wurde eine pH-Reihe erstellt (siehe IV.12.2) und die jeweilige ETR ermittelt. Dabei wurde (wenn möglich) bei jedem Grenz-pH-Wert, bei dem der Puffer gewechselt werden mußte, eine Doppelbestimmung mit beiden Puffern durchgeführt, um zu testen, ob



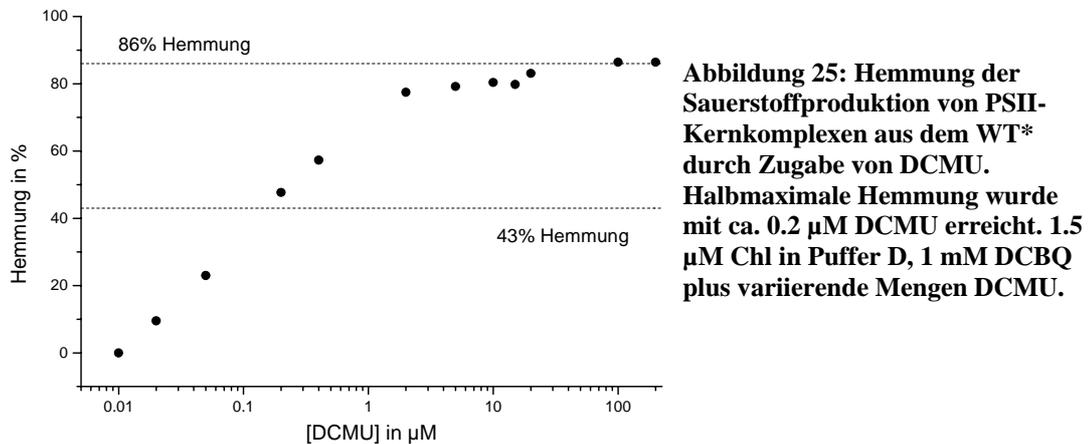
**Abbildung 24:** Abhängigkeit der Elektronentransportrate der PSII-Kernkomplexe des WT\* vom pH-Wert. An die Meßpunkte wurde eine Gaußfunktion angepaßt, mit der das pH-Optimum um pH 6.6 bestimmt wurde. Meßbedingungen: siehe IV.12.2.

die puffernde Substanz allein einen Einfluß auf die ETR hatte. Die ETR variierte aber kaum oder gar nicht bei verschiedenen Puffersubstanzen und festem pH (siehe auch Tabelle 20, Seite 199). Die Ergebnisse der Messungen wurden in Abbildung 24 dargestellt. Die PSII-Kernkomplexe hatten ein schmales pH-Optimum, das um einen pH-Wert von 6.6 lag. PSII-Kernkomplexe aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 nach [Kirilovsky *et al.* 92] zeigen ebenfalls ein schmales pH-Optimum [Hundelt 99] genauso wie

Kernkomplexe aus höheren Pflanzen nach van Leeuwen [Bögershausen 97]. Bei letzteren liegt das pH-Optimum bei pH 6 und bei den *Synechocystis*-Kernkomplexen bei pH 6.5.

## V.5.2 Hemmung der Sauerstoffproduktion durch DCMU

DCMU bindet an die  $Q_B$ -Bindestelle von PSII und blockiert diese, so daß der Elektronentransfer von  $Q_A$  zu  $Q_B$  oder einem alternativen Elektronenakzeptor unterbunden



ist [Lavergne 82; Renger und Wolff 75]. Die Hemmbarkeit von PSII-Kernkomplexen durch DCMU ist deshalb ein Hinweis auf die Intaktheit der Akzeptorseite [Catucci *et al.* 98; Hundelt 99; Ikeuchi und Inoue 86]. Die Hemmung der Sauerstoffproduktion der PSII-Kernkomplexe wurde in Anwesenheit von 0 – 200 µM DCMU gemessen (Abbildung 25). Die Elektronentransportrate ohne DCMU betrug 2370 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub>·s. Die maximale prozentuale Hemmung der Elektronentransportrate betrug 86% und wurde ab ca. 20 µM DCMU erreicht. Sie konnte auch nicht durch Zugabe von 200 µM DCMU weiter gesteigert werden. Bereits ab 2 µM DCMU ging die Hemmung vom linearen Bereich in den gesättigten Bereich über. 2 µM DCMU hemmte zu 78% die Sauerstoffproduktion. Bei 10 µM DCMU wurde sie zu 80% gehemmt. Die Hemmung mit 20 µM wurde genauer untersucht, weil diese Konzentration auch für spektroskopische Messungen (Abbildung 29) verwendet wurde. Bei 20 µM DCMU schwankten die Werte zwischen 84 und 93% Hemmung.

## V.5.3 Inaktivierung der PSII-Kernkomplexe

Mit der unter IV.13 beschriebenen Methode wurde versucht, das Mangan aus den PSII-Kernkomplexen zu entfernen. Nach der pH-Behandlung wurde die ETR dieser Kernkomplexe bestimmt. Vor der Mn-Behandlung lag die ETR der Probe bei 3200 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub>·s. Nach der pH-Behandlung sank die ETR auf 100 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub>·s ab. Das bedeutete eine nahezu vollständige Hemmung (97%) durch die Mangan-Verarmung. Die pH-Behandlung bewirkte, daß das Mangan aus den Kernkomplexen entfernt wurde, so daß kein Sauerstoff mehr produziert wurde [Ahlbrink *et al.* 98; Cole *et al.* 86].

#### V.5.4 Haltbarkeit der PSII-Kernkomplexe aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Die Messungen unter erhöhtem Sauerstoffpartialdruck (siehe Kapitel VIII) setzten eine längere Inkubation der Kernkomplexe in verdünnter Lösung und in Anwesenheit bestimmter Chemikalien voraus. Um eine eventuelle Schädigung durch den Sauerstoffpartialdruck von einer Schädigung allein durch die Inkubation bei Raumtemperatur abgrenzen zu können, wurde die Sauerstoffproduktion in Abhängigkeit verschiedener Inkubationsbedingungen bestimmt.

In Puffer DB1 verdünnte ( $1.5 - 8 \mu\text{M}$  Chl) Kernkomplexe konnten bei Raumtemperatur ohne Verringerung der Aktivität für 60 min gerührt werden; nach 75 und 95 min betrug die Aktivität 88%. Kernkomplexe, die für 6 h auf Eis gerührt worden waren, zeigten 100% Aktivität. Die An- bzw. Abwesenheit von  $\beta$ -DM beeinflusste die Elektronentransportrate nicht. Wurden die PSII-Kernkomplexe in Puffer D (wie DB1 aber ohne 1 M Glycin-Betain, siehe Abschnitt V.5) inkubiert, sank die Elektronentransportrate innerhalb von 11 min auf 58% ab. *Die Zugabe von 1 M Glycin-Betain war entscheidend für die Stabilität der PSII-Kernkomplexe.*

Unverdünnt und ohne Rühren konnten die Kernkomplexe auf Eis über einen Zeitraum von 10 h gelagert werden ohne Verringerung der Elektronentransportrate. Erst nach 24 h und Lagerung bei  $8^\circ\text{C}$  war die Elektronentransportrate auf 71% abgesunken.

PSII-Kernkomplexe aus Spinat (siehe IV.10) lieferten nach 40 min Rühren bei Raumtemperatur ebenfalls eine unveränderte Elektronentransportrate. Nach 75 min bei Raumtemperatur lag die Restaktivität bei 87%. PSII-Kernkomplexe aus Spinat waren damit gleich stabil wie die *Synechocystis*-Kernkomplexe.

Der Elektronenakzeptor konnte nicht über längere Zeiträume mit den Kernkomplexen inkubiert werden.  $1.5 \mu\text{M}$  Kernkomplexe, die zusammen mit  $16 \mu\text{l}$  1 mM DCBQ in DB1 inkubiert wurden, zeigten nach 5 min 100% Aktivität. Nach 20 min war die Aktivität auf 36% abgesunken. Nach 40 min fand überhaupt keine Sauerstoffentwicklung mehr statt.

In anschließenden Versuchen wurde überprüft, ob der Elektronenakzeptor durch die Lagerung bei Raumtemperatur inaktiv wurde, oder ob die Auslöschung der Sauerstoffproduktion durch Schädigung von PSII durch 2,5-DCBQ hervorgerufen wurde. Dazu wurden die Kernkomplexe mit 2,5-DCBQ inkubiert und bei Raumtemperatur gelagert. Nach 30 und 60 min wurde frisches 2,5-DCBQ hinzupipettiert und die Elektronentransportrate bestimmt. Nach 30 min betrug sie 54% und nach 60 min 42%. Die oben beschriebene vollständige Auslöschung der Sauerstoffproduktion war also ein Produkt aus Inaktivierung des Elektronenakzeptors und Schädigung von PSII durch den Elektronenakzeptor (bei einer Konzentration von 1 mM 2,5-DCBQ/  $1.5 \mu\text{M}$  Chl).

Eine dauerhafte Schädigung der Kernkomplexe ( $8 \mu\text{M}$ ) durch Inkubation bei Raumtemperatur im Puffer DB1 mit einer niedrigeren Konzentration ( $200 \mu\text{M}$ ) von 2,5-DCBQ erfolgte nicht. Wenn nach 20 bzw. 60 min frisches 2,5-DCBQ zur Probe hinzupipettiert wurde, betrug die Elektronentransportrate weiterhin 100%.

Der Elektronenakzeptor 2,5-DCBQ lag gelöst in DMSO vor. Um zu überprüfen, daß DMSO keine Beschädigung der Kernkomplexe herbeiführte, wurden die Kernkomplexe ( $1.5 \mu\text{M}$ ) 20 und 40 min lang mit demselben Volumen DMSO ( $16 \mu\text{l}$ ; wie oben mit der DCBQ-Lösung) und Puffer DB1 inkubiert. Anschließend wurde die ETR mit 1 mM DCBQ gemessen, die in beiden Fällen identisch und auch unverändert zur Eiskontrolle war. DMSO alleine schädigte die Kernkomplexe in diesen geringen Konzentrationen also nicht.

*Der Elektronenakzeptor 2,5-DCBQ konnte nicht über längere Zeiträume (>5 min) zusammen mit den Kernkomplexen (z.B. bei den optischen Messungen unter erhöhtem Sauerstoffpartialdruck) inkubiert werden, sondern mußte kurz vor der Messungen extra injiziert werden. Bei längerer Inkubation bei Raumtemperatur wurde 2,5-DCBQ inaktiv und schädigte (in hohen Konzentrationen; 8  $\mu\text{M}$  Chl / 5.3 mM 2,5-DCBQ) PSII. Eine Lagerung bei 8  $\mu\text{M}$  Chl / 200  $\mu\text{M}$  2,5-DCBQ für 5 min verlief ohne Aktivitätsverlust.*

### **Reaktivierung der Kernkomplexe:**

Inkubationen von Kernkomplexen mit 0.06%  $\beta$ -DM und 8  $\mu\text{M}$  Chl, also gleichen Bedingungen wie bei den Proben für optische Messungen (IV.15.3.1), lieferten nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur und pH 5.6 eine Restaktivität von 46%. Nachdem der pH-Wert wieder auf pH 6.6 titriert worden war, betrug die Elektronentransportrate 63 - 69%. Ca. 30 - 40% der Kernkomplexe wurden durch die pH-Behandlung irreversibel geschädigt.

Ähnlich verhielten sich die Kernkomplexe bei pH 4.5. Eine Inkubation der Kernkomplexe (1.5  $\mu\text{M}$ ) für 30 s, 5 min oder 11 min ohne  $\beta$ -DM reduzierte die Aktivität auf ca. 25%. Ein anschließendes Titrieren auf pH 6.6 bewirkte eine Reaktivierung auf 62 - 74%. Eine Zeitabhängigkeit der Schädigung wurde nicht festgestellt.

Die dauerhafte Schädigung der Kernkomplexe durch erhöhten Sauerstoffpartialdruck wurde untersucht. Puffer DB1 wurde für mehr als 2 h unter 19.6 bar Sauerstoff vorinkubiert. Anschließend wurde dieser Puffer in die Küvette innerhalb der optischen Meßzelle überführt und für weitere 15 min unter 19.6 bar Sauerstoff inkubiert. Dann wurden die Kernkomplexe (8  $\mu\text{M}$ ) unter Druck in die Küvette injiziert und für 10 - 15 min inkubiert (Raumtemperatur). Um die Restaktivität der Kernkomplexe bestimmen zu können, mußte erst der gelöste Sauerstoff aus dem Puffer entfernt werden. Dazu wurden in mehreren Ansätzen die Kernkomplexe für 30 min bis 3 h 40 min auf Eis durch starkes Rühren entgast. Die verbleibende Restaktivität war größer als 70%. An- bzw. Abwesenheit von  $\beta$ -DM hatte wiederum keinen Einfluß auf die Elektronentransportraten (siehe oben).

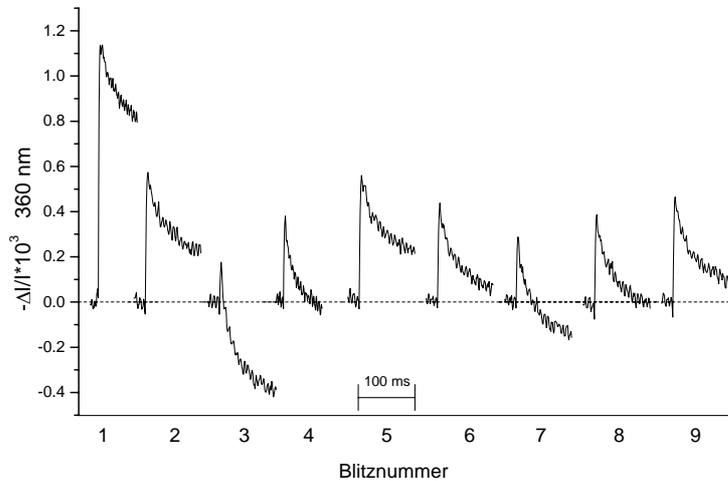
*Die irreversible Schädigung der Kernkomplexe durch erhöhten Sauerstoffpartialdruck war gering. Damit war eine wichtige Voraussetzung für die optischen Messungen bzw. deren Interpretation gewährleistet (Kapitel VIII).*

## **V.6 Oszillation der S-Übergänge**

Die Voraussetzung zur Messung der Halbwertszeiten der einzelnen S-Übergänge (siehe Abbildung 9) im Wasserspaltungskomplex ist, daß die S-Zustände synchronisiert durchlaufen werden. Außerdem ist es für die Interpretation spektroskopischer Daten wichtig zu wissen, wie die Dunkelverteilung der S-Zustände im jeweiligen biologischen Material ist. Die Synchronisation der PSII-Kernkomplexe wurde durch Bestimmung der Abhängigkeit der Absorptionsänderung bei 360 nm gemessen. Dabei ist es für spektroskopische Messungen am Mangankomplex von großer Bedeutung, inwieweit repetierend-dunkeladaptierte Messungen mit einer einzelnen Probe durchgeführt werden können. Da die Absorptionsänderungen des Mangan-Komplexes bei 360 nm klein sind [Dekker 92; Lavergne 91] und die Ausbeute an PSII-Kernkomplexen pro Präparation gering war, war es wünschenswert, das Signal/Rausch-Verhältnis durch mehrere Messungen mit einer Küvettenfüllung zu verbessern. *Für die spektroskopischen Messungen der Kapitel VI, VII und VIII war es also wichtig, die Dunkelverteilung der PSII-Kernkomplexe zu kennen und zu ermitteln, ob repetierende Messungen ohne starke*

Dämpfung (= Desynchronisation der S-Übergänge) der Oszillationen (siehe unten und Abbildung 26) durchgeführt werden konnten.

Die Absorption eines Lichtquants bewirkt eine Ladungstrennung zwischen  $P_{680}$  und  $Q_A$ , so daß  $P_{680}^{+\bullet}$  und  $Q_A^{\bullet}$  entstehen.  $P_{680}^{+\bullet}$  wird reduziert durch  $Y_Z$  (D1-Y161), das wiederum

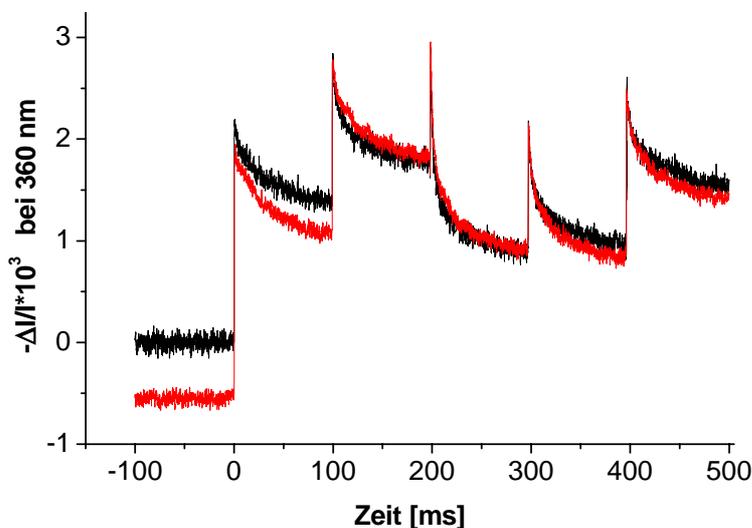


**Abbildung 26:**  
Blitzinduzierte Redoxreaktionen des OEC dunkeladaptierter Proben in Puffer  $M^+$  (mit Glycerin). 4  $\mu M$  Chl, Mittelwert aus 6 Messungen. Die Oszillation des OEC war deutlich zu sehen. Der erste Blitz entsprach dem Übergang  $S_1 \Rightarrow S_2$ . Positive Absorptionsänderungen kennzeichnen Oxidationen, negative (im 3. und 7. Blitz) kennzeichnen Reduktionen. Blitzabstand 100 ms.

durch den OEC reduziert wird. Der OEC akkumuliert vier Oxidationsäquivalente und durchläuft dabei die Oxidationszustände  $S_0$  bis  $S_4$ . Unter Spaltung von zwei Wassermolekülen geht der OEC spontan vom höchsten oxidierten Zustand  $S_4$  (siehe Kapitel VIII) in den am stärksten reduzierten Zustand  $S_0$  über. Die Messungen bei 360 nm erlauben, die oszillierenden Absorptionsänderungen, wie sie durch die Oxidation und Reduktion des OEC entstehen, spektroskopisch zu verfolgen.

Bei 317 nm können die Absorptionsänderungen durch die S-Zustände ebenfalls verfolgt werden. Jedoch ist das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten der S-Zustände zu dem Extinktionskoeffizienten von  $Q_A$  günstiger bei 360 nm [Dekker *et al.* 84c; Dekker 92; Lavergne 91; van Gorkom 74], so daß die Signale der S-Zustände hier besser zu messen sind.

In Abbildung 26 wurden die Absorptionsänderungen nach dem ersten bis neunten Blitz langzeit-dunkeladaptierter PSII-Kernkomplexe in Gegenwart von Glycerin einzeln abgebildet. Die Oszillation der S-Zustände war deutlich zu erkennen. Im dunkeladaptierten

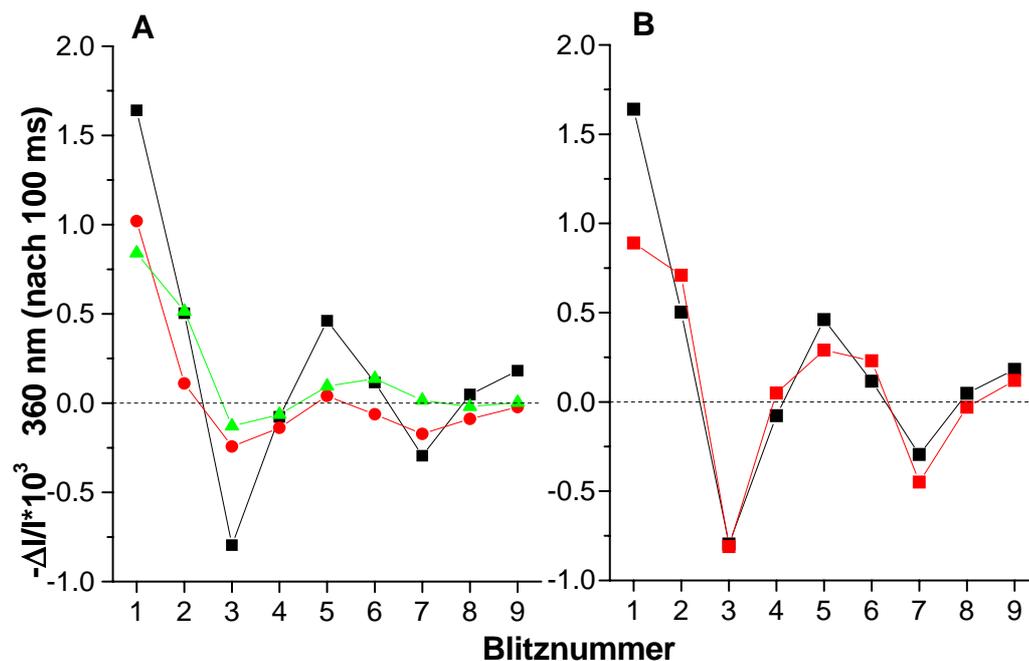


**Abbildung 27:**  
Unterschiedliche Signale im ersten Blitz. Vergleich zweier Präparationen. Die Signale in den letzten vier Blitzen waren identisch. Die Signale im ersten Blitz waren unterschiedlich verursacht durch variierenden Grad an donatorseitiger Inaktivierung (siehe Text). Normiert auf 8,4  $\mu M$  Chl, 50  $\mu s$ /Punkt, über 5 Punkte geglättet.

Zustand befinden sich ca. 70% der PSII-Kernkomplexe im Zustand  $S_1$ , die übrigen im Oxidationszustand  $S_0$  (siehe unten). Durch den ersten Blitz ging die Mehrzahl der PSII-

Kernkomplexe in den Zustand  $S_2$  über, was in einer positiven Absorptionsänderung resultierte. Bei der zweiten Oxidation durch den im Abstand von 100 ms folgenden Blitz ging der *OEC* in den Zustand  $S_3$  über, wobei die Amplitude des Signals wiederum positiv war. Die negative Amplitude des 3. Blitzes resultierte aus der Reduktion des *OEC*.  $S_3$  ging durch diesen Blitz in  $S_4$  über, wodurch spontan die Wasserspaltung ausgelöst wurde und  $S_4$  zu  $S_0$  reduziert wurde. Der vierte Blitz induzierte die Oxidation von  $S_0$  zu  $S_1$  und der nächste Zyklus begann. Im zweiten Zyklus (ab dem 5. Blitz) wurde die Oszillation undeutlicher, da sich durch Fehl- und Doppelanregungen die deutliche Synchronisation der PSII-Kernkomplexe verringerte.

Bei jedem Blitz wurde auch die Reduktion von  $Q_A$  gemessen, die aber zeitlich nicht aufgelöst wurde ( $\tau_{1/2} \approx 200$  ps [Bernarding *et al.* 94; Eckert *et al.* 88]). Die Absorptionsänderungen von  $P_{680}/P_{680}^{+\bullet}$  und  $Y_Z/Y_Z^{ox}$  sind ungefähr 0 bei 360 nm [Gerken *et al.* 89] und trugen somit nicht zum Signal bei. Auch die Oxidationen bzw. die Reduktion der S-Zustände wurden zeitlich nicht aufgelöst. Es konnten lediglich die Amplituden bestimmt werden. Dabei war die Amplitude des ersten Blitzes unverhältnismäßig groß. Hierbei handelt es sich u.a. um reduziertes  $Q_A$  in donatorseitig inaktiven Kernkomplexen, die während der Dauer der Blitzserie nicht reduziert wurden. In den weiteren Blitzen tragen diese donatorseitig-inaktivierten Kernkomplexe nicht mehr zum Signal bei [Hundelt



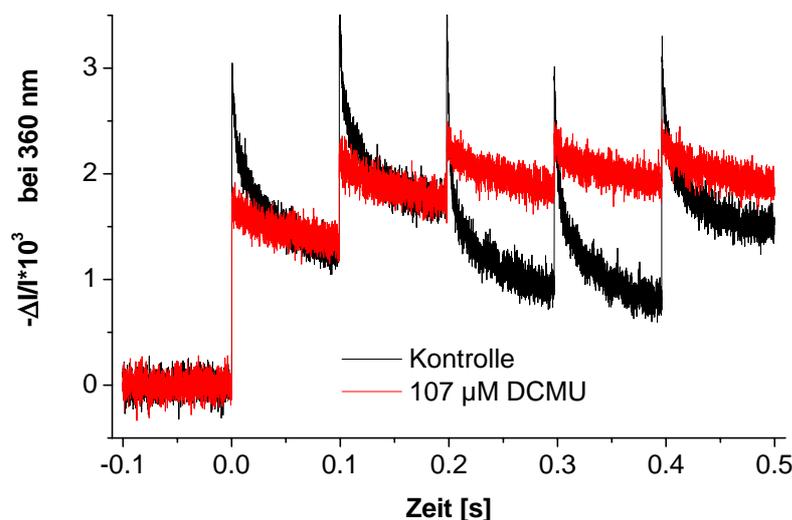
**Abbildung 28: Amplituden der stabilen Absorptionsänderungen durch die verschiedenen S-Übergänge (100 ms nach jedem Blitz) als Funktion der Blitznummer. A) Die Viereroszillation war deutlich bei dunkeladaptierten Proben mit Glyzerin (25% [v/v], schwarz) zu erkennen (Mittelwert aus 6 Messungen). Repetierende Messungen mit 25 s Abstand zwischen jeder Blitzserie mit Glyzerin (25%, [v/v]) rot und ohne Glyzerin (grün) waren desynchronisiert. 8  $\mu$ M Chl, Puffer  $M^+/M^-$ . B) Vergleich von dunkeladaptierten Messungen aus Abb. A) mit repetierend-semidunkeladaptierten Messungen (rot, 10 Blitzserien, Puffer DB1). Zwischen jeder Blitzserie lagen 2 min Dunkelphase. Repetierend-semidunkeladaptierte Messungen zeigten eine deutliche Viereroszillation - nahezu unverändert im Vergleich zu dunkeladaptierten Proben.**

*et al.* 98b; Lavergne 91]. Der Anteil an derart geschädigten PSII-Kernkomplexen variierte von Präparation zu Präparation. In Abbildung 27 ist zu sehen, daß die Signale zweier unterschiedlicher Präparationen in den Blitzen 2 – 5 innerhalb der Schwankungsbreite

identisch waren. Dagegen unterschieden sich die Amplituden im ersten Blitz deutlich. *Zum Vergleich mehrerer Meßspuren war daher die Normierung auf das Signal des ersten Blitzes ungeeignet.*

Um Bedingungen zu finden, mit denen repetierend-semidunkeladaptierte Messungen durchführbar waren, die wegen des geringen Materialverbrauchs günstig waren (s.o.), wurden die Meßbedingungen modifiziert und die Oszillationsmuster gemessen. Zur besseren Übersicht wurden bei der Auswertung dieser Messungen nur die stabilen Absorptionsänderungen (100 ms nach dem Blitz), die aus der blitzinduzierten Oxidation bzw. Reduktion der S-Zustände resultierten, aufgetragen (Abbildung 28). Wie oben schon erläutert, oxidiert DCBQ  $Q_A^{\bullet}$  schnell. Auf Grund der Ähnlichkeit der beiden Differenzspektren bei dieser Wellenlänge ist diese Oxidation aber nicht sichtbar [Bensasson und Land 73; Bögershausen 97; Dekker *et al.* 84d]. DCBQ dismutiert mit einer Halbwertszeit von mehreren Millisekunden [Bögershausen 97; Rich und Bendall 80], was auch in Abbildung 20 zu sehen ist. Da zwischen zwei Blitzen eine Pause von 100 ms war, reichte diese Zeit aus, damit DCBQ vollständig dismutierte, so daß die durch  $Q_A^{\bullet}$  bzw.  $DCBQ^{\bullet}$  hervorgerufene Absorptionsänderung abklang. Somit konnte 100 ms nach dem Blitz die Amplitude der Absorptionsänderung abgelesen werden, die fast ausschließlich aus dem jeweiligen S-Übergang resultierte. Bei Messungen mit 500  $\mu\text{M}$  Ferricyanid war die Abnahme des durch  $Q_A^{\bullet}$  hervorgerufenen Signals wesentlich schneller, da Ferricyanid kein vergleichbares Differenzspektrum wie  $Q_A$  hat (Daten nicht gezeigt).

Die stabilen Absorptionsänderungen, die aus Abbildung 26 ermittelt wurden, sind in Abbildung 28 dargestellt. Bei dunkeladaptierten Proben mit Glycerin ergab sich ein deutliches Muster. Die Probe befand sich vor der Blitzserie überwiegend im Zustand  $S_1$  (siehe unten) und durchlief den Kok-Zyklus nach Einzelblitzanregung gut synchronisiert. Repetierende Messungen mit Glycerin und 25 s Abstand zwischen den Blitzserien zeigten kein verwertbares Oszillationsmuster. Die höheren S-Zustände relaxierten mit Glycerin in den 25 s nicht ausreichend in den Zustand  $S_1$ , so daß die Oszillation gedämpft war. Ebenso ergaben repetierende Messungen ohne Glycerin keine deutliche Oszillation der S-Zustände (Abbildung 28 A).



**Abbildung 29: Einfluß von DCMU auf die Oszillationen des OEC. Die Oszillationen waren in Gegenwart von 107  $\mu\text{M}$  DCMU (rot) gegenüber der Kontrollmessung ohne DCBQ (schwarz) stark gedämpft. 8  $\mu\text{M}$  Chl, 50  $\mu\text{s}$ /Punkt. MW aus 5 repetierend-semidunkeladaptierten Messungen (2 min Pause/Serie).**

Eine deutliche Oszillation unter repetierend-semidunkeladaptierten Bedingungen ergaben Messungen mit Puffer DB1 (1 M Glycin-Betain und 1 M Saccharose) und 2 min Blitzabstand (Abbildung 28 B). Hier war die Viereroszillation bis zum letzten Blitz deutlich zu erkennen und gegenüber dem dunkeladaptierten Oszillationsmuster kaum verändert. *Mit Puffer DB1 und 2 min Abstand zwischen jeder Blitzserie konnten repetierend-semidunkeladaptierte und damit materialsparende Messungen durchgeführt*

werden. So konnte mit geringerem Materialaufwand ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis bei blitzlichtspektroskopischen Messungen erreicht werden.

Mit sieben gemittelten, dunkeladaptierten Messungen wurde der Anteil der schnellen ms-Phase ( $\tau_{1/2} \approx 1.3$  ms), die den Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  charakterisierte, in Abhängigkeit von der Blitznummer ermittelt (Daten nicht dargestellt). Die rechnerische Anpassung ergab keine schnelle ms-Phase in den Blitzen 1, 2 und 5. Im dritten Blitz hatte der schnelle Abfall eine Halbwertszeit von 1 ms ( $\pm 0.1$  ms) und eine Amplitude von  $-\Delta I/I \cdot 10^3_{360\text{nm}} = 0.89$ . Im vierten Blitz hatte die ms-Phase eine Halbwertszeit von  $\tau_{1/2} = 1.3$  ms ( $\pm 0.2$ ), was im Rahmen des Signal/Rausch-Verhältnisses identisch zum dritten Blitz war. Die Amplitude dieser Phase betrug nur  $-\Delta I/I \cdot 10^3_{360\text{nm}} = 0.4$ . Damit ergab sich eine Verteilung der S-Zustände von  $S_0/S_1 = 31\% / 69\%$ , also ungefähr 30% / 70%.

Der Einfluß von DCMU auf das Differenzsignal bei 360 nm wurde mit einer Meßreihe aus fünf Blitzen untersucht. DCMU ist ein Inhibitor für PSII. Es bindet an die  $Q_B$ -Bindestelle, kann aber nicht von  $Q_A^{\bullet}$  reduziert werden [van Rensen 89].  $Q_A^{\bullet}$  rekombiniert daraufhin mit  $Y_Z^{\text{ox}}$  oder den S-Zuständen, was zu einer Erhöhung der Fehlreffer (*misses*,  $\alpha$ ) führt und damit zu einer Dämpfung der Oszillationen (s.o.).

Bei der Kontrollmessung (Abbildung 29, schwarze Spur) waren die Oszillationen deutlich erkennbar (200  $\mu\text{M}$  2,5-DCBQ). Nach zusätzlicher Zugabe von 107  $\mu\text{M}$  DCMU (rote Kurve) verschwand das deutliche Blitzmuster. Die positiven Amplituden in den ersten beiden Blitzen waren bei der Kontrolle viel größer, weil hier die S-Übergänge noch durchlaufen wurden (vgl. Abbildung 28) und 2,5-DCBQ durch  $Q_A^{\bullet}$  reduziert wurde. Mit 107  $\mu\text{M}$  DCMU war im wesentlichen nur die  $Q_A$ -Reduktion zu sehen. Auch bei diesen Messungen hatte das Signal im ersten Blitz eine deutlich größere Amplitude als bei den nachfolgenden Blitzen (vgl. Seite 65). Der Abfall des Signals mit DCMU war einphasig in den Blitzen 1 und 2 und zweiphasig in den folgenden Blitzen: Auf den Blitzen 3 – 5 kam eine schnelle Phase hinzu (sichtbar als kleine Spitze über dem langsamen Signal). Durch die erhöhte Anzahl an *misses* (s.o.) war der Übergang  $S_3 \Rightarrow S_4 \rightarrow S_0$  nicht auf den dritten Blitz beschränkt. Die rechnerische Anpassung der langsamen Phase in den Blitzen 1 – 5 ergab eine Halbwertszeit von 31 ms ( $\sigma_{n-1} = 3$  ms). Die schnelle Phase des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  hatte eine Halbwertszeit von 1.7 ms und eine Amplitude von 0.12 mit DCMU. Die rechnerische Anpassung des dritten Blitzes bei der Kontrollmessung ergab eine Amplitude von 1.43 für den Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$ . PSII wurde also in Gegenwart von DCMU zu 91.6% gehemmt.

## V.7 Diskussion zur Charakterisierung der Kernkomplexe

### a) Reinheit der Kernkomplexe

Die neu entwickelte Präparation von PSII Kernkomplexen hatte eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Präparationen. Der große Vorteil *per se* war das Fehlen von PSI in den Zellen, so daß keine aufwendige Trennung von PSI und PSII durchgeführt werden mußte. Die Reinheit der Kernkomplexe wurde durch die SDS-PAGE (Abbildung 18) und das Absorptionsspektrum (Abbildung 22) belegt und entsprach der Reinheit anderer PSII-Kernkomplex-Präparationen [Kirilovsky *et al.* 92; Sugiura *et al.* 99; Tang und Diner 94]. Die kleinen Untereinheiten ( $< 10$  kDa) konnten mit der hier verwendeten

Gelzusammensetzung nur schlecht aufgelöst werden. Vor kurzem sind neue SDS-PAGE vorgestellt worden, die eine wesentlich bessere Auflösung der kleinen Untereinheiten von PSII ermöglichen [Kashino *et al.* 01; Kashino *et al.* 02a; Kashino *et al.* 02b].

Für den hohen Grad an Reinheit der Präparation und für die Aufkonzentrierung der PSII-Kernkomplexe sprach auch das niedrige Chl/PSII Verhältnis von 35, das über die Absorptionsänderungen bei 827 nm und 360 nm (Abschnitt V.3) ermittelt wurde und bei der Simulation des gesamten Absorptionsspektrums (Abbildung 23) sehr gute Übereinstimmung lieferte. Die Anzahl von 35 Chl wurde dabei eher überschätzt als unterschätzt, da bei den Messungen bei 317 nm (317 nm IF,  $\pm 6$  nm FWHM) mit dem molaren, differentiellen Extinktionskoeffizienten von  $Q_A/Q_A^{\bullet}$  bei 325 nm gerechnet wurde, der größer als bei 317 nm ist. Außerdem wurde die Gesamtchlorophyllmenge bei 665.5 nm ermittelt. Bei dieser Wellenlänge ist der Extinktionskoeffizient der beiden Phaeophytine von PSII etwa halb so groß wie der von Chl *a*, was ebenfalls nur zu einer Überschätzung des Chl/PSII-Verhältnis hätte führen können.

35 Chl/PSII war ein deutlich besseres Verhältnis, als es mit Kernkomplex-Präparationen aus *Synechocystis*-Zellen erreicht wird, die noch PSI enthalten (50 – 66 Chl/PSII [Boerner *et al.* 93; Rögner *et al.* 90; Tang und Diner 94] bzw.  $38 \pm 2$  Chl nach Berücksichtigung der PSI-Kontamination [Tang und Diner 94]). Ähnliche Kernkomplexe aus PSI-freien Zellen besitzen 39 Chl/PSII [Hays *et al.* 98]. Mit His-Tag-gereinigten Kernkomplexen aus *Synechocystis* sind 42 ( $\pm 2$ ) [Lakshmi *et al.* 02] und 41 [Kashino *et al.* 02b] Chl/PSII ermittelt worden. Aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus vulcanus* (früher *Synechococcus v.*) sind Kernkomplexe mit einem Chl/PSII Verhältnis von 41 [Kashino *et al.* 02a] präpariert worden (siehe Tabelle 6).

Seit 2001 liegen die ersten Röntgenkristallstrukturen von PSII vor. Die erste Struktur aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* (früher *Synechococcus elongatus*) von Zouni *et al.* mit einer Auflösung von 3.8 Å zeigt 32 Chlorophylle [Zouni *et al.* 01b]. Diese verteilen sich folgendermaßen: CP43 12 = Chl *a*, CP47 = 14 Chl *a* und D1/D2 = 6 Chl *a*. Die Verfeinerung der Elektronendichteverteilung dieser ersten Struktur auf 3.6 Å zeigt drei zusätzliche Chl *a*-Moleküle in den CP43/CP47 UE von PSII, so daß die Gesamtzahl auf 35 ansteigt [Fromme *et al.* 02; Vasil'ev *et al.* 01; Zouni *et al.* 01a] (13 in CP43, 16 in CP47). Die Röntgenkristallstruktur aus *Thermosynechococcus vulcanus* [Kamiya und Shen 03] mit einer Auflösung von 3.7 Å zählt 36 Chlorophylle: 6 in D1/D2, 17 in CP47 und 13 in CP43. Eines der Chl *a*-Moleküle in CP43 sitzt an anderer Stelle als in der Struktur von Zouni *et al.* Das könnte ein Hinweis auf zwei lose gebundene Chl *a*-Moleküle in CP43 sein, wovon jeweils eines in den jeweiligen o.g. Strukturen fehlen würde. Damit würde sich die Gesamtzahl auf 37 Chl/PSII erhöhen. 2004 ist wiederum eine Röntgenkristallstruktur von PSII aus *T. elongatus* veröffentlicht worden [Ferreira *et al.* 04]. Die Auflösung konnte auf 3.5 Å verbessert werden. Die Strukturanalyse zeigt 36 Chl; davon zwei, die lose an CP43 und CP47 gebunden sind. CP43 bindet 14 und CP47 16 Chl; D1/D2 6 Chl. Alle Kombinationen aus den Röntgenstrukturdaten in Betracht ziehend, ergibt sich bisher eine Anzahl von 35 bis 37 Chl/PSII. Eine genauere Aufklärung muß auf eine Struktur mit höherer Auflösung warten. Es ist bekannt, daß die Anzahl an Chl/PSII von den Lichtbedingungen während des Wachstums und vom Organismus abhängt [Fujita *et al.* 94]. Die in dieser Arbeit beschriebenen PSII-Kernkomplexe zeigen, ermittelt über spektroskopische Messungen, die beste Übereinstimmung mit den Röntgenstrukturdaten in Bezug auf die Chlorophyllanzahl pro PSII.

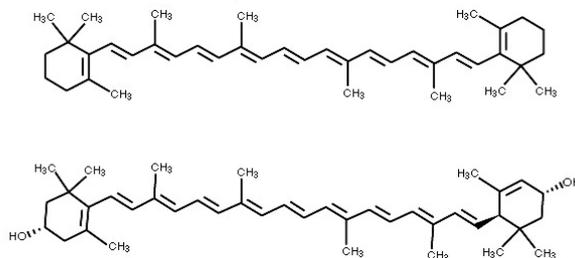
Für die Diskrepanz zwischen 35 – 37 Chl/PSII und  $> 40$  Chl/PSII sind wahrscheinlich andere Chl-bindende Proteine verantwortlich. Die Kristallstrukturen berichten ausschließlich von Chlorophyllmolekülen in den PSII-UE CP43, CP47 und D1/D2. Eventuell können aber auch einige der kleinen PS-II UE (siehe Tabelle 1) Chl binden. Es ist für das PsbS-Protein aus Spinat bereits gezeigt worden, daß es ein Chlorophyll- und

Xanthophyll-bindendes Protein ist [Funk *et al.* 95]. PsbS ist ein Bestandteil vieler PSII-Präparationen; auch jener, denen die Lichtsammel-Komplexe (*light-harvesting-complexes*, LHC) entfernt worden sind [Li *et al.* 00]. Außerdem können Verunreinigungen mit anderen Proteinen der Thylakoidmembran zu einem anderen Chl/PSII Verhältnis führen. Vermaas *et al.* beschreiben Mutanten von *Synechocystis* sp. PCC 6803, die weder PSI noch PSII besitzen. Trotzdem findet man in diesen Mutanten Chlorophylle [Shen und Vermaas 94]. Auch am Cytochrom  $b_6f$ -Komplex von *Synechocystis* bindet ein Chl *a* Molekül [Kurusu *et al.* 03; Peterman *et al.* 98].

Mittels der spektralen Dekomposition des Absorptionsspektrums wurde immer noch ein Gehalt von 0.7 Phycoerythrin-Hexameren pro PSII gefunden, obwohl versucht wurde, die Phycobilisomen durch dreimaliges Waschen vollständig zu entfernen. Dem hier verwendeten WT\* ist das Gen für das ApcE Protein entfernt worden (siehe IV.1). Das ApcE Protein bewirkt vermutlich die Bindung der Phycobilisomen an die Thylakoidoberfläche und an PSII [Bald *et al.* 96; Shen *et al.* 93; Sidler 94]. Da trotz der Entfernung dieses Proteins und dreimaligem Waschen noch Phycoerythrin in den Kernkomplexen vorhanden war, ist das ApcE Protein wahrscheinlich nicht alleine für die Bindung der Phycobilisomen verantwortlich.

Die spektrale Dekomposition des Absorptionsspektrums der PSII-Kernkomplexe ergab neben den 35 Chlorophyllen 11 Carotinoide, davon 3x  $\beta$ -Carotin und 8x Lutein. Die Anzahl der Carotinoide pro Kernkomplex in der Literatur streut erheblich. In der „ursprünglichen“ Struktur von Zouni *et al.* [Zouni *et al.* 01b] sind noch keine Carotinoide sichtbar und in der Shen-Kristallstruktur mit 3.7 Å [Kamiya und Shen 03] sind 2  $\beta$ -Carotine in der Nähe der Chlorophylle des Reaktionszentrum modelliert worden. In der jüngsten Struktur aus *T. elongatus* (3.5 Å Auflösung) berichten Ferreira *et al.* [Ferreira *et al.* 04] von 7  $\beta$ -Carotinen, wovon keines innerhalb des D1/D2-Dimers zu sehen ist. Daneben wird auf weitere Elektronendichten hingewiesen, bei denen mit dieser relativ geringen Auflösung nicht klar gewesen ist, ob es sich um Fettsäurereste oder Carotinoide handelt. Hier werden erst Strukturen mit deutlich besserer Auflösung weitere Aufschlüsse geben. Die Zuordnung der Elektronendichten zu genau 7  $\beta$ -Carotinen [Ferreira *et al.* 04] beruht auf biochemischen Daten, die ca. 10  $\beta$ -Carotine im PSII angeben (Übersichtsartikel [Barber 03]). Eindeutig unterscheiden lassen sich die Carotinoide  $\beta$ -Carotin und Lutein (ein Xanthophyll) oder andere Xanthophylle bzw. Carotine mit einer Auflösung von 3.5 Å nicht (vergleiche Abbildung 30).

Biochemische und spektroskopische Analysen mit Präparationen aus unterschiedlichen Organismen berichten von 17 Carotinoiden (davon 14  $\beta$ -Carotine) [Tracewell *et al.* 01], 10



**Abbildung 30: Vergleich der Strukturformeln von Carotin und Xanthophyllen. Oben: all-trans  $\beta$ -Carotin ( $C_{40}H_{56}$ ). Unten: das Xanthophyll Lutein ( $C_{40}H_{56}O_2$ ).**

$\beta$ -Carotinen [Barber 03; Tang und Diner 94], 7  $\beta$ -Carotinen (und weiteren, lose assoziierten Carotinoiden) [Ohno *et al.* 86] und 11  $\beta$ -Carotine und 1 Zeaxanthin [Kashino *et al.* 02b]. 11  $\beta$ -Carotine, 4 Zeaxanthin, 4 Myxoxanthophylle sind in

Thylakoiden von *Thermosynechococcus* gefunden worden [Takahashi *et al.* 85], aber in PSII-Reaktionszentren

(bestehend aus D1, D2 und Cytb559) aus Spinat wird nur ein  $\beta$ -Carotin gefunden [Nanba und Satoh 87]. Bei anderen Präparationen von Reaktionszentren wird von 2  $\beta$ -Carotinen berichtet [Bialek-Bylka *et al.* 95; Tracewell *et al.* 01].

Im bakteriellen Reaktionszentrum von *Rhodospseudomonas viridis* ist nur ein Carotinoid vorhanden (Röntgenkristallstruktur mit 2.3 Å Auflösung [Deisenhofer *et al.* 95]). Die Kristallstruktur von PSI ist mit 2.5 Å aufgelöst worden [Jordan *et al.* 01]. Die 22 Carotinoide sind als  $\beta$ -Carotine modelliert worden. Die beiden großen UE von PSI, PsaA und PsaB, zeigen Homologien zu vier UE aus PSII: D1, D2, CP43 und CP47 [Jordan *et al.* 01; Kamiya und Shen 03]. PsaA und PsaB können wahrscheinlich als Verschmelzungsprodukt der vier o.g. UE aus PSII angesehen werden – ein Hinweis auf den gemeinsamen, evolutionären Ursprung von PSI und PSII [Schubert *et al.* 98]. Die 22 Carotinoide von PSI liegen in dem Bereich, der Ähnlichkeiten zu CP43 und CP47 zeigt, nicht aber im Kern, der D1/D2 ähnelt. Basierend auf der Verteilung der Carotinoide in PSI und dem Wissen aus dem bakteriellen Reaktionszentrum ist ein Modell für PSII konstruiert worden, um die möglichen Lokalisationen der  $\beta$ -Carotine in PSII vorhersagen zu können [Nayak *et al.* 02], solange die Röntgenkristallstrukturen aus PSII noch keinen genauen Aufschluß auf die Anzahl und die Lokalisation der Carotinoide in PSII geben.

Es ist zu vermuten, daß im Reaktionszentrum 2  $\beta$ -Carotine lokalisiert sind. Die restlichen  $\approx$  10 Carotinoide liegen wahrscheinlich in den Kernantennen CP43 und CP47. *Insofern stimmt auch hier die spektrale Dekomposition in der Gesamtzahl an Carotinoiden mit den Literaturdaten überein.* Da Carotinoiden neben ihrer Antennenfunktion eine große Bedeutung als Lichtschutzpigmente zukommt [Anderson 01; Nayak *et al.* 02], ist es verständlich, daß der Gehalt (und die Klasse) von Carotinoiden von den Belichtungsbedingungen während des Wachstums abhängt und damit variiert (siehe zum Vergleich [Demmig-Adams und Adams 96]). So ist es vielleicht zu erklären, daß die spektrale Dekomposition (Abbildung 23) 8 Xanthophylle (Lutein) ergab, im Gegensatz zu den biochemischen Analysen, die eine größere Anzahl an Carotinen als an Xanthophyllen fordern. Der Gehalt an Carotinoiden im WT\* war deutlich erhöht gegenüber dem „normalen“ WT. Der WT\* ist lichtempfindlicher als der WT, weil ihm PSI fehlt [Smart *et al.* 91], und synthetisiert wahrscheinlich mehr Carotinoid-Bindeproteine als Lichtschutz [Hays *et al.* 98]. Von Xanthophyllen ist vielfach berichtet worden, daß sie überschüssige Energie durch Bildungen von Komplexen mit Chl *a* und Antennenproteinen abbauen [Gilmore 97; Kühlbrandt *et al.* 94] (thermische Relaxation durch nicht-photochemisches „Löschen“ [quenchen] der Chl *a* Fluoreszenz). Die Chromophorzusammensetzung unterschiedlicher Organismen und Präparationen wurde zur besseren Übersicht in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Wie oben angedeutet, spielen Xanthophylle eine große Rolle bei der Dissipation von Überschußenergie. In höheren Pflanzen werden die Xanthophylle Violaxanthin und Zeaxanthin im sog. Xanthophyllzyklus ineinander umgewandelt. Violaxanthin überträgt im Schwachlicht Excitonen zu Chl. Im Starklicht wird es zur Zeaxanthin umgewandelt, das Excitonen von Chl übernimmt und unschädlich macht. In einigen Algengruppen sind andere Xanthophylle am Xanthophyllzyklus beteiligt [Wilhelm 99]. Der Xanthophyllzyklus läuft in den LHC ab. Cyanobakterien besitzen keine LHC und es ist auch noch kein Xanthophyllzyklus in Cyanobakterien gefunden worden [Demmig-Adams 90]. Der erhöhte Anteil an Xanthophyllen bei den hier verwendeten Stämmen könnte ein erster Hinweis auf einen Xanthophyll-abhängigen Lichtschutzmechanismus sein, der nur bei hoher Lichtsensibilität der Zellen exprimiert wird. Es ist möglich, daß mit dem WT im Labor bisher nicht solche Bedingungen simuliert werden konnten, so daß sich ein möglicher Lutein-abhängiger Xanthophyllzyklus der Charakterisierung entzogen haben könnte.

**Tabelle 6: Anzahl von Chlorophyllen und Carotinoiden (Car) in unterschiedlichen Organismen und Präparationen.**

Organismus	Präparation	Chl/PSII	Car/PSII (davon β-Carotine)	Xanthophylle	Quelle
<i>Synechocystis</i> sp.	Kernkomplexe	50 – 66	n.b. <sup>a</sup>	-	[Boerner <i>et al.</i> 93]
<i>Synechocystis</i> sp.	Kernkomplexe	77	n.b.	-	[Kirilovsky <i>et al.</i> 92]
<i>Synechocystis</i> sp.	Kernkomplexe	45-50	n.b.		[Metz <i>et al.</i> 89]
<i>Synechocystis</i> sp.	Kernkomplexe	45 ± 5	n.b.	-	[Rögner <i>et al.</i> 90]
<i>Synechocystis</i> sp.	Kernkomplexe	42 ± 2	n.b.	-	[Lakshmi <i>et al.</i> 02]
<i>Synechocystis</i> sp.	Kernkomplexe	39	n.b.	-	[Hays <i>et al.</i> 98]
<i>T. vulcanus</i>	Kernkomplexe	41	n.b.	-	[Kashino <i>et al.</i> 02a]
<i>T. elongatus</i>	Kristallstruktur	35	n.b.	-	[Zouni <i>et al.</i> 01a]
<i>T. elongatus</i>	Kristallstruktur	36	7 (7)	-	[Ferreira <i>et al.</i> 04]
<i>T. vulcanus</i>	Kristallstruktur	36	2 (2)	-	[Kamiya und Shen 03]
<b><i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803</b>	<b>Kernkomplexe</b>	<b>35</b>	<b>11 (3)</b>	<b>8x Lutein</b>	<b>Diese Arbeit</b>
<i>Synechocystis</i> sp.	Kernkomplexe	41	12 (11)	1 Zeaxanthin	[Kashino <i>et al.</i> 02b]
<i>Synechocystis</i> sp.	Kernkomplexe	41 ± 2	9 – 10 (9 - 10)	-	[Tang und Diner 94]
<i>Synechocystis</i> sp.	Kernkomplexe		17 (14)	3 Zeaxanthin und Spuren.	[Tracewell <i>et al.</i> 01]
<i>T. vulcanus</i>	Kernkomplexe		>7 (7)	lose assoziiert	[Ohno <i>et al.</i> 86]
<i>T. vulcanus</i>	Thylakoide		19 (11)	4 Zeaxanthin, 4 Myxoxanthophyll	[Takahashi <i>et al.</i> 85]
Spinat	RZ <sup>b</sup>		2 (2)	-	[Bialek-Bylka <i>et al.</i> 95]
Spinat	RZ		1 (1)	-	[Nanba und Satoh 87]

<sup>a</sup> nicht berichtet, <sup>b</sup> Reaktionszentren bestehend aus D1/D2 und Cyt *b*<sub>559</sub>

Dies war der erste Hinweis auf das Vorhandensein von Lutein in Cyanobakterien. Bisher sind lediglich andere Xanthophylle in Cyanobakterien gefunden worden [van den Hoek *et al.* 93]. Die hier vorgenommene Analyse beruhte jedoch ausschließlich auf der Dekomposition komplexer Absorptionsspektren. Sie war (bedingt durch das Auswertprogramm) auf die Spektren von neun Carotinoiden beschränkt (u.a. β-Carotin, Zeaxanthin, Violoxanthin), unter denen sich das Lutein-Spektrum deutlich abgrenzt. Eine endgültige Identifizierung von Lutein muß mittels chromatographischer Methoden erfolgen.

*Die hohe Reinheit dieser Kernkomplexe und das kleine Chl/PSII-Verhältnis ermöglichten spektroskopische Messungen mit einem verbesserten Signal/Rausch-Verhältnis. So zeigen z.B. Messungen zum Lineardichroismus vom primären Donator P<sub>680</sub> ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis als mit PSII-Kernkomplex-Präparationen, deren Chl/PSII-*

Verhältnis höher (40 – 50 Chl/PSII) liegt [Ahlbrink 02; Ahlbrink und Junge 98]. Dies war eine entscheidende Voraussetzung für die Messungen unter erhöhtem Sauerstoffpartialdruck (Kapitel VIII). Da dort mit dunkeladaptierten Proben gemessen werden mußte, konnte also bei einer Vorbereitungszeit für die Probe von ca. 1 ½ Stunden mit jedem Ansatz nur eine Messung durchgeführt werden. Dies verlangte nach einem guten Signal/Rausch-Verhältnis von Anfang an.

#### b) Aktivität und Haltbarkeit der PSII-Kernkomplexe

Die Elektronentransportraten lagen durchschnittlich bei etwa 3000 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub> · s und waren damit höher als bei bisherigen Präparationen aus unserem Labor: Kernkomplexe aus *Synechocystis* sp., die noch mit PSI verunreinigt waren, zeigten eine maximale ETR von ca. 1400 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub> · s (Schwankungsbreite 600 – 1400 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub> · s). Die Elektronentransportrate war höher als mit Kernkomplexen aus Spinat (Optimum = 1600) und *Chlamydomonas reinhardtii* (PSI-freie Zellen, mit His Tag isoliert: 1900 ± 200). Auch *Synechocystis*-Kernkomplexe nach [Tang und Diner 94] mit sehr geringen Verunreinigungen an PSI ergeben niedrigere ETR von 2400 - 2600 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub> · s. Andere Präparationen zeigen vergleichbare Elektronentransportraten: 3200 und 2900 (His-Tag gereinigte Kernkomplexe aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, [Lakshmi *et al.* 02] und [Kashino *et al.* 02b]), 3100 (Kernkomplexe aus *Synechococcus lividus*, [Lakshmi *et al.* 02]). Einzig PSII-Kernkomplexe aus den thermophilen Cyanobakterien *T. elongatus* (His-Tag gereinigte Kernkomplex mit 3400 [Sugiura und Inoue 99]) und *T. vulcanus* (4000 [Kashino *et al.* 02a]) liefern höhere Elektronentransportraten. Eine Quelle berichtet sogar von einer Elektronentransportrate von 5000 – 6000 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub> · s [Kuhl *et al.* 00] für *T. elongatus*. Die hier neu etablierte Präparation lieferte also hochaktive PSII-Kernkomplexe. Da die absolute Elektronentransportrate mit PSII-Kernkomplexen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 höher als mit PSII-Kernkomplexen aus Spinat war und zudem die Spinat-Kernkomplexe noch mit PSI verunreinigt waren, wurden für die weiterführenden Messungen (Kapitel VI, VII und VIII) in erster Linie die *Synechocystis*-Kernkomplexe verwendet.

Einschränkend muß darauf hingewiesen werden, daß absolute Werte der Elektronentransportraten mit einem gewissen Fehler behaftet sein können. Die gemessenen Elektronentransportraten mit ein und derselben Präparation wichen manchmal um einen Wert von bis zu 1000 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub> · s voneinander ab, wenn zwischenzeitlich der Aufbau der Clark-Elektrode verändert worden war. Die absoluten Elektronentransportraten einer Kernkomplex-Präparation hängen von der Güte der ausgebildeten AgCl-Schicht und vom gut platzierten Auflegen der Teflonmembran ab. Da dies schwer zu kontrollierende Parameter waren, variierten die Elektronentransportraten unter Umständen beträchtlich. Um diesen Fehler bei der Bestimmung der Elektronentransportraten neuer PSII-Kernkomplex-Präparationen nicht einfließen zu lassen, wurden neue Kernkomplex-Präparationen zum Vergleich immer zusammen mit älteren Präparationen vermessen. Aus den relativen Werten wurden dann die absoluten errechnet, wenn dies auf Grund eines suboptimalen Aufbaus der Clark-Elektrode nötig war. Als Beispiel sei hier genannt, daß eine PSII-Kernkomplex-Präparation, die in einem anderen Labor eine Elektronentransportrate von ≈ 7000 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub> · s lieferte, mit unserem Aufbau und unter Berücksichtigung von Vergleichsmessungen „nur“ eine Elektronentransportrate von ca. 2500 - 3000 mmol Elektronen/mol<sub>Chl</sub> · s hatte. Auch die Dicke der Teflonmembran bestimmt die meßbare Elektronentransportrate.

Die Kernkomplexe hatten ein schmales pH-Optimum, das bei pH 6.6 lag, was vergleichbar ist mit Literaturwerten von pH 6 mit PSII-Kernkomplexen aus höheren Pflanzen

[Bögershausen und Junge 95] und *Synechocystis*-Kernkomplexen (präpariert nach [Kirilovsky *et al.* 92]) mit einem pH-Optimum von 6.5 [Hundelt 99]. Ein deutlich breiteres pH-Optimum haben Kernkomplexe aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus* sp. [Schlodder und Meyer 87]. Stabilere Proteine sind ein Kennzeichen thermophiler Organismen (siehe unten), auf Grund der extremen Umweltbedingungen in denen sie wachsen. Die Reaktivierung von PSII-Kernkomplexen, die auf pH 4.5 bzw. 5.5 titriert worden waren, lieferte in beiden Fällen eine Restaktivität von ca. 70% und war nicht zeitabhängig (siehe V.5.4). Es gibt wahrscheinlich zwei Populationen von Kernkomplexen, wovon die eine durch niedrige pH-Werte irreversibel geschädigt wurde.

Die Hemmbarkeit von PSII-Kernkomplexen durch DCMU ist ein Maß für die Intaktheit der  $Q_B$ -Bindestelle [Hundelt 99; Ikeuchi und Inoue 86]. Die Sauerstoffproduktion dieser Kernkomplexe wurde mit 10  $\mu$ M DCMU zu 80% gehemmt. Die maximale Hemmung lag bei 93%. Diese Ergebnisse konnten mit Einzelblitzmessungen an Thylakoiden (98% Hemmung, Abschnitt VII.2.1) und den spektroskopischen Messungen (92% Hemmung) bestätigt werden. Eine Hemmung von 70 – 80% durch 10  $\mu$ M DCMU wird auch von Tang & Diner [Tang und Diner 94] beschrieben. Andere Autoren berichten von einer Hemmung von 85 – 93% mit 10  $\mu$ M DCMU [Hundelt 99; Kashino *et al.* 02b; Renger und Wolff 75; Sugiura *et al.* 99] und [Sugiura und Inoue 99]. *Die Akzeptorseite war im Zuge der Präparation weitgehend intakt geblieben.* Die niedrige Elektronentransportrate mit Ferricyanid (35%, Tabelle 20) bestätigte die Intaktheit der  $Q_B$ -Bindestelle. Ferricyanid ist ein hydrophiler Elektronenakzeptor. Je mehr die  $Q_B$ -Bindestelle durch die Präparation vom nativen, hydrophoben Zustand in einen hydrophileren Zustand überführt wird, desto höher ist die Elektronentransportrate mit Ferricyanid. Oder anders herum: Je intakter die  $Q_B$ -Bindestelle ist, desto schlechter kann Ferricyanid Elektronen am PSII abgreifen und desto niedriger fallen die gemessenen Elektronentransportraten aus [Catucci *et al.* 98; Ikeuchi und Inoue 86; Kashino *et al.* 02b].

Durch Titration der Kernkomplexe auf einen pH von 9.5 – 10 wurde der Mn-Komplex entfernt, was zu einer Verringerung der Sauerstoffproduktion auf 3% der Kontrolle führte. Die Inaktivierung entsprach den Literaturwerten [Ahlbrink *et al.* 98; Mulkidjanian *et al.* 96].

In verdünnten Lösungen erleiden PSII-Kernkomplexe einen Aktivitätsverlust ([Papageorgiou und Murata 95] und Seite 62). *Durch Zugabe von Glycin-Betain wurde die Stabilität der PSII-Kernkomplexe bei Raumtemperatur drastisch verbessert. Ein Rühren in verdünnter Lösung führte selbst nach 1 h (in Dunkelheit) nicht zu einer Verringerung der Aktivität.* Auf Eis konnten die Kernkomplexe im Dunkeln für 6 h ohne Aktivitätsverlust inkubiert werden. Nach 24 Stunden Lagerung bei 4 °C betrug die Aktivität immer noch 71%. Allein Kernkomplexe aus thermophilen Organismen haben, bedingt durch ihren Lebensraum, noch stabilere Proteine. PSII-Kernkomplexe aus *T. elongatus*, die in Gegenwart von 10% Glycerin inkubiert worden sind, zeigen noch am 8. Tag der Lagerung im Dunkeln (bei 20 °C) 100% Aktivität. Der positive Einfluß von Glycin-Betain auf die Aktivität von PSII-Kernkomplexen und auf die Stabilisierung der Struktur ist in der Literatur beschrieben worden [Boekema *et al.* 98; Catucci *et al.* 98; Papageorgiou und Murata 95; Schiller und Dau 00] und wurde hier bestätigt. Die Effekte von Glycin-Betain sind vielfältig. Es wirkt als Frostschutz und verhindert die Dissoziation der UE bei hohen Salzkonzentrationen [Popova und Busheva 01]. Es verzögert die Inaktivierung durch hohe Temperaturen, stabilisiert den Mn-Komplex und erhöht die Elektronentransportrate [Allakhverdieva *et al.* 99; Catucci *et al.* 98]. Die Wirkungsweise von Glycin-Betain auf die einzelnen Faktoren ist nicht vollständig geklärt. Die Stabilisierungsfunktion erfüllt Glycin-Betain, zumindest teilweise, durch Wechselwirkungen mit den polaren Köpfen der

Phospholipide [Popova und Busheva 01]. Soweit bekannt, werden die Wirkungsweisen der Stabilisierung bei Schiller und Dau [Schiller und Dau 00] zusammengefaßt.

Der Elektronenakzeptor 2,5-DCBQ schädigte in hohen Konzentrationen (1 mM DCBQ/1.5  $\mu$ M Chl) bei Inkubationszeiträumen  $> 5$  die PSII-Kernkomplexe irreversibel (Seite 62). Eine längere Inkubation bei niedrigeren Konzentrationen (200  $\mu$ M 2,5 DCBQ/8  $\mu$ M Chl) hatte dagegen keine schädigende Wirkung, jedoch wurde der Elektronenakzeptor selbst inaktiviert. Wenn also wie für die Sauerstoffmessungen (Kapitel VIII) Kernkomplexe in einer Lösung mit dem Akzeptor untersucht werden sollten, konnte der Elektronenakzeptor frühestens ca. 5 min vor Start der Messungen nachträglich injiziert werden, um seine Deaktivierung zu verringern. Einhergehend mit der Verringerung der Elektronentransportrate war ein Farbumschlag der Lösung ins tief Braune zu beobachten. Dies deutete auf Chinhydronbildung hin. Chinone und Hydrochinone bilden 1:1 Komplexe, die viel weniger wasserlöslich sind als die Einzelmoleküle [Fieser und Fieser 79]. Es ist also wahrscheinlich, daß bei längerer Inkubation des Elektronenakzeptors ein gewisser Anteil reduziert wurde, wonach die Chinhydronbildung ablief. Der Komplex kann nicht mehr als Elektronenakzeptor für PSII dienen, so daß die Aktivität stark absank. Die Voraussetzung der Chinhydronbildung – die Reduktion einiger 2,5-DCBQ-Moleküle zur Hydrochinonform - ging (u.a.) wahrscheinlich einher mit einer, zumindest partiellen, Oxidation von PSII, was die Schädigung von PSII durch hohe Konzentrationen von 2,5-DCBQ erklären würde.

Der irreversible Verlust an Aktivität nach Inkubation der Kernkomplexe für 10 - 15 min bei  $\approx 20$  bar  $O_2$  und nachfolgender Dekompression in Luft war geringer als 30%. Proben, die nur 60 – 80 min entgast worden waren, zeigten Restaktivitäten von 73 – 88%. Bei diesen Messungen war die Konzentration von  $O_2$  in der Probe aber noch erhöht, was mit der Clark-Elektrode gemessen wurde. Der Verlust an 12 – 27% Aktivität war also eine Summe aus Hemmung und irreversibler Schädigung. Hinzu kommt, daß durch das heftige Rühren (zum Entgasen der Probe) die Probe aufkochte, wodurch weitere Zentren nachträglich beschädigt wurden. Daraus folgt, daß der Anteil an Photosystemen, die nach der Inkubation unter Sauerstoffhochdruck vollständig aktiv waren, wahrscheinlich größer war, als anhand der Elektronentransportrate nach Dekompression abgeschätzt worden war. *Wie die Blitzabhängigkeit der stabilen Absorptionsänderungen zeigte (Abbildung 28), waren die PSII-Kernkomplexe gut geeignet für repetierend-semidunkeladaptierte Messungen (2 min Pause pro Meßserie). Damit konnte ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis bei spektroskopischen Messungen materialsparend erreicht werden.* Die hier vorgestellte Präparation verhielt sich anders als es für PSII-Kernkomplexe (präpariert nach [Kirilovsky et al. 92]) berichtet wird [Hundelt 99]. Letztere können für repetierende Messungen mit 25 s Abstand zwischen den Meßserien verwendet werden. Das Blitzmuster bleibt dabei relativ deutlich, aber nur wenn kein Glycerin im Meßpuffer vorhanden ist. Die in dieser Arbeit vorgestellten Kernkomplexe zeigten weder mit noch ohne Glycerin synchronisierte Oszillationen bei 25 s Abstand zwischen den Serien (Abbildung 28 A). Dafür war die Synchronisation der dunkeladaptierten und der repetierend-semidunkeladaptierten (mit 2 min Abstand) Blitzmuster deutlicher und die Amplitudenbeträge größer als mit Kernkomplexen aus Erbsen [Bögershausen und Junge 95] und dem WT von *Synechocystis* sp. PCC 6803 [Hundelt 99]. Da ohne 1 M Glycin-Betain und Saccharose keine deutliche Viereroszillation zu messen war, bedeutete dies, daß die einzelnen S-Zustände selbst in den 100 ms Blitzabstand zu einem nicht unerheblichen Anteil in den vorhergehenden S-Zustand relaxierten, so daß die Synchronisation der S-Zustände deutlich schneller verloren ging. Literaturwerte für die Reduktionen der Zustände  $S_2$  und  $S_3$  ( $\tau_{1/2}$ ) liegen für Thylakoide und Zellen im Bereich von 10 s – 150 s bei Raumtemperatur [Hundelt 99], [Messinger 93] und [Rutherford 89]. Mit PSII-Kernkomplexen nach van Leeuwen wird für

S<sub>3</sub> eine Halbwertszeit von 300 ms berichtet [Bögershausen 97]. Ohne Glycin-Betain und Saccharose fand also eine erhebliche Destabilisierung der S-Zustände statt.

Die Dunkelverteilung der PSII-Kernkomplexe entsprach dem Verhältnis 70 / 30 (S<sub>1</sub> / S<sub>0</sub>) und war vergleichbar mit anderen PSII-Kernkomplex-Präparationen, die ein Verhältnis von 75 / 25 [Haumann und Junge 94] oder 73 / 27 [Hundelt *et al.* 98a] aufweisen. Bei der Ermittlung wurden lediglich die Amplitudenanteile der Millisekundenphase auf dem dritten und vierten Blitz miteinander verglichen. Fehlanregungen ( $\alpha$ , *misses*) wurden vernachlässigt. Zusammen mit dem schlechten Signal/Rausch-Verhältnis bei sieben Einzelmessungen könnte dies dazu geführt haben, daß der Anteil an S<sub>1</sub> im dunkeladaptierten Zustand etwas zu gering eingeschätzt wurde.

## **VI. Einfluß der Punktmutationen D1-E189K, R und Q auf das Elektronentransfergeschehen an der Donatorseite von PSII**

Die hier vorgestellten Ergebnisse sind in drei Artikeln veröffentlicht [Clausen *et al.* 01a; Clausen *et al.* 01b; Junge *et al.* 02] worden. Die Ergebnisse wurden in diesem Kapitel zusammengefaßt, durch zusätzliches Material ergänzt und mit späteren Veröffentlichungen anderer Gruppen, die die hier vorgetragenen Ergebnisse bestätigen, zusammenhängend diskutiert.

### **VI.1 Einleitung**

Die Aminosäuren in der Umgebung des katalytischen *OEC* sind entscheidend für das Verständnis von dessen Funktionsweise (siehe u.a. [Debus 01]). Neue Ergebnisse legen nahe, daß für die schnelle Oxidation von  $Y_Z$  durch  $P_{680}^{+\bullet}$  eine Deprotonierung von  $Y_Z$  erforderlich ist [Ahlbrink *et al.* 98], welche durch die Aminosäure D1-H190 vermittelt wird [Diner und Nixon 98; Hays *et al.* 98; Hays *et al.* 99; Mamedov *et al.* 98]. Die Aminosäure D1-H332 ist wahrscheinlich ein Ligand des Mn-Komplexes [Debus *et al.* 01] und D1-D170 ist entweder ein direkter oder indirekter [Chu *et al.* 01] (über eine Wasserstoffbrückenbindung [Debus 01; Diner 01]) Ligand des Mn-Komplexes. Eine Reihe von Untersuchungen zielte auf die AS D1-E189, den Nachbarn von D1-His190. Wenigstens 17 Punktmutationen sind an dieser Position durch ortsgerichtete Mutagenese durchgeführt worden: Gln, Asp, Asn, His, Ser, Thr, Ala, Gly, Cys, Lys, Arg, Leu, Ile, Val, Met, Phe und Tyr [Chu *et al.* 95a; Debus *et al.* 98; Debus *et al.* 00; Svensson *et al.* 98]. Von diesen Stämmen wachsen nur die Gln, Lys, Arg, Leu und Ile Mutanten photoautotroph. Unter Berücksichtigung der z.T. veränderten Konzentration von PSII in den Mutantenzellen entwickeln Lys, Arg und Ile Mutanten Sauerstoff mit zum WT vergleichbaren Raten, wohingegen die Rate der Sauerstofffreisetzung der Gln und Leu Mutanten auf etwa 70% vom WT sinkt [Chu *et al.* 95a; Debus *et al.* 00]. Keine der anderen 12 Mutanten entwickelt Sauerstoff in signifikanten Mengen. Es ist bemerkenswert, daß der Austausch des negativen Glu durch ein negatives Asp eine nicht-photoautotrophe Mutante liefert, wohingegen der Austausch gegen positive AS (Arg, Lys) oder neutrale AS (Gln) photoautotrophe Mutanten liefert [Debus *et al.* 00]. Das betont die strukturelle Bedeutung einer langen Seitenkette an Position D1-189. Es gibt auch andere Belege in der Literatur (für andere Enzyme), daß der Austausch von Glu durch Asp nicht grundsätzlich in einer konservativen Mutation resultiert [Babu *et al.* 92; Chen *et al.* 00; Joseph-Mccarthy *et al.* 94; Loll und Lattman 90; Mizrahi *et al.* 94].

Der Einfluß der meisten der 17 Mutationen auf den Zusammenbau oder die Stabilität des Mn-Komplexes war gering, so daß D1-E189 vermutlich kein Ligand des Mn-Komplexes ist [Chu *et al.* 95a; Debus *et al.* 00; Svensson *et al.* 98]. Auf der Basis erster Untersuchungen mit Gln, Asp und Asn Mutanten ist vorgeschlagen worden, daß D1-Glu189 an einem Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt ist. Dieses Geflecht ist für die Positionierung einer weiteren Gruppe verantwortlich, welche an der Protonenfreisetzung von PSII mitwirkt [Chu *et al.* 95a]. Kürzlich ist vorgeschlagen worden, daß D1-Glu189 entweder direkt oder indirekt (über Positionierung eines

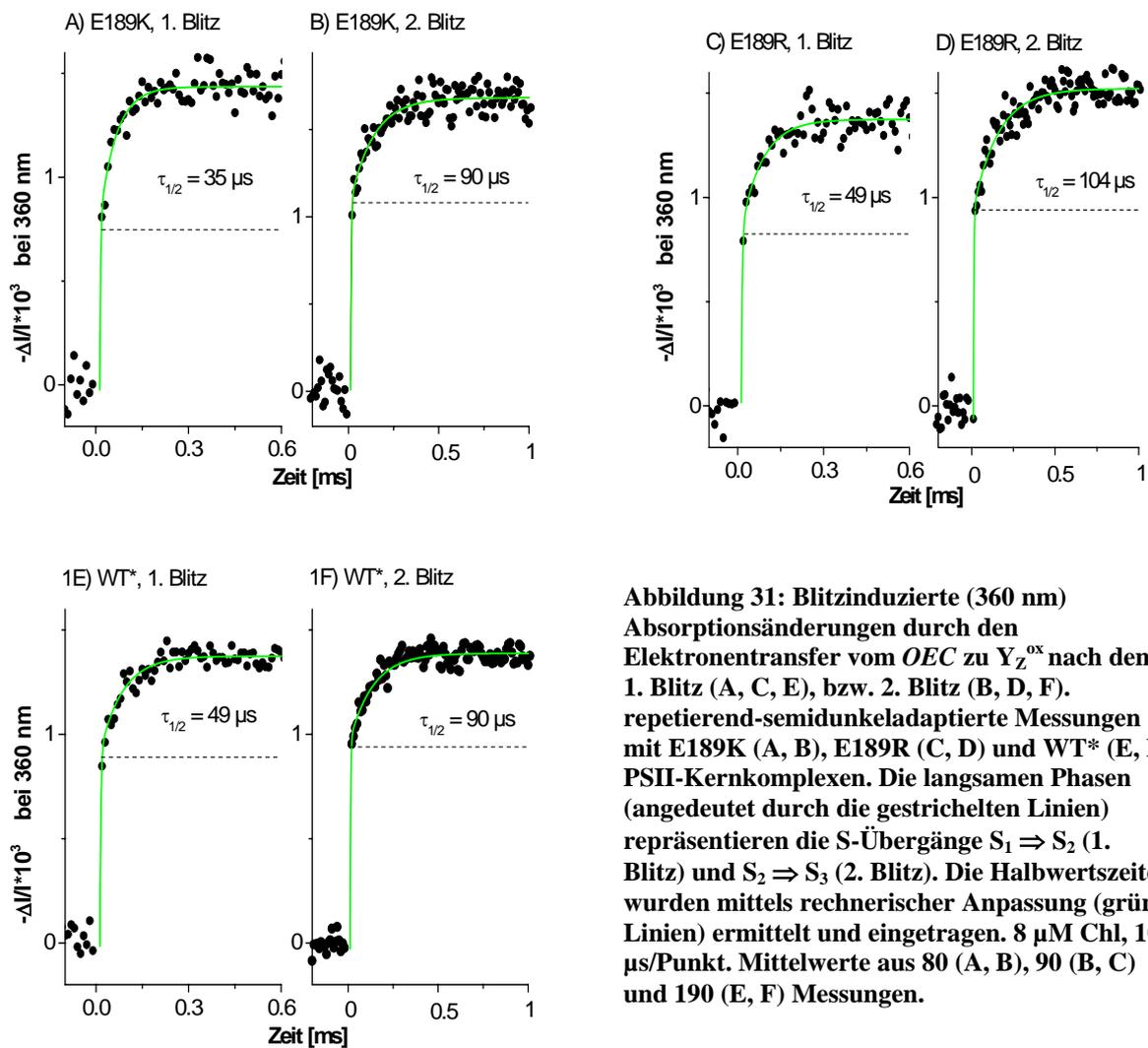
Wassermoleküls oder einer anderen Gruppe) ein Proton von D1-His190 aufnimmt [Babcock 95; Tommos und Babcock 98; Tommos und Babcock 00]. Verschiedene Autoren haben vorgeschlagen, daß eine Wasserstoffbrückenbindung D1-Glu189 und D1-His190 verbindet [Babcock 95; Haumann *et al.* 99; Svensson *et al.* 98; Tommos und Babcock 98; Tommos und Babcock 00] mit der Funktion, daß D1-Glu189 entweder für die optimale räumliche Ausrichtung von D1-His190 [Svensson *et al.* 98] oder für eine Verschiebung des  $pK_a$ -Wertes [Haumann *et al.* 99] von D1-His190 verantwortlich ist. Vor kurzem sind die ESR- und Elektronentransfer-Eigenschaften von PSII-Kernkomplexen aus den Mutanten Gln, Leu, Asp, Asn, His, Gly, und Ser untersucht worden [Debus *et al.* 00]. Intakte, sauerstoffentwickelnde PSII-Kernkomplexe aus der Gln Mutante (D1-E189Q) zeigen ein unverändertes  $S_1$  und  $S_2$  *multiline* ESR-Signal, wohingegen PSII-Kernkomplexe aus Mutanten, die keinen Sauerstoff entwickeln, nicht weiter als bis zu einem modifizierten Zustand  $S_2^* Y_Z^{ox}$  oxidiert werden können [Debus *et al.* 00]. Außerdem ist die Rekombination zwischen  $Q_A^{\bullet}$  und  $Y_Z^{ox}$  in diesen Mutanten beschleunigt, was den Einfluß dieser Mutationen auf die Redox Eigenschaften von  $Y_Z$  belegt [Debus *et al.* 00]. Auf der Basis der letztgenannten Ergebnisse ist vorgeschlagen worden, daß die Mitwirkung von D1-E189 in dem Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen die Konfiguration des Systems  $(Mn)_4$ - $Y_Z$  für schnellen Protonen- und Elektronentransfer vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{ox}$  und für schnellen Protonen-Transfer von  $Y_Z$  zu D1-His190 optimiert [Debus *et al.* 00]. Darüber hinaus ist aus den Ergebnissen geschlossen worden, daß D1-Glu189 ein Proton weder direkt aufnimmt noch abgibt, sondern statt dessen eine aktive Gruppe ausrichtet, die ein Proton von D1-H190, als Antwort auf die Oxidation von  $Y_Z$ , aufnimmt [Debus *et al.* 00].

Um die Funktion von D1-E189 und den Einfluß von D1-E189 auf den Mn-Komplex und  $Y_Z$  genauer beschreiben zu können, wurden in diesem Kapitel die Raten des Elektronentransfers vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{ox}$  und von  $Y_Z$  zu  $P_{680}^{\bullet+}$  in PSII-Kernkomplexen aus den drei photoautotrophen Mutanten D1-E189Q, D1-E189R und D1-E189K gemessen. Es wurden drastische, elektrostatische Effekte erwartet, weil der native, vermutlich negativ-geladene AS-Rest D1-Glu189 gegen vermutlich positiv-geladene Reste (Arg und Lys) bzw. gegen einen neutralen AS-Rest ausgetauscht worden war.

## VI.2 Ergebnisse

### VI.2.1 Halbwertszeiten der S-Übergänge in D1-E189Q, D1-E189K, D1-E189R und WT\* PSII Kernkomplexen

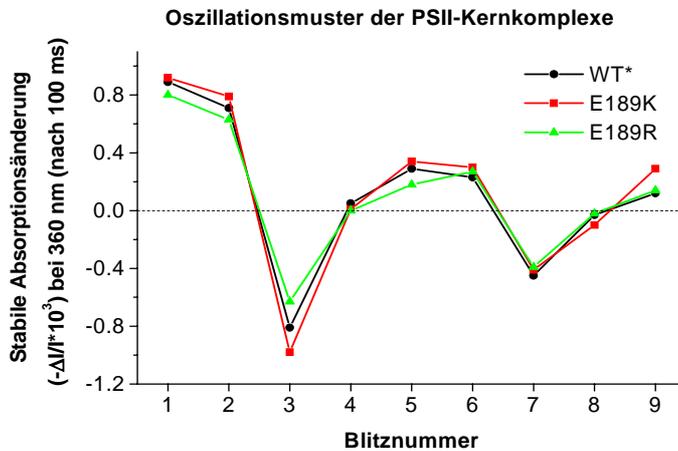
Abbildung 31 zeigt die blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei 360 nm der ersten



**Abbildung 31: Blitzinduzierte (360 nm) Absorptionsänderungen durch den Elektronentransfer vom  $OEC$  zu  $Y_Z^{ox}$  nach dem 1. Blitz (A, C, E), bzw. 2. Blitz (B, D, F). repetierend-semidunkeladaptierte Messungen mit E189K (A, B), E189R (C, D) und WT\* (E, F) PSII-Kernkomplexen. Die langsamen Phasen (angedeutet durch die gestrichelten Linien) repräsentieren die S-Übergänge  $S_1 \Rightarrow S_2$  (1. Blitz) und  $S_2 \Rightarrow S_3$  (2. Blitz). Die Halbwertszeiten wurden mittels rechnerischer Anpassung (grüne Linien) ermittelt und eingetragen.  $8 \mu\text{M}$  Chl,  $10 \mu\text{s}$ /Punkt. Mittelwerte aus 80 (A, B), 90 (B, C) und 190 (E, F) Messungen.**

beiden Blitze mit repetierend-semidunkeladaptiert vermessenen PSII-Kernkomplexen aus den Mutanten D1-E189R, D1-E189K und WT\*. Das ansteigende Signal wurde mit zwei Exponentialfunktionen rechnerisch angepaßt (grüne Linien). Die Transienten waren aus folgenden Komponenten zusammengesetzt: Der nicht aufgelöste, schnelle Anstieg ( $\tau_{1/2} \gg 20 \mu\text{s}$ ) reflektiert die Reduktionen des primären Chinon-Akzeptors  $Q_A$  (siehe V.6). Die langsam ansteigenden Phasen beschreiben die Oxidation des Mn-Komplexes. Mit D1-E189K PSII-Kernkomplexen ergab die rechnerische Anpassung eine Halbwertszeit von  $\tau_{1/2} = 35 \pm 10 \mu\text{s}$  im ersten Blitz (Abbildung 31 A) und von  $90 \pm 15 \mu\text{s}$  im zweiten Blitz

(Abbildung 31 B). Für PSII-Kernkomplexe aus der Mutante D1-E189R ergaben sich Halbwertszeiten von  $49 \pm 10 \mu\text{s}$  im ersten Blitz und  $104 \mu\text{s} \pm 20$  im zweiten Blitz (Abbildung 31 C, D) und mit D1-E189Q-Kernkomplexen  $35 \pm 6 \mu\text{s}$  bzw.  $90 \mu\text{s} \pm 35 \mu\text{s}$  (Daten nicht dargestellt).



**Abbildung 32: Ausmaß der stabilen Absorptionsänderung der Transienten nach 100 ms (gemessen bei 360 nm) in Abhängigkeit von der Blitznummer. Die Viereroszillation war auch unter repetierend-semidunkeladaptierten Bedingungen deutlich. PSII-Kernkomplexe aus D1-E189K (rote Vierecke), D1-E189R (grüne Dreiecke) und WT\* (schwarze Kreise).**

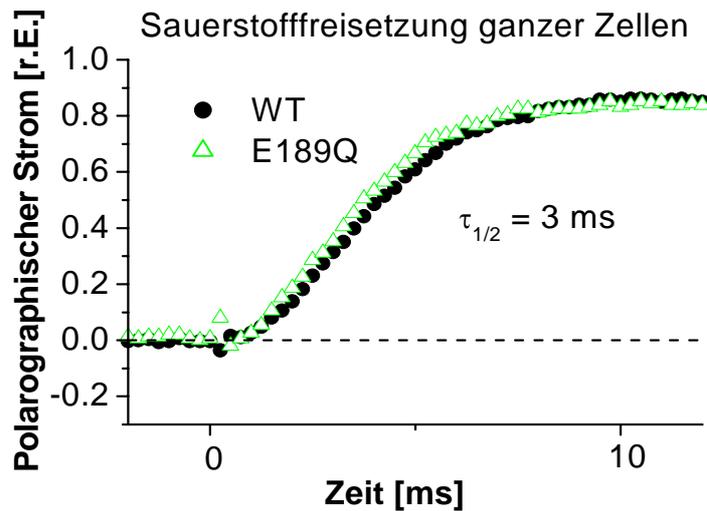
Im dunkeladaptierten Zustand liegen die PSII-Kernkomplexe vor allem im Zustand  $S_1$  vor. Dies wurde durch das Oszillationsmuster einer Meßreihe mit neun Blitzen bestätigt (Abbildung 32, vgl. auch Abbildung 28). Daher beschrieben die langsamen Signale auf dem ersten Blitz den Übergang  $S_1 \Rightarrow S_2$  und den Übergang  $S_2 \Rightarrow S_3$  auf dem zweiten Blitz. Mit D1-E189Q, K und D1-E189R PSII-Kernkomplexen waren die Halbwertszeiten für die Übergänge  $S_1 \Rightarrow S_2$  und  $S_2 \Rightarrow S_3$  nahezu unverändert im Vergleich zum WT\* ( $49 \pm 10 \mu\text{s}$ , und  $90 \pm 10 \mu\text{s}$ , Abbildung 31 E, F). Die Ergebnisse dieser Analysen wurden in Tabelle 7 zusammengefaßt. Innerhalb der Fehlergrenzen waren die hier vorgestellten Ergebnisse identisch mit den aus der Literatur berichteten Halbwertszeiten für PSII-Kernkomplexe aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus* sp. ( $40 \mu\text{s}$  für  $S_1 \Rightarrow S_2$  und  $100 \mu\text{s}$  für  $S_2 \Rightarrow S_3$ ; [Saygin und Witt 87]).

**Tabelle 7: Halbwertszeiten der Elektronentransferreaktionen in Zellen und PSII-Kernkomplexen verschiedener Mutanten und WT\***

Reaktion	WT / WT*	E189Q	E189K	E189R
$S_1 \Rightarrow S_2$	$46 \pm 5 \mu\text{s}$ , n = 190	$35 \pm 6 \mu\text{s}$ , n = 55 <sup>a</sup>	$44 \pm 7 \mu\text{s}$ , n = 80	$41 \pm 7 \mu\text{s}$ , n = 90
$S_2 \Rightarrow S_3$	$90 \pm 5 \mu\text{s}$ , n = 190	$90 \pm 35 \mu\text{s}$ , n = 55 <sup>a</sup>	$99 \pm 7 \mu\text{s}$ , n = 80	$96 \pm 7 \mu\text{s}$ , n = 90
$S_4 \rightarrow S_0$	$1.1 \text{ ms}$ , n = 55 <sup>c</sup>	$1.2 \text{ ms}$ , n = 50 <sup>c</sup>	$1.2 \text{ ms}$ , n = 50 <sup>c</sup>	$1.4 \text{ ms}$ , n = 50 <sup>c</sup>
O <sub>2</sub> -Produktion (Zellen)	$1.5 \text{ ms} \pm 0.5$ , n = 5 <sup>b</sup>	$1.5 \pm 0.5 \text{ ms}$ , n = 5 <sup>b</sup>	nicht bestimmt	nicht bestimmt
O <sub>2</sub> -Produktion (Thylakoide)	$0.7 \pm 0.2 \text{ ms}$ , n = 1	$0.6 \pm 0.2 \text{ ms}$ , n = 1	$0.7 \pm 0.2 \text{ ms}$ , n = 1	$0.7 \pm 0.2 \text{ ms}$ , n = 1
P <sub>680</sub> <sup>+</sup> -Reduktion:				
a) Intakte Kernkomplexe	$30 \pm 3 \text{ ns}$ (36%) $253 \pm 21 \text{ ns}$ (20%) > 2 $\mu\text{s}$ (45%) n = 1950	$38 \pm 2 \text{ ns}$ (24%) $259 \pm 10 \text{ ns}$ (21%) > 2 $\mu\text{s}$ (55%) n = 800	$27 \pm 0 \text{ ns}$ (48%) $251 \pm 6 \text{ ns}$ (21%) > 2 $\mu\text{s}$ (31%) n = 1800	$30 \pm 1 \text{ ns}$ (41%) $304 \pm 21 \text{ ns}$ (24%) > 2 $\mu\text{s}$ (35%) n = 1750
b) Mn-verarmte Kernkomplexe	$780 \pm 10 \mu\text{s}$ (87%) > 2 ms (13%) n = 300	$650 \pm 20 \mu\text{s}$ (96%) > 2 ms (4%) n = 150	nicht bestimmt	nicht bestimmt

<sup>a</sup> nicht abgebildet in Abbildung 31; <sup>b</sup> abgeschätzt unter Berücksichtigung der Diffusion (siehe Text); <sup>c</sup> Fehler < 0.1 ms

Die Ergebnisse waren vergleichbar mit solchen von Kernkomplexen und BBY aus höheren Pflanzen ( $\tau_{1/2} = 55 - 110 \mu\text{s}$  für  $S_1 \Rightarrow S_2$  und  $130 - 380 \mu\text{s}$  für  $S_2 \Rightarrow S_3$  [Haumann *et al.* 97a; Karge *et al.* 97; Rappaport *et al.* 94; Razeghifard *et al.* 97; Razeghifard und Pace 97]) und Kernkomplexen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 [Hundelt *et al.* 98a], die nach einer anderen Vorschrift präpariert worden sind ( $100 \mu\text{s}$  und  $220 \mu\text{s}$  für  $S_1 \Rightarrow S_2$  bzw.  $S_2 \Rightarrow S_3$ ). Die Halbwertszeit des sauerstoffentwickelnden S-Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  wurde mit zwei voneinander unabhängigen Methoden bestimmt. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 33,



**Abbildung 33: Vergleich der polarographischen Signale mit WT-Zellen und D1-E189Q-Zellen. Die blitzinduzierte Sauerstoffabgabe auf dem dritten Blitz war in beiden Fällen mit einer effektiven  $\tau_{1/2}$  von 3 ms (intrinsische  $\tau_{1/2} = 1.5 \text{ ms}$ ; siehe Text) identisch. 25  $\mu\text{M}$  Chl, Zeitauflösung 50  $\mu\text{s}$ /Punkt, MW aus 5 Messungen; nur jeder 5. Punkt wurde abgebildet.  $T \approx 20^\circ\text{C}$ .**

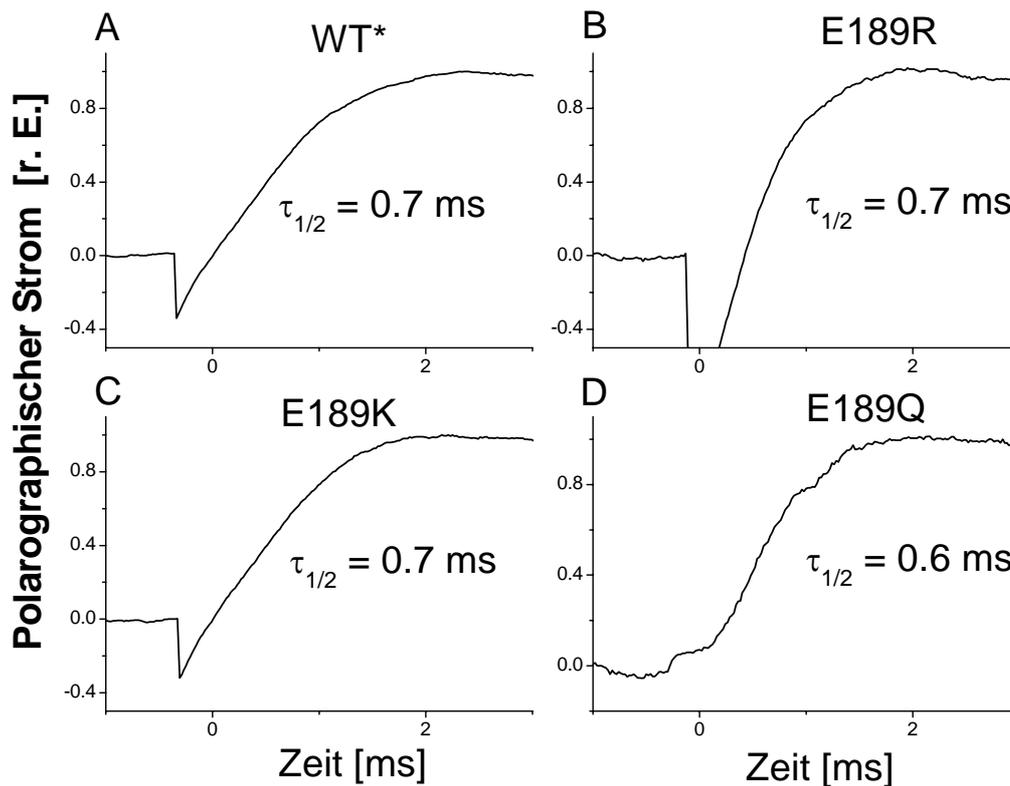
Abbildung 34 und Abbildung 35 dargestellt. Zeitaufgelöste, polarographische Messungen (siehe IV.14) der Sauerstofffreisetzung nach dem dritten Blitz (Abbildung 33) lieferten identische Raten mit Wildtyp-Zellen (schwarze Punkte) und mit Zellen der Mutante D1-E189Q (grüne Dreiecke). Als Annahme galt, daß das ansteigende Signal mit einer effektiven Halbwertszeit von  $\tau_{1/2} = 3 \pm 0.5 \text{ ms}$  (für WT und D1-E189Q) das Resultat zweier konsekutiver Reaktionen war: (1) die Produktion von Sauerstoff (intrinsische  $\tau_{1/2} \approx 1.5 \text{ ms}$ , Tabelle 7) und (2) die Diffusion von  $\text{O}_2$  zur Elektrode ( $\tau_{1/2} \approx 1.5 \text{ ms}$ ). Die Details dieser Annahme sind in [Hundelt *et al.* 98a] beschrieben. In Abbildung 34 wurde die zeitaufgelöste Sauerstofffreisetzung (siehe IV.14) mit Thylakoiden vom WT\* und den Mutanten D1-E189K, Q und R abgebildet. Mit Thylakoiden waren die polarographischen Signale nicht durch Diffusion des Sauerstoffs zur Elektrode überlagert (genaue Analyse in Kapitel VII). Abbildung 34 A – C zeigen Originalspuren polarographischer Messungen ohne Abzug der Artefakte (für eine genaue Beschreibung siehe Kapitel VII). Die Amplituden wurden auf 1 normiert. In Abbildung 34 D wurde beispielhaft das polarographische Signal nach Abzug der Artefakte (siehe Kapitel VII) dargestellt. Die Halbwertszeiten der Sauerstofffreisetzung waren in den Mutanten unverändert gegenüber dem WT\*. Sie betragen  $\tau_{1/2} = 0.7 \text{ ms}$  mit WT\*, E189K und E189R und  $0.6 \text{ ms}$  mit E189Q-Thylakoiden.

In Tabelle 8 wurden die Elektronentransportraten von Thylakoiden und ganzen Zellen im Dauerlicht zusammengefaßt. Zum Vergleich wurden die Amplituden (aus spektroskopischen Messungen mit PSII-Kernkomplexen) des sauerstofffreisetzenden S-Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  mit angeführt. Die Aktivität der Mutanten D1-E189K und D1-E189R war nahezu unverändert im Vergleich zum WT\*, aber ungefähr um die Hälfte verringert in der Mutante D1-E189Q. Die Verringerung der Elektronentransportrate im Dauerlicht bei D1-E189Q auf  $\approx 50\%$  entsprach den Literaturwerten [Pujols-Ayala und Barry 02].

**Tabelle 8: Elektronentransportraten [ $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chlorophyll} \cdot \text{h}$ ] im Dauerlicht von Zellen und PSII-Kernkomplexen aus Mutanten und WT\***

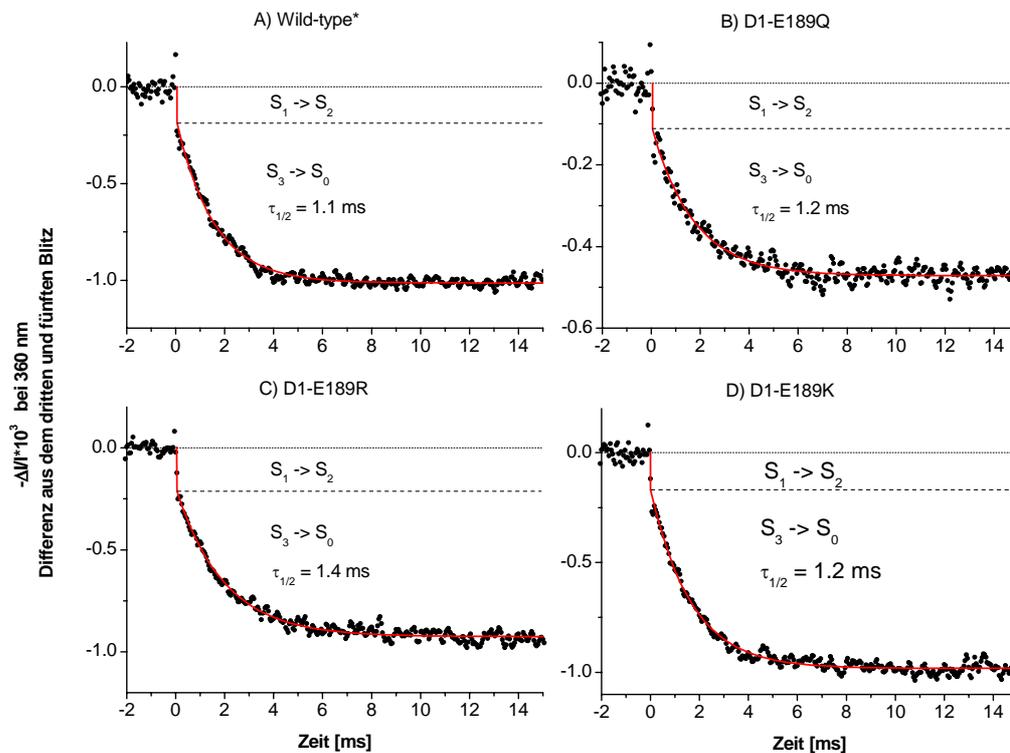
Material	WT*	D1-E189K	D1-E189R	D1-E189Q
ETR (Zellen)	1031 (100%)	885 (86%)	828 (80%)	446 (43%)
ETR (Kernkomplexe)	2100 (100%)	2000 (95%)	1900 (90%)	1000 (48%)
Amplitude von $S_4 \rightarrow S_0$ <sup>a</sup>	0.86 (100%)	0.81 (94%)	0.73 (85%)	0.37 (43%)

<sup>a</sup> bestimmt aus Abbildung 35



**Abbildung 34: Polarographische Signale (auf dem dritten Blitz) mit Thylakoiden von B) D1-E189R, C) D1-E189K, D) D1-E189Q und A) WT\*. Zeitaufgelöste Einzelblitzmessungen mit einer zentrifugierbaren Platinelektrode. In den Abbildungen A – C wurden die polarographischen Rohsignale (nach Normierung auf eine einheitliche Amplitude) dargestellt. In Abbildung D wurde das polarographische Signal nach Abzug der Artefakte (siehe Kapitel VII) dargestellt. Die Halbwertszeiten wurden eingetragen.  $3 \mu\text{M Chl}$ ,  $20 \mu\text{s/Punkt}$ . Die Temperatur wurde bei diesen Messungen nicht reguliert, betrug aber ca.  $27^\circ\text{C}$ .**

Die Halbwertszeit der Reduktion des Mn-Komplexes wurde über blitzinduzierte Absorptionsänderungen bei 360 nm mit repetierend-semidunkeladaptierten, sauerstoffentwickelnden PSII-Kernkomplexen aus D1-E189Q, R, K und WT\* gemessen. Oxidations- und Reduktionsreaktionen des Mn-Komplexes und der Akzeptorseite ( $Q_A$ ) tragen zu den Absorptionsänderungen bei dieser Wellenlänge bei (vgl. Abschnitt V.3). Um die akzeptorseitige Komponente aus dem Signal zu entfernen, die auf jedem Blitz gleich

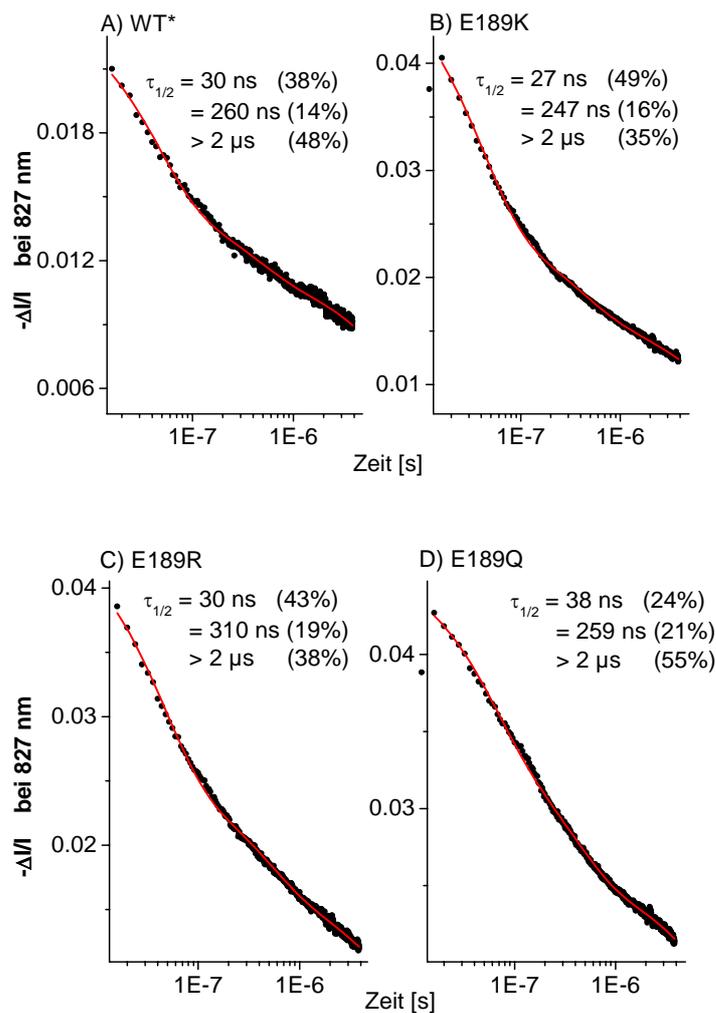


**Abbildung 35:** Kinetiken des S-Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$ . Differenz aus dem 3. und 5. Blitz. 8  $\mu$ M Chl, Zeitauflösung 50  $\mu$ s/Punkt; geglättet über zwei Punkte. PSII-Kernkomplexe aus A) WT\*, B) D1-E189Q, C) D1-E189R und D) D1-E189K. MW aus 55 (A) bzw. 50 (B–D) Messungen.

ist, wurde die Differenz aus dem Signal des 3. Blitzes ( $S_3 \Rightarrow S_0$  plus  $Q_A$ -Reduktion) und 5. Blitzes ( $S_1 \Rightarrow S_2$  plus  $Q_A$ -Reduktion) gebildet (Abbildung 35). Die Meßdaten (schwarze Punkte) wurden mit einer einfach-exponentiellen, abfallenden Phase und einem schnellen, zeitlich nicht aufgelösten (Zeitauflösung = 100  $\mu$ s / Punkt), negativen Sprung ( $S_1 \Rightarrow S_2$ ) rechnerisch angepaßt (rote Linie). Die resultierenden Halbwertszeiten waren untereinander identisch mit 1.2 ms (D1-E189Q), 1.4 ms (D1-E189R), 1.2 ms (D1-E189K) und 1.2 ms (WT\*). Der Elektronentransfer vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{ox}$  war unbeeinflusst durch die Mutationen an Position 189 im D1-Protein.

## VI.2.2 Halbwertszeiten der Reduktion von $P_{680}^{+\bullet}$ durch $Y_Z$ und $Q_A^{\bullet}$ in D1-E189K, D1-E189R, D1-E189Q und WT\* PSII-Kernkomplexen

Der Zerfall von  $P_{680}^{+\bullet}$  wurde anhand der blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei 827 nm mit sauerstoffentwickelnden PSII-Kernkomplexen verfolgt (Abbildung 36). Die PSII-Kernkomplexe wurden repetierend angeregt (100 ms Blitzabstand, bis zu 100 Blitze pro

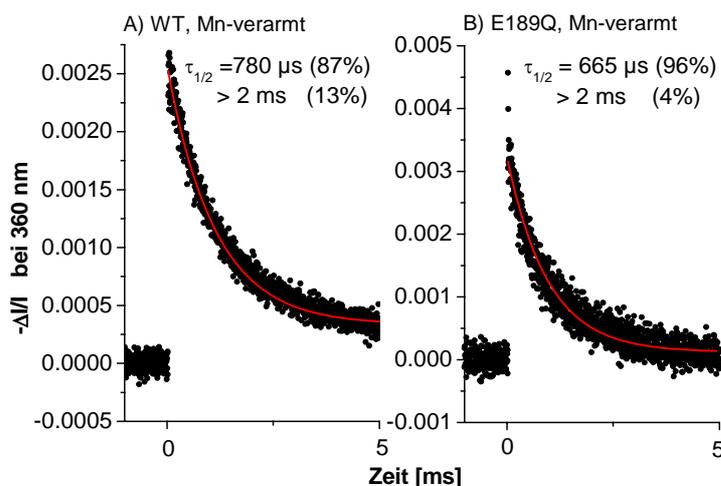


**Abbildung 36: Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  in PSII-Kernkomplexen aus A) WT\*, B) D1-E189K, C) D1-E189R und D) D1-E189Q. Logarithmische Darstellung. Die abfallenden Signale wurden mit zwei Exponentialfunktionen rechnerisch angepaßt (rote Linien). Die Analyse ergab Halbwertszeiten von  $30 \pm 2$  ns (38%),  $260 \text{ ns} \pm 25$  ns (14%) und  $> 2 \mu$ s (48%) für WT\*;  $27 \pm 1$  ns (49%),  $247 \pm 10$  ns (16%) und  $> 2 \mu$ s (35%) für D1-E189K;  $30 \pm 1$  ns (43%),  $310 \pm 15$  ns (19%) und  $> 2 \mu$ s (38%) für D1-E189R und  $38 \pm 2$  ns (24%),  $259$  ns (21%) und  $> 2 \mu$ s (55%) für D1-E189Q. Zeitauflösung 4 ns/Punkt, optische Weglänge 5 cm. MW aus 800 (A, WT\*, 15  $\mu$ M), 1000 (B, D1-E189K, 29.8  $\mu$ M), 950 (C, D1-E189R, 30  $\mu$ M) und 800 (D, D1-E189Q, 30  $\mu$ M) Messungen.**

Probe), so daß die S-Zustände in der Probe gleich verteilt waren. Die Rekombination von  $P_{680}^{+\bullet}$  mit  $Q_A^{\bullet}$  wurde in Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen gemessen (Abbildung 37), die laut der Vorschrift aus [Hundelt *et al.* 98a] präpariert worden waren. Die Mn-verarmten Proben wurden durch zwei aufeinanderfolgende Blitze angeregt (Abstand 20 ms). Durch den kurzen Abstand zwischen den Blitzen wurde der Anteil an Rekombination auf dem zweiten Blitz maximiert. Anschließend folgten 100 ms Dunkelphase und erneute Anregung durch das Blitzpaar. Dieser Vorgang wurde bis zu 500 Mal mit einer Probe wiederholt. Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse für die Signale auf dem zweiten Blitz, der im wesentlichen die Rekombination von  $P_{680}^{+\bullet}$  und  $Q_A^{\bullet}$  widerspiegelt. Der Abfall der Transienten in sauerstoffentwickelnden PSII-Kernkomplexen vom WT\* (der die Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  durch  $Y_Z$  beschreibt, Abbildung 36), wurde mit zwei exponentiell

abfallenden Phasen mit Halbwertszeiten von  $30 \pm 2$  ns (38%),  $260 \pm 25$  ns (14%) und einem stabilen Untergrund einer Mikrosekundenphase  $\tau_{1/2} > 2$   $\mu$ s (48%) rechnerisch angepaßt (rote Linie). Die Prozentwerte geben den Amplitudenanteil der jeweiligen Phase am Gesamtsignal an. Ähnliche Halbwertszeiten (20 – 40 ns [50%], 100 – 300 ns [20%] und  $> 2$   $\mu$ s [30%]) werden in der Literatur für Messungen mit Chloroplasten und PSII-Präparationen aus Spinat [Brettel und Witt 83] und für PSII-Kernkomplexe aus *Thermosynechococcus elongatus* [Schlodder *et al.* 84] berichtet. Die kinetischen Analysen der Meßdaten mit PSII-Kernkomplexen aus den Mutanten lieferten die folgenden Ergebnisse: Für D1-E189K  $27 \pm 1$  ns (49%),  $247$  ns  $\pm 10$  ns (16%),  $> 2$   $\mu$ s (35%); für D1-E189R  $30 \pm 1$  ns (43%),  $310 \pm 15$  ns (19%),  $> 2$   $\mu$ s (38%); für D1-E189Q  $38 \pm 2$  ns (24%),  $259 \pm 10$  ns (21%),  $> 2$   $\mu$ s (55%). Die Ergebnisse wurden in Tabelle 7 zusammengefaßt. Diese Daten belegten, daß die Halbwertszeiten der Nanosekundenkomponenten in den Mutanten nahezu unverändert waren im Vergleich zum WT\*. Nur das Ausmaß der langsamen Mikrosekundenphasen ( $\tau_{1/2} > 2$   $\mu$ s) unterschied sich zwischen den Präparationen. Der relative Anteil an Phasen langsamer  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion ( $\tau_{1/2} > 2$   $\mu$ s) ist als ein Maß für die obere Grenze inaktiver Reaktionszentren festgesetzt worden [Conjeaud und Mathis 80; Hundelt *et al.* 98a; Rappaport *et al.* 95; Schlodder *et al.* 85]. Eine obere Grenze deshalb, weil es auch langsame, oszillierende Komponenten der  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion in aktiven Zentren gibt [Rappaport *et al.* 95; Schilstra *et al.* 98; Schlodder *et al.* 85]. In PSII-Kernkomplexen aus D1-E189K und D1-E189R betrug der relative Anteil der langsamen Phasen ungefähr 30% (Tabelle 7). PSII-Kernkomplexe aus WT\*-Zellen, die unter denselben Anzuchtbedingungen wuchsen wie diese Mutanten, hatten einen vergleichbaren Anteil an langsamen Phasen (ca. 35%, siehe Abschnitt VIII.2.4). Die o.g. Messungen wurden jedoch mit PSII-Kernkomplexen aus WT\*-Zellen durchgeführt, die bei höheren Lichtintensitäten angezogen worden waren. Dies verursachte einen höheren prozentualen Anteil geschädigter Zentren und damit einen größeren Anteil langsamer Phasen (48%, Tabelle 7). In diesem Sinne war der erhöhte Anteil an  $\mu$ s-Phasen, also an inaktiven Zentren, in der Mutante D1-E189Q, die unter den gleichen Bedingungen wie die anderen Mutanten gewachsen war, in Übereinstimmung mit der um 50% herabgesetzten Elektronentransportrate (siehe Tabelle 8).

Das abfallende Signal bei Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen vom WT\*, das die



**Abbildung 37: Rekombination zwischen  $P_{680}^{+\bullet}$  und  $Q_A^{-\bullet}$  in Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen aus WT (A) und D1-E189Q (B). Die rechnerischen Anpassungen lieferten Halbwertszeiten von  $780 \pm 10$   $\mu$ s (87%) und  $> 2$   $\mu$ s (13%) im WT\* und  $665 \pm 20$   $\mu$ s (83%) und  $> 2$  ms (17%) in D1-E189Q. 50  $\mu$ M Chl, 4  $\mu$ s/Punkt, MW aus 300 (WT) bzw. 150 (D1-E189Q) Messungen**

Rekombination zwischen  $P_{680}^{+\bullet}$  und  $Q_A^{-\bullet}$  beschrieben (Abbildung 37), wurde mit zwei Exponentialfunktionen mit Halbwertszeiten von  $780 \pm 10$   $\mu$ s (87%) und  $> 2$  ms (13%) angepaßt (rote Linien, vergleiche [Hundelt *et al.* 98b]). Vergleichbare Halbwertszeiten von

800 – 900  $\mu\text{s}$  werden für die Ladungsrekombination zwischen  $Q_A^{\bullet}$  und  $P_{680}^{+\bullet}$  in den Cyanobakterien *Phormidium laminosum* [Reinman *et al.* 81] und *Synechocystis* sp. PCC 6803 [Buser *et al.* 90; Hays *et al.* 98; Metz *et al.* 89] angegeben. Für das Cyanobakterium *S. elongatus* wird ein mehrphasiger Abfall mit Halbwertszeiten von 170  $\mu\text{s}$  (60%), 800  $\mu\text{s}$  (25%) und 6 ms (15%) beschrieben [Gerken *et al.* 89]. Mit Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen aus D1-E189Q wurde das abfallende Signal mit Halbwertszeiten von 665  $\mu\text{s} \pm 20 \mu\text{s}$  (96%) und  $> 2$  ms (4%) angepaßt, was mit den WT\*-Ergebnissen nahezu identisch war (Tabelle 7). *Die Rekombination zwischen  $Q_A^{\bullet}$  und  $P_{680}^{+\bullet}$  war durch den Austausch von Glu durch Gln an Position 189 des D1-Proteins unbeeinflusst.*

### VI.3 Diskussion

Die schrittweise verlaufende Wasseroxidation in PSII ist charakterisiert durch eine relativ kleine Triebkraft für den Elektronentransfer zwischen dem katalytischen Mn-Komplex (*oxygen evolving complex, OEC*), dem vermittelnden Elektronenüberträger ( $Y_Z$ ) und  $P_{680}^{+\bullet}$ . Aktuelle Abschätzungen siedeln die Mittenpotentiale bei pH 6 um 0.9 – 0.95 V ( $S_2/S_1$ ,  $S_3/S_2$ ), 0.95 – 0.99 V ( $Y_Z^{\text{ox}}/Y_Z$ ) und 1.1 V ( $P_{680}^{+\bullet}/P_{680}$ ) an [Vass und Styring 91b]. Es ist gefordert worden, daß die Netto-Triebkraft des vorwärtsgerichteten Elektronentransfers durch Protonenreaktionen feinreguliert wird: entweder durch Freisetzung von Protonen aus Wasser-Liganden (bzw. Derivaten des Wassers) des Mn-Komplexes [Baldwin und Pecoraro 96; Gilchrist *et al.* 95; Hoganson *et al.* 95; Krishtalik 90; Limburg *et al.* 99; Pecoraro *et al.* 98; Szalai und Brudvig 96; Tommos *et al.* 98a; Tommos und Babcock 98; Tommos und Babcock 00] oder durch Protonenverschiebung um  $Y_Z$  herum [Ahlbrink *et al.* 98; Haumann und Junge 99; Rappaport und Lavergne 01]. Die effektive und schnelle Oxidation von  $Y_Z$  in Nanosekunden fordert ein intaktes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen um  $Y_Z$  [Ahlbrink *et al.* 98; Haumann und Junge 99; Hays *et al.* 99], das den AS-Rest D1-His190, den mutmaßlichen Protonenakzeptor für  $Y_Z$  [Diner und Nixon 98; Hays *et al.* 98; Hays *et al.* 99; Mamedov *et al.* 98], einschließt. Für dasselbe Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen ist vorgeschlagen worden, daß es die Konfiguration des Systems  $Mn_4$ - $Y_Z$  im Sinne eines schnellen Elektronen- / Protonentransfers vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  [Limburg *et al.* 99; Szalai und Brudvig 96; Tommos *et al.* 98b; Tommos und Babcock 00] optimiert. Auf der Basis einer jüngeren Studie, die 17 verschiedene Mutanten von D1-E189-Zellen und sieben verschiedene PSII-Kernkomplex-Präparationen von D1-E189-Mutanten umfaßt, ist geschlußfolgert worden, daß D1-E189 eine Komponente dieses Wasserstoffbrückennetzwerkes ist [Debus *et al.* 00]. Daraus resultierte die Hypothese, daß ein Austausch von D1-Glu189 durch ein neutrales Gln oder positiv geladene Reste (Arg, Lys) die Raten des Elektronentransfers vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  und von  $Y_Z$  zu  $P_{680}^{+\bullet}$  entweder elektrostatisch oder durch Veränderung des Wasserstoffbrückennetzwerkes beeinflussen sollte. Im Gegensatz zu diesen Erwartungen anderer Autoren, zeigten die sauerstoffentwickelnden PSII-Kernkomplexe der Mutanten unveränderte Raten in den Elektronentransferreaktionen vom  $Mn_4$  zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  und von  $Y_Z$  nach  $P_{680}^{+\bullet}$ . Solange noch keine hochaufgelöste Röntgenkristallstruktur von PSII vorhanden ist, können diese Ergebnisse auf wenigstens vier unterschiedliche Weisen interpretiert werden.

1. Die Abwesenheit irgendeines signifikanten Einflusses der Mutationen an Position D1-Glu189 auf das Elektronentransfergeschehen könnte aus einem Abstand zwischen D1-

Glu 189 und  $Y_Z$  (D1-Y161) resultieren, der so groß ist, daß elektrostatische Einflüsse auf  $OEC$ ,  $Y_Z$  und  $P_{680}^{+\bullet}$  vernachlässigbar sind. Diese Interpretation ist naheliegend, läßt sich jedoch schwierig mit einer Vielzahl an indirekt ermittelten Ergebnissen in Einklang bringen, die D1-His190, der direkte Nachbar von D1-Glu189, in enger Nachbarschaft von  $Y_Z$  ansiedeln. Dies ist aus Modellen abgeleitet worden, die die Struktur von PSII, basierend auf der bekannten Struktur des bakteriellen Reaktionszentrums, modellieren [Ruffle *et al.* 92; Svensson *et al.* 90; Svensson *et al.* 96]. Darüber hinaus zeigen andere Studien, daß D2-His189 der Protonenakzeptor für  $Y_D$  ist [Campbell *et al.* 97; Hienerwadel *et al.* 97; Tang *et al.* 93; Tommos *et al.* 93], und daß in Punktmutanten von D1-His190 der Elektronentransport von  $Y_Z$  nach  $P_{680}^{+\bullet}$  beeinträchtigt ist [Chu *et al.* 95a; Diner *et al.* 91; Diner und Nixon 98; Hays *et al.* 98; Hays *et al.* 99; Mamedov *et al.* 98; Roffey *et al.* 94a; Roffey *et al.* 94b]. Der drastisch verlangsamte Elektronentransport von  $Y_Z$  nach  $P_{680}^{+\bullet}$  in D1-His190-Punktmutanten kann durch Zugabe von Imidazol oder anderen, kleinen organischen Basen [Hays *et al.* 98; Hays *et al.* 99] oder durch Einstellung eines hohen pH-Wertes [Hays *et al.* 99; Mamedov *et al.* 98] wieder beschleunigt werden. Gemäß der o.g. Modellierungen [Svensson *et al.* 90; Svensson *et al.* 96] sind D1-Glu189 und D1-His190 auf dem Zwischenstück der beiden Helices CD und D der D1-Untereinheit lokalisiert. Auf der Gegenseite scheint, laut der Kristallstruktur von PSII mit 3.8 Å Auflösung [Zouni *et al.* 01b], dieses Zwischenstück in größerem Abstand zur Helix C zu liegen, auf der  $Y_Z$  lokalisiert ist. Eine genaue Zuweisung kann jedoch erst gemacht werden, wenn eine Röntgenkristallstruktur mit höherer Auflösung vorliegt (siehe VI.3.1). Auch zwei weitere Studien kommen zu dem Schluß, daß D1-His190 nicht der Protonenakzeptor von  $Y_Z$  ist [Bernard *et al.* 95; Roffey *et al.* 94b], was mit dem größeren (als bisher angenommenen) Abstand dieser beiden AS im Einklang wäre.

2. Eine stark hydrophobe Umgebung um D1-Glu189 könnte jede Seitenkette an Position D1-189 in die neutrale Konfiguration zwingen, insbesondere Glu im WT und Arg und Lys in den Mutanten. Da es jedoch etliche Studien gibt (siehe Punkt 1), die für D1-E189 ein Position nahe  $Y_Z$  und nahe dem Mn-Komplex vorschlagen, ist ein hydrophobes Umfeld schwierig mit den Modellstudien in Einklang zu bringen, die für  $Y_Z$  eine hydrophile Umgebung vorhersagen [Svensson *et al.* 90; Svensson *et al.* 96]. Spektroskopische Untersuchungen zeigen außerdem, daß der Mn-Komplex leicht zugänglich für Alkohole [Force *et al.* 98] ist, und daß  $Y_Z$  (zumindest in Abwesenheit des Mn-Komplexes) leicht zugänglich für Lösungsmittelmoleküle [Ahlbrink *et al.* 98; Diner *et al.* 98] und reduzierende Agenzien ist [Babcock *et al.* 83; Ghanotakis *et al.* 82].
3. Die elektrostatisch aktiven Mutationen könnten die Redoxmittenpotentiale aller betrachteten Redoxkomponenten (Mn-Komplex,  $Y_Z$  und  $P_{680}$ ) parallel verschoben haben, so daß effektiv kein Unterschied in den Elektronentransferraten zu sehen war. Diese Möglichkeit kann nahezu ausgeschlossen werden, da die Rekombination zwischen  $Q_A^{\bullet}$  und  $P_{680}^{+\bullet}$  nicht durch die Mutation D1-E189Q beeinflusst wurde (Abbildung 37, Tabelle 7).
4. Eine weitere Möglichkeit ist, daß es eine Anhäufung von Säure/Base-Gruppen um D1-E189 gibt, die die veränderten Ladungen an Position 189 in den Mutanten kompensiert, so daß die Eigenschaften des direkten Nachbarn, D1-His190, unverändert sind. Diese Möglichkeit wäre kompatibel mit der Hypothese, daß D1-Glu189 an einem Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt ist, das D1-His190 und  $Y_Z$  einschließt [Chu *et al.* 95a; Debus *et al.* 00; Debus 01].

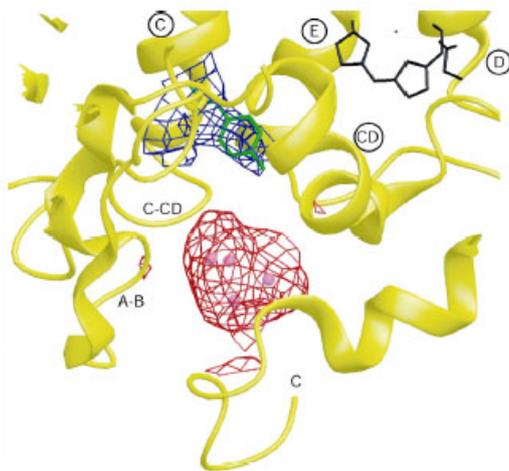
Gerafft gesagt, zeigen diese Ergebnisse, daß der AS-Rest D1-X189, der direkte Nachbar von D1-His190 (der vermutlich direkt mit  $Y_Z$  wechselwirkt), entweder erzwungenermaßen

elektroneutral vorliegt (hervorgerufen durch eine stark hydrophobe Umgebung) oder weit entfernt von  $Y_Z$  oder in einer Gruppe von Säuren und Basen lokalisiert ist, die die Ladung an Position 189 kompensieren. Die ersten zwei Interpretationen verlangen eine Revision der gegenwärtig vorherrschenden Vorstellungen zur Organisation der Donatorseite im Bereich des *OEC*. Eine genauere Unterscheidung dieser Möglichkeiten kann erst vorgenommen werden, wenn die komplette AS-Sequenz zuverlässig der Röntgenkristallstruktur zugewiesen werden kann. *Diese Daten legen nahe, daß D1-E189 keine besondere Rolle als Protonendonator bzw. Protonenakzeptor oder als elektrostatischer Modulator in PSII spielt.*

### VI.3.1 Diskussion der Ergebnisse im Zusammenhang mit aktuellen Literaturdaten

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind nachträglich durch ESR-Messungen mit Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen aus D1-E189Q bestätigt worden [Pujols-Ayala und Barry 02]. Die Punktmutation hat keinen signifikanten Einfluß auf die Linienstruktur des  $Y_Z^{ox}$ -ESR-Signals oder die Zerfallskinetik von  $Y_Z^{ox}$ . Die Ausbeute von  $Y_Z^{ox}$  in diesen Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen ist temperaturabhängig und wird mit Konformationsänderungen an der Donatorseite erklärt. Die Autoren schließen ebenfalls eine Funktion von D1-Glu189 (und von D1-His190) als Protonenakzeptor aus und betonen die strukturelle Bedeutung dieser beiden AS-Reste.

Die Verbesserung der Röntgenkristallstruktur auf 3.6 Å [Fromme *et al.* 02; Zouni *et al.* 01a] zeigt, daß das Zwischenstück der Helices CD und D weit entfernt ist von der Elektronendichte (Abbildung 38), die  $Y_Z$  zugeschrieben wird. Die Autoren wiederholen



**Abbildung 38:** Nahansicht auf die Proteinumgebung des Mn-Komplexes (rotes Gittermodell). Die Elektronendichte um  $Y_Z$  ist blau markiert. Die Helices sind mit Buchstaben in Kreisen markiert, zwischenhelikale Schleifen sind mit Buchstaben ohne Kreise beschriftet. Der C-Terminus ist extra gekennzeichnet. Abbildung aus [Zouni *et al.* 01a].

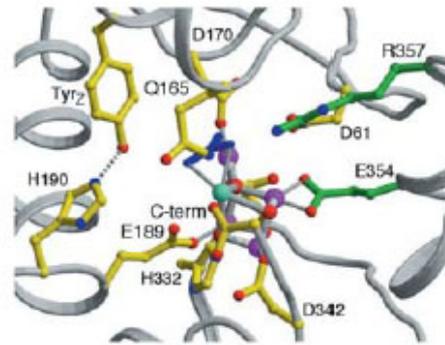
unsere Forderung nach einem größeren Abstand zwischen  $Y_Z$  und D1-His190 ([Fromme *et al.* 02; Zouni *et al.* 01a] und persönliche Mitteilungen Fromme und Kern). Die Autoren der Röntgenkristallstruktur aus *T. vulcanus* mit 3.7 Å Auflösung [Kamiya und Shen 03] beschreiben, daß D1-E189 oder D1-His190 als Liganden des Mn-Komplexes in Frage kommen. Die vermuteten Positionen von D1-Glu189 und D1-His190 sind dabei näher an der postulierten Position von  $Y_Z$  als in der o.g. 3.8 Å / 3.6 Å – Struktur [Fromme *et al.* 02; Zouni *et al.* 01a; Zouni *et al.* 01b]. Die Elektronendichte in diesem Bereich war allerdings nur schwach ausgeprägt. In der zuletzt veröffentlichten Kristallstruktur von PSII mit 3.5 Å Auflösung [Ferreira *et al.* 04] (Abbildung 39) sind die Verhältnisse in Bezug auf D1-His190 ähnlich wie in der Struktur von [Kamiya und Shen 03]. D1-His190 ist hier als Protonenakzeptor von  $Y_Z$  dargestellt und D1-Glu189 als Ligand

des Mn-Komplexes. Die hier [Ferreira *et al.* 04] vorgeschlagene, langgestreckte

Konformation des Glu189 ist in einer polaren Umgebung energetisch äußerst ungünstig [Cherepanov und Mulkidjanian 01]. Die energetische Hürde könnte allerdings durch die elektrostatische Anziehungskraft der positiven Mn-Ionen herabgesetzt sein. Dies würde aber nur für das negative Glu von Bedeutung sein, nicht für die Mutanten mit positiven Seitenketten wie Arg und Lys. Die widersprüchlichen Ergebnisse der drei Röntgenkristallstrukturen verlangen nach einer höheren Auflösung, um diesen Punkt genauer klären zu können.

Schließlich zeigen DFT-Simulationen (*density function theory*) [Adachi und Kusunoki 03] auf Basis der Kristallstrukturen von [Fromme *et al.* 02; Kamiya und Shen 03; Zouni *et al.* 01b], daß D1-His190 nicht der Protonenakzeptor des phenolischen Protons von  $Y_Z$  ist, sondern statt dessen ein Ligand des Mn-Komplexes. Dies wäre verträglich mit einer vom Mn-Komplex und  $Y_Z$  weiter entfernten Lokalisation von D1-E189, wie unter VI.3 gefordert. Der Autor schlägt alternativ D1-Gln165 als Protonenakzeptor des phenolischen Protons vor. Dagegen spricht die Tatsache, daß die Punktmutante D1-Q165A photoautotroph wächst (Daten nicht dargestellt). *Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, daß D1-E189 nicht als Ligand für den Mn-Komplex in Frage kommt.*

Unter Kenntnis der aktuellen Forschungsergebnisse läßt sich die Funktion von D1-E189 neu formulieren. *Wahrscheinlich ist die lange Seitenkette an Position D1-E189 für die strukturelle Organisation in PSII von kritischer Bedeutung.* Das würde erklären, warum alle Punktmutanten mit kurzen oder strukturell andersartigen Seitenketten (His, Tyr, Phe) nicht photoautotroph sind. Die lange Glu-Seitenkette könnte über Wasserstoffbrückenbindungen für die optimale Ausrichtung der Helices oder nur einer anderen AS-Seitenkette verantwortlich sein. Durch die optimierte Ausrichtung der Helices zueinander oder durch die bestmögliche Positionierung eines Akzeptorrestes kann der Elektronen- oder Protonentransport optimal ablaufen. Diese Funktion kann von anderen, strukturell ähnlichen Seitenketten ebenfalls erfüllt werden. Für die Ausbildung der orientierenden Wasserstoffbrücke sind geladene Reste (Glu, Arg, Lys) effektiver als polare (Gln) Seitenketten (siehe Tabelle 8). Ein ungeladener, unpolarer Rest vergleichbarer Länge (Met) kann keine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden und führt zu einer heterotrophen, nicht sauerstoffentwickelnden Mutante [Debus *et al.* 00].



**Abbildung 39: Nahansicht auf den OEC und seine Proteinumgebung. Farbcode: Mn = violett, Ca = türkis und O = rot. Gelbe Seitenketten gehören zum D1-Protein, grüne zu CP43. Abbildung aus [Ferreira *et al.* 04].**

## VII. Zeitaufgelöste Sauerstoffentwicklung in PSII

Die Ergebnisse aus diesem Kapitel sind vor kurzem veröffentlicht worden [Clausen *et al.* 04] und wurden hier kurz zusammengefaßt und durch zusätzliches Material ergänzt.

### VII.1 Einleitung

Die photosynthetische Wasserspaltung läuft im Wasserspaltungskomplex (*oxygen evolving complex, OEC*) von PSII ab, der sich unter anderem aus einem vieratomigen Mangankomplex zusammensetzt. Schrittweise Absorption von Lichtquanten läßt den *OEC* durch vier aufeinanderfolgende Oxidationsstufen voranschreiten, die als  $S_n$ -Zustände bezeichnet werden, wobei  $n$  die Anzahl der gespeicherten Oxidationsäquivalente im *OEC* angibt ( $n = 0 - 4$ ).  $S_4$  zerfällt spontan, ohne Lichtabsorption unter Freisetzung von Sauerstoff in den Zustand  $S_0$ , von wo aus der Zyklus neu startet (siehe Abbildung 9). Der stabilste Zustand im Dunkeln ist  $S_1$  und als Folge zeigt die Sauerstoffentwicklung von dunkeladaptierten PSII-Proben (Zellen, Thylakoide, Kernkomplexe) ein Maximum der Sauerstofffreisetzung auf dem 3. Blitz und danach auf jeden vierten nachfolgenden Blitz (für eine Übersicht siehe [Britt 96; Debus 00; Hoganson und Babcock 00; Pecoraro und Hsieh 00; Penner-Hahn 98; Renger 01; Tommos und Babcock 00; Yachandra *et al.* 96]).

Es wird allgemein angenommen, daß jeder der o.g. sukzessiven Oxidationsschritte von  $S_0$  nach  $S_3$  eine positive Ladung im Mn-Komplex oder seinen Liganden speichert (siehe [Messinger *et al.* 01] für eine aktuelle Abhandlung der Frage, in welchen S-Zuständen der Mn-Komplex oder dessen Liganden oxidiert werden). Das gebundene Substrat-Wasser ist noch in allen S-Zuständen bis  $S_3$  austauschbar [Hillier *et al.* 98a; Hillier *et al.* 01; Messinger *et al.* 95]. Die Absorption des vierten Lichtquants oxidiert  $S_3Y_Z$  zu  $S_3Y_Z^{ox}$ , was zu  $S_0$  und Sauerstoff zerfällt. Bisher ist  $S_3Y_Z^{ox}$  das einzige greifbare Intermediat zwischen  $S_3$  und  $S_0$  (plus Sauerstoff) und damit die einzige Einheit die bis *dato* dem Zustand  $S_4$  zugeordnet werden kann [MacLachlan *et al.* 94; Rappaport *et al.* 94; Renger *et al.* 94]. Als weiteres Intermediat für die Reaktion vom Wasser zum Sauerstoff ist ein Peroxid-Intermediat postuliert worden [Renger 78]. Obwohl dieses Intermediat Einzug in aktuelle Modelle zum Wasserspaltungsmechanismus gefunden hat [Haumann *et al.* 97a; Haumann und Junge 99; Renger 01], hat es sich bisher jeglicher Identifizierung entzogen. Die Röntgenkristallstrukturen von PSII mit derzeit noch zu niedrigen Auflösungen von 3.8 [Zouni *et al.* 01b], 3.7 [Kamiya und Shen 03], 3.6 [Fromme *et al.* 02; Zouni *et al.* 01a] und 3.5 Å [Ferreira *et al.* 04] lassen diesbezüglich keine Rückschlüsse auf den Mechanismus der Wasserspaltung zu.

Es ist bisher erfolglos versucht worden, die Reaktion  $S_3Y_Z^{ox} \Rightarrow S_0Y_Z^{red} + 4 H^+ + O_2$  kinetisch durch (i)  $O_2$ -Polarographie, (ii) UV-Absorptions-Spektroskopie, (iii) ESR-Spektroskopie von  $Y_Z^{ox}$ , (iv) ESR-Oximetrie und (v) pH-Titrationsen zu entzerren.

Ein Hinweis auf ein mögliches Intermediat (neben  $S_3Y_Z^{ox}$ ) kann von einem Knickpunkt aus Arrheniusdiagrammen (spektroskopische Messungen des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  bei 360 nm) abgeleitet werden. Spektroskopische Messungen mit PSII-Kernkomplexen des thermophilen Cyanobakteriums *Thermosynechococcus vulcanus* Copeland [Koike *et al.* 87] zeigten eine Unterbrechung des linearen Verlaufs der Aktivierungsenergie ( $E_a$ ) bei 16

°C. Dieselbe Gruppe berichtet von einem Knickpunkt im Arrheniusdiagramm mit BBY aus Spinat bei 6 °C [Renger und Hanssum 92] bzw. bei 11 °C mit PSII-Kernkomplexen aus Spinat [Karge *et al.* 97]. Für den Zustand  $S_3$  ist ein redoxisomeres Gleichgewicht, bestehend aus  $S_3(I)$  und  $S_3(II)$ , vorgeschlagen worden [Karge *et al.* 97; Renger 97; Renger 01], wovon der Zustand  $S_3(II)$  einen Peroxidcharakter hat (siehe außerdem [Haumann und Junge 99]). Der Knickpunkt in den Arrheniusdiagrammen ist mit einer temperaturabhängigen Verschiebung dieses Redoxgleichgewichtes in Zusammenhang gebracht worden [Karge *et al.* 97; Koike *et al.* 87; Renger und Hanssum 92]. Im Widerspruch dazu ist bei ähnlichen Experimenten mit PSII-Kernkomplexen aus Erbse (*Pisum sativum*) im Temperaturbereich von 7.9 bis 30.6 °C keine Abweichung von einem linearen Verlauf der Aktivierungsenergie beobachtet worden [Haumann *et al.* 97a]. Dies ist einem zu kleinem Temperaturbereich der Messungen zugeschrieben worden [Karge *et al.* 97].

Ein anderer Ansatz zur Diskriminierung von Intermediaten ist die Suche nach Verzögerungsphasen zwischen Elektronentransferreaktionen und der tatsächlichen Sauerstofffreisetzung im finalen Schritt der Wasserspaltungsreaktion  $S_3Y_Z^{ox} \Rightarrow S_4 \rightarrow S_0Y_Z$ . Nach kinetischen Analysen berichten zwei Gruppen von solchen Verzögerungsphasen. Die in dieser Arbeit gefundene Verzögerung war länger (450  $\mu$ s bei 20 °C) als die zuvor berichteten. Razeghifard und Pace [Razeghifard und Pace 99] beschreiben, unter ähnlichen experimentellen Bedingungen, eine kürzere Verzögerung (< 50  $\mu$ s) mit Messungen zur ESR-Oximetrie, die bei niedrigen pH-Werten oder hohen Salzkonzentration länger wird (200  $\mu$ s). Rappaport *et al.* haben bei 295 nm die Reduktion von  $Y_Z^{ox}$  verfolgt und Verzögerungsphasen im Übergang  $S_0Y_Z^{ox} \Rightarrow S_1Y_Z$  und  $S_3Y_Z^{ox} \Rightarrow S_0Y_Z$  mit Halbwertszeiten von 30 bzw. 50  $\mu$ s gefunden. Es soll an dieser Stelle betont werden, daß die in der Literatur beschriebenen Verzögerungsphasen dem Elektronentransfergeschehen vorhergehen, wohingegen die in dieser Arbeit beschriebene Verzögerung dem Elektronentransfer folgt.

Die o.g. Diskrepanz zwischen den experimentellen Ergebnissen und die Notwendigkeit, jedem möglichen Hinweis zur Identifizierung eines Intermediates nachzugehen, gab den Anstoß dazu, die spektroskopischen Messungen (bei 360 nm) des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  in einem größeren Temperaturbereich zu wiederholen. Die Auswertung der Aktivierungsenergie im Temperaturbereich von 21 bis 3.9 °C resultierte wiederum in einer geraden Linie (Abbildung 49) ohne Unterbrechung. Deshalb wurde das Augenmerk auf die kinetische Analyse der zeitaufgelösten Sauerstofffreisetzung (Abschnitt IV.14) gelenkt. Die blitzinduzierte Sauerstoffproduktion von Thylakoiden aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde mit einer Platinelektrode bei hoher Zeitauflösung gemessen. Um den Einfluß der Diffusion des Sauerstoffs vom Entstehungsort zur Platinoberfläche möglichst niedrig zu halten, wurden die sauerstoffentwickelnden Membranen durch Zentrifugation möglichst eng und dicht auf die Platinoberfläche gepackt.

Sinclair und Arnason [Sinclair und Arnason 74] haben die Aktivierungsenergie der Sauerstoffentwicklung mit einer dispersiven Methode untersucht, indem sie Algenzellen mit sinoidal moduliertem Dauerlicht belichtet haben. Lavorel [Lavorel 92] hat die Sauerstoffproduktion von Algenzellen und Chlorplasten (aus Erbse, *P. sativum*) nach Einzelblitzen mit einer zentrifugierbaren Elektrode untersucht. Beide Gruppen haben das Diffusionsproblem theoretisch gelöst und korrigierten ihre Meßdaten mit den errechneten Diffusionszeiten. Diese raffinierten Lösungsansätze waren dennoch nur begrenzt aussagekräftig, da (i) die Packungsdichte der Zellen auf der Zentrifuge ein nicht vollständig zu kontrollierender Faktor war und (ii) die Originaldaten nicht frei von Artefakten waren (siehe Abbildung 5 in [Lavorel 92]). In diesem Kapitel wurde deshalb zuerst die kinetische Kompetenz der Sauerstoffelektrode und der Einfluß von Artefakten

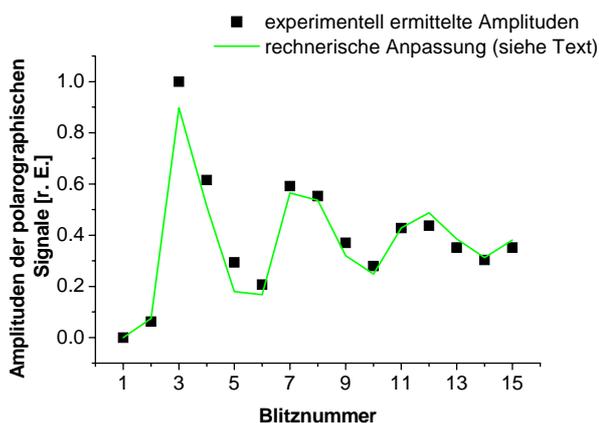
geklärt, um dann die Frage unterschiedlicher Aktivierungsenergien (des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$ ) als Funktion der Temperatur erneut aufgreifen zu können.

## VII.2 Ergebnisse

### VII.2.1 Korrektur polarographischer Signale mit hoher Zeitauflösung

Die Sauerstoffentwicklung durch Membranpräparationen des einzelligen Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde als Funktion der Temperatur mit einer zentrifugierbaren Sauerstoffelektrode gemessen. Die 20-minütige Temperatureinstellung der auf die Platinoberfläche zentrifugierten Thylakoide im Dunkeln hatte keinen Einfluß auf die Amplitude oder die Rate der Sauerstoffproduktion. Dies wurde durch Vergleichsmessungen mit Thylakoiden, deren Sauerstoffproduktion direkt nach der Zentrifugation gemessen worden war, ermittelt (Daten nicht dargestellt). Bei niedrigeren Temperaturen wurde sogar eine höhere Stabilität der Thylakoide erwartet. PSII-Kernkomplexe, die letztendlich aus den hier verwendeten Thylakoiden gewonnen wurden (siehe IV.7), konnten eine Stunde lang im Dunkeln ohne Verlust an Aktivität gelagert werden (Abschnitt V.5.4).

Die Blitzabhängigkeit der Sauerstofffreisetzung mit den hier verwendeten Thylakoiden entsprach in Blitzfolgen aus 15 Blitzen den Literaturdaten [Li und Burnap 01; Qian *et al.*

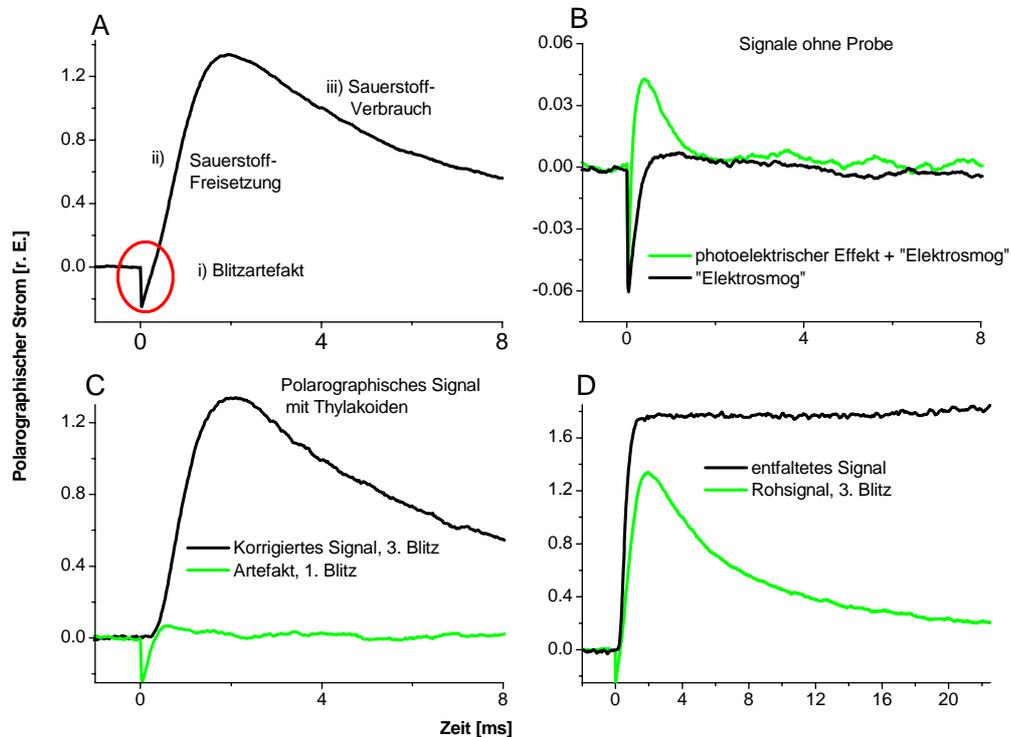


**Abbildung 40: Blitzabhängigkeit der Sauerstoffsignale mit Thylakoiden aus *Synechocystis*. Die rechnerische Anpassung erfolgte mit folgenden Kok-Parametern:  $\alpha = 12.3\%$ ,  $\beta = 3.2\%$  und Dunkelverteilung von  $S_1/S_2/S_3/S_4 = 20.4/79.6/0/0$ . Grüne Linie = errechneter Werte, schwarze Vierecke = Rohdaten.**

99]. Aus der Blitzabhängigkeit des polarographischen Signals von Thylakoiden (nach 10 min Dunkeladaptation) wurden die Kok-Parameter bestimmt (siehe IV.14): 12.3% Fehlanregungen ( $\alpha$ , *misses*), 3.2% Doppelanregungen ( $\beta$ , *double hits*) und eine Dunkelverteilung der S-Zustände ( $S_0/S_1/S_2/S_3$ ) von 20.4/79.6/0/0. In Abbildung 40 wurden die Meßdaten (schwarz) und die rechnerische Anpassung (grüne Linie) dargestellt.

Die typischen Rohsignale einer polarographischen Messung nach dem dritten Blitz einer Blitzfolge wurden in Abbildung 41 abgebildet. Die Transienten kennzeichneten drei charakteristische Bereiche: (i) das Blitzartefakt, (ii) der Anstieg des polarographischen

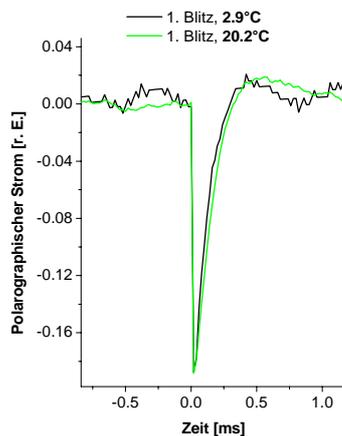
Signals aufgrund der blitzinduzierten Sauerstoffproduktion und (iii) der Verbrauch (und die Wegdiffusion) des Sauerstoffs durch die Elektrode.



**Abbildung 41: Polarographische Rohsignale und ihre Korrektur.** A) Das polarographische Rohsignal mit drei charakteristischen Bereichen: i) das Blitzartefakt, teilweise überlagert durch (ii) das ansteigende polarographische Signal (Sauerstofffreisetzung). (iii) Abfall des Signals = Sauerstoffverbrauch durch die Elektrode (und Wegdiffusion). B) Blitzinduzierte Artefakte der Elektrode. Elektrosmog (schwarze Linie) und Überlagerung (grüne Linie) von photoelektrischem Effekt und Elektrosmog. Das Elektrosmog-Signal war auch sichtbar, wenn der Lichtleiter nicht mit der Elektrode verbunden war. Beide Signale wurden ohne biologisches Material (nur mit Puffer) auf der Elektrode aufgenommen. MW aus 10 Messungen. C) Grüne Linie = Blitzartefakt auf dem ersten Blitz. Schwarze Spur = Polarographisches Signal nach Abzug des Blitzartefaktes des ersten Blitzes.  $5.43 \mu\text{M Chl}$ ,  $28.7^\circ\text{C}$ . D) Polarographisches Signal auf dem dritten Blitz (grüne Linie, Einzelmessung). Das Blitzartefakt und das abfallende Signal waren deutlich sichtbar. Die schwarze Linie spiegelt dasselbe Meßsignal nach Abzug des Blitzartefaktes und nach der Entfaltung des abfallenden Signals mit zwei Exponentialfunktionen wider. Die Halbwertszeit betrug  $0.65 \text{ ms}$ .  $5.43 \mu\text{M Chl}$ ,  $28.7^\circ\text{C}$ . Zeitauflösung =  $20 \mu\text{s/Punkt}$ .

(i) Das Blitzartefakt war selbst dann sichtbar, wenn keine Probe auf der Elektrode war (Abb. Abbildung 41 B). Es setzte sich aus zwei Komponenten zusammen: Die negative Komponente (Abbildung 41 B, schwarz) wurde durch elektromagnetische Störungen, die die Entladung der Blitzlampe begleiteten, ausgelöst („Elektrosmog“). Sie konnte auch dann detektiert werden, wenn die Sauerstoffelektrode vom Licht vollständig abgeschirmt wurde. Die zweite Komponente, der positive „Buckel“, wurde durch den photoelektrischen Effekt [van Gorkom und Gast 96], den der Blitz in der Ag/AgCl-Anode auslöste, hervorgerufen. Dieser positive „Buckel“ war naturgemäß nur sichtbar, wenn der Lichtleiter mit der Elektrode verbunden war. Die grüne Spur in Abbildung 41 B gibt die Überlagerung von beiden Komponenten des Blitzartefaktes wieder. Die Größe des Blitzartefaktes war so gering, daß der Verstärker den linearen Antwortbereich nicht verließ. Das photoelektrische Blitzartefakt war temperaturunabhängig (Abbildung 42). Die Beobachtung, daß die

Zeitauflösung der Sauerstoffelektrode nicht temperaturabhängig war, war kritisch für die Auswertung der polarographischen Signale. Über einen extern angelegten Spannungssprung wurde die Halbwertszeit des Verstärkers mit  $100 \mu\text{s}$  bestimmt. Das Blitzartefakt war unabhängig von der Blitznummer: Mit einer durch DCMU gehemmten Probe (Abbildung 43) wurden identische Artefakte auf dem ersten und dritten Blitz erhalten. Die Amplitude des polarographischen Signals sank in Gegenwart von DCMU auf 2% der Ausgangsamplitude von unbehandelten Thylakoiden ab, was vergleichbar mit den Ergebnissen aus Abschnitt V.7 war.



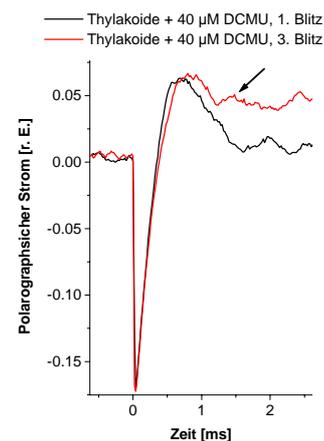
**Abbildung 42:**  
Temperaturunabhängigkeit des Blitzartefaktes. Bei  $2.9^\circ\text{C}$  und  $20.2^\circ\text{C}$  war das Blitzartefakt identisch. Die Antwortzeit der Elektrode wurde im gewählten Temperaturbereich nicht signifikant beeinflusst. Amplituden normiert.

Erwartungsgemäß war die Amplitude des um das Blitzartefakt korrigierten und entfalteten polarographischen Signals größer als das Rohsignal.

(ii) Der Anstieg des polarographischen Signals erfolgte im Zeitraum von ca. 1 ms im WT\* und von ca. 10 ms in der Mutante D1-D61N (siehe unten). Er war eine Funktion der Geschwindigkeit der Bildung des Sauerstoffs, seiner Freisetzung aus dem katalytischen Zentrum, der Diffusion des Sauerstoffs zur Elektrode und der signalerzeugenden Reduktion des Sauerstoffs an der Elektrode. Die intrinsische Antwortzeit der Elektrode bzw. des Verstärkers von  $100 \mu\text{s}$  war somit nicht limitierend. Die Diffusionszeit hängt von der Entfernung der Sauerstoffquelle zur Platinoberfläche der Elektrode ab [Lavorel 92] und damit von der Packungsdichte des biologischen Materials auf der Elektrode. Die Abhängigkeit (a) der Halbwertszeit ( $\tau_{1/2}$ ), (b) der Dauer der Verzögerungsphase ( $t_{lag}$ ) und (c) der Amplitude der polarographischen Signale von der eingesetzten Chlorophyllmenge wurde überprüft. Abbildung 44 zeigt zwei Transienten bei  $5.4$  (grün) und  $54$  (schwarz)  $\mu\text{M}$  Chlorophyll in einem kleinen

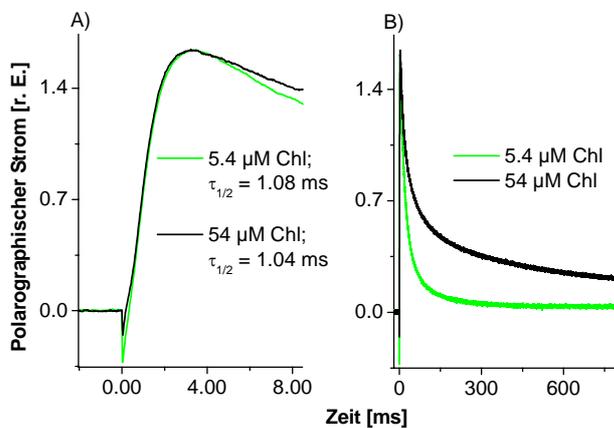
Von jeder Probe wurde das Signal auf dem ersten und dritten Blitz aufgezeichnet. Das Signal auf dem ersten Blitz spiegelte, gemäß der Ergebnisse von Abbildung 40 und der Dunkelverteilung der Proben (Abschnitt V.6), allein das Blitzartefakt wieder und keine Sauerstoffproduktion. Zur Korrektur der Rohdaten wurde vom Sauerstoffsignal des dritten Blitzes (Abb. Abbildung 41 C, schwarz) das reine Blitzartefakt (aus dem ersten Blitz, Abbildung 41 C, grün) subtrahiert. Ein wichtiges Merkmal dieser Korrektur der Rohdaten war die Enthüllung der Verzögerungsphase zwischen Blitz und detektiertem Sauerstoffsignal (siehe unten). Vergleichbare Verzögerungsphasen waren auch bei Messungen mit BBY aus Spinat deutlich erkennbar (Daten nicht dargestellt).

(iii) Der Abfall des polarographischen Signals wurde durch den Sauerstoffverbrauch der Elektrode und durch die Wegdiffusion des Sauerstoffs verursacht. Die polarographische Transiente wurde mit zwei Exponentialfunktionen entfaltet, um das reine Signal der Sauerstoffproduktion, frei von verbrauchenden Phasen, zu erhalten (Abbildung 41 D, schwarze Spur).



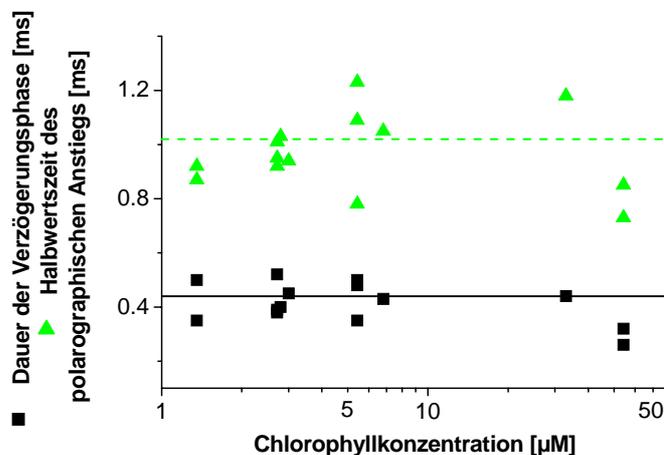
**Abbildung 43: Blitzunabhängigkeit des Blitzartefaktes. Das Artefakt war auf dem 1. und 3. Blitz identisch.  $5.43 \mu\text{M}$  Chl. Der Pfeil kennzeichnet die Restamplitude der Sauerstofffreisetzung**

(Abbildung 44 A) und einem großen (Abbildung 44 B) Zeitfenster. Im wesentlichen unterschieden sich weder die Halbwertszeit des Anstiegs noch die Dauer der Verzögerungsphase; hingegen zeigte das abfallende Signal eine drastische Abhängigkeit von der eingesetzten Chlorophyllkonzentration. Letzteres wurde erwartet, da eine dickere Membranschicht einer größeren Kapazität für Sauerstoff (gleich einem elektrischen Kondensator) entspricht und damit die Relaxationszeit des Sauerstoffpulses verlängert. Elf entfaltete, polarographische Transienten (siehe Abbildung 41 D, schwarze Spur) wurden mit von 1.4 bis 33  $\mu\text{M}$  variierenden Chlorophyllkonzentrationen bei einer Temperatur von 17.6 °C aufgenommen. Die Durchschnittswerte dieser Messungen waren  $\tau_{1/2} = 1.02$  ms (11%) und  $t_{\text{lag}} = 0.44$  ms (14%) [siehe Abbildung 45]. Die Werte in den Klammern geben die Standardabweichung  $\sigma_{n-1}$  in Prozent an. Die Menge an eingesetztem Material war ohne signifikanten Einfluß auf die Rate der Sauerstofffreisetzung. Im Gegensatz dazu war das abfallende Signal stark beeinflusst. Die Variation des abfallenden Signals bei mehreren Ansätzen war selbst bei derselben Probe und gleichen Chlorophyllkonzentrationen deutlich ausgeprägt ( $\sigma_{n-1} = 52\%$ ,  $n = 6$ , Daten nicht dargestellt) und variierte von Zentrifugationslauf zu Zentrifugationslauf.



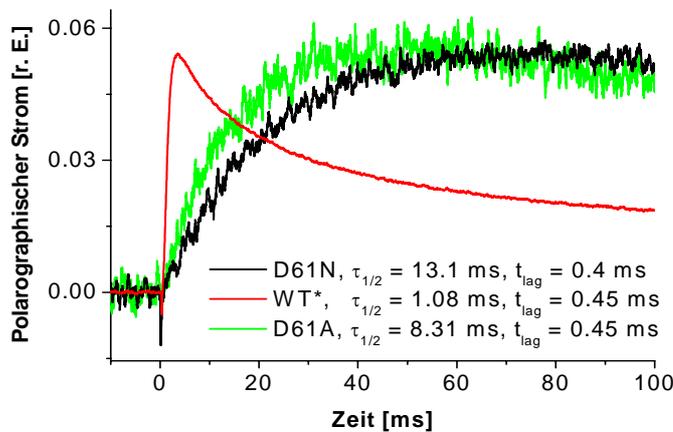
**Abbildung 44: Variation der polarographischen Signale in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Thylakoiden. Die Amplituden waren aufeinander normiert. Grüne Linie = 5.43  $\mu\text{M}$  Chl, schwarze Linie = 54.3  $\mu\text{M}$  Chl. A) Kleines Zeitfenster: Sowohl  $t_{\text{lag}}$  als auch  $\tau_{1/2}$  waren unverändert bei 10fach erhöhten Konzentrationen. B) Großes Zeitfenster: Der Abfall des Signals war mit größeren Mengen von Thylakoiden deutlich langsamer.**

An dieser Stelle soll noch einmal betont werden, daß die unterschiedliche Packung des biologischen Materials keinen detektierbaren Einfluß auf die Verzögerungsphase und den Anstieg des polarographischen Signals hatte.



**Abbildung 45: Unabhängigkeit von  $\tau_{1/2}$  und  $t_{\text{lag}}$  von der Menge an eingesetzten Thylakoiden. Vierecke = Dauer der Verzögerungsphase, Dreiecke = Halbwertszeiten. Gestrichelte Linie = MW von  $t_{\text{lag}}$  (0.44 ms), durchgezogene Linie = MW von  $\tau_{1/2}$  (1.02 ms).**

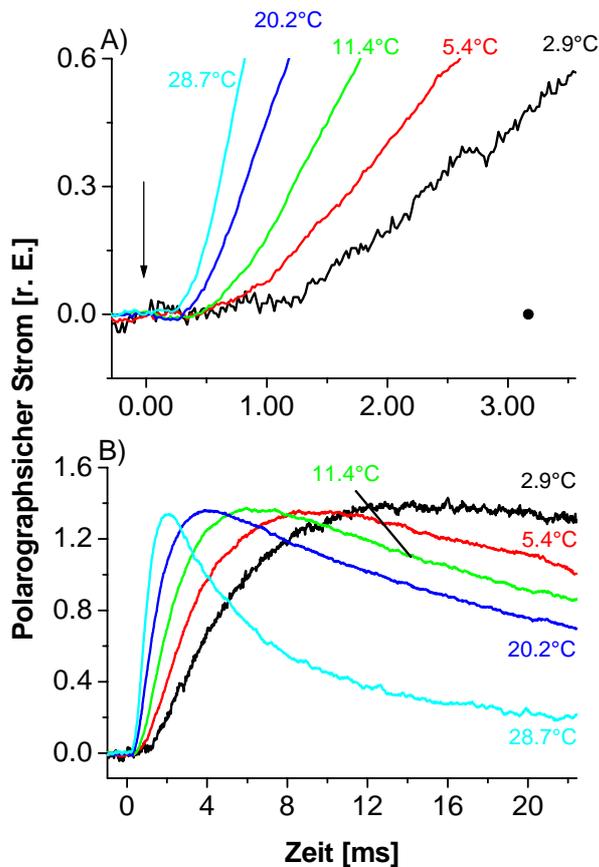
Lavorels theoretische Beschreibung [Lavorel 92] eines diffusionslimitierten, infinitesimal kurzen Sauerstoffpulses einer dünnen Quellschicht im festen Abstand  $X$  zum Verbraucher



**Abbildung 46:**  
Polarographische Rohsignale mit Thylakoiden der Punktmutanten D61N (schwarz) und D61A (grün) im Vergleich zum WT\* (rot). Die Amplituden wurden normiert. MW aus 7 (D61N) bzw. 5 (D61A) Messungen (WT\* = Einzelmessung). Zeitauflösung 20  $\mu$ s/Punkt.

sagt eine Verzögerungsphase voraus, deren Dauer proportional zur Anstiegs- und Relaxationszeit der polarographischen Signale ist. Die Ursache der hier gefundenen Verzögerungsphase wurde untersucht, um festzustellen, ob sie (a) ein Resultat der Diffusion des Sauerstoffs zur Elektrode oder (b) eine verzögerte Freisetzung des Sauerstoffs aus dem *OEC* oder der Membranschicht darstellt. Hierzu wurden die polarographischen Signale mit Thylakoiden der Mutanten D1-D61N und D1-D61A (Abbildung 46) bei ca. 20 °C aufgenommen. Die Halbwertszeiten des ansteigenden polarographischen Signals betragen 13.1 ms (D1-D61N) bzw. 8.67 ms (D1-D61A); sie waren also gegenüber dem WT\* ca. 10fach verlangsamt. Die Dauer der Verzögerungsphase war in den Mutanten unbeeinflusst (0.4 ms in D1-D61N und 0.45 ms in D1-D61A und WT\*). *Daraus folgte, daß die Verzögerungsphase ein Resultat einer Reaktion nach dem Elektronentransfer war.* Wenn die Temperatur auf 2.7 °C abgesenkt wurde, verlangsamte sich die Halbwertszeit der ansteigenden polarographischen Signale auf 3.2 ms (in WT\*-Thylakoiden), und die Dauer der Verzögerungsphase erhöhte sich auf 1 ms (Abbildung 47).

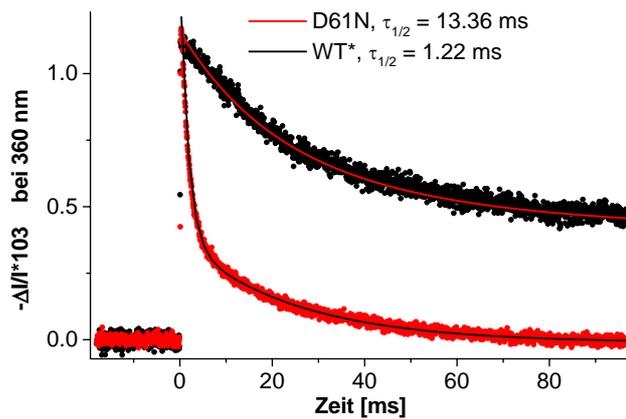
Die absoluten Mengen an eingesetztem Membranmaterial waren in Mutanten und WT\*-



**Abbildung 47: Die Verzögerungsphase der polarographischen Transienten unter Variation der Temperatur. Zeitauflösung: 20  $\mu$ s/Punkt, 5.43  $\mu$ M Chl, Amplituden normiert und Blitzartefakte subtrahiert (vgl. Abbildung 41). A) Kleines Zeitfenster: Die Dauer der Verzögerungsphase veränderte sich mit der Temperatur: 28.7 °C = 0.32 ms, 20.2 °C = (0.45 ms), 11.4 °C = 0.63 ms, 5.4 °C (0.91 ms) und 2.0 °C = 0.94 ms). Die erwartete Dauer der diffusionlimitierten Verzögerungsphase gemäß der Theorie von Lavorel ( $t_{lag} = 0.218 * t_M$ ) wurde durch den schwarzen Punkt angedeutet (für die Transiente bei 2.9 °C).  $t_M$  = Zeitpunkt des Maximums. Der Pfeil markiert den Blitz. B) Dieselben Signale wie in Abbildung A im großen Zeitfenster. Diese Signale wurden nicht entfaltet (vgl. Abbildung 41) dargestellt. Die Halbwertszeiten der entfalteten Signale betragen 0.65 ms (28.7 °C), 1.01 ms (20.2 °C), 1.58 ms (11.4 °C), 2.29 ms (5.4 °C), 3.7 ms (2.9 °C).**

Thylakoiden gleich. Eine Bestimmung des Trockengewichts zweier Proben derselben Chl-Konzentration lieferte identische Ergebnisse.

Daß die Verlängerung der Halbwertszeit des polarographischen Signals in der Mutante D1-D61N durch die Verlangsamung des Elektronentransfers und nicht auf eine veränderte, diffusionsabhängige Versorgung der Elektrode mit Sauerstoff (z.B. durch eine andere Packung der Mutantenthylakoide auf der Elektrode) hervorgerufen wurde, wurde durch spektroskopische Messungen des S-Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  bei 360 nm (dritter Blitz, vgl. VI.2.1) nachgewiesen. Das abfallende Signal wurde mit zwei Exponentialfunktionen rechnerisch angepaßt (DCBQ-Dismutation und  $S_4 \rightarrow S_0$ ). Die UV-Signale des S-Übergangs waren in der Mutante in gleicher Weise gegenüber dem WT\* verlangsamt wie die polarographischen Signale (1.22 ms für WT\* und ca. 13.4 ms in D1-D61N [Abbildung 48]). Für die DCBQ-Dismutation wurden langsamere Halbwertszeiten von 17.2 ms (WT\*) bzw. 33 – 35 ms (D61A und D61N) gefunden. Offensichtlich wurde in den Mutanten weniger DCBQ $^{\cdot-}$  gebildet, so daß die Dismutation langsamer ablief. Die ermittelten Zeiten stimmten gut mit den Literaturangaben (15 ms [Karge *et al.* 97] bzw. 18 – 20 ms [Bögershausen 97; Bögershausen und Junge 95; Hundelt 99]) überein.

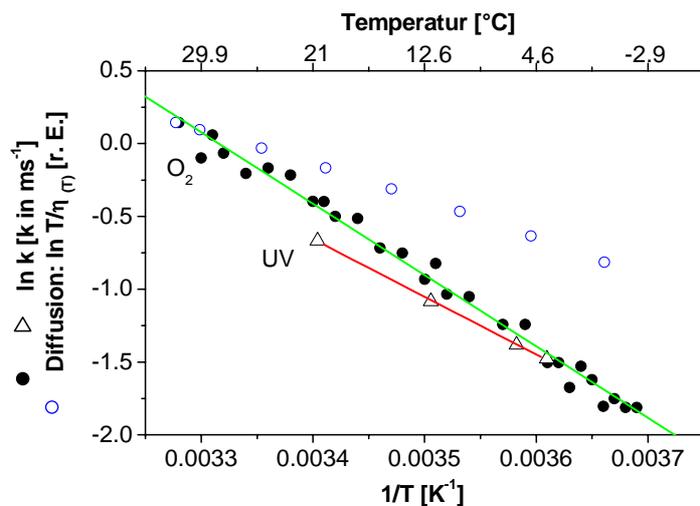


**Abbildung 48: Blitzinduzierte UV-Absorptionsänderung mit PSII-Kernkomplexen aus D61N (schwarze Punkte) und WT\* (rote Punkte) auf dem dritten Blitz. Die durchgezogenen Linien stellen die rechnerischen Anpassungen mit  $\tau_{1/2} = 13.36$  ms (D61N) und  $\tau_{1/2} = 1.22$  ms (WT\*) dar. Mit D61A wurden 8.67 ms ermittelt (nicht abgebildet). MW aus 50 repetierenden (25 s Abstand) Messungen, 12  $\mu$ M Chl, Amplituden normiert. Zeitauflösung 50  $\mu$ s/Punkt.**

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Verzögerungsphase des polarographischen Signals nicht durch die Diffusion des  $O_2$  vom Entstehungsort zur Elektrode hervorgerufen wurde, sondern wahrscheinlich die verzögerte Freisetzung des Sauerstoffs (nach der Bildung) aus dem katalytischen Zentrum und/oder der Membranschicht in das Medium repräsentiert.

## VII.2.2 Arrheniusdiagramme der Verzögerungsphasen und der ansteigenden polarographischen Signale

Die Temperaturabhängigkeit der Verzögerungsphase und die Halbwertszeiten der ansteigenden, polarographischen Signale des dritten Blitzes einer Blitzfolge wurden im Temperaturbereich von  $-2.1$  bis  $31.7$  °C bestimmt. Die Dauer der Verzögerungsphasen und die Anstiegshalbwertszeiten wurden aus 75 entfalteten Meßspuren aus Thylakoiden von *Synechocystis* sp. PCC 6803 ermittelt. Beispiele für vom Blitzartefakt befreite, polarographische Signale wurden in Abbildung 47 dargestellt. Die Signale wurden nicht-entfaltet abgebildet, um die Temperatureffekte auf das abfallende polarographische Signal darzustellen. Hingegen wurden die Halbwertszeiten, die im folgenden besprochen werden, nach der Entfaltung bestimmt. Die Anstiegsraten wurden für jede Probe ermittelt und typischerweise über drei Messungen bei einer Temperatur gemittelt. Die gemittelten Ergebnisse wurden in ein Arrheniusdiagramm übertragen (schwarze Punkte in Abbildung 49). Im untersuchten Temperaturbereich von  $-2.1$  bis  $31.7$  °C lagen alle Meßwerte auf einer geraden Linie, mit der eine Aktivierungsenergie von  $E_a = 40.75$  ( $\pm 0.9$  kJ/mol) und eine Arrheniuskonstante von  $\ln A = 16.3$  ( $\pm 0.4$ ) bestimmt wurden. Es war kein Hinweis auf eine Unterbrechung des linearen Verlaufs sichtbar. Bei  $20$  °C lieferte die Ausgleichsgerade eine Halbwertszeit von  $1.1$  ms für die Sauerstofffreisetzung. Die Dauer der Verzögerungsphase stieg mit abnehmenden Temperaturen an (Abbildung 47). Die Aktivierungsenergie der Verzögerungsphase betrug  $E_a = 31.1$  ( $\pm 0.9$ ) kJ/mol (Abbildung 50 B).



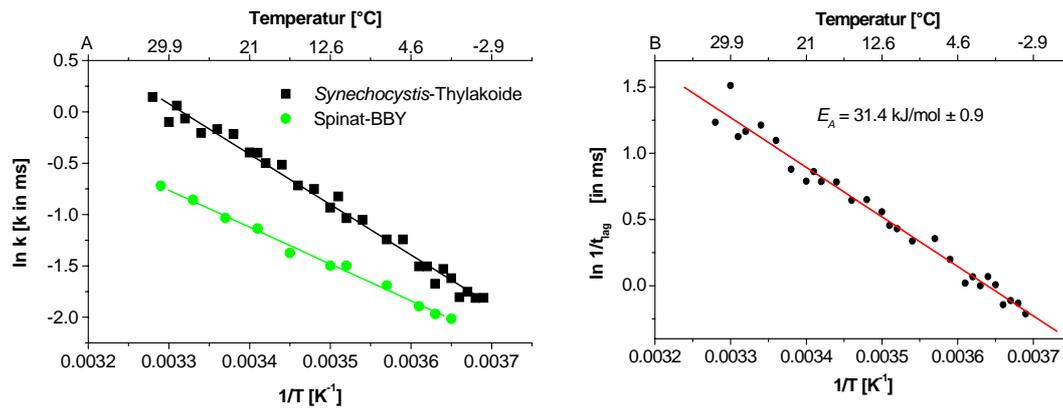
**Abbildung 49: Arrheniusdiagramm des S-Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$ .**  
**Schwarze Punkte:** Raten der Sauerstoffentwicklung bestimmt aus polarographischen Messungen mit *Synechocystis*-Thylakoiden ( $5.43 \mu\text{M}$ ). Die Ausgleichgerade ergab eine  $E_a = 40.75 \text{ kJ/mol}$  ( $\pm 0.9$ );  $\ln A = 16.3$  ( $\pm 0.4$ ). Für  $20^\circ\text{C}$  ergab die Ausgleichgerade für die Sauerstofffreisetzung eine Halbwertszeit von 1.1 ms. Dies war in guter Übereinstimmung mit Literaturangaben, die von 1 bis 1.5 ms reichen [Babcock *et al.* 76; Clausen *et al.* 01a; Dekker *et al.* 84b; Dekker *et al.* 84a; Haumann *et al.* 97a; Haumann *et al.* 97b; Koike *et al.* 87; Li und Burnap 01; Qian *et al.* 99; Rappaport *et al.* 94; Renger und Weiss 86; Saygin und Witt 87] (ermittelt mit unterschiedlichen Methoden). Die ermittelten Halbwertszeiten waren länger als bei Messungen zur zeitaufgelösten ESR-Oximetrie mit Spinat-Thylakoiden (0.4 [Strzalka *et al.* 90] und 0.75 – 0.85 ms bei 8 – 10 °C [Razeghifard *et al.* 97; Razeghifard und Pace 99]). **Dreiecke:** Raten der UV-Absorptionsänderungen bei 360 nm mit PSII-Kernkomplexen aus *Synechocystis* sp. (siehe Abbildung 51).  $E_a = 33$  ( $\pm 1 \text{ kJ/mol}$ );  $\ln A = 12.8$  ( $\pm 0.2$ ). **Blaue Kreise:** Berechnetes Arrheniusdiagramm der Sauerstoffdiffusion in Wasser mit niedriger apparenter  $E_a$  von 20.7 kJ/mol.

Temperaturabhängigkeit von der Viskosität des Wassers bestimmt wird. Die Raten wurden aus tabellierten Werten [Weast und Astle 79] der Wasserviskosität errechnet. Dies ergab eine apparente Aktivierungsenergie von nur 20.7 kJ/mol, ungefähr die Hälfte der Aktivierungsenergie, die für die Sauerstofffreisetzung bestimmt wurde (40.8 kJ/mol). Außerdem wurden in Abbildung 49 die spektroskopischen Daten der blitzinduzierten Absorptionsänderungen aus dem folgenden Abschnitt dargestellt.

Diese Versuchsreihe wurde mit BBY aus Spinat im Temperaturbereich von 0.82 bis  $30.8^\circ\text{C}$  wiederholt (Abbildung 50 A). Eine Auftragung der Raten im Arrheniusdiagramm ergab wiederum einen linearen Verlauf mit einer etwas anderen Aktivierungsenergie von  $E_a = 29.8 \pm 0.8 \text{ kJ/mol}$  und einer Arrheniuskonstante von  $\ln A = 15.9 \pm 0.3$ . Die Signalamplituden (Daten nicht dargestellt) waren deutlich kleiner als mit Thylakoiden von *Synechocystis*.

*Die Arrhenius-Analyse der polarographischen Signale der blitzinduzierten Sauerstofffreisetzung mit Thylakoiden aus Synechocystis und BBY aus Spinat ergab lineare Ausgleichgeraden ohne einen Hinweis auf einen temperaturabhängigen Wechsel von einer ratenlimitierenden zur anderen ratenlimitierenden Reaktion.*

Zum Vergleich wurde in Abbildung 49 die Rate der „apparenten Aktivierungsenergie“ der Diffusion von Sauerstoff in Wasser dargestellt, deren



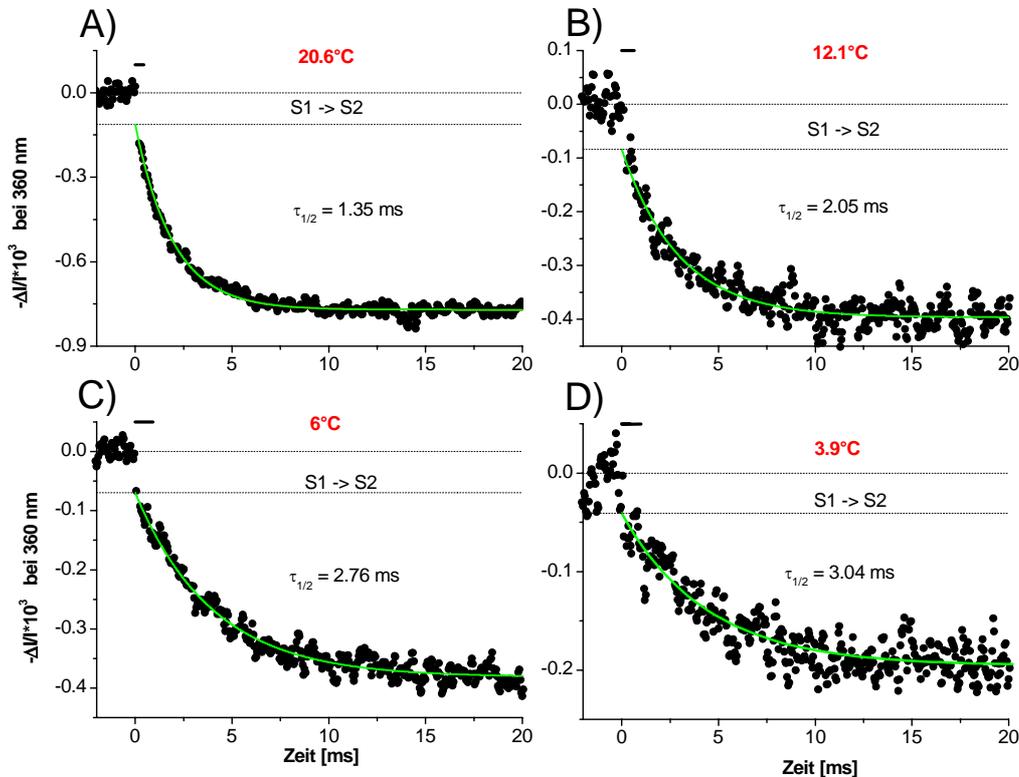
**Abbildung 50:** Arrheniusdiagramme der polarographischen Signale. A) Vergleich der Ergebnisse aus *Synechocystis*-Thylakoiden (schwarz, aus Abbildung 49) mit den polarographischen Ergebnissen aus Spinat-BBY (grün). Die Raten für die Sauerstofffreisetzung wurden aus den korrigierten Rohdaten ermittelt (vgl. Abbildung 41). Die Ausgleichgerade ergab eine  $E_a$  von  $29.8 (\pm 0.8)$  kJ/mol ( $\ln A = 11.1 \pm 0.3$ ) für Spinat-BBY. B) Arrhenius-Analyse der Verzögerungsphase (siehe Text) aus den polarographischen Messungen mit *Synechocystis*-Thylakoiden. Die Ausgleichgerade ergab  $E_a = 31.4 (\pm 0.9)$  kJ/mol. Sie unterschied sich deutlich von der apparenten Aktivierungsenergie für die Diffusion von Sauerstoff in Wasser (Abbildung 49).

### VII.2.3 Arrhenius-Diagramm der UV-Transienten bei 360 nm

Dunkeladaptierte PSII-Kernkomplexe aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurden mit einer Serie aus fünf kurzen Laserblitzen angeregt, und die blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei 360 nm wurden bei unterschiedlichen Temperaturen aufgezeichnet. Jede dieser Meßspuren, die in Abbildung 51 dargestellt wurden, repräsentierte die Differenz aus den Rohsignalen des 3. und des 5. Blitzes einer Blitzserie. Die Differenzbildung entfernte akzeptorseitige Signale, die die Absorptionsänderungen des OEC bei 360 nm überlagerten (eine detaillierte Beschreibung der Signalkorrektur durch Differenzbildung findet sich in [Clausen *et al.* 01b]). Der schnelle, hier nicht aufgelöste Sprung zwischen den gestrichelten Linien in Abbildung 51 spiegelte Absorptionsänderungen des S-Übergangs  $S_1 \Rightarrow S_2$  wider. Das anschließende, langsam abfallende Signal repräsentierte den Elektronentransfer vom Mn zu  $Y_Z^{ox}$ . Dieses Signal wurde in Abbildung 51 einfach exponentiell angepaßt (rote Linie). Die Halbwertszeiten bei 3.9, 6, 12.1 und 20.6 °C betragen 3.04, 2.76, 2.05 und 1.35 ms. Die Arrheniusparameter der UV-Transienten der langsamen Phase waren, wie folgt:  $E_a = 33 \pm 1$  kJ/mol und  $\ln A = 12.8 \pm 0.2$ . Die Halbwertszeiten waren in der gleichen Größenordnung wie die über Polarographie ermittelten Werte, aber etwas langsamer (vgl. Abschnitt VII.2.2). Die Auftragung der Raten nach Arrhenius ergab wiederum einen linearen Verlauf (Abbildung 49, offene Dreiecke), so daß auch die spektroskopische Analyse keinen Anhaltspunkt für ein temperaturabhängiges Umschalten von einer ratenlimitierenden Reaktion zur anderen lieferte.

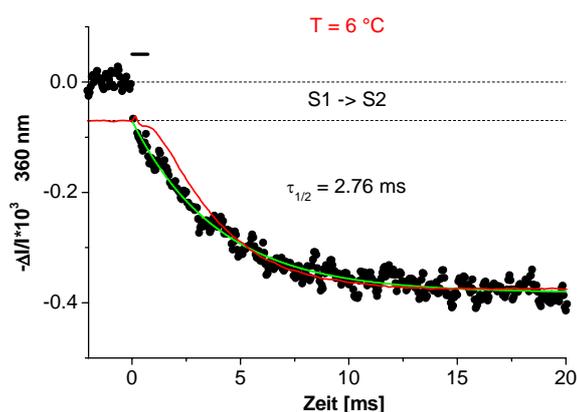
Abschließend wurde untersucht, ob bei den spektroskopischen Signalen eine ähnliche Verzögerungsphase wie bei den polarographischen Messungen auftrat. Eine Überlagerung einer polarographischen Transiente (bei 5.5 °C) und der blitzinduzierten Absorptionsänderung im UV-Bereich bei 6°C belegte, daß eine Verzögerungsphase im

Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  von ähnlichem Ausmaß wie in den polarographischen Messungen in



**Abbildung 51: Blitzinduzierte Absorptionsänderungen des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  in Abhängigkeit von der Temperatur. PSII-Kernkomplexe von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Differenz aus dem 3. und 5. Blitz (siehe Text). Die gestrichelten Linien deuten den zeitlich nicht aufgelösten Sprung durch den Übergang  $S_1 \Rightarrow S_2$  an. Die horizontalen Balken spiegeln die Dauer der Verzögerungsphasen in den ungefähr korrespondierenden (siehe Text), polarographischen Messungen wider. Repetierend-semidunkeladaptierte Messungen mit 2 min Dunkelphase zwischen den Meßserien. Zeitauflösung 50  $\mu$ s/Punkt, 8 – 12  $\mu$ M Chl. Die Meßspuren wurden über jeden zweiten Punkt geglättet. A) 6 °C,  $\tau_{1/2} = 2.76$  ms, MW aus 85 Messungen. B) 12.1 °C,  $\tau_{1/2} = 2.05$  ms, MW aus 40 Messungen. C) 20.6 °C,  $\tau_{1/2} = 1.35$  ms, MW aus 70 Messungen. D) 3.9 °C,  $\tau_{1/2} = 3.04$  ms, MW aus 55 Messungen.**

den spektroskopische Messungen nicht vorhanden war. Bei dem vorliegenden Signal/Rausch-Verhältnis hätte eine so ausgeprägte Verzögerungsphase wie in den polarographischen Messungen (angedeutet durch den schwarzen Balken in Abbildung 52) in den spektroskopischen Signalen diskriminierbar sein müssen. Offensichtlich gab es keine Verzögerungsphase vor dem Elektronentransfer vom Mn-Komplex zum  $Y_Z^{ox}$ . Dies untermauerte die vorherige Zuweisung der Verzögerungsphase zur Freisetzung von bereits gebildetem, aber noch gebundenem Sauerstoff aus dem katalytischen Zentrum oder der Membranschicht (Abschnitt VII.2.2).



**Abbildung 52:** Vergleich der blitzinduzierten Absorptionsänderungen im Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  ( $6^\circ\text{C}$ , PSII-Kernkomplexe) mit den polarographischen Transienten ( $5.5^\circ\text{C}$ , *Synechocystis*-Thylakoide). Daten aus Abbildung 47 bzw. Abbildung 51. Die deutliche Verzögerungsphase der polarographischen (rot) Messungen (hervorgehoben durch den schwarzen, horizontalen Balken) trat bei den spektroskopischen Messungen (schwarz, bzw. grün = Ausgleichkurve) nicht auf.

## VII.2.4 Vergleich polarographischer Signale mit spektroskopischen Transienten

Die ersten beiden Zeilen in Tabelle 9 vergleichen die Halbwertszeiten mit unterschiedlichen Startmaterialien (aus demselben Organismus) und unterschiedlichen Meßmethoden (Sauerstoff-Polarographie und UV-Spektroskopie). Bei den vier ausgewerteten Temperaturen (von  $3.9$  bis  $20.6^\circ\text{C}$ ) waren die ermittelten Halbwertszeiten

**Tabelle 9:** Vergleich der temperaturabhängigen Halbwertszeiten (in ms) des S-Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  von polarographischen<sup>a</sup> und spektroskopischen Messungen

Material / Methode	$\tau_{1/2}$ [ms] bei Temperatur [ $^\circ\text{C}$ ]			
	3.9	6	12.1	20.6
<i>Synechocystis</i> Kernkomplexe/UV	3.0	2.8	2.1	1.4
<i>Synechocystis</i> -Thylakoide/Polaro.	2.9	2.5	1.8	1.1
Spinat-BBY/Polarographie	4.5	4.0	3.2	2.1

<sup>a</sup> ermittelt aus den Ausgleichgeraden

in der gleichen Größenordnung. Die polarographisch ermittelten Halbwertszeiten waren eher noch schneller als die ermittelten Halbwertszeiten aus UV-Absorptionsmessungen. Da die Sauerstofffreisetzung ein Ereignis darstellt, das dem Elektronentransfer vom Mn-

Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  folgt, bewiesen die nahezu identischen Halbwertszeiten, daß das polarographische Signal nicht diffusionslimitiert war, sondern statt dessen die tatsächliche Rate der Sauerstofffreisetzung charakterisierte. Die beiden unteren Zeilen in Tabelle 9 vergleichen die Halbwertszeiten der polarographischen Signale von *Synechocystis*-Thylakoiden und BBY aus Spinat (*Spinacia oleracea*).

## VII.3 Diskussion

PSII produziert Sauerstoff in einem vierstufigen Prozeß. Das Substrat-Wasser kann selbst noch im letzten stabilen Zustand vor der Bildung des Sauerstoffs im katalytischen Zentrum ausgetauscht werden [Hendry und Wydrzynski 02; Hillier *et al.* 98a; Hillier *et al.* 01; Messinger *et al.* 95]. Sauerstoff wird nur freigesetzt, wenn der Mn-Komplex im dritten

Oxidationszustand  $S_3$  vorliegt und das redoxaktive Tyrosin durch einen weiteren Blitz zu  $Y_Z^{ox}$  oxidiert worden ist. Die Rate der Sauerstofffreisetzung – polarographisch über einen großen Temperaturbereich gemessen – glich den Raten des Elektronentransfers zwischen dem Mn-Komplex und  $Y_Z^{ox}$ , die über blitzinduzierte Absorptionsänderungen bei 360 nm ermittelt wurden (bei unterschiedlichen Temperaturen, siehe Tabelle 9). Leichte Unterschiede zwischen den ermittelten Raten wurden den unterschiedlichen Ausgangsmaterialien zugeschrieben. *Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse hatte zwei Konsequenzen: (i) Sie bewies die kinetische Kompetenz der zentrifugierbaren Elektrode. (ii) Sie unterstrich die Abwesenheit eines greifbaren Intermediates des finalen Reaktionsschrittes der Wasserspaltung. Die Suche nach einem Intermediat über weitere Messungen der Temperaturabhängigkeit wurde deshalb aufgegeben.*

### VII.3.1 Betrachtung der kinetischen Kompetenz der zentrifugierbaren Sauerstoffelektrode

Eine Theorie für den diffusionlimitierten Sauerstofftransport, ausgehend von einer Quellschicht aus PSII-Membranen zu einer verbrauchenden Platinelektrode, ist von Lavorel [Lavorel 92] entwickelt worden. Unter idealisierten Annahmen (sehr schneller, stufenförmiger Sauerstoffpuls, der von einer sehr dünnen Membranschicht in einem einzigen festen Abstand  $X$  abgegeben wird) liefert dieser Ansatz eine sehr kurze Verzögerungsphase (i), gefolgt von einem diffusionslimitierten Anstieg des amperometrischen Signals (ii) bis zum Maximum (iii), dem sich ein langsamer Abfall des Signals (iv) anschließt, der den Sauerstoffverbrauch durch die Amplitude beschreibt (zzgl. Wegdiffusion). Unter diesen idealisierten Annahmen waren die Parameter der Meßkurven (Dauer der Verzögerungsphase, Halbwertszeiten der ansteigenden Signale, Zeitpunkt des Maximums, Halbwertszeiten der abfallenden Signale) in einem konstanten Verhältnis zueinander: (i)/(ii)/(iii)/(iv) = 0.218/0.436/1/3.14 [Lavorel 92] (siehe Anhang XI.4). Lavorel hat die von ihm theoretisch herausgefundenen Verhältnisse durch Experimente bestätigen können. Mit den hier durchgeführten Versuchen konnten diese strikten Verhältnisse nicht wiedergefunden werden, und es war offensichtlich, daß die o.g. Theorie und Ihre Vereinfachungen nicht auf das hier verwendete System angewendet werden konnten.

Folgende Punkte sprachen gegen das Modell der diffusionslimitierten Sauerstofffreisetzung:

- (i) Der Elektronentransfer vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{ox}$  ist der Vorläufer der Sauerstoffproduktion. Die im Vergleich zu den spektroskopischen Signalen (mit PSII-Kernkomplexen) des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  geringfügig schnelleren polarographischen Signale mit Thylakoiden bewiesen, daß das Signal nicht diffusionslimitiert war bzw. daß die Elektrode kinetisch kompetent war.
- (ii) Bei 20 °C betrug die Halbwertszeit des ansteigenden Signals mit Thylakoiden aus *Synechocystis* 1.1 ms und die temperaturunabhängige Halbwertszeit des Elektrode/Verstärker-Systems betrug 100 µs. Die instrumentelle Zeitauflösung war also hoch genug, um Halbwertszeiten um 1 ms herum aufzulösen.
- (iii) Unterschiedliche Mengen an eingesetztem Chlorophyll auf der Platinelektrode beeinflussten weder die Verzögerungsphase noch den Anstieg des polarographischen Signals. Allein das abfallende Signal verlangsamte sich mit steigender Menge an eingesetztem Chl. Die sauerstoffentwickelnden Zentren, die durch die Zentrifugation direkt auf die Platinelektrode zentrifugiert worden waren, wurden offensichtlich unmittelbar von der Elektrode ohne signifikanten Einfluß der Diffusion detektiert und verursachten das schnell ansteigende polarographische

- Signal. Sauerstoffentwickelnde Zentren, die sich bei erhöhten Chlorophyllkonzentrationen und, daraus resultierend, größeren Schichtdicken weiter entfernt von der Platinoberfläche befanden, bewirkten den langsameren Abfall des polarographischen Signals („die größere Kapazität der Sauerstoffmembranen“). Dasselbe galt für sauerstoffentwickelnde Zentren die auf durch Verunreinigungen inaktive Bereiche der Platinoberfläche zentrifugiert worden waren. In beiden Spielarten von sauerstoffentwickelnden Zentren hatte der Sauerstoff einen längeren Diffusionsweg. Beide Populationen vergrößerten die Quellstärke der Probe und verzögerten das abfallende polarographische Signal.
- (iv) Es wurden zwei Mutanten mit ungefähr zehnfach langsameren Elektronentransferzeiten vom Mn-Komplex zum  $Y_Z^{ox}$  mit spektroskopischen Messungen charakterisiert. Die Rate des polarographischen Signals mit Thylakoiden dieser Mutanten war um das gleiche Maß verlangsamt.
  - (v) Die ermittelte Aktivierungsenergie der Verzögerungsphase unterschied sich mit 31.1 kJ/mol deutlich von der apparenten Aktivierungsenergie der Diffusion von Sauerstoff in Wasser (20.7 kJ/mol) und der Diffusion von Sauerstoff in unterschiedlichen, künstlichen Membranen (4.6 bis 6.7 kJ/mol) [Fischkoff und Vanderkooi 75].
  - (vi) Eine genaue Untersuchung der Verzögerungsphase zeigt, daß das polarographische Signal nicht mit einer einfachen konsekutiven Reaktion im Sinne von  $A \rightarrow B \rightarrow C$  beschrieben werden kann, in der der erste Schritt die Bildung des Sauerstoffs und der zweite Schritt die Diffusion des Sauerstoffs zur Elektrode darstellt. Mit solch einer einfachen konsekutiven Reaktionsgleichung kann keine derart ausgeprägte Verzögerungsphase entstehen (Abbildung 53 B). Wenigstens vier Komponenten ( $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$ ) sind notwendig, um das polarographische Signal zufriedenstellend beschreiben zu können (Abbildung 53 A). Die rechnerischen Anpassungen für die ermittelten Differentialgleichungen der o.g. Reaktionsschemata wurden in Abbildung 53 A, B als rote Linien abgebildet. Die Identität von A, B, C, D (und E ?) wurde in diesem Kapitel nicht bestimmt. Ein möglicher Vorschlag für die drei Reaktionen wäre: 1. Bildung von  $O_2$  2. Freisetzung von  $O_2$  3. eventuell ein kleiner, nicht variierender und nicht limitierender Anteil an Diffusion und 4. die Reaktion von  $O_2$  mit dem Platin (siehe VII.3.3).

Diese Daten bewiesen, daß die Antwort der Elektrode nicht durch die Diffusion des Sauerstoffs zur Platinoberfläche limitiert war.

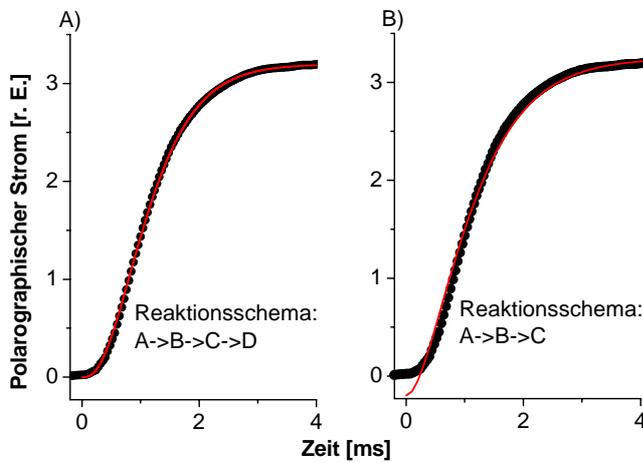


Abbildung 53: Simulation der Verzögerungsphase einer polarographischen Einzelmessung (ca. 27 °C, 5.43 μM Chl, 20 μs/Punkt) durch konsekutive Reaktionsfolgen. Die Meßdaten waren entfaltet und das Blitzartefakt abgezogen worden (vgl. Abbildung 41).  $\tau_{1/2} = 0.73$  ms. A) Die polarographische Transiente konnte gut durch drei konsekutive Reaktionen beschrieben werden. B) Eine einfache Folge zweier konsekutiver Reaktionen konnte die ausgeprägte Verzögerungsphase nicht beschreiben.

### VII.3.2 Die Halbwertszeit der Sauerstoffentwicklung und ihre Temperaturabhängigkeit

Bei 20 °C wurde für die Sauerstoffentwicklung eine Halbwertszeit von ungefähr 1 ms mit leichten Unterschieden zwischen PSII-Membranen und solubilisierten PSII-Kernkomplexen und leichten Unterschieden zwischen unterschiedlichen Ausgangsmaterialien gefunden. Die Ergebnisse waren in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten, die ebenfalls mit zentrifugierbaren Sauerstoffelektroden ermittelt worden sind (Tabelle 10 und Legende von Abbildung 47). Die geringfügigen Abweichungen bei den ermittelten Halbwertszeiten und Aktivierungsenergien wurden eher den unterschiedlichen Ausgangsmaterialien (Thylakoide ↔ PSII-Kernkomplexe; Bakterien ↔ höhere Pflanzen) als systembedingten Unterschieden der Sauerstoffelektroden zugeschrieben. Dies ist in Einklang mit Ergebnissen, die belegen, daß die Geschwindigkeit des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  mit zunehmender Detergenzbehandlung abnimmt [Razeghifard *et al.* 97; Razeghifard und Pace 99]. Dies wurde auch durch die Ergebnisse aus Tabelle 9

**Tabelle 10: Halbwertszeiten der ansteigenden polarographischen Signale mit ganzen Zellen oder sauerstoffentwickelnden Membranen**

Material	$\tau_{1/2}$ [ms]	Temp. [°C]
<i>Synechocystis</i> -Zellen	2.7 (gemessen) <sup>a, b</sup> 1.2 (intrinsisch)	ca. 20
<i>Synechocystis</i> -Zellen	3 (gemessen) ≈ 1.5 (intrinsisch) <sup>c</sup>	ca. 20
<i>Synechocystis</i> -Membranen	1.07 <sup>d</sup>	20.6
<i>Synechocystis</i> -Membranen	1.3 <sup>e, f</sup>	nicht genannt
Spinat-BBY	2.12 <sup>d</sup>	20.6
Erbsen-Thylakoide	1.6 <sup>g</sup>	20

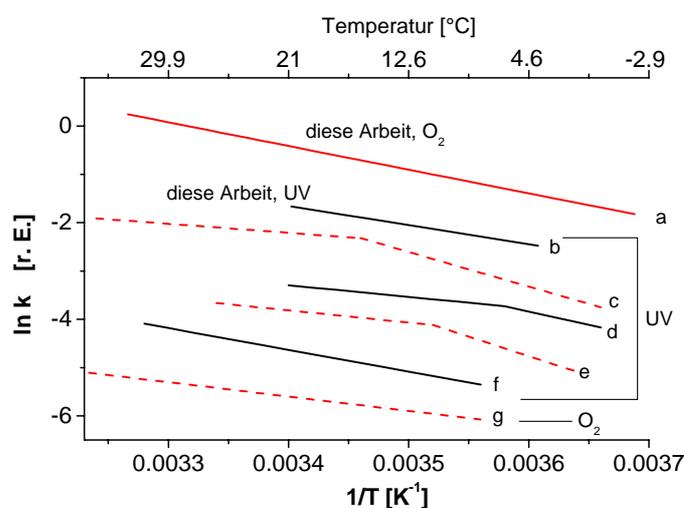
<sup>a</sup> [Hundelt *et al.* 98a], <sup>b</sup> [Hundelt 99],

<sup>c</sup> [Hundelt *et al.* 98b], <sup>d</sup> diese Arbeit, <sup>e</sup> [Qian *et al.* 99], <sup>f</sup> [Li und Burnap 01], <sup>g</sup> [Haumann *et al.* 97a]

bestätigt, in der leicht unterschiedliche Halbwertszeiten mit derselben Elektrode aber unterschiedlichen Materialien zusammengefaßt wurden. Die Tatsache, daß die polarographische Signale sogar etwas schneller waren als die UV-Transienten (letztere beschreiben den Elektronentransport vom Mn zum  $Y_Z^{ox}$  und sind der Auslöser der Sauerstoffproduktion), ließ keinen Zweifel an der kinetischen Kompetenz der Elektrode. Im Temperaturbereich von -2 bis +32 °C wurde weder mit den polarographischen Messungen noch mit den spektroskopischen Daten eine Abweichung von einem linearen

Verlauf der Aktivierungsenergie gefunden (Abbildung 54). Demzufolge gab es nach dieser intensiven Untersuchung keinen Hinweis auf eine konsekutive Reaktion mit einem Intermediat, daß ab einer kritischen Temperatur greifbar gewesen wäre.

Unsere Ergebnisse bestätigten alte polarographische Analysen aus der Literatur, die mit einer herkömmlichen, nicht zentrifugierbaren und zeitlich nicht hochauflösenden Sauerstoffelektrode durchgeführt worden sind. Im Temperaturbereich von 8 bis 42 ° C ermitteln Sinclair und Arnason [Sinclair und Arnason 74] ebenfalls eine kontinuierliche Aktivierungsenergie ohne Knickpunkt im Arrheniusdiagramm mit Zellen der Grünalgen *Chlorella vulgaris* und *C. pyrenoidosa*. Sie geben für die Aktivierungsenergie einen Wert von 24.7 kJ/mol an.



**Abbildung 54: Vergleich der Arrhenius-Analysen des S-Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  (Literaturdaten und diese Arbeit). Für eine günstigere, vergleichende Darstellung wurden die Arrheniuskonstanten,  $A$ , verschoben. In drei Artikeln wird von einem Knickpunkt im Arrheniusdiagramm berichtet (c, d, e; spektroskopische Messungen). Die Lage des Knickpunktes variiert: 6 °C (a), 11 °C (e) und 16 °C (c). Zwei Auswertungen von polarographischen Messungen (a und g) zeigen keinen Knickpunkt, wie auch andere UV-Daten (b, f). a, b: Diese Arbeit; c: [Koike *et al.* 87]. d: [Renger und Hanssum 92]. e: [Karge *et al.* 97]. f: [Haumann *et al.* 97a]. g: [Sinclair und Arnason 74].**

**Tabelle 11: Aktivierungsenergien des S-Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  in Abhängigkeit vom Material, von der Präparation und der Meßmethode**

Material (Organismus und Präparation)	Knickpunkt ?	$E_a$ in kJ/mol (Spektroskopie)	$E_a$ in kJ/mol (Polarographie)	Temperaturbereich [°C]
<i>C. pyrenoidosa</i> , Zellen	Nein		32.2 <sup>a</sup>	3 und 27
<i>C. pyrenoidosa</i> , Zellen	Nein		27.6 <sup>b</sup>	9 und 26
Zellen von <i>C. pyrenoidosa</i> & <i>C. vulgaris</i>	Nein		24.7 <sup>c</sup>	8 – 42
Spinat BBY	Nein		29.8 ± 0.8 <sup>d</sup>	0.82 – 30.8
<i>Synechocystis</i> -Thylakoide	Nein		40.75 ± 0.9 <sup>d</sup>	-2.1 – 31.7
<i>Synechocystis</i> -Kernkomplexe	Nein	33 ± 1		3.9 – 20.6
Kernkomplexe aus Erbsen	Nein	37.5 ± 2 <sup>e</sup>		7.9 – 30.6
<i>S. vulcanus</i> Kernkomplexe	Ja	15.5 (T > 16 °C) 59.4 (T < 16 °C)		1 – 50
Spinat-Kernkomplexe	Ja	21 (T > 11 °C) 67 (T < 11 °C)		2 – 25
Spinat BBY	Ja	20 (T > 6 °C) 46 (T < 6 °C)		0.3 - 21

<sup>a</sup> [Joliot *et al.* 66], <sup>b</sup> [Etienne 68], <sup>c</sup> [Sinclair und Arnason 74], <sup>d</sup> diese Arbeit, <sup>e</sup> [Haumann *et al.* 97a], <sup>f</sup> [Koike *et al.* 87], <sup>g</sup> [Karge *et al.* 97], <sup>h</sup> [Renger und Hanssum 92].

### VII.3.3 Betrachtung der Verzögerungsphase mit Hinblick auf ein kurzlebiges Intermediat der Wasseroxidation

Im Gegensatz zu vorherigen Analysen wurden in diesem Kapitel erstmals die polarographischen Signale um das Blitzartefakt korrigiert. Das Blitzartefakt setzte sich aus dem photoelektrischen Effekt und elektromagnetischen Störungen („Elektrosmog“) zusammen. Die Korrektur der Signale enthüllte eine kurze, temperaturabhängige Verzögerungsphase (Dauer ungefähr 450  $\mu\text{s}$  bei 20 °C) vor dem eigentlichen polarographischen Signal. Die Verzögerungsphase war identisch in WT\* und Mutanten mit ca. zehnfach (bis zu 13 ms) verlangsamter Sauerstoffproduktion. Die Verzögerungsphase war unabhängig von der Menge an Chlorophyll, die auf die Elektrode zentrifugiert wurde, und sie war nicht sichtbar in den entsprechenden blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei 360 nm. Die Dauer dieser Verzögerungsphase nahm mit sinkenden Temperaturen zu. Die ermittelte Aktivierungsenergie der Verzögerungsphase unterschied sich mit 31.1 kJ/mol deutlich von der apparenten Aktivierungsenergie der Diffusion von Sauerstoff in Wasser (20.7 kJ/mol) und der Diffusion von Sauerstoff in unterschiedlichen, künstlichen Membranen (4.6 bis 6.7 kJ/mol) [Fischkoff und Vanderkooi 75]. Alle diese Ergebnisse sprachen dafür, die Verzögerungsphase einer verzögerten Freisetzung des gebildeten Sauerstoffs zuzuweisen und nicht dem Elektronentransfer vom Wasser zum Mn-Komplex und weiter zum  $Y_Z^{\text{ox}}$  oder der Diffusion von der Sauerstoffquelle zur Platinoberfläche. In gewisser Hinsicht war die Verzögerungsphase mit einem Intermediat im selben Oxidationszustand wie Wasser vereinbar, das nur existiert, wenn der Mn-Komplex im niedrigsten Oxidationszustand  $S_0$  vorliegt. Die Zuweisung der Verzögerungsphase zur Freisetzung des bereits gebildeten Sauerstoffs aus den zentrifugierten Membranschichten würde im Einklang mit der Lipophilie von Sauerstoff stehen. Der Verteilungskoeffizient von Sauerstoff zwischen Lipiden und Wasser beträgt 4.4 [Battino *et al.* 68].

Messungen zur ESR-Oximetrie mit Thylakoiden aus Spinat zeigen keine vergleichbare Verzögerungsphase [Razeghifard *et al.* 97; Razeghifard und Pace 99; Strzalka *et al.* 90]. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf eine durch Zentrifugation dichtgepackte Membranquellschicht als Verursacher der Verzögerungsphase sein, da die Proben bei der ESR-Oximetrie nicht zentrifugiert werden.

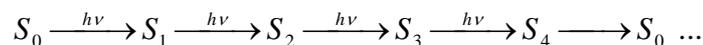
Ob letztendlich dieses Intermediat von chemischem Interesse ist oder ein triviales, durch die Meßmethode bedingtes Intermediat (gebildeter aber noch gebundener Sauerstoff) repräsentiert, muß noch geklärt werden.

## VIII. Erste Identifizierung von Intermediaten der Wasserspaltung durch erhöhten Sauerstoffpartialdruck

### VIII.1 Einleitung

Der in der Atmosphäre vorhandene Sauerstoff ist ausschließlich das Produkt der von höheren Pflanzen, Algen und Cyanobakterien durchgeführten oxygenen Photosynthese. Die Spaltung von Wasser in Protonen, Elektronen und Sauerstoff läuft im Photosystem II ab. Der Reaktionsort der Wasseroxidation ist der Wasserspaltungskomplex (engl. *oxygen evolving complex, OEC*), der 4 Manganatome, ein redoxaktives Tyrosin (Tyrosin Z,  $Y_Z$ ), ein  $Ca^{2+}$ , wahrscheinlich ein  $Cl^-$ , gebundenes Wasser und Aminosäureliganden umfaßt.

Der primäre Donator in PSII,  $P_{680}$ , wird durch einen Lichtblitz oxidiert und anschließend durch  $Y_Z$  reduziert.  $Y_Z^{ox}$  wird wiederum durch den Mn-Komplex und/oder Liganden (siehe Einleitung III, Seite 6) reduziert. Angetrieben durch Lichtquanten speichert der *OEC* zunächst schrittweise Oxidationsäquivalente, bevor es zur Wasserspaltung kommt. Seit der Entdeckung, daß vier Lichtblitze zur Sauerstofffreisetzung führen [Joliot *et al.* 69; Kok *et al.* 70], wird der Reaktionsmechanismus („Kok-Zyklus“) formal durch den Fortschritt zu jeweils höheren Oxidationszuständen des *OEC* ( $S_n$ ,  $n = 0 - 4$ ) beschrieben:



Schema 1

Der sauerstofffreisetzende Schritt ist der Übergang  $S_3 \xrightarrow{h\nu} S_4 \xrightarrow{\nearrow} S_0$ . Im dunkeladaptierten Zustand liegt der *OEC* typischerweise zu 70 - 75% in  $S_1$  und zu 30 - 25% in  $S_0$  vor ([Haumann und Junge 94], Abschnitt V.6 und Abschnitt VII.2.1). Die Sauerstofffreisetzung erfolgt also bei dunkeladaptierten Proben vor allem nach dem dritten Blitz (Abbildung 40, Seite 91). Das Erstaunliche an dieser Reaktionsfolge ist das bisherige Fehlen jeglicher Zwischenstufen der insgesamt vierstufigen Oxidation der beiden gebundenen Wassermoleküle. Weder im Zustand  $S_2$  noch transient im Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  konnte ein Zwischenprodukt der Oxidation von Wasser (z.B. ein gebundenes Peroxid, s.u.) identifiziert werden.  $S_4$  steht stellvertretend für alle Zwischenzustände und besitzt bisher keine andere nachgewiesene Bedeutung, als diejenige des, durch den vorherigen  $S_3$ -Zustand des *OEC* und das frisch erzeugte Tyrosinradikal beschriebenen, „Einstiegs-Zustands“ ( $S_3Y_Z^{ox}$ ) für die zu erwartende Reaktionsfolge bis hin zum freien Sauerstoff [Rappaport *et al.* 94; Renger *et al.* 94]. Die Zeitkonstanten aus der Beobachtung (a) des Zerfalls von  $Y_Z^{ox}$  aus ESR-Messungen [Babcock *et al.* 76; Razeghifard *et al.* 97; Razeghifard und Pace 97; Razeghifard und Pace 99], (b) der UV/VIS-Absorptionsänderungen aus dem System  $Y_ZMn_4$  [Clausen *et al.* 01a; Clausen *et al.* 01b; Dekker *et al.* 84b; Haumann *et al.* 97b; Renger und Weiss 86] und (c) der Freisetzung des molekularen Sauerstoffs (gemessen mit zeitaufgelöster Polarographie [Clausen *et al.* 01a; Clausen *et al.* 04; Hundelt *et al.* 98a; Hundelt 99] oder zeitaufgelöster ESR-Oximetrie [Razeghifard und Pace 99]), stimmen überein, und dies gerade auch in solchen Mutanten, bei denen die Sauerstofffreisetzung um eine Größenordnung verlangsamt ist. Dies deutet

darauf hin, daß die Elektronenübertragung auf  $Y_Z$  geschwindigkeitsbestimmend für alle folgenden Reaktionen bis hin zur Ablösung des Sauerstoffs ist. Zwischenschritte sind offenbar kinetisch maskiert wegen ihrer kurzen Halbwertszeit. Nach bisherigem Verständnis könnten die Zwischenzustände,  $B_i$ , eines Reaktionsschemas



Schema 2

dadurch maskiert sein, daß

- 1.)  $B_i \rightleftharpoons C + O_2$  sehr viel schneller abläuft als  $A \rightleftharpoons B_i$ , und/oder
- 2.) das vorgelagerte Gleichgewicht  $A \rightleftharpoons B_i$  sehr weit auf der Seite von  $A$  liegt.

Es besteht Übereinstimmung in der Literatur, daß es eine Reihe von Zwischenreaktionen geben muß. Naheliegend ist die Existenz einer gebundenen Peroxid-Zwischenstufe [Haumann *et al.* 97a; Haumann und Junge 99; Renger 78; Renger 97; Renger 01], welche mit geringer Wahrscheinlichkeit sogar schon im Zustand  $S_3$  vorhanden sein könnte. Es ist jedoch bisher nicht gelungen, einen dieser Zwischenzustände nachzuweisen (s.u.).

Durch Isotopenaustauschversuche ist gezeigt worden, daß noch im letzten Zustand vor der Wasserspaltung ( $S_3$ ) beide Substratwassermoleküle ausgetauscht werden können [Hendry und Wydrzynski 02; Hillier *et al.* 98a; Hillier *et al.* 98b; Hillier und Wydrzynski 00; Hillier und Wydrzynski 01; Radmer und Ollinger 86]. Wasserstoffperoxid ist kein Substrat der Wasserspaltungsreaktion [Samuilov *et al.* 01]. Diese Beobachtungen legen nahe, daß die Ausbildung der O-O Bindung erst nach dem Zustand  $S_3$  erfolgt, im Gegensatz zu früheren Überlegungen [Haumann *et al.* 97a; Haumann und Junge 99; Renger 78; Renger 97; Renger 01]. Die Natur scheint die Bildung potentiell gefährlicher, intermediärer Oxidationsprodukte des Wassers vermieden zu haben. Statt dessen werden die Oxidationsäquivalente im *OEC* gespeichert und die Oxidation der beiden Wassermoleküle erfolgt in einem einzigen, finalen Schritt,  $Y_Z^{ox}S_3 \bullet (H_2O)_2 \rightarrow Y_Z S_0 + O_2 + 4 H^+$ .

Die Identifikation von Zwischenstufen ist unerlässlich für das Verständnis des Mechanismus der Wasseroxidation. Ein überzeugendes Schema der Reaktionsfolge am katalytischen Manganzentrum ließ sich bisher u.a. auch deshalb nicht formulieren, weil weder die Anordnung der vier Mn-Atome und ihrer Liganden noch die Verteilung der Redoxäquivalente über diese Kofaktoren sicher bekannt ist. Die aktuellen Röntgenkristallstrukturen von PSII und dem Mn-Komplex haben dazu eine zu geringe Auflösung (3.8 Å [Zouni *et al.* 01b], 3.7 Å [Kamiya und Shen 03] und 3.5 Å [Ferreira *et al.* 04]), und widersprechen sich z.T. drastisch.

Mindestens drei Ansätze zur Identifikation von Intermediaten der Wasserspaltung sind bisher erfolglos verfolgt worden: 1. Spektroskopische Messungen bei 360 nm haben einen Knickpunkt im Arrheniusdiagramm für den Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  enthüllt, der einem möglichen Peroxid-Intermediat zugesprochen worden ist [Karge *et al.* 97; Koike *et al.* 87; Renger und Hanssum 92]. Wir konnten einen Knickpunkt weder spektroskopisch noch polarographisch bestätigen ([Clausen *et al.* 04; Haumann *et al.* 97a] und Kapitel VII). 2. Über eine pH-abhängige Verschiebung des Gleichgewichts kann theoretisch eine Redox-Titration des letzten Schrittes der Wasserspaltung durchgeführt werden, weil dabei Protonen freigesetzt werden (siehe Schema 2). In der Praxis ist dies nicht möglich, weil bei niedrigen pH-Werten Ca und Mn aus PSII freigesetzt werden [Krieger und Weis 93; Ono und Inoue 86]. Die Verschiebung des Gleichgewichts durch niedrige pH-Werte wird also durch die vollständige Inaktivierung untrennbar überlagert. 3. Durch Arbeiten im Cryo-

Bereich werden mögliche Intermediate „eingefroren“ (stabilisiert), deren Existenz durch ESR-Messungen belegt werden könnte [Ioannidis *et al.* 02; Ioannidis und Petrouleas 02; Koulougliotis *et al.* 03]. Dies verlief bisher ebenfalls ohne Erfolg für den Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$ . Hinzu kommt, daß sich das System bei Tieftemperaturen erheblich vom nativen System unterscheidet, so daß möglicherweise artifizielle Zustände aufgelöst werden.

Direkte und reversible Messungen der extrem positiven Mittenpotentiale für die Redoxpaare  $Y_Z^{ox}/Y_Z$  und  $S_{n+1}/S_n$  im OEC sind bisher nicht möglich gewesen. Sie sind bislang nur indirekt ermittelt worden [Klimov *et al.* 79; Rappaport *et al.* 02; Rappaport und Lavergne 01; Vass und Styring 91a; Vos *et al.* 91]. Für den Übergang  $Y_Z^{ox}S_3 \Rightarrow Y_ZS_0 + O_2$  ist  $\Delta G^\circ$  mit  $-10.1$  kJ/mol ( $\approx -105$  meV) abgeschätzt worden [Renger 97; Renger 01; Vos *et al.* 91].

In diesem Kapitel wurde versucht, Intermediate unter vergleichsweise milden Bedingungen dadurch nachzuweisen, daß das Gleichgewicht des letzten Reaktionsschrittes durch Erhöhen des Sauerstoffpartialdruckes schrittweise in Richtung Edukte verschoben wird. Neben einer ersten möglichen Stabilisierung eines Intermediates sollte durch die Redox-Titration mit Sauerstoff versucht werden, das  $\Delta G$  für diesen Reaktionsschritt zu bestimmen.

## VIII.2 Ergebnisse

In Abschnitt V.5.4 und V.7 wurde gezeigt, daß die Inkubation der Kernkomplexe in Puffer mit hoher Sauerstoffkonzentration nur einen geringen Anteil dauerhaft schädigte. Dies war die Voraussetzung für die Durchführbarkeit und Interpretierbarkeit der im folgenden beschriebenen spektroskopischen Messungen.

Im Laufe der umfangreichen Versuchsreihen mit erhöhtem Sauerstoffpartialdruck fiel eine Vielzahl von Kontrollmessungen an. Um dem Leser den roten Faden zu erhalten, wurde die Essenz in den Unterkapiteln mit dreistelliger Nummerierung „VIII.2.X“ dargestellt und die ergänzenden experimentellen Details, Rechnungen und reine Kontrollmessungen wurden durch eine vierstellige, kursive Nummerierung vom Hauptteil abgetrennt.

### VIII.2.1.1 Konstruktion der optischen Meßzelle

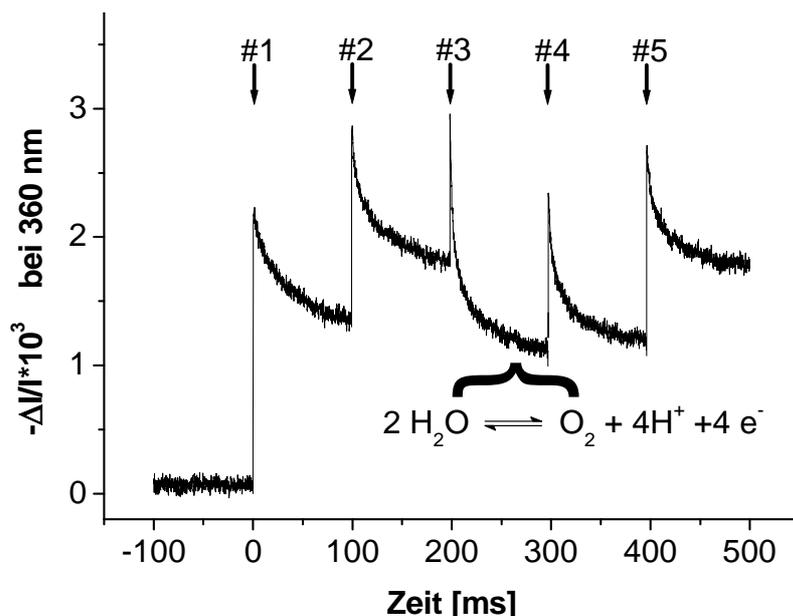
Die erste Aufgabe dieser Doktorarbeit war es, eine optische Zelle zu entwickeln, mit der spektroskopische Messungen unter erhöhtem Druck möglich waren. Es wurden Gläser mit hoher Durchlässigkeit im UV-Bereich und großer Festigkeit verwendet, die einem Druck von mindestens 30 bar standhalten konnten. Es wurde ein Injektionssystem entwickelt, mit dem die Proben und der Elektronenakzeptor unter Hochdruck in die optische Zelle injiziert werden konnten. Die Zelle wurde möglichst klein konstruiert, da der vorhandene optische Meßstand nur wenig Spielraum ließ. Es wurden kleine Ventile und Drucksensoren beschafft, welche den Druckbelastungen standhalten konnten. Des weiteren mußten geeignete Druckminderer angeschafft werden, um im relevanten Bereich möglichst fein regulieren zu können. Die Beschaffung der Einzelteile und die Konstruktion der Kammer dauerte insgesamt 2½ Jahre; verzögert durch andere, zwischenzeitlich begonnene Aufgaben (Kapitel VI und VII), lange Lieferzeiten von Spezialteilen und die Überlastung der feinmechanischen Werkstatt. Schließlich konnten die Probleme gelöst werden (Abbildung 16, Seite 46). Für das Anregungs- und Meßlicht wurden Fenster aus Saphirglas

(Fa. BIEG mbH, Elzach) verwendet. Die Transmission dieser Scheiben betrug 85% bei der relevanten Wellenlänge von 360 nm. Die ersten Drucksensoren (bis 20 bar absolut) wurden von der Firma Sensortechnics GmbH, Puchheim geliefert. Erst ab Mitte 2002 standen auf dem Markt preisgünstige Drucksensoren zur Verfügung, die äußerst kompakt waren und Drücke > 20 bar (absolut) aufnehmen konnten. Später wurden Drucksensoren der Fa. Huba Control AG, Walddorfhäslach angeschafft. Die Ventile zur Begasung der Meßzelle wurden sämtlich von der Fa. B.E.S.T. Ventil + Fitting GmbH, Hamburg geliefert (Kipphebel-, Kugelhahn- und Überstromventile). Die Injektion erfolgte über ein Drehventil der Firma Omnifit, Cambridge. Alle Drucksensoren und Ventile mußten für den Einsatz mit reinem Sauerstoff speziell gereinigt werden, da Rückstände von Ölen und Fetten unter erhöhtem O<sub>2</sub>-Druck leicht entzündlich sind. Die Kammer wurde vollständig aus nahezu unmagnetischem V2A-Stahl gefertigt, um ein Rühren in der Küvette mittels Magnetrührern zu ermöglichen.

Die Kammer hielt allen Druckbelastungen bis 30 bar stand und zeigte bisher nach einem Jahr Einsatz keine Verschleißerscheinungen. Auch mit hohen Chlorophyllkonzentrationen von bis zu 10 µM war die Transmission durch Glasscheiben und Küvette hoch genug, um ausreichend große Signale mit den verfügbaren Meßlichtintensitäten zu erhalten. Der Sauerstoffpartialdruck ließ sich auf ± 0.1 bar genau einstellen und die Injektion von Kernkomplexen und dem Elektronenakzeptor ließ sich gegen einen Druck von 30 bar problemlos durchführen.

## VIII.2.1 Unterdrückung der sauerstofffreisetzenden Reaktion durch erhöhten O<sub>2</sub>-Partialdruck

Der Einfluß von schrittweise erhöhtem Sauerstoffpartialdruck [p(O<sub>2</sub>)] auf die Oszillation der S-Zustände (vgl. Kapitel V.6, VI und VII), vor allem auf den letzten, sauerstofffreisetzenden Schritt (siehe Schema 2) wurde bei 360 nm untersucht. Die blitzinduzierten Absorptionsänderungen der S-Übergänge hatten in den ersten beiden Blitzen (Übergänge S<sub>1</sub> ⇒ S<sub>2</sub> und S<sub>2</sub> ⇒ S<sub>3</sub>) eine positive stabile Absorptionsänderung



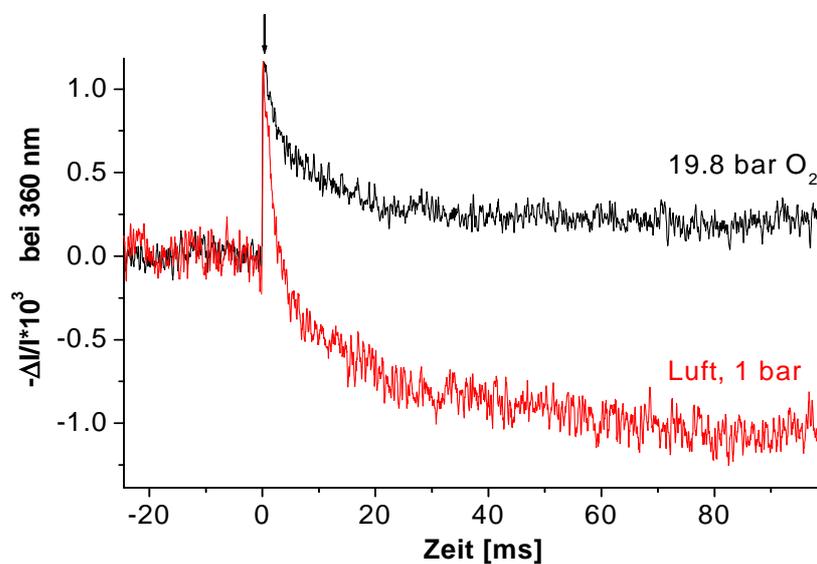
**Abbildung 55:** Blitzabhängigkeit der Absorptionsänderungen des OEC bei 360 nm. Blitzserie einer dunkel-adaptierten Probe (1 bar Luft). Die ausgeprägte negative Amplitude nach dem dritten Blitz spiegelt die Relaxation des vierfach oxidierten OEC in den Grundzustand S<sub>0</sub> wider. Die Pfeile markieren den jeweiligen Blitz. MW aus 7 Messungen, 50 µs/Punkt; geglättet über 5 Punkte. Normiert auf 8.4 µM Chl.

(Abbildung 28 und Abbildung 55). Die positiven, blitzinduzierten Absorptionsänderungen spiegeln die Oxidationen des Mn-Komplexes (und ggf. seiner Liganden, siehe III e) wider. Die ausgeprägte, negative Amplitude nach dem dritten Blitz charakterisiert die Reduktion

des OEC zum Zustand  $S_0$  und die gleichzeitige Sauerstofffreisetzung (vgl. Abschnitt V.6). Es wurde erwartet, daß ein erhöhter Sauerstoffpartialdruck das Gleichgewicht  $Y_Z^{ox}S_3 \bullet (H_2O)_2 \rightleftharpoons Y_Z S_0 + O_2 + n H^+$  zu Gunsten der Edukte verschieben würde (s.o.). Dies sollte sich in einer Verringerung des Betrags der negativen Amplitude niederschlagen. In den vorhergehenden S-Übergängen wurde keine Veränderung erwartet.

*i) Hoher Sauerstoffpartialdruck bremst den Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$*

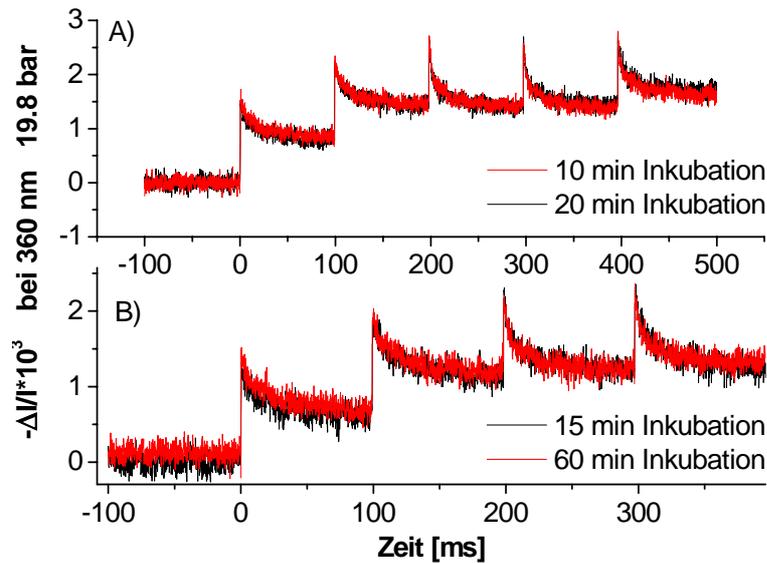
Der Anteil von Sauerstoff in normaler Luft beträgt  $\approx 21\%$  (20.95% in getrockneter Luft [Hollemann und Wiberg 85]); der normale Partialdruck ist also 0.21 bar. Ein Partialdruck von 20 bar entspricht der Verschiebung von  $\Delta G^\circ$  um ca. 11 kJ/mol  $O_2$  gegenüber luftgesättigtem Puffer. Da die Reaktionen am katalytischen Zentrum der Wasseroxidase zwischen Komponenten ablaufen, deren Redox-Mittelpotentiale sich nach bisherigen



**Abbildung 56: Hemmung von  $S_4 \rightarrow S_0$  durch erhöhten  $p(O_2)$ . Blitzinduzierte Absorptionsänderung auf den dritten Blitz. Bei 1 bar Luft war die Reduktion des OEC von  $S_3$  zu  $S_0$  zu erkennen (abfallendes Signal). Bei 19.8 bar Sauerstoff war das abfallende Signal deutlich vermindert. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt des Blitzes. Beide Kurven wurden auf die positive Amplitude normiert. 50  $\mu$ s/Punkt; über 5 Punkte geglättet. Mittelwert (MW) aus 2 (rot) bzw. 5 (schwarz) Messungen.**

Erkenntnissen nur um ca. 100 mV voneinander unterscheiden (siehe VIII.1), sollte ein Sauerstoffpartialdruck von 20 bar ausreichen, um das Gleichgewicht völlig auf die Seite der Edukte zu verschieben. Dies wurde überprüft (Abbildung 56). Es wurden ausschließlich dunkeladaptierte Proben verwendet, da nicht abzusehen war, wie sich die Kernkomplexe nach dem dritten Blitz verhielten. Es ging hier in erster Linie um die Betrachtung des Signals auf dem dritten Blitz. Deshalb wurde im Sinne einer Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses mit einer relativ geringen Zeitauflösung von 50  $\mu$ s/Punkt gemessen. Da Kinetiken mit einer Halbwertszeit ( $\tau_{1/2}$ ) zwischen 1 – 1.5 ms erwartet wurden, war dies völlig ausreichend. In Abbildung 56 wurde die Absorptionsänderung auf dem dritten Blitz bei ca. 20 bar im Vergleich zur Luftkontrolle dargestellt. Auf den Blitz folgte zuerst eine positive Absorptionsänderung, die die Reduktion von  $Q_A$  repräsentiert. Die  $Q_A$ -Reduktion verläuft so schnell ( $\tau_{1/2}$  ca. 200 ps [Rutherford 89]), daß sie mit der hier benutzten Zeitauflösung als vertikaler Sprung erscheint. Die Oxidation von  $Q_A \bullet$  durch DCBQ ist bei dieser Wellenlänge auf Grund der Ähnlichkeit der beiden Differenzspektren [Bensasson und Land 73; Bögershausen 97; Dekker *et al.* 84d] praktisch unsichtbar. Der anschließende Abfall des Signals war mehrphasig und setzt sich mindestens aus der Dismutation des Elektronenakzeptors 2,5-DCBQ [Bögershausen 97] und der Reduktion des OEC zusammen. Eine genauere Analyse des abfallenden Signals wurde in Abschnitt VII.2.2 behandelt. In der Kontrollmessung (rote Kurve) war die negative Absorptionsänderung, die aus der Reduktion von  $S_4 \rightarrow S_0$  resultierte, deutlich ausgeprägt.

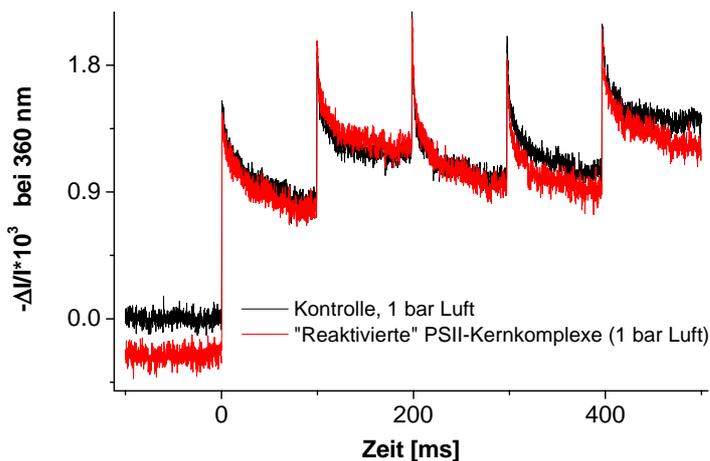
Unter 20 bar O<sub>2</sub> war die negative Amplitude deutlich vermindert (schwarze Kurve). *Der sauerstofffreisetzende Schritt wurde durch hohen Sauerstoffpartialdruck unterdrückt.*



**Abbildung 57:** Abhängigkeit der Absorptionsänderungen von der Inkubationsdauer. **A)** Die Inkubationsdauer der Kernkomplexe im Meßpuffer unter erhöhtem p(O<sub>2</sub>) hatte keinen Einfluß auf die Kinetik und die Amplituden der Signale. Dunkeladaptierte Einzelmessungen, 9,9 µM Chl; 50 µs/Punkt; über 5 Punkte geglättet. **B)** Sättigung des Puffers mit O<sub>2</sub>. Die Signale nach 15 min Pufferbegasung (ohne Chl) waren identisch zu Signalen nach einer Begasungsdauer von 60 min (ohne Chl). 9,8 µM Chl, 100 µs/Punkt; mit  $f_{3dB} = 3$  kHz leicht überfiltert.

ii) *Der Effekt des erhöhten Sauerstoffpartialdruckes auf S<sub>4</sub> → S<sub>0</sub> war reversibel*

Die Abhängigkeit der Verringerung der Amplitude von der Inkubationsdauer der Kernkomplexe im Meßpuffer unter hohem p(O<sub>2</sub>) [ca. 20 bar] wurde in mehreren Versuchsreihen untersucht. Das Ausmaß der Verringerung der negativen Amplitude im dritten Blitz war bei 10, 20 und 30 min Inkubation identisch. Zwei exemplarische Meßreihen nach 10 und 20 min Inkubation wurden in Abbildung 57 A dargestellt. *Die in Abbildung 56 sichtbare Verringerung der negativen Amplitude basierte nicht auf einer zeitabhängigen Schädigung des OEC durch die hohe Sauerstoff-Konzentration im Meßpuffer.*



**Abbildung 58:** Reversibilität der Hemmung durch 20 bar O<sub>2</sub>. PSII-Kernkomplexe wurden für 20 min bei 19,8 bar O<sub>2</sub> inkubiert und danach für 145 min entgast (rote Spur). Eine anschließende Messung des Blitzmusters war identisch zur Kontrollmessung (schwarze Spur). MW aus 5 repetierend-semidunkeladaptierten Messungen, 100 µs/Punkt (leicht überfiltert mit  $f_{3dB} = 3$  kHz). Normiert auf die positive Amplitude des dritten Blitzes der Kontrolle (8 µM Chl).

Die Zeitabhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung zwischen dem Puffer und dem Sauerstoff wurde überprüft (Abbildung 57 b). Der bereits vorinkubierte DB1-Puffer wurde für 10 bis 82 min in der Küvette unter Rühren inkubiert, bevor Chl zugegeben wurde. Die resultierenden Signale waren in allen Fällen identisch, der Puffer also bereits nach 10 min vollständig mit O<sub>2</sub> gesättigt.

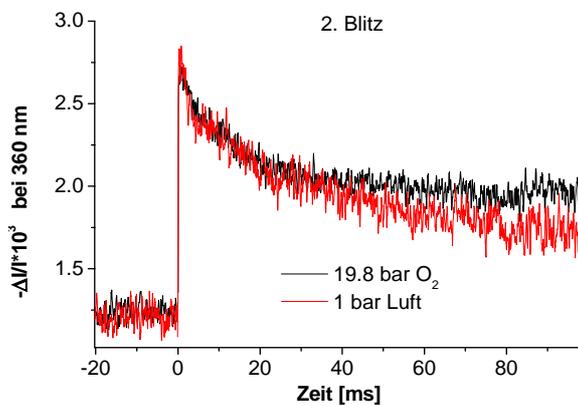
In einem weiteren Versuch wurden PSII-Kernkomplexe für 20 min unter 19,8 bar O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend, auf Eis rührend, für 145 min auf den Umgebungsdruck

(p(O<sub>2</sub>) = 0,21 bar) entspannt. Der Sauerstoff sollte also wieder aus der Probe entweichen

sein, und die „reaktivierten“ Kernkomplexe sollten sich wie unbehandelte PSII-Kernkomplexe verhalten. In Abbildung 58 wurden repetierend-semidunkeladaptierte Meßreihen mit Kontrollmessungen und reaktivierten PSII-Kernkomplexen bei 1 bar Luft abgebildet. Beide Signale waren nahezu identisch (bezüglich des ersten Blitzes siehe Seite 65). Die reaktivierten Kernkomplexe oszillierten wieder deutlich: die negative Amplitude nach dem dritten Blitz war so groß wie bei der Kontrolle (die Reduktion von  $S_3$  nach  $S_0$  lief also unverändert ab) und die positive Amplitude nach dem 5. Blitz war durch den Übergang  $S_1 \Rightarrow S_2$  deutlich vergrößert gegenüber den Blitzen #3 und #4 (vgl. Abschnitt b, Tabelle 12). Das unveränderte Signal der Reduktion von  $S_3$  zu  $S_0$  nach dem dritten Blitz wurde im folgenden Abschnitt VIII.2.2 noch einmal extra abgebildet. *Die Hemmung des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  bei 20 bar  $O_2$  war also kein Produkt einer vollständigen Zerstörung des OEC, sondern beruhte nur auf der Hemmung durch die erhöhte Sauerstoffkonzentration und war reversibel (siehe auch Abbildung 66).*

### iii) Keine Nebeneffekte des Sauerstoffpartialdruckes auf das Dunkelgleichgewicht

Die blitzinduzierten Absorptionsänderungen nach Blitz Nr. 2 waren bei der Luftkontrolle

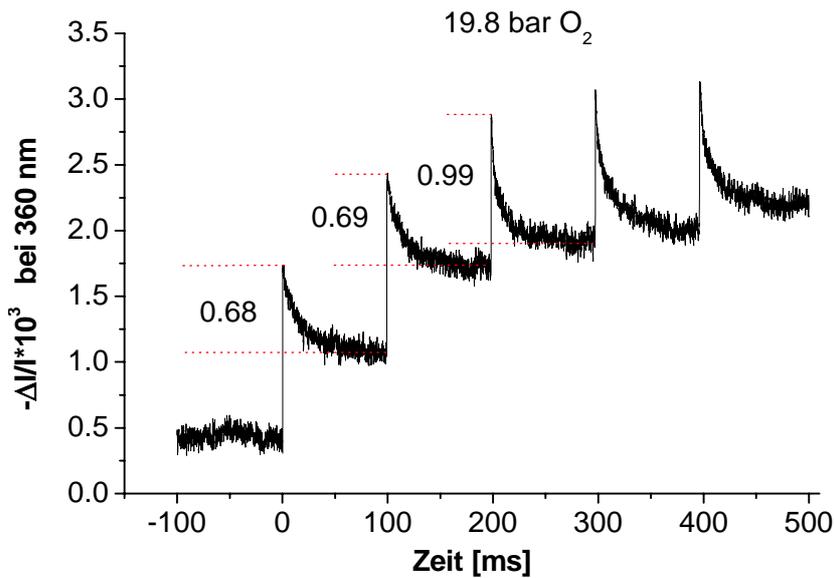


**Abbildung 59: Vergleich der blitzinduzierten Absorptionsänderung im 2. Blitz bei 1 bar Luft und 19.8 bar  $O_2$ . Die negative Amplitude war bei 19.8 bar gegenüber der Kontrollmessung nicht vergrößert. Es fand keine Voroxidation des OEC bei hohen  $O_2$ -Konzentrationen im Puffer statt. Signale normiert auf die positive Amplitude; 50  $\mu$ s/Punkt, geglättet über 5 Punkte. MW aus 2 (rot) bzw. 5 (schwarz) Messungen.**

und bei Messungen mit erhöhtem  $p(O_2)$  nahezu identisch (Abbildung 59). Die Kinetik war bei beiden Blitzen anfangs völlig gleich. Erst nach ca. 40 ms wichen die beiden Spuren durch eine der roten Spur überlagerten Drift voneinander ab. Allerdings driftete die rote Kurve (1 bar Luft) augenscheinlich linear weg. Diese Drift trat unabhängig von den Sauerstoffbedingungen gelegentlich auf. Die Amplitude des Abfalls der schwarzen Kurve (19.8 bar  $O_2$ ) war gegenüber der Luftkontrolle (rote Spur) nicht vergrößert. Damit lag nahe, daß der OEC nicht durch die hohe Sauerstoffkonzentration im Puffer schon vor dem ersten Blitz oxidiert worden war. Wäre die Verringerung der negativen Amplitude nach dem dritten Blitz allein eine Folge der Voroxidation zu  $S_2$  (und nicht einer spezifischen

Hemmung von  $S_4 \rightarrow S_0$ ) gewesen, wäre der Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  nach dem zweiten Blitz erfolgt. Als Folge hätte die negative Amplitude im zweiten Blitz bei 19.8 bar größer als bei der Luftkontrolle sein müssen. Entsprechendes galt für eine eventuelle Voroxidation zu  $S_3$  und dem Signal nach dem ersten Blitz. Da beides nicht der Fall war, war die Dunkelverteilung der S-Zustände (Abschnitt V.6 und V.7) unbeeinflusst von der Gegenwart hoher Sauerstoffkonzentrationen. *Es fand keine Voroxidation des OEC durch die erhöhte Konzentration an  $O_2$  im Puffer statt.* Das bestätigte auch der Vergleich der negativen Gesamtamplitude von Blitz Nr. 1, 2 und 3 bei 19.8 bar Sauerstoff (Abbildung 60). Sie betrug 0.68 im ersten Blitz und war unverändert im zweiten Blitz (0.69). Im dritten Blitz war sie deutlich vergrößert (0.99) durch Zentren, die zumindest noch Partialschritte des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  durchführten (z.B.  $A \rightleftharpoons B$ ; Schema 2). Die identischen negativen Gesamtamplituden im ersten und zweiten Blitz und der Unterschied zum dritten Blitz bekräftigten das Ergebnis (s.o.), daß das System im Dunkeln weder zum Zustand  $S_2$  noch

zum Zustand  $S_3$  durch die erhöhte Sauerstoffkonzentration voroxidiert worden war. Eine

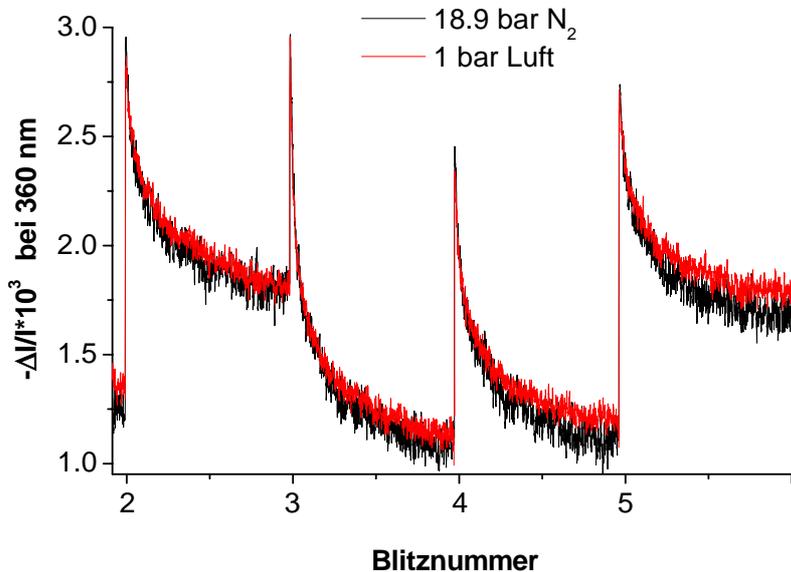


**Abbildung 60:** Blitzinduzierte Absorptionsänderungen nach Anregung durch fünf kurze Laserblitze bei 19.8 bar Sauerstoff. Die negativen Amplituden waren in den Blitzen 1 und 2 identisch und gegenüber dem dritten Blitz deutlich kleiner. Die hohe Sauerstoffkonzentration hatte keinen Einfluß auf die Dunkelverteilung der  $S$ -Zustände. Normiert auf  $8.4 \mu\text{M Chl}$ ;  $50 \mu\text{s/Punkt}$ , geglättet über 5 Punkte. MW aus 5 Messungen.

Beschreibung der folgenden Blitze (3 - 5) folgt unter Punkt v).

#### iv) Einfluß des hydrostatischen Drucks

Der Einfluß von erhöhtem hydrostatischen Druck auf die PSII-Kernkomplexe und die blitzinduzierten Absorptionsänderungen wurde überprüft. In Abbildung 61 wurde eine Blitzserie aus fünf Blitzen bei 18.9 bar  $N_2$  mit der Luftkontrolle verglichen. Beide Signale



**Abbildung 61:** Vergleich blitzinduzierter Absorptionsänderungen bei 18.9 bar  $N_2$  mit einer Meßreihe bei 1 bar Luft. Darstellung der Blitze 2 - 5. Beide Meßreihen waren nahezu identisch. Der hydrostatische Druck von  $\approx 19$  bar veränderte die Oszillationen des OEC nicht. Normiert auf  $8.4 \mu\text{M Chl}$ ;  $50 \mu\text{s/Punkt}$ , über 5 Punkte geglättet. Rot (1 bar Luft): MW aus 7 Messungen, schwarz (18.9 bar  $N_2$ ): MW aus 3 Messungen.

waren in allen Blitzen nahezu identisch. Auf Blitz Nr. 1 war die Amplitude mit 18.9 bar  $N_2$  unsignifikant größer als bei 1 bar Luft. Die Amplitudengrößen im ersten Blitz schwanken je nach Anteil geschädigter Zentren in der jeweiligen Probe (siehe Abschnitt V.6, Seite 65). Zur deutlicheren Darstellung wurden nur die Blitze 2 - 5 in Abbildung 61 dargestellt. Hydrostatischer Druck von ca. 19 bar  $N_2$  hatte keinen Einfluß auf die Oszillationen des OEC. Die Verringerung der negativen Amplitude bei 19.8 bar  $O_2$  (Abbildung 56) wurde nur durch die erhöhte Sauerstoffkonzentration verursacht, nicht durch den erhöhten Druck

per se. Zusammenfassend wurden in Abbildung 62 zum Vergleich die Transienten der Blitze Nr. 2 und 3 bei 1 bar Luft, 18.9 bar N<sub>2</sub> und 19.8 bar O<sub>2</sub> übereinanderlegt.

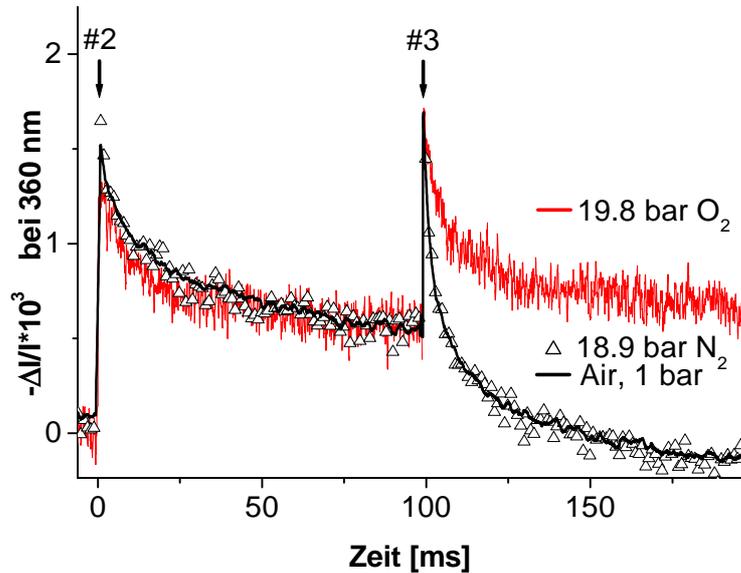


Abbildung 62: UV-Absorptions-Transienten induziert durch den zweiten und dritten Blitz bei unterschiedlichen Gasen und Drücken. Die negative Amplitude (kennzeichnend für die Freisetzung von Sauerstoff) war deutlich unterdrückt bei 19.8 bar O<sub>2</sub>, aber unverändert bei erhöhtem hydrostatischen Druck (18.9 bar N<sub>2</sub>). Normiert auf die positive Amplitude des dritten Blitzes; Zeitauflösung 50 µs/Punkt, geglättet über 5 (O<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>) und 30 Punkte (Luftkontrolle).

v) Genauere Analyse der gesamten Blitzmuster unter Berücksichtigung der durch den Sauerstoffpartialdruck irreversibel geschädigten Zentren

Um Aussagen über das Schicksal der nicht mehr sauerstoffentwickelnden Zentren nach dem dritten Blitz machen zu können, wurden Meßreihen mit fünf Blitzen aufgenommen. In Abbildung 63 wurde die vollständige Meßspur einer Kontrollmessung mit einer Meßspur unter ca. 20 bar Sauerstoff verglichen.

Tabelle 12: Größe der positiven Amplitude in den Blitzen 3 - 5 (aus Abbildung 63).

Probe	3. Blitz	4. Blitz	5. Blitz
20 bar O <sub>2</sub>	1.1 <sup>a</sup>	1.1 <sup>b</sup>	1.1 <sup>b</sup>
Kontrolle	1.1 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1.7 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> nur Q<sub>A</sub>-Reduktion; <sup>b</sup> vermutlich nur Q<sub>A</sub>-Reduktion; <sup>c</sup> Q<sub>A</sub>-Reduktion + S<sub>1</sub> ⇒ S<sub>2</sub>

Beide Meßspuren wurden auf die positive Amplitude des dritten Blitzes normiert. Die Signale unterschieden sich im ersten Blitz. Dies ist ein bekanntes Phänomen, das donatorseitig inaktivierte Zentren kennzeichnet und bereits auf Seite 65 beschrieben wurde. Die Amplitude im

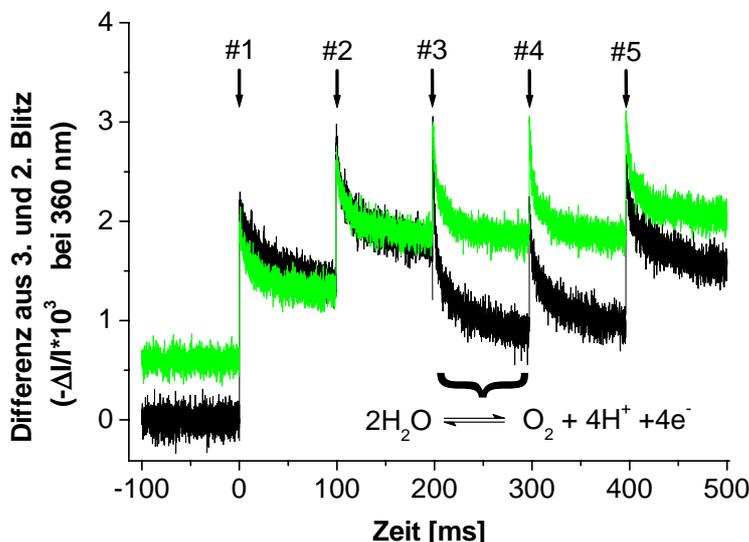


Abbildung 63: Vergleich zweier Meßreihen mit 5 Blitzen. Die Sauerstofffreisetzung ist im 3. Blitz bei 19.9 bar gehemmt (grüne Transiente). Die Blitze 4 und 5 waren nahezu identisch zum Signal auf Blitz Nr. 3. Die Kontrollmessung (schwarz) zeigte deutlich die S<sub>4</sub> → S<sub>0</sub> Reduktion im dritten Blitz und die positive Absorptionsänderung im 5. Blitz durch den Übergang S<sub>1</sub> ⇒ S<sub>2</sub>. 50 µs/Punkt. MW aus 3 Messungen. Normiert auf die positive Amplitude im dritten Blitz.

ersten Blitz war um 33% ( $\sigma_{n-1} = 10\%$ ,  $n = 4$ ) verringert gegenüber den Kontrollmessungen. Im zweiten Blitz waren die Signale nahezu identisch und im dritten Blitz war die oben bereits angesprochene Verringerung der negativen Amplitude bei den Sauerstoffproben zu sehen. Die positive Amplitude im dritten Blitz spiegelte die Reduktion von  $Q_A$  bzw. DCBQ wieder (s.o.). Genauso verhielt es sich im vierten Blitz; denn der S-Übergang  $S_0 \Rightarrow S_1$ , der in der Kontrollprobe zweifellos durchlaufen wurde, hat bei 360 nm kein Differenzsignal [Lavergne 91] (siehe Anhang XI.8). Die positive Amplitude im vierten Blitz sollte also in der Kontrolle und der  $O_2$ -Probe gleich groß sein. Das wurde bestätigt (Tabelle 12). Im fünften Blitz durchlief die Kontrollprobe den S-Übergang  $S_1 \Rightarrow S_2$ , was zu einer positiven Absorptionsänderung führte. Die Sauerstoffprobe sollte nach den bisherigen Ergebnissen im fünften Blitz nicht im Zustand  $S_1$  vorliegen, sondern in  $S_3$  oder einem Folgeprodukt (siehe VIII.3.3) gestoppt sein. Es wurde also bei der Sauerstoffprobe wieder nur das Signal aus der  $Q_A$ -Reduktion erwartet. Die erwarteten Signale im fünften Blitz für die Kontrolle und die  $O_2$ -Messung wurden bestätigt (Tabelle 12): Die positive Amplitude bei der Kontrolle war durch den positiven Hub von  $S_1 \Rightarrow S_2$  deutlich vergrößert gegenüber den Blitzen 3 und 4. Bei der Sauerstoffprobe war die Amplitude in den Blitzen 3 bis 5 unverändert und auch identisch zu den positiven Amplituden der Kontrolle in Blitz 3 und 4, die nur die  $Q_A$ -Reduktion anzeigten.

Die Gesamtamplituden der abfallenden Signale aus Abbildung 63 wurden in Tabelle 13 eingetragen. Die negative Amplitude in der Kontrolle war, wie erwartet, viel größer als in der Sauerstoffprobe. In den Blitzen 4 und 5 hatte sie wieder ungefähr das Ausmaß wie im zweiten Blitz. In der durch Sauerstoff gehemmten Probe war die Tendenz in den Blitzen 4 und 5 anders. Die negative Amplitude in Blitz Nr. 4 war deutlich größer als in den Blitzen 1 und 2. Tendenziell war dies auch in Blitz Nr. 5 zu beobachten. Die in den Blitzen 4 und 5 leicht erhöhten negativen Amplituden könnten Zentren darstellen, die in Blitz Nr. 3 durch den hohen  $p(O_2)$  in  $S_3$  stehen geblieben waren, und dann „verspätet“ in den Blitzen 4 und 5 den Übergang  $A \rightleftharpoons B$  durchführten (vgl. Schema 2, Abschnitt VIII.3.3.1).

*Die Auswertung der positiven Amplituden in den Blitzen 3 –5 und der negativen Gesamtamplituden der Blitze 1 - 5 untermauerte den vorherigen Schluß, daß eine hohe Sauerstoffkonzentration die Progression des OEC über den  $S_3$ -Zustand hinaus verhinderte.*

**Tabelle 13: Blitzabhängigkeit der Gesamtamplituden der abfallenden Signale bei 360 nm**

Probe	1. Blitz	2. Blitz	3. Blitz	4. Blitz	5. Blitz
1 bar Luft	0.7	1	2.1	1.1	1
19.9 bar $O_2$	0.7	0.9	1.2	1.2	1

### VIII.2.1.2 Bestimmung der Sauerstoffkonzentration und des pH im Meßpuffer

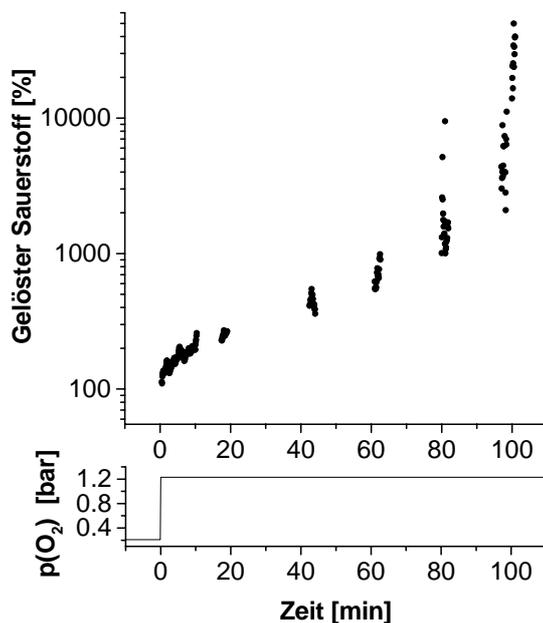
In den oben beschriebenen Versuchen wurde der Sauerstoffpartialdruck über der Probenlösung gemessen und angenommen (und auch gezeigt, vgl. Abbildung 57), daß sich in der Lösung ein Gleichgewicht mit dem Gasvolumen einstellte.

Es wurde nach einem Weg gesucht, die Konzentration des im Meßpuffer gelösten Sauerstoffs zu bestimmen. Damit sollte direkt ermittelt werden, wie lange die Lösung dem erhöhten  $p(O_2)$  ausgesetzt werden mußte, bis gelöster und gasförmiger Sauerstoff im Gleichgewicht standen. Eine Nachfrage beim Hersteller für Einstab-Meßketten Mettler-Toledo, Gießen ergab, daß die vertriebenen  $O_2$ -Sensoren nur bis 1 bar Sauerstoff linear sind und damit ungeeignet waren. Die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration mit Hilfe einer herkömmlichen Clark-Elektrode warf gleich mehrere Probleme auf. Der Puffer

wurde zunächst in einer extra Kammer unter  $O_2$ -Druck vorinkubiert. Zur Messung wurde die Kammer geöffnet und eine kleine Probe des  $O_2$ -gesättigten Puffers entnommen. Hierbei kam es zum Verlust von Sauerstoff, was anhand der Gasbildung in der Pipette verfolgt werden konnte. Hinzu kam der Verlust an Sauerstoff allein beim Öffnen der Druckkammer. Außerdem war nicht zu erwarten, daß die Clark-Sauerstoffelektrode bei hohen Konzentrationen von  $O_2$  noch linear arbeitete. Genauere Angaben hierzu konnten aus der vorhandenen Literatur nicht entnommen werden. Schlußendlich war die Probenkammer der Clark-Elektrode nicht gasdicht abgeschlossen, so daß, begünstigt durch das notwendige Rühren, der Sauerstoff leicht aus der übersättigten Lösung verschwinden konnte. Dieses System war also ebenfalls ungeeignet, um die absolute Menge an gelöstem  $O_2$  zu bestimmen.

Eine relative neue Entwicklung auf dem Markt zur Bestimmung von Sauerstoffkonzentrationen ist die Messung mit faseroptischen Sensoren, sog. „Optoden“ [Dremel *et al.* 91; Koneke *et al.* 98; Lubbers und Opitz 75]. Eine Sonde mit eingelagertem Fluoreszenzfarbstoff taucht in die zu messende Lösung ein. Blaues Licht regt den Farbstoff zur Fluoreszenz an. Die Anwesenheit der fluoreszenzlöschenden Sauerstoffmoleküle verringert die Fluoreszenzintensität, welche über einen Lichtleiter von einem Photodetektor aufgenommen und mittels integrierem Mikrocomputer in die entsprechende Sauerstoffkonzentration umgerechnet wird. Neben der Löschung (*Quenching*) der Fluoreszenzintensität ist auch die Fluoreszenz-Abklingzeit proportional zur Sauerstoffkonzentration. Ein großer Vorteil dieser Bestimmungsmethode ist, daß die zu messende Substanz (Sauerstoff) nicht verbraucht wird.

In Zusammenarbeit mit der Firma Comte (Comte GmbH, Hannover) wurde versucht, eine



**Abbildung 64: Instabilität der Optode. Gemessene Sauerstoffkonzentration bei einem  $O_2$ -Druck über der Lösung von 1.2 bar. Man beachte die logarithmische Skala auf der Ordinate und die enorme Streuung der Meßwerte**

Druckkammer mit integriertem faseroptischen Sensor zu entwickeln, mit der auch ohne weiteres Umfüllen die Konzentration von  $O_2$  im Puffer bei hohen Sauerstoffdrücken bestimmt werden konnte. Nach einiger Entwicklungszeit mußte allerdings festgestellt werden, daß die Optode nicht in der Lage war, die Signale bei erhöhten Sauerstoffdrücken aufzunehmen. In Abbildung 64 wurden die ausgegebenen Meßwerte bei längeren Meßzeiten abgebildet. Die Sauerstoffkonzentration im Puffer bei einem Druck von 1.2 bar  $O_2$  wurde von der Optode gemessen. Erwartet wurde ein Meßwert von ca. 600% (100% = 0.21 bar). Aber bereits nach wenigen Minuten Exposition waren die Meßwerte extrem instabil. Als Beispiel sei eine Folge von Meßwerten nach 108 min Exposition genannt (5 Messungen / min): 0.0059%, 53731%, 10617%, 46257%. Auch die absoluten Meßwerte der Kalibrierungsmessungen waren nach kurzer Zeit nicht mehr

reproduzierbar, weil die Matrix, in der die Fluoreszenzfarbstoffe eingelagert waren [Koneke *et al.* 98], durch den hohen Druck geschädigt worden war. Daneben erschwerten

zahlreiche, z.T. erhebliche Fehler in der Software die Arbeit mit der Optode unter erhöhtem Sauerstoffdruck. Auf Grund dieser Ergebnisse, der fehlenden Aussicht auf Behebung der Probleme in naher Zukunft und der sich dem Ende nähernden Zeit dieser Doktorarbeit, wurden die Arbeiten mit der Optode eingestellt.

Allein die Sauerstoffkonzentration im Meßpuffer DB1 bei 1 bar Luft (50 mM MES [pH 6.6], 1 M Saccharose, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 1 M Glycin-Betain) konnte im Vergleich zu derjenigen in destilliertem, luftgesättigtem Wasser ohne Probleme gemessen werden. Im Rahmen der Meßgenauigkeit dieses Systems (ca. 5%) war die Konzentration in destilliertem, luftgesättigtem Wasser und Puffer DB1 identisch (285-287 mM bei 20 °C, siehe IV.12).

Der Einfluß des erhöhten Sauerstoffdruckes auf den pH-Wert in der Probe wurde ebenfalls untersucht. Puffer DB1 wurde mit pH 6.7 für 45 min bei 19.9 bar O<sub>2</sub> in der Küvette gerührt. Anschließend wurde die Druckkammer geöffnet und der pH bestimmt. Nach der O<sub>2</sub>-Inkubation war der pH unverändert bei pH 6.7. Demnach war die Pufferung des Systems ausreichend (50 mM MES) und die beobachteten Effekte kein Resultat einer pH-Änderung.

## VIII.2.2 Redox Titration des Überganges S<sub>4</sub> → S<sub>0</sub>

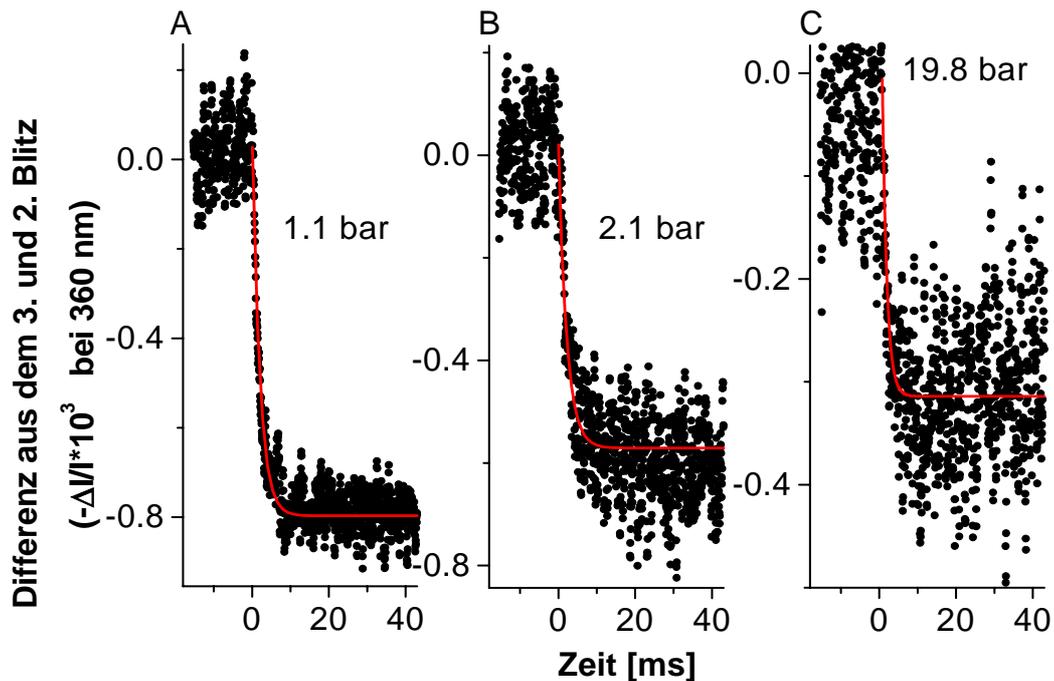
Tabelle 14: Amplitude der Reduktion von S<sub>3</sub> nach S<sub>0</sub> in Abhängigkeit vom p(O<sub>2</sub>)

p(O <sub>2</sub> ) [bar]	ΔX in %	Anzahl der Präparationen	Anzahl der Messungen	σ <sub>n-1</sub>
0.001178 (18.9 bar N <sub>2</sub> )	100	2	4	
0.21 (Luft)	100	6	21	
0.21 (Luft) <sup>a</sup>	100	1	2	
1.1	77.9	2	6	
2.1	59.4	1	2	
3	49	1	3	
5	33.6	1	2	
7	54.5	1	3	
10.1	26.7	1	2	
13	26.1	1	3	
14.9	18	1	2	
19.8	30.9	6	17	12.3
28	29.1	1	3	
pH 5.7 + Luft	64.4	3	12	3.3
pH 5.7 + 20.1 bar Sauerstoff	19.2	1	1	

<sup>a</sup> „reaktivierte“ PSII-Kernkomplexe (siehe VIII.2.1, Abbildung 58. und Abbildung 66)

Wie in Abbildung 56 gezeigt wurde, konnte der Übergang S<sub>4</sub> → S<sub>0</sub> durch hohe Sauerstoffkonzentrationen gehemmt werden. Die Hemmung war reversibel (Abbildung 66). Der Grad der Hemmung in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck wurde untersucht, um das ΔG<sup>o</sup> für diesen Schritt zu ermitteln. Die blitzinduzierten Absorptionsänderungen im dritten Blitz wurden mit dunkeladaptierten Proben mit Sauerstoffpartialdrücken von 1.1, 2.1, 3, 5, 7, 10, 13, 14.9, 19.8 und 28 bar gemessen. Zum

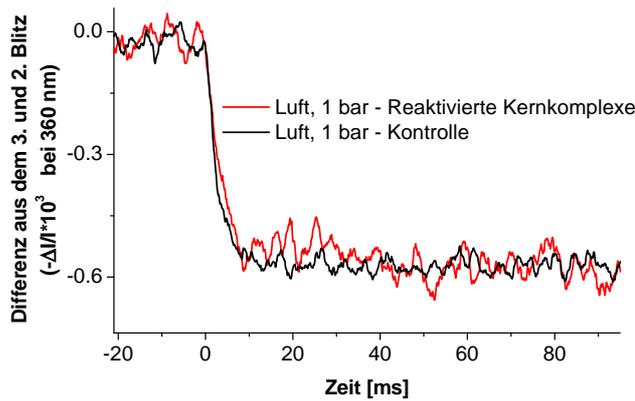
Vergleich wurden Messungen mit 18.9 bar N<sub>2</sub> und bei 1 bar Luft durchgeführt. Diese Messungen waren sehr materialaufwendig, und es mußten mehrere Präparationen verwendet werden. Mit jeder Präparation wurden mindestens zwei Messungen mit erhöhtem p(O<sub>2</sub>) und zwei Luftkontrollen (zur Kalibrierung) durchgeführt. Die Meßergebnisse wurden normiert und die Amplitude ( $\Delta X$ ) der Reaktion S<sub>4</sub> → S<sub>0</sub> ausgewertet (siehe VIII.2.2.1). Die Ergebnisse wurden in Tabelle 14 zusammengefaßt. Das abfallende Differenzsignal ( $\Delta X$ ) bei drei verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken wurde in Abbildung 65 dargestellt. Eine monoexponentielle Anpassung ergab eine



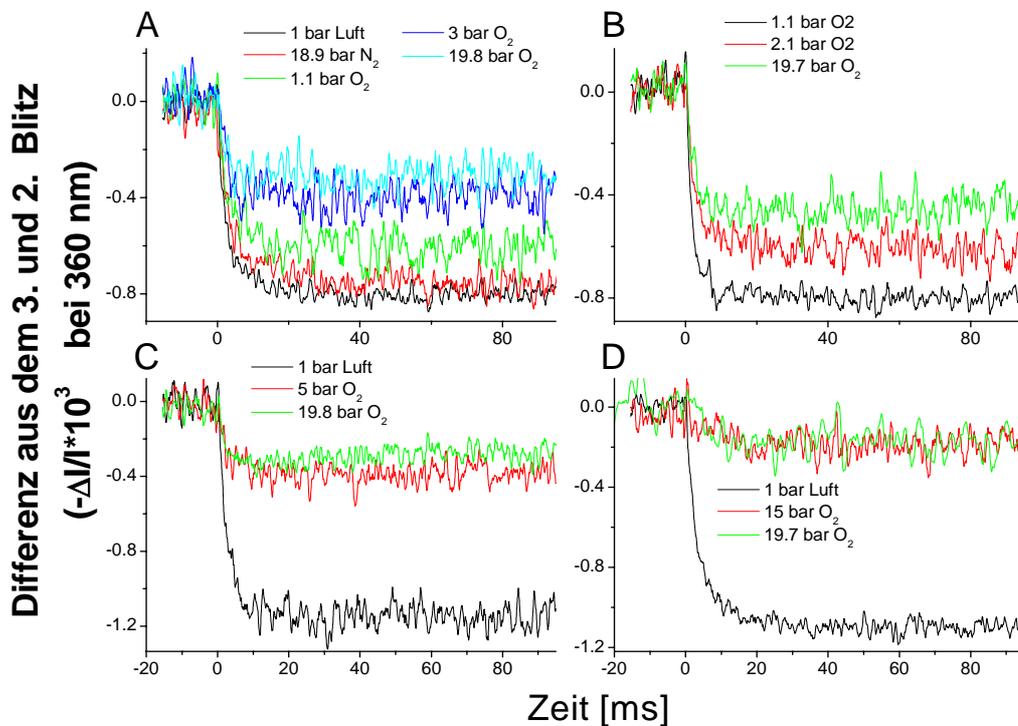
**Abbildung 65:** Halbwertszeiten der Reduktion von S<sub>3</sub>. Differenz aus dem 3. und 2. Blitz. Das abfallende Signal wurde monoexponentiell angepaßt (rote Linie). A) 1.1 bar O<sub>2</sub>,  $\tau_{1/2} = 1.4$  ms. MW aus 3 Messungen. B) 2.1 bar O<sub>2</sub>,  $\tau_{1/2} = 1.5 \pm 0.2$  ms. MW aus 2 Messungen. C) 19.8 bar O<sub>2</sub>,  $\tau_{1/2} = 0.8 \pm 0.2$  ms. Mittelwert aus 5 Messungen. 50  $\mu$ s/Punkt, über 5 Punkte geglättet. Differenzbildung erfolgte wie unter VIII.2.2.1 beschrieben.

Halbwertszeit von 1.4 ms bei 1.1 bar O<sub>2</sub> (Abbildung 65 A),  $1.5 \pm 0.2$  ms bei 2.1 bar (Abbildung 65 B) und  $0.8 \pm 0.2$  ms bei 19.8 bar O<sub>2</sub> (Abbildung 65 C). Die Verringerung der Halbwertszeit war im Einklang mit den Simulationen zum Zerfall von A (VIII.3.3). Bei den übrigen, in Tabelle 14 aufgeführten Sauerstoffpartialdrücken ergaben die monoexponentiellen Anpassungen ebenfalls Halbwertszeiten mit abnehmender Dauer bei zunehmendem Sauerstoffpartialdruck (Daten nicht dargestellt).

Exemplarische Differenzsignale (siehe Abbildung 69 C) mit verschiedenen Präparationen für den Übergang S<sub>4</sub> → S<sub>0</sub> wurden in Abbildung 66 und Abbildung 67 abgebildet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden alle Meßspuren über 20 Punkte geglättet. Die in einem Bild dargestellten Messungen wurden jeweils mit derselben Präparation durchgeführt.



**Abbildung 66: Vollständige Reversibilität der Unterdrückung von  $S_4 \rightarrow S_0$ . Nach 20 min Inkubation bei 19.8 bar  $O_2$  und 33 min Entgasen war die negative Amplitude der reaktivierten Kernkomplexe (rot) wieder so groß wie bei der unbehandelten Kontrollmessung (schwarz). MW aus 2 (rot) bzw. 4 (schwarz) dunkeladaptierten Messungen. 100  $\mu s$ /Punkt,  $f_{3dB} = 3$  kHz), geglättet über 20 Punkte.**



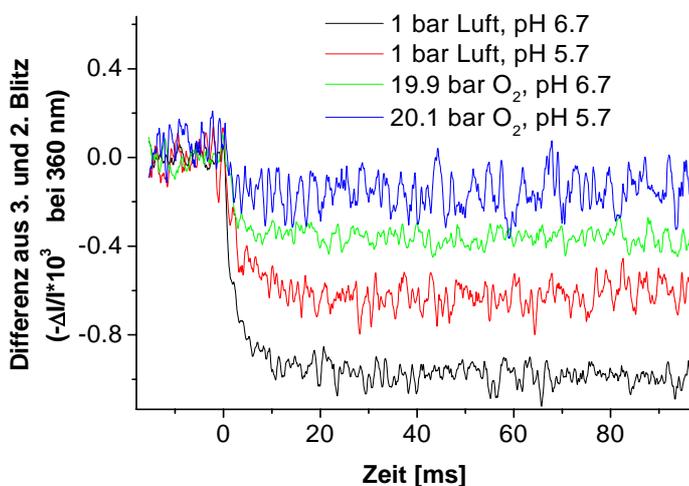
**Abbildung 67: Unterdrückung von  $S_4 \rightarrow S_0$  in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck. Korrigierte (siehe VIII.2.2.1) UV-Absorptions-Änderungen nach dem dritten Blitz. 50  $\mu s$ /Punkt, geglättet über 20 Punkte. MW aus 2 bis 7 Messungen. Jedes Bild (A - D) zeigt Messungen mit einer anderen Präparation.**

*i) pH-Abhängigkeit des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0 + O_2 + n H^+$*

Die Abhängigkeit der Amplitude ( $\Delta X$ ; siehe VIII.2.2.1) des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  vom pH-Wert wurde überprüft (Abbildung 68). Wie in der Einleitung bereits beschrieben (VIII.1, Seite 107), schädigt ein niedriger pH-Wert die PSII-Kernkomplexe z.T. irreversibel (ca. 30%, Abschnitt V.5.4).

Bei einer zehnfach höheren Protonenkonzentration ( $\Delta$  ca. 60 mV) sank die Amplitudendifferenz  $\Delta X$  von 100% (schwarze Kurve, pH 6.7) auf durchschnittlich 64.4% (rote Kurve) bei pH 5.7 ab (siehe Tabelle 14). Eine zehnfach höhere Protonenkonzentration entsprach damit im Grad der Verringerung von  $\Delta X$  ungefähr einer zehnfachen Erhöhung des  $p(O_2)$  [ $\Delta X = 59.4$  bei 2.1 bar  $O_2$ ; siehe Abbildung 71 und Tabelle 14]. Eine Messung mit PSII-Kernkomplexen bei 20 bar  $O_2$  und pH 5.7 (blaue Kurve) senkte  $\Delta X$  noch unter das Niveau, das allein mit 20 bar  $O_2$  erreicht wurde (grüne Kurve), auf 19.2%.

Dieser Befund bedeutet, daß im letzten, sauerstofffreisetzenden Reaktionsschritt eine  $H^+/O_2$ -Stöchiometrie von 1 vorliegt. Dieser Punkt wird später ausführlicher diskutiert (Abschnitt VIII.3.3).



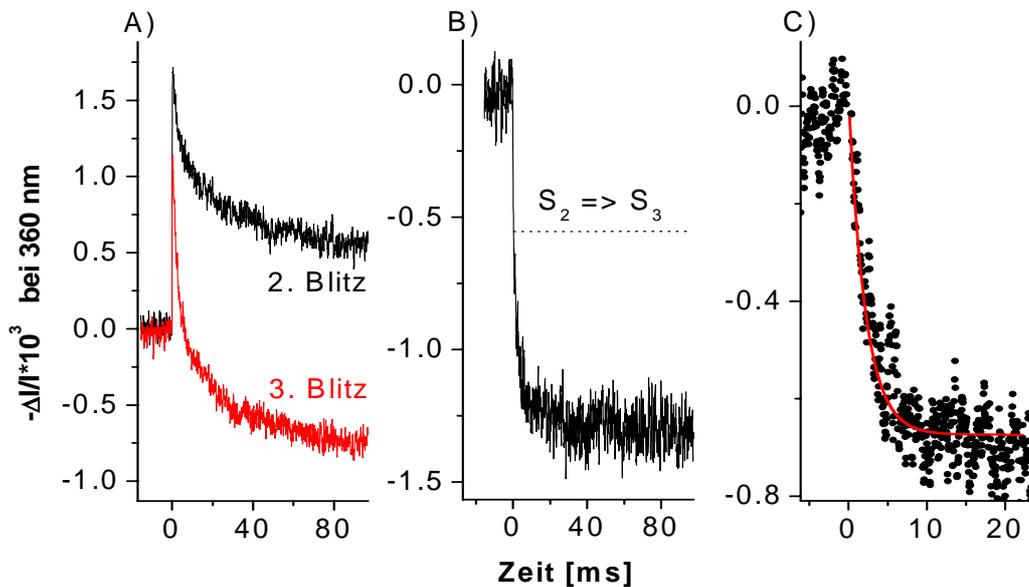
**Abbildung 68:**

**Unterdrückung von  $S_4 \rightarrow S_0$  in Abhängigkeit vom pH. Korrigierte (siehe VIII.2.2.1) UV-Absorptions-Änderungen nach dem dritten Blitz. 50  $\mu s$ /Punkt, geglättet über 20 Punkte. MW aus drei Messungen (schwarz, rot und grün) bzw. einer Messung (blau). Ein  $\Delta pH$  von 1 verringerte  $\Delta X$  ungefähr im selbem Maße wie ein zehnfach erhöhter  $p(O_2)$ .**

### VIII.2.2.1 Normierung und Auswertung der Signale

Der Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  war gekennzeichnet durch die ausgeprägte, negative Amplitude, die im dritten Blitz zu sehen war. Die absolute Größe dieser negativen Amplitude schwankte abhängig von der verwendeten Präparation. Außerdem wurde bereits gezeigt, daß ein gewisser Anteil ( $< 30\%$ ) an Kernkomplexen durch die Sauerstoffbehandlung irreversibel geschädigt wurde (V.5.4). Aus diesem Grund lieferten Luftkontrollmessungen und Sauerstoffmessungen derselben Präparation und derselben eingesetzten Chl-Konzentration unterschiedlich große Amplituden. Um vergleichbare Ergebnisse zu bekommen, wurden die Meßspuren aller Präparationen auf die positive Amplitude des dritten Blitzes einer Kontrollmessung mit  $8.4 \mu M$  Chl normiert. Diese Amplitude repräsentiert fast ausschließlich die Reduktion von  $Q_A$ . Als Folge der Normierung hatte die durch die DCBQ-Dismutation hervorgerufene (siehe Abschnitt VII.2.1), negative Amplitude dieselbe Größe in Kontroll- und Sauerstoffmessungen. Die einzigen Unterschiede in der negativen Amplitude des dritten Blitzes resultierten dann aus dem unterschiedlichen Anteil von Zentren, die von  $S_3$  nach  $S_0$  reduziert wurden.

Um ein reines Signal für den Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  zu erhalten, wurde die Differenz aus dem

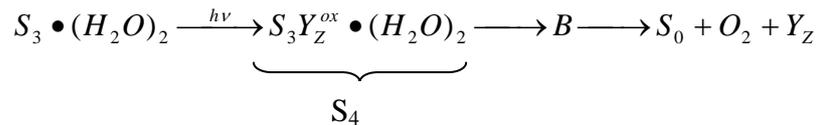


**Abbildung 69:** Auswertung der Signale. A) Vergleich der Signale auf dem 2. (schwarz) und 3. (rot) Blitz. B) Differenz aus dem 3. und 2. Blitz. Die gestrichelte Linie markiert den Sprung ( $\Delta = 0.54$ ) durch den Übergang  $S_2 \Rightarrow S_3$  (siehe Text). C) Abzug der Amplitude durch  $S_2 \Rightarrow S_3$  vom Gesamtsignal lieferte das reine Signal ( $\Delta X$ ) für den Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  mit  $\tau_{1/2} = 1.5$  ms.  $50 \mu\text{s}/\text{Punkt}$ , geglättet über 5 Punkte; normiert auf  $8.4 \mu\text{M}$  Chl. MW aus 3 Messungen, 1 bar Luft.

dritten und zweiten Blitz gebildet, so daß das DCBQ-Signal subtrahiert wurde. In (Abbildung 69 A) wurden der zweite und dritte Blitz einer Meßreihe nach der Normierung abgebildet (Messung bei 18.9 bar  $\text{N}_2$ ). Im zweiten Blitz setzte sich die positive Gesamtamplitude aus der Reduktion von  $Q_A$  und dem Übergang  $S_2 \Rightarrow S_3$  zusammen (vgl. Abbildung 28). Im dritten Blitz resultierte die positive Gesamtamplitude fast ausschließlich aus der  $Q_A$ -Reduktion, weshalb sie deutlich kleiner war. Nach der Subtraktion (Abbildung 69 B) blieb der Übergang  $S_2 \Rightarrow S_3$  als Sprung sichtbar (von 0 bis zur gestrichelten Linie). In Abbildung 69 B betrug die Gesamtamplitude 1.31 und die Amplitude des Sprungs 0.54. Die Differenz ( $\Delta X$ ) hieraus von 0.77 stellte die Amplitude für den Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  dar (Abbildung 69 C). Eine einfach exponentielle Anpassung (rote Linie) des Differenzsignals (Abbildung 69 C) ergab eine Halbwertszeit von 1.5 ms ( $\pm 0.1$ ) bei atmosphärischem  $p(\text{O}_2)$ . Die Messung bei 18.9 bar  $\text{N}_2$  entsprach einem  $p(\text{O}_2)$  von max. 0.001 bar (siehe Anhang XI.5).  $\Delta X$  war bei 18.9 bar  $\text{N}_2$  und 1 bar Luft gleich groß. **Bei jeder Präparation wurde deshalb die Luftkontrolle gemessen, das  $\Delta X$  bestimmt und gleich 100% gesetzt. Die relativen, tabellierten  $\Delta X$ -Werte (Tabelle 14) errechnete sich dann als prozentualer Anteil der verbleibenden negativen Amplitude  $\Delta X$  bei  $p$  bar  $p(\text{O}_2)$  von der maximalen negativen Amplitude  $\Delta X$  der jeweiligen Luftkontrolle.**

### VIII.2.3 Auswertung der Titration mit Sauerstoff

Bei der Beschreibung der S-Übergänge gilt folgende Konvention, beginnend mit dem *OEC* unmittelbar vor dem dritten Blitz:



**Die Quadrate (1 - ΔX) in Abbildung 70 bis Abbildung 72 errechneten sich aus den in der Tabelle 14 zusammengefaßten Meßwerte (ΔX). Die vollständige Relaxation wurde aus der Amplitude von ΔX bei 18.9 bar N<sub>2</sub> bzw. 1 bar Luft [= 0.21 bar p(O<sub>2</sub>)] ermittelt und als 100% definiert.**

Die Interpretation dieser Meßwerte muß sich notwendigerweise auf Annahmen über den Reaktionsmechanismus und die spektroskopischen Eigenschaften der Intermediate stützen. Im folgenden wurden drei verschiedene Typen von Annahmen auf ihre Verträglichkeit mit den Meßdaten geprüft. Ein wesentlicher Nachteil der Beobachtung im nahen UV ist die geringe Signatur der hier beteiligten Komponenten (Mn<sub>4</sub>Ca, Y<sub>Z</sub>). Durch Auswahl der Wellenlänge (360 nm) wurde der Blick auf Mn<sub>4</sub>Ca eingengt. Trotzdem konnten die erwarteten Oxidationszustände A, B und C (Schema 3 und Schema 4) nicht getrennt aufgelöst werden, sondern trugen zusammen zur Absorptionsänderung der korrigierten UV-Transienten bei. Für die Auswertung der Ergebnisse der Redox Titration wurden drei verschiedene Ansätze durchgeführt, die in den Punkten *i* - *iii* erläutert sind.

*i) Reaktionsschema A ⇌ B ⇌ C; nur A absorbiert bei 360 nm*

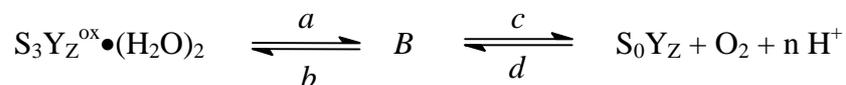
Betrachtet wird das Reaktionsschema:



**Schema 3**

A ist das erste Produkt des katalytischen Zentrums nach dem dritten Blitz und nach der Reduktion des primären Donators P<sub>680</sub>, B das einzige Zwischenprodukt und C der Endzustand.

Eine mögliche Zuweisung wäre:



Das Intermediat B wird hier nicht näher definiert. Von Bedeutung ist hier nur, daß es nicht zur Absorption beiträgt. Das gesamte ΔX (Tabelle 14) resultierte in diesem Fall aus der Konzentrationsabnahme von A [= S<sub>3</sub>Y<sub>Z</sub><sup>ox</sup>•(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]. Der sich nach vollständiger Relaxation ergebende Anteil nicht umgesetzter Zentren, A<sub>∞</sub>, ergibt sich aus den Anfangsbedingungen unmittelbar nach dem dritten Blitz: A<sub>0</sub> = 1 und B<sub>0</sub> = C<sub>0</sub> = 0, sowie die Bilanzgleichung A<sub>∞</sub> + B<sub>∞</sub> + C<sub>∞</sub> = 1.

Durch Einsetzen und Umformen [siehe Anhang XI.6 *i*)] folgt daraus für A<sub>∞</sub>:

$$A_{\infty} = \frac{1}{1 + \frac{a}{b} + \frac{c}{d * p} * \frac{a}{b}}$$

Gleichung 4

wobei  $a - d$  die Ratenkonstanten und  $p$  den Sauerstoffpartialdruck bezeichnen.

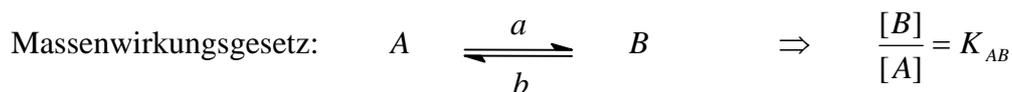
Alle Reaktionen sind von pseudo-erster Ordnung mit Ausnahme der letzten Rückreaktion (2. Ordnung, Ratenkonstante  $d$ ).  $p$  ist der Sauerstoffpartialdruck. Die Reaktionen von  $S_n$  und  $Y_Z$  sind Festkörperreaktionen und Wasser ist sowohl Lösungsmittel als auch Reaktand. Die einzigen gelösten Reaktionspartner sind Sauerstoff und Protonen. Dabei wurden Protonen zur Vereinfachung nicht berücksichtigt. Das Gleichgewicht zwischen dem Intermediat  $B$  und dem voll relaxierten Zustand  $C$  wurde durch Variation des Sauerstoffpartialdruckes verschoben.

Die rechnerische Anpassung (rote Kurve) der Daten nach Gleichung 4 wurde in Abbildung 70 dargestellt. Die Standardabweichung der Ergebnisse für Messungen mit  $\approx 20$  bar  $O_2$  wurde als Fehlerbalken mit eingetragen. Für das Verhältnis  $a/b$  ergab sich ein Wert von **0.2** und für  $c/d$  von **13.6 bar**. Bei  $p \rightarrow \infty$  geht  $A_{\infty}$  gegen 0.83 (gestrichelte Linie in Abbildung 70); der halbmaximale Anteil von  $A_{\infty}$  betrug 0.42. *Eingesetzt in Gleichung 4 ergab dies eine halbmaximale Hemmung des Zerfalls von A bei 2.31 bar*. Nach diesem Model lagen ca. 80% der Zentren nach dem dritten Blitz weiterhin im Zustand  $S_3$  vor. *15 % des Intermediates konnten durch den hohen Sauerstoffpartialdruck stabilisiert werden (siehe VIII.3.3).*

Die Restamplitude bei einem pH von 5.7 (grüner Punkt) wurde ebenfalls in Abbildung 70 dargestellt. Bei pH 5.7 lag  $A_{\infty}$  bei 0.36 und entsprach damit nach Gleichung 4 einem  $p(O_2)$  von 1.72 bar. Für pH 5.7 und 20 bar  $O_2$  entsprach  $A_{\infty}$  einem  $p(O_2)$  von 68 bar.

Mit den ermittelten Verhältnissen von  $a/b$  ließ sich die freie Enthalpie der Reaktionsschritte berechnen. Es galt  $\Delta G^{\circ\prime} = -RT * \ln K$  (unter angenäherten Standardbedingungen: 1 bar  $O_2$ , 20 °C und pH 6.7).

Ermittlung von  $\Delta G^{\circ\prime}$ :



$$\text{und } \frac{[B]}{[A]} = \frac{a}{b}$$

Mit  $K_{AB} = a/b = 0.2$  folgt:

$$\Delta G_{A \rightarrow B}^{\circ\prime} = -2.3RT * \log K_{AB} = -5.6 \text{ kJ / mol} * \log 0.2 = 3.9 \text{ kJ / mol}$$

und für  $\Delta G_{B \rightarrow C}^{\circ\prime}$ :



Nach Gleichung VI [Anhang XI.6 i)] gilt:  $K_{BC} = \frac{c}{d * x}$

$c/d = 13.6$  bar. Daraus folgt bei  $p = 1$  bar:

$$\Delta G_{B \rightarrow C}^{\circ} = -2.3RT * \log K_{BC} = -5.6 \text{ kJ/mol} * \log 13.6 = -6.3 \text{ kJ/mol}$$

Für Normalluftdruck [ $p(\text{O}_2) = 0.21$  bar,  $20^\circ\text{C}$  und  $\text{pH } 6.7$ ]:

$\Delta G_{A \rightarrow B}$  bleibt gleich  $3.9 \text{ kJ/mol}$ , da es sich um eine reine Festkörper-Reaktion handelt.

$$\Delta G_{B \rightarrow C} = -2.3RT * \log 64.8 = -10.2 \text{ kJ/mol}$$

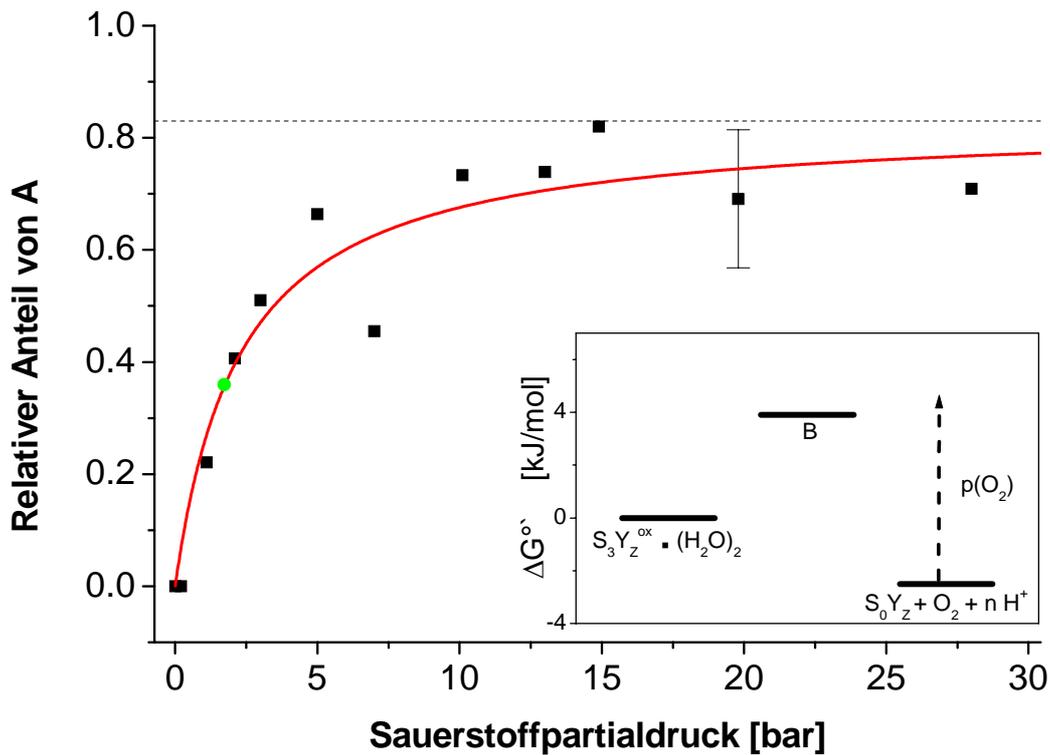


Abbildung 70: Korrigierte (VIII.2.2.1) Absorptionsänderungen ( $A_\infty = 1 - \Delta X$ ) als Funktion des Sauerstoffpartialdrucks. Alle Meßpunkte (schwarze Quadrate) bei  $\text{pH } 6.7$ , außer einem (grüner Punkt) bei  $\text{pH } 5.7$  und 1 bar Luft.  $a/b = 0.2$ ;  $c/d = 13.6$  bar (siehe Text). Bei 20 bar wurden 17 Messungen mit 6 Präparationen durchgeführt und die Standardabweichung eingetragen ( $\sigma_{n-1} = 12.3$ ). Der Einsatz illustriert das berechnete freie Standardenthalpieprofil, beginnend beim höchsten Oxidationszustand über ein unbestimmtes, nicht absorbierendes Intermediat zum völlig entspannten Zustand mit freigesetztem Sauerstoff. Die gestrichelte Linie deutet  $A_\infty$  bei  $p(\text{O}_2) \rightarrow \infty$  an.

Die Kinetik des Zerfalls von A (bei hohem Druck (20 bar) unter der guten Näherung, daß  $C \approx 0 \Rightarrow B = 1 - A$  gilt, ist wie folgt:

$$\frac{dA}{dt} = -a * A + b * B = -(a + b) * A + b$$

$$\text{mit } z = (a + b) * A - b$$

**Gleichung 5**

$$\text{und } \frac{dz}{dA} = (a + b)$$

$$\Rightarrow \frac{dz}{dt} = -z * (a + b)$$

Nach Integration folgt:  $z = z_0 * e^{-(a+b)*t}$

**Gleichung 6**

$$\text{Da } A_0 = 1 \text{ gilt } z_0 = a \quad (\text{eingesetzt in Gleichung 5})$$

$$\Rightarrow (a + b) * A - b = a * e^{-(a+b)*t} \quad (\text{eingesetzt in Gleichung 6})$$

$$\Rightarrow A = \frac{b}{a + b} + \frac{a}{a + b} * e^{-(a+b)*t}$$

**Gleichung 7**

Das Signal fällt also mit  $-(a+b) = k_{eff}$  ab.

Als Näherung ( $C \approx 0$ ) wurde die Halbwertszeit für den Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  bei 20 bar Sauerstoff eingesetzt (Abbildung 65). Mit den rechnerisch ermittelten Verhältnissen von  $a/b$  sowie  $c/d$  ließen sich die absoluten Raten für den Übergang  $A \rightleftharpoons B$  aus der gemessenen Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  ermitteln:

$$\tau_{1/2} = \ln 2 * \tau = 0.8 \text{ ms}$$

$$\Rightarrow \tau = 1.154 \text{ ms gibt } k_{eff} = 866.6 \text{ s}^{-1} \text{ als effektive Rate}$$

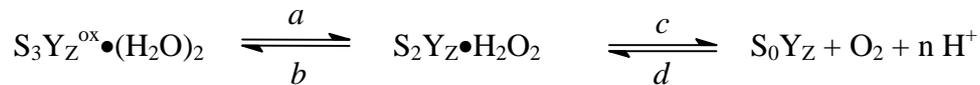
$$\text{mit } k_{eff} = (a + b) = 866.6 \text{ s}^{-1} \text{ und } a/b = 0.2 \text{ ist}$$

$$\Rightarrow a = 144.43 \text{ s}^{-1} \text{ und } b = 722.17 \text{ s}^{-1}$$

Die absoluten Werte der Ratenkonstanten für den zweiten Reaktionsschritt ( $c, d * p$ ) wurden nicht bestimmt, aber beide waren viel größer als  $a$  und  $b$  (siehe VIII.3.3).

ii) Reaktionsschema  $A \rightleftharpoons B \rightleftharpoons C$ ;  $A$  und  $B$  absorbieren bei 360 nm

Die Annahmen sind dieselben wie in *i*), nur daß dem Intermediat,  $B$ , ein konkreter, plausibler Zustand zugewiesen wird:



Das Intermediat wurde dem zweifach oxidierten *OEC* mit gebundenem Peroxid zugeordnet. Die negative Amplitude nach dem dritten Blitz revertiert zwei positive Absorptionsänderungen aus dem ersten und zweiten Blitz, nämlich  $\Delta A_{S_1 \rightarrow S_2}$  und  $\Delta A_{S_2 \rightarrow S_3}$ , welche beide annähernd gleich groß und gleich gerichtet sind [Lavergne 91] (siehe Anhang XI.7). Im Gegensatz dazu tragen die Übergänge  $Y_Z \Rightarrow Y_Z^{\text{ox}}$  und  $S_0 \Rightarrow S_1$  bei 360 nm nicht zur Absorptionsänderung bei [Dekker *et al.* 84c; Gerken *et al.* 89; Haumann *et al.* 99; Lavergne 91]. Demzufolge galt die Annahme, daß das Verschwinden von  $A = S_3Y_Z^{\text{ox}} \bullet (H_2O)_2$ , der am höchsten oxidierte Zustand im *OEC*, eine doppelt so große Absorptionsänderung hervorrief wie das Intermediat im zweiten Oxidationszustand  $B = S_2Y_Z \bullet H_2O_2$ .

Zur Vereinfachung wird hier die Größe  $(1 - \Delta X)$  als  $E$  definiert.

Bei  $E = 0$  ( $\Delta X = 100\%$ ) waren alle Zentren nach  $C + O_2$  relaxiert (Schema 3). Bei  $E = 0.5$  ( $\Delta X = 50\%$ ) blieb die Reaktion bei einem zu bestimmenden Verhältnis von  $A$  zu  $B$  stehen (theoretisch maximal mögliches Verhältnis: 100% der Zentren in  $B$  und kein  $A$ ,  $C$  oder  $O_2$ ).

Die observierte Größe  $E$  war also zusammengesetzt aus der mit eins gewichteten Konzentration von  $A$ , und der mit ein halb gewichteten Konzentration von  $B$ :

$$E = A + \frac{1}{2} * B = f(p)$$

Für  $E_\infty$  gilt dann [(siehe Anhang XI.6 *ii*)]:

$$E_\infty = \frac{1 + \frac{1}{2} * \frac{a}{b}}{1 + \frac{a}{b} * \left(1 + \frac{c}{d * p}\right)}$$

#### Gleichung 8

Die weiteren Schritte erfolgten homolog zu VIII.2.3 *i*). Die rechnerische Anpassung der Daten (rote Kurve) wurde in Abbildung 71 dargestellt. Sie ergab für  $a/b$  einen Wert von **0.5** und für  $c/d = \mathbf{6.8 \text{ bar}}$ . Bei  $p \rightarrow \infty$  geht  $E_\infty$  gegen 0.83 (gestrichelte Linie in Abbildung 71) und  $\frac{1}{2} E_\infty = 0.42$  lag bei 2.3 bar (Gleichung 8). Für  $E_\infty = 0.36$  bei pH 5.7 ergab sich  $p = 1.72 \text{ bar}$  und  $p = 68 \text{ bar}$  für pH 5.7 + 20 bar  $O_2$ .

Mit  $K_{AB} = 0.5$  folgt:

$$\Delta G^\circ_{A \rightarrow B} = -2.3 RT * \log K_{AB} = 1.7 \text{ kJ/mol}$$

und

$$\Delta G^\circ_{B \rightarrow C} = -2.3 RT * \log K_{BC} = -4.7 \text{ kJ/mol bei } p = 1 \text{ bar}$$

Bei Normalluftdruck ( $x = 0.21$  bar):

$$\Delta G_{A \rightarrow B} = 1.7 \text{ kJ/mol (siehe oben)}$$

$$\Delta G_{B \rightarrow C} = -2.3 RT * \log K_{BC} = -8.5 \text{ kJ/mol}$$

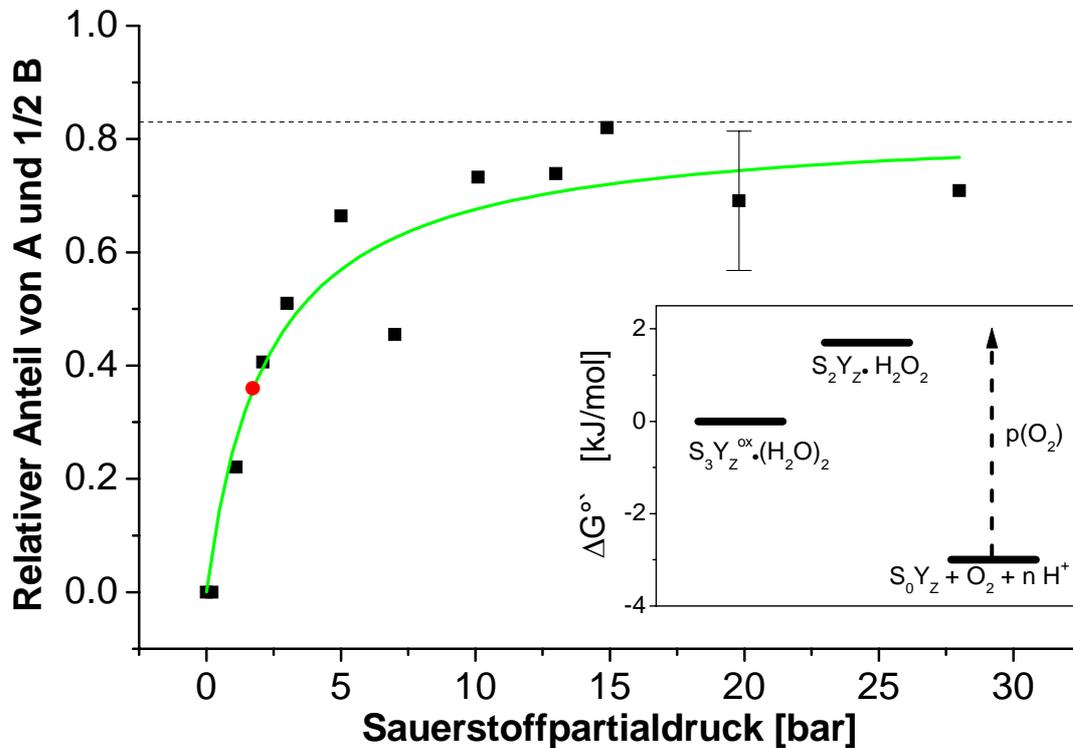


Abbildung 71: Korrigierte (VIII.2.2.1) Absorptionsänderungen  $E_\infty$  ( $E_\infty = 1 - \Delta X$ ) als Funktion des Sauerstoffpartialdrucks. Alle Meßpunkte (schwarze Quadrate) bei pH 6.7 außer einem (roter Punkt) bei pH 5.7 und 1 bar Luft. Die rechnerische Anpassung (siehe Text) ergab 0.5 für  $a/b$  und 6.8 bar für  $c/d$ . Zur Absorption trugen sowohl der Ausgangszustand ( $S_3$ ) als auch das Intermediat ( $S_2 \bullet (H_2O_2)$ ) bei. Die Standardabweichung ( $\sigma_{n-1} = 12.3$ ) für 17 Messungen (6 Präparationen) bei 20 bar wurde eingetragen. Einsatz: Berechnetes freies Standardenthalpieprofil (siehe Text); beginnend beim höchsten Oxidationszustand über einen modifizierten  $S_2$ -Zustand (mit gebundenem Peroxid) zum völlig entspannten Zustand mit freigesetztem Sauerstoff. Die gestrichelte Linie deutet  $E_\infty$  bei  $p(O_2) \rightarrow \infty$  an.

Die Kinetik des Zerfalls [Herleitung unter Anhang XI.6 iii)] wurde durch

$$A + \frac{1}{2} B = E = \frac{1}{2} * \left( 1 + \frac{1}{a+b} * (b + a * e^{-(a+b)*t}) \right) \text{ beschrieben.}$$

Die absoluten Werte für  $a$  und  $b$  waren dann:

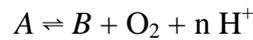
$$k_{eff} = (a + b) = 866.6 \text{ s}^{-1} \quad \text{und} \quad a/b = 0.5$$

$$\Rightarrow a = 288.9 \text{ s}^{-1} \text{ und } b = 577.7 \text{ s}^{-1}$$

Die absoluten Werte der Ratenkonstanten für den zweiten Reaktionsschritt ( $c, d^*p$ ) wurden auch hier nicht bestimmt, waren aber ebenfalls viel größer als  $a$  und  $b$  (siehe VIII.3.3).

iii) Reaktionsschema  $A \rightleftharpoons B$ ; nur  $A$  absorbiert bei 360 nm

Beschreibung der Ergebnisse aus Tabelle 14 mit einem einfachen Reaktionsschema



**Schema 4**

$A$  entspräche dem höchsten oxidierten Zustand  $S_3Y_Z^{ox}$  und  $B$  dem vollständig reduzierten System  $S_0Y_Z$ . Die Absorptionsänderung resultierte aus der Abnahme von  $A$ .

Für  $A_\infty$  gilt [Anhang XI.6 iv)]:

$$A_\infty = \frac{p}{\frac{a}{b} + p}$$

**Gleichung 9**

Die rechnerische Anpassung von  $A_\infty$  (Abbildung 71, grüne Linie) ergab für  $a/b = 4.2$  bar. Für  $p \rightarrow \infty$  war  $A_\infty = 1$  (gestrichelte Linie). Die halbmaximale Amplitude (0.5) wurde bei  $p = 4.2$  bar erreicht (Gleichung 9). Die Restamplitude von 0.36 bei pH 5.7 entsprach einem Sauerstoffpartialdruck von 2.4 bar (grüner Punkt). Die größte Unterdrückung des sauerstofffreisetzens Schritt bei pH 5.7 und einem Sauerstoffpartialdruck von 20 bar lieferte nach Tabelle 14 einen Wert für  $A_\infty$  von 0.808. Das entsprach  $p = 17.7$  bar.

Mit  $a/b = 4.2$  bar folgt für  $\Delta G^\circ$ :

$$\frac{[B]}{[A]} = \frac{a}{bp} = K_{AB}$$

$$\Rightarrow \Delta G^\circ_{A \rightarrow B} = -2.3 * RT * \log 4.2 = -3.5 \text{ kJ/mol} \quad \text{bei } p = 1 \text{ bar, } 20 \text{ }^\circ\text{C und pH } 6.7$$

Und für Normalluftdruck ( $p = 0.21$  bar):

$$\Delta G_{A \rightarrow B} = -2.3 * RT * \log 20 = -7.3 \text{ kJ/mol}$$

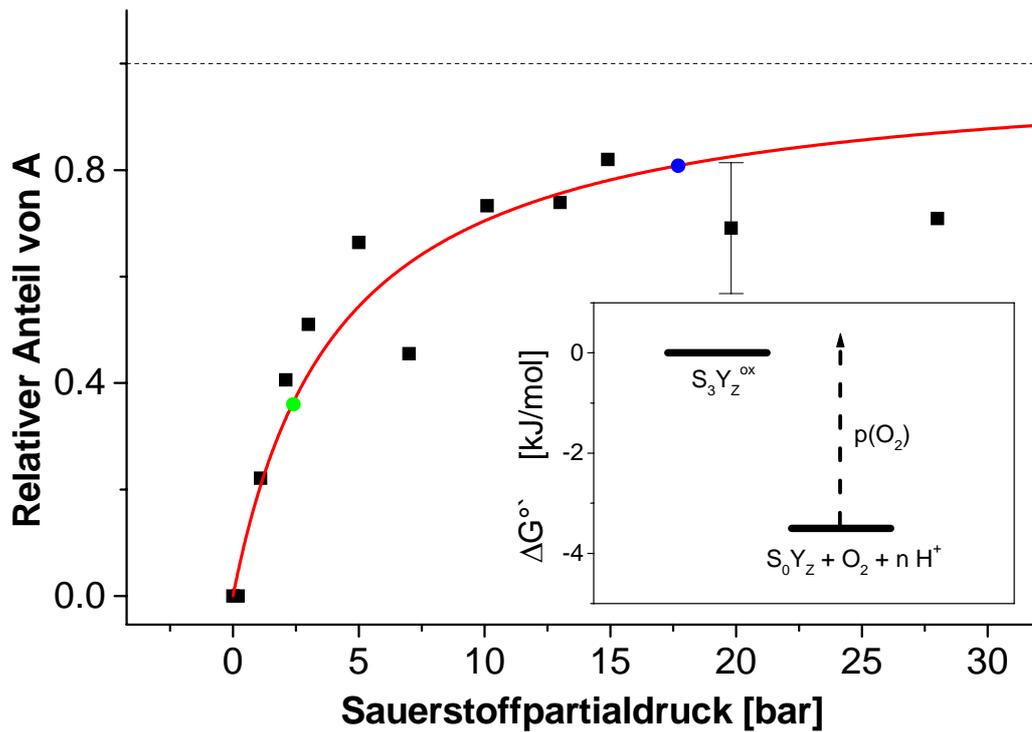


Abbildung 72: Korrigierte (VIII.2.2.1) Absorptionsänderungen ( $A_{\infty} = 1 - \Delta X$ ) als Funktion des Sauerstoffpartialdrucks. Alle Meßpunkte (schwarze Quadrate) bei pH 6.7 außer einem (grüner Punkt) bei pH 5.7 und einem (blauer Punkt) bei pH 5.7 plus 20 bar  $O_2$ . Analyse der Titrationsdaten ohne Intermediat (siehe Text). Die rechnerische Anpassung (rote Linie, Gleichung 9) ergab eine halbmaximale Hemmung bei 4.2 bar und ein Verhältnis von  $a/b = 4.2$  bar (siehe Text). Die maximale Hemmung ist als gestrichelte Linie eingezeichnet ( $A_{\infty} = 1$ ). Im Einsatz wurde das errechnete freie Enthalpieprofil dargestellt. Bei 20 bar wurde die Standardabweichung ( $\sigma_{n-1} = 12.3$ ) für 17 Messungen mit sechs unterschiedlichen Präparationen eingetragen.

Für den Zerfall von A gilt die bereits hergeleitete Gleichung 7 (Seite 126):

$$A = \frac{b}{a + b} + \frac{a}{a + b} * e^{-(a+b)*t}$$

wobei  $b'$  die Ratenkonstante einer Reaktion pseudo-erster Ordnung ist (siehe VIII.3.3 i):

$$b' = b * p(O_2).$$

Für 0.21 bar Sauerstoff ist die effektive  $\tau_{1/2} \approx 1.5$  ms für  $S_4 \rightarrow S_0$ . Also ist  $k_{eff} = a + b' = 462.96 \text{ s}^{-1}$ .

Mit  $a/b = 4.2$  bar und  $b * 0.21 \text{ bar} = b'$

$$a = 440.92 \text{ s}^{-1} \text{ und } b = 104.98 \text{ bar}^{-1} * \text{s}^{-1}$$

Der Vergleich der Datenanpassung unter den Annahmen i) – iii) zeigt, daß die Annahme, es gäbe kein Intermediat [Fall iii)] mit den Daten nicht verträglich ist, wohingegen

unterschiedliche Annahmen über die Extinktion eines existierenden Intermediates mit den Daten verträglich sind. Eine ausführliche Diskussion folgt im Abschnitt VIII.3.3.

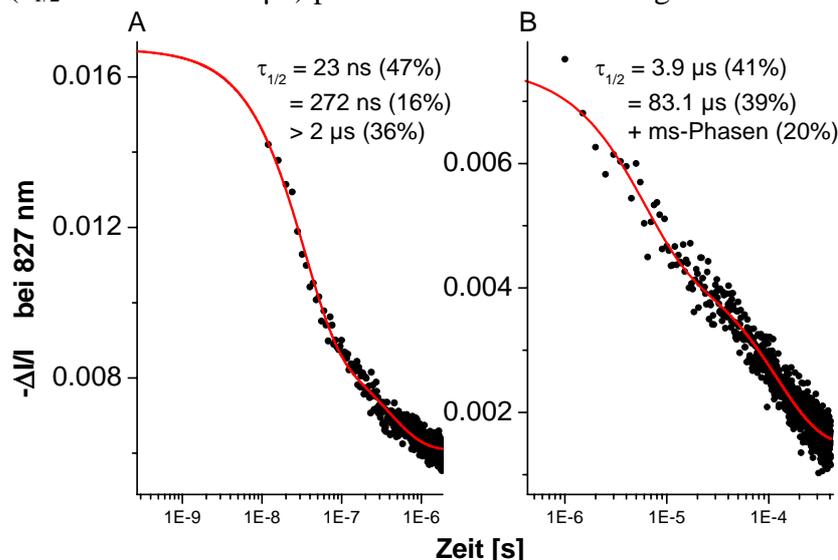
## VIII.2.4 Reduktion von $P_{680}^{+\bullet}$ unter erhöhtem $p(O_2)$

Es stellte sich die Frage, inwieweit erhöhter Sauerstoffdruck auch in andere Reaktionen von PSII eingriff.

Die Reduktion des primären Donators  $P_{680}^{+\bullet}$  durch Tyrosin Z wurde spektroskopisch bei 827 nm bei normalem Luftdruck und bei erhöhtem Sauerstoffpartialdruck verfolgt. Damit sollte der Einfluß bzw. eine etwaige Schädigung des primären Donators/der Akzeptorseite durch den hohen Druck oder die hohe Sauerstoffkonzentration untersucht werden. Auf Grund der räumlichen Beschränkungen der optischen Druckmeßzelle konnten die Messungen (im Gegensatz zu Kapitel VI) nur mit einer optischen Weglänge  $d = 1\text{ cm}$  durchgeführt werden.

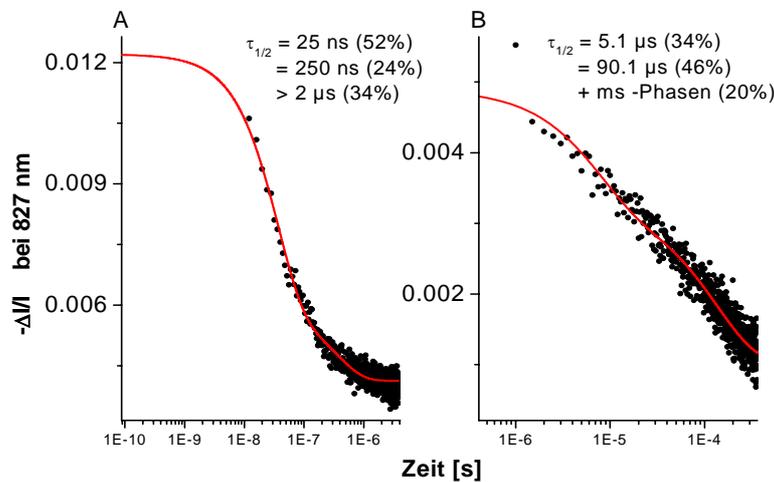
### i) $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion bei repetierender Anregung

Die Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  verlief mehrphasig bei 1 bar Luft (vgl. Kapitel VI). In Abbildung 73 A wurde der Mittelwert aus 600 repetierenden (10 Hz) Kontrollmessungen abgebildet. Die Bandbreite des Tiefpaßfilters war höher (1 GHz) als bei den Messungen in Kapitel VI. Der blitzinduzierte Abfall des Signals konnte mit drei Phasen angepaßt werden (rote Linie): eine sehr schnelle Phase ( $\tau_{1/2} = 23\text{ ns}$ ), eine schnelle Phase mit  $\tau_{1/2} = 272\text{ ns}$  und eine langsame  $\mu\text{s}$ -Phase, die in diesem kurzem Zeitfenster (0 - 3.8  $\mu\text{s}$ ) nicht aufgelöst werden konnte und als stabiler Untergrund gewertet wurde. Die rechnerisch extrapolierte Gesamtamplitude betrug  $-\Delta I/I_{827} = 0.0167$ , wovon die sehr schnelle Phase einen Anteil von 47% hatte. Die schnelle Phase hatte einen Amplitudenanteil von 16% und der Untergrund betrug 36%. Durch parallele Messungen mit einem größeren Zeitfenster (400  $\mu\text{s}$ , Abbildung 73 B) wurde der  $\mu\text{s}$ -Zerfall von  $P_{680}^{+\bullet}$  mit zwei weiteren  $\mu\text{s}$ -Phasen angepaßt ( $\tau_{1/2} = 3.9$  und  $83.1\text{ }\mu\text{s}$ ) plus einem weiteren Untergrund aus ms-Phasen.



**Abbildung 73: Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  in Luft (0.21 bar  $O_2$ ) unter repetierender Anregung (10 Hz). 34.9  $\mu\text{M}$  Chl, Bandbreite 1 GHz, optische Weglänge ( $d$ ) = 1 cm. Die  $\tau_{1/2}$  für die einzelnen Phasen (siehe Text) wurden mit ihrem prozentualen Anteil am Gesamtsignal angegeben. A) Kurzes Zeitfenster, 4 ns/Punkt. MW aus 600 Messungen. B) Größeres Zeitfenster, 500 ns/Punkt. MW aus 550 Messungen.**

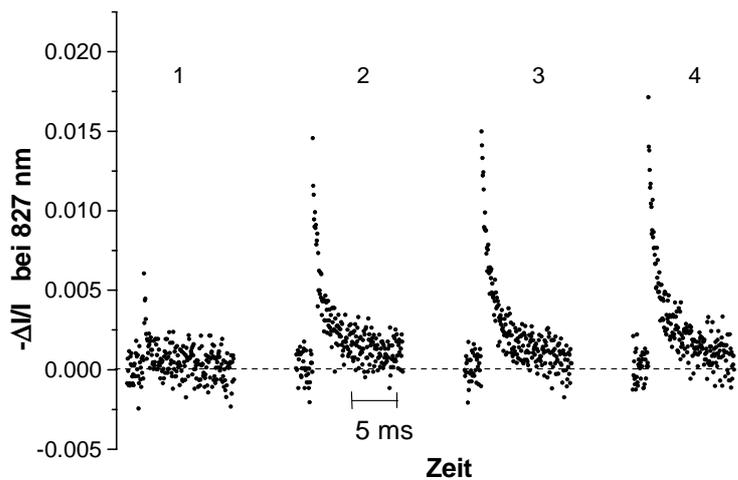
Diese Messungen wurden mit einem Sauerstoffdruck von 19.6 bar wiederholt. Der Puffer war für 40 – 145 min bei 19.6 bar  $O_2$  vorinkubiert worden. Danach wurden die Kernkomplexe in Gegenwart des erhöhten  $p(O_2)$  unter Rühren für 30 min in der Küvette inkubiert. Die Kinetik der  $P_{680}^{+\bullet}$  Reduktion war nahezu unverändert im Vergleich zu den Kontrollmessungen. Die Halbwertszeiten der sehr schnellen Phase (25 ns), der schnellen



Phase (250 ns) und der  $\mu s$ -Phasen ( $\tau_{1/2} = 5.1 \mu s$  und  $90.1 \mu s$ ) waren nahezu identisch wie auch die Anteile der einzelnen Phasen an der Gesamtamplitude (siehe Tabelle 15 und Abbildung 74, rote Linie). Lediglich die extrapolierte Gesamtamplitude unter hohem Sauerstoffdruck war mit  $\Delta I/I_{827} = 0.01221$  etwas geringer als unter atmosphärischem Druck (73%). Da die Reduktionskinetiken von  $P_{680}^{+\bullet}$  bei einem Blitzabstand von 100 ms gegenüber den Kontrollmessungen unverändert war, bedeutete dies auch, daß  $Y_Z^{ox}$  in den 100 ms Dunkelphase selbst dann wieder reduziert wurde, wenn die Oxidation des *OEC* über  $S_3$  hinaus blockiert war. Zum Vergleich wurden die einzelnen Werte der  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion in Tabelle 15 zusammengefaßt.

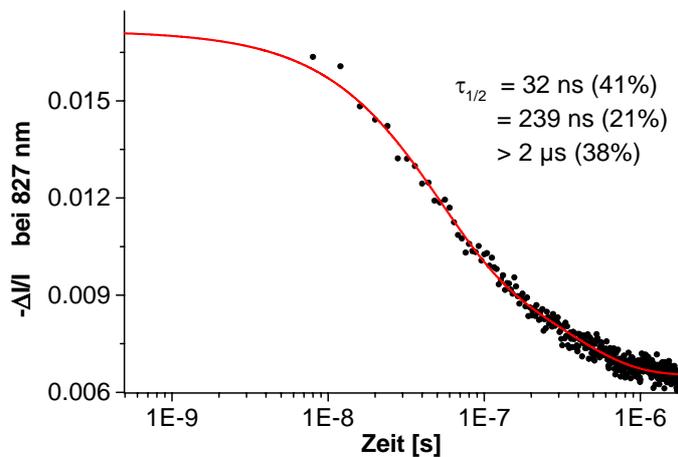
#### ii) Reduktion von $P_{680}^{+\bullet}$ in Mn-verarmten Zentren

Durch Titration von PSII-Kernkomplexen auf hohe pH-Werte kann der Mn-Komplex aus PSII entfernt werden (siehe IV.13). In diesen Kernkomplexen kann der sekundäre Donator  $Y_Z^{ox}$  nicht durch den Mn-Komplex reduziert werden, so daß ab dem zweiten Blitz auch  $P_{680}^{+\bullet}$  nicht mehr durch  $Y_Z^{ox}$  reduziert werden kann.  $P_{680}^{+\bullet}$  rekombiniert deshalb ab dem 2. Blitz vergleichsweise langsam mit  $Q_A^{\bullet}$  ( $\tau_{1/2} = 90 - 900 \mu s$ ) [Gerken *et al.* 89; Haumann *et al.* 96; Hundelt 99; Metz *et al.* 89; Reinman *et al.* 81]. Der Zerfall von  $P_{680}^{+\bullet}$  in derartig inaktivierten Kernkomplexen wurde mit der Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  in PSII-Kernkomplexen verglichen, bei denen spezifisch der  $S_4 \rightarrow S_0$  Übergang durch hohen  $p(O_2)$  gehemmt war. In beiden Systemen war also die Funktion des *OEC* eingeschränkt: einmal durch harsche, biochemische Behandlung und vollständigen Verlust der Metall-Kofaktoren, das andere Mal durch vergleichsweise milde biochemische Behandlung und vermutlich struktureller Unversehrtheit.



**Abbildung 75: Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  in Mn-verarmten Kernkomplexen. Die Zahlen geben die Blitznummer an. In den Blitzen 2 – 4 war die Rekombination von  $P_{680}^{+\bullet}$  mit  $Q_A^{\bullet}$  zu sehen. Die Amplitude der Rekombination war nahezu unverändert zur Amplitude in unbehandelten PSII-Kernkomplexen. Ca. 15  $\mu\text{M}$  Chl,  $d = 5$  cm, Blitzfrequenz = 100 Hz. Messungen bei 10  $\mu\text{s}$ /Punkt und einer Bandbreite von 20 MHz. MW aus drei dunkeladaptierten Messungen (nur jeder 5. Punkt abgebildet).**

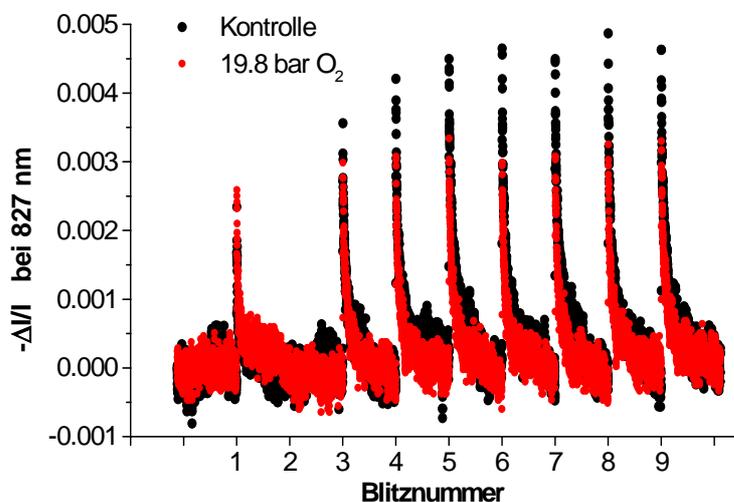
Mit dunkeladaptierten, Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen wurde eine Blitzserie von vier Blitzen aufgenommen (10 ms Blitzabstand). Die Messungen wurden mit einer Küvette mit einer optischen Weglänge von 5 cm durchgeführt. Die Signale wurden in Abbildung 75 dargestellt. Auf dem ersten Blitz war die sichtbare Amplitude von  $P_{680}^{+\bullet}$  kleiner als bei den folgenden Blitzen, und der Abfall des Signals war schnell. Im dunkeladaptierten Zustand vor dem ersten Blitz lag  $Y_Z$  reduziert vor, so daß  $P_{680}^{+\bullet}$  im ersten Blitz überwiegend in ns durch Tyrosin Z reduziert wurde (vgl. Abbildung 73 und Abbildung 76). Mit der hier gewählten, geringen Zeitauflösung von 10  $\mu\text{s}$ /Punkt konnte diese sehr schnelle Phase nicht aufgelöst werden. Deshalb war die Amplitude im ersten Blitz sehr klein ( $-\Delta I/I_{827} \approx 0.005$ ). Bei den nachfolgenden Blitzen war die deutlich langsamere Rekombination von  $Q_A^{\bullet}$  mit  $P_{680}^{+\bullet}$  zu sehen. Die Gesamtamplitude betrug  $-\Delta I/I_{827} = 0.016$  und war damit nahezu identisch mit der extrapolierten Gesamtamplitude einer Kontrollmessung mit unbehandelten PSII-Kernkomplexen (rote Linie, Abbildung 76,  $-\Delta I/I_{827} = 0.017$ ). Die Übereinstimmung der Gesamtamplituden von Mn-verarmten Kernkomplexen ( $P_{680}^{+\bullet}$ - $Q_A^{\bullet}$ -Rekombination) und der Kontrollmessung (Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  durch  $Y_Z$ ) bestätigte, daß das oxidierte Tyrosin Z bei einem Blitzabstand von 10 ms in der Dunkelphase nicht anderweitig reduziert wurde, sondern als  $Y_Z^{\text{ox}}$  stabil war. Mit Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen konnte daher eine deutliche Abhängigkeit der Amplitude von der Blitznummer gemessen werden. Eine Abschätzung der Halbwertszeit für die Rekombination von  $P_{680}^{+\bullet}$  und  $Q_A^{\bullet}$  ergab einen einphasigen Verlauf mit  $\tau_{1/2} = 500 \mu\text{s}$ .



**Abbildung 76: Reduktion von  $P_{680}^{+}$  in unbehandelten PSII-Kernkomplexen. Kontrollmessung zu Abbildung 75. Das Signal wurde biexponentiell angepaßt (rote Kurve). Es ergaben sich vergleichbare Halbwertszeiten und Amplitudenanteile wie in Abbildung 75. Die Gesamtamplitude entsprach ungefähr der Gesamtamplitude bei Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen. Ca.  $15 \mu\text{M}$  Chl, Bandbreite 150 Mhz, 4 ns/Punkt Zeitauflösung,  $d = 5 \text{ cm}$ , MW aus 350 Messungen, repetierende Anregung (10 Hz).**

*iii) Reduktion von  $P_{680}^{+}$  in dunkeladaptierten Kernkomplexen unter erhöhtem  $p(\text{O}_2)$*

Wie mit den Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen wurde die Blitzabhängigkeit der Reduktion von  $P_{680}^{+}$  auch unter erhöhtem  $p(\text{O}_2)$  an dunkeladaptierten Proben untersucht. Dabei sollte festgestellt werden, ob sich bei einer Blitzfrequenz von 100 Hz ein ähnliches Blitzmuster wie in Abbildung 75 ergab, da nach den Ergebnissen aus Abschnitt VIII.2.1



**Abbildung 77: Blitzabhängige Reduktion von  $P_{680}^{+}$  unter erhöhtem  $\text{O}_2$ -Druck (19.8 bar, rot,  $33.6 \mu\text{M}$  Chl) und 1 bar Luft (Kontrolle,  $33.8 \mu\text{M}$  Chl, schwarz) in dunkeladaptierten Proben. Bis auf die verringerte Gesamtamplitude war das Muster der Blitzabhängigkeit unter 19.8 bar unverändert zur Kontrolle, unterschied sich aber deutlich von demjenigen in Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen.  $10 \mu\text{s}$ /Punkt, Bandbreite 76 kHz,  $d = 1 \text{ cm}$ . Über 2 Punkte geglättet; nur jeder 5. Punkt wurde dargestellt. 10 ms Blitzabstand.**

durch erhöhten  $p(\text{O}_2)$  von 19.8 bar der S-Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  blockiert wurde. Zu diesem Zweck wurden Meßspuren aus 9 Blitzen (10 Hz Blitzabstand) mit Kontrollproben (1 bar Luft) und  $\text{O}_2$ -Proben (19.8 bar) aufgenommen. Die Probe wurde für 40 min im Dunkeln in der Küvette unter Rühren bei dem erhöhten Druck inkubiert.

Das Blitzmuster der Reduktion von  $P_{680}^{+}$  bei 19.8 bar  $\text{O}_2$  war nahezu unverändert gegenüber den Kontrollmessungen (Abbildung 77) bei 1 bar Luft und unterschied sich deutlich vom Blitzmuster bei Mn-verarmten Kernkomplexen. Dies bestätigte die Ergebnisse unter Punkt i), daß die  $P_{680}^{+}$ -Reduktion unter hohem  $p(\text{O}_2)$  unverändert war. Auch nach einer Inkubation des Chl von 65 min unter 20 bar  $\text{O}_2$  war das Signal nahezu unverändert zur Kontrollmessung (Daten nicht dargestellt). Anders als bei Mn-verarmten

Kernkomplexen konnte auch bei 10 ms Blitzabstand Tyrosin Z zwischen den Blitzen reduziert werden, obwohl die Progression der S-Zustände über S<sub>4</sub> hinaus weitgehend inhibiert war (VIII.2.1). Im ersten Blitz war die Amplitude ( $\approx 0.0028$ ) ungefähr auf dem Niveau des ersten Blitzes bei Mn-verarmten Kernkomplexen (Abbildung 75), welches gerade noch die einmalige P<sub>680</sub><sup>+</sup>-Reduktion durch Y<sub>Z</sub> in dunkeladaptierten Proben reflektierte. In den weiteren Blitzen stieg die Amplitude nicht wie bei Mn-verarmten Kernkomplexen um das dreifache an sondern blieb bei zwei Meßreihen zwischen 0.0031 (MW aus Blitz Nr. 3 – 9,  $\sigma_{n-1} = 0.0001$ ) und 0.0036 ( $\sigma_{n-1} = 0.0001$ ). Dies entsprach der erwarteten Amplitudengröße: Bei repetierenden Messungen (10 Hz) der P<sub>680</sub><sup>+</sup>-Reduktion (Abbildung 74 B) betrug die Signalgröße der rechnerisch angepaßten Kurve nach 10  $\mu$ s ebenfalls  $-\Delta I/I_{827} = 0.0035$ .

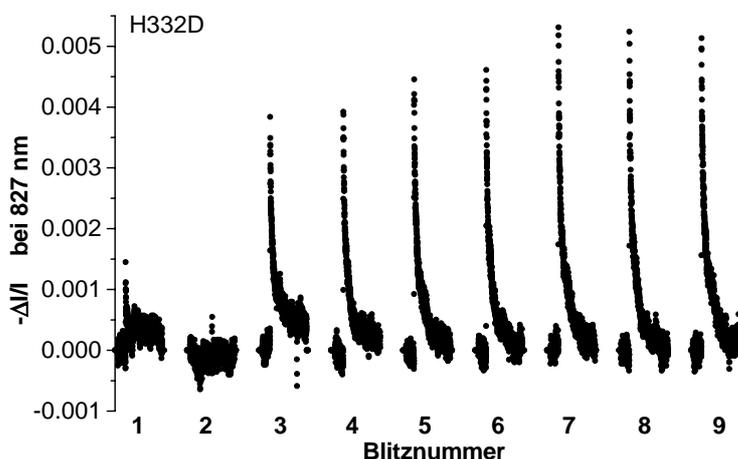
Das Blitzmuster der Kontrollmessung (schwarze Punkte in Abbildung 77) verhielt sich genauso wie dasjenige der O<sub>2</sub>-Messung. Lediglich die Gesamtamplitude in den Blitzen 3 – 9 war wiederum etwas größer (MW  $-\Delta I/I_{827} = 0.0047$ ,  $\sigma_{n-1} = 0.00003$ ), war aber auch identisch mit der nach 10  $\mu$ s ermittelten Amplitude bei repetierenden Kontrollmessungen (Abbildung 73 B,  $-\Delta I/I_{827} = 0.0047$ ). Die Gesamtamplitude der O<sub>2</sub>-Messungen bei 19.8 bar O<sub>2</sub> (0.0031) sank auf 66% gegenüber den Kontrollmessungen (0.0047) ab [vgl. Punkt i)]. *Wie schon unter Punkt i) beschrieben, wurde auch mit diesen Messungen gezeigt, daß die Reduktion von P<sub>680</sub><sup>+</sup> unter hohem p(O<sub>2</sub>) unverändert ablief, und daß Y<sub>Z</sub><sup>ox</sup>, anders als in Mn-verarmten Kernkomplexen, zwischen den Blitzen (10 ms Dunkelphase) reduziert wurde.* Der Mechanismus hierfür ist unklar, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Der zweite Blitz stellte eine Besonderheit bei O<sub>2</sub>-Messungen und Kontrollmessungen dar. In beiden Meßspuren war auf den zweiten Blitz kein Signal zu sehen. Dies ist momentan unverständlich. Auf jeden Fall unterschieden sich diese Messungen damit in einem weiteren Punkt von Messungen mit Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen.

Eine weitere Messung mit einer Probe, die für 80 min bei 19.8 bar inkubiert worden war, zeigte einen identischen Verlauf der P<sub>680</sub><sup>+</sup>-Reduktion (Daten nicht dargestellt). Die Amplitude (0.003,  $\sigma_{n-1} = 0.0001$  bei 35.5  $\mu$ M Chl) der Blitze 3 – 9 war nahezu unverändert gegenüber 40 min Inkubation. Die Verringerung der Amplitude gegenüber der Kontrollmessung beruhte also überwiegend nicht auf einer zeitabhängigen Schädigung der PSII-Kernkomplexe durch erhöhten Sauerstoffpartialdruck (siehe auch VIII.2.1).

#### iv) Reduktion von P<sub>680</sub><sup>+</sup> in der Mutante D1-H332D

Wie unter Punkt ii) beschrieben, ergab sich bei Mn-verarmten Kernkomplexen eine



**Abbildung 78: Reduktion von P<sub>680</sub><sup>+</sup> in PSII-Kernkomplexen aus D1-H332D.** MW aus 2 dunkeladaptierten Messungen, 10  $\mu$ s/Punkt, über 2 Punkte geglättet. 38  $\mu$ M Chl. Bandbreite 76 kHz, d = 1 cm. Die P<sub>680</sub><sup>+</sup>-Reduktion lief in H332D-Kernkomplexen wie in WT\*-Kernkomplexen ab, obwohl erstere kein Mn enthalten.

deutliche Blitzabhängigkeit der Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$ , weil Tyrosin Z in diesen PSII-Kernkomplexen zwischen den Blitzen nicht mehr reduziert wurde. PSII-Kernkomplexe, deren Progression der S-Übergänge durch hohen Sauerstoffpartialdruck gehemmt war, zeigten kein derartiges Verhalten [Punkt iii)] – Tyrosin Z wurde offenbar zwischen den Blitzen (in der 10 ms Dunkelphase) reduziert. Es lag also nahe, daß die Blitzabhängigkeit der Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  in Mn-verarmten Kernkomplexen nicht in erster Linie auf das Fehlen des Mn-Komplexes zurückzuführen war, sondern auf anderen Veränderungen/Schädigungen basierte, die im Zuge der Mn-Verarmung (Titration auf hohe pH-Werte, vgl. IV.13) erfolgt waren. Um dies zu überprüfen wurde die  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion in PSII-Kernkomplexen aus der *Synechocystis* Mutante D1-H332D untersucht. Über Messung der Photoakkumulation von  $Q_A^{\bullet}$  ist der Gehalt an photooxidierbarem Mn in Zellen von D1-H332D mit  $\geq 95\%$  ermittelt worden [Chu *et al.* 95b]. Trotzdem wächst die Mutante nicht mehr photoautotroph und produziert keinen Sauerstoff. Der Gehalt an PSII in den Zellen ist ebenfalls unverändert im Vergleich zum WT. Vermutlich ist der AS-Rest D1-H332D an der Aufrechterhaltung und Stabilisierung der Struktur des Mn-Komplexes beteiligt; entweder als Ligand des Mangans oder als Mitspieler in einem Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen, die  $Y_Z$  mit dem Mn-Komplex verbinden [Debus 01]. Der Austausch von Histidin gegen Aspartat durch ortsgerichtete Mutagenese bewirkt deshalb wahrscheinlich, daß der Mn-Komplex strukturell anders als im WT aufgebaut wird [Chu *et al.* 95b]. In meiner Diplomarbeit (Photosynthetische Wasseroxidation in Cyanobakterien: Untersuchung an spezifischen Mutanten, Universität Osnabrück, 1999) habe ich gezeigt, daß der Mn-Komplex während der Präparation von PSII-Kernkomplexen aus H332D-Zellen verlorengeht. Dies wurde über die Rekombination von  $Q_A^{\bullet}$  mit dem OEC oder exogenem  $Mn^{2+}$  [Debus *et al.* 98] überprüft. PSII-Kernkomplexe aus H332D ohne Mn waren also dazu geeignet zu untersuchen, ob die Blitzabhängigkeit der Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  ein direktes Resultat allein aus dem Fehlen des Mn-Komplexes war oder ein Nebeneffekt der Prozedur zur Mn-Verarmung durch Exposition auf hohe pH-Werte.

Die Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  wurde mit einer Blitzserie von neun Blitzen aufgenommen (Abbildung 78). Die Signale waren identisch zu den Kontrollmessungen (Abbildung 76). Im ersten Blitz war die Amplitude etwas kleiner, und auf dem zweiten Blitz war wiederum keine Amplitude zu sehen. Die Amplitude stieg in den Blitzen 3 – 9 nicht so drastisch an wie bei den Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen.  $Y_Z^{ox}$  wurde also zwischen den Blitzen reduziert. Die Amplitude der Blitze 3 - 9 hatte einen Mittelwert von 0.005 ( $\sigma_{n-1} = 0.0006$ ). Bei der entsprechenden Kontrollmessung betrug die mittlere Amplitude 0.0053 ( $\sigma_{n-1} = 0.0005$ , 41.8  $\mu$ M Chl, Daten nicht dargestellt), war also nahezu gleich. Auch gegenüber der  $P_{680}^{+\bullet}$ -Messung mit 19.8 bar  $O_2$  war das Blitzmuster mit H332D-Kernkomplexen identisch; abgesehen von der etwas kleineren, mittleren Amplitude der Blitze 3 – 9 [siehe Punkt ii)]. *Trotz Fehlens des Mn-Komplexes unterschied sich die  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion in H332D-Kernkomplexen von Mn-verarmten WT\*-PSII-Kernkomplexen und war identisch zu unbehandelten WT\*-Kernkomplexen bei 1 bar Luft und WT\*-Kernkomplexen bei ca. 20 bar  $O_2$ . Das abweichende Verhalten in durch Exposition bei alkalinem pH-Wert Mn-verarmten Proben ist daher der Prozedur und nicht der Verarmung an sich zuzuschreiben.*

Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  in PSII-Kernkomplexen

Material	$P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion (repetierend, 10 Hz <sup>a</sup> , 4 ns/Punkt)			$P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion (dunkeladaptiert, 100 Hz <sup>a</sup> , 10 $\mu$ s/Punkt)	
	$\tau_{1/2}$	Amplitu- denanteil	Gesamtamplitude bei $t = 0^\circ$ / nach 10 $\mu$ s	Amplitude <sup>b</sup> nach 10 $\mu$ s	Beschreibung
WT*, 0.21 bar O <sub>2</sub>	23 $\pm$ 1 ns 272 $\pm$ 17 ns 3.9 $\mu$ s 83.1 $\mu$ s ms/ $\mu$ s-Phasen	47% 16% 36%	0.0167 / 0.0047	0.0047 – 0.0053	Blitzmuster anders als bei Mn-verarmten WT*
WT*, 20 bar O <sub>2</sub>	25 $\pm$ 2 ns 250 $\pm$ 15 ns 5.1 $\mu$ s 90.1 $\mu$ s ms/ $\mu$ s-Phasen	52% 24% 34%	0.0122 / 0.0035	0.0031 - 0.0036	wie WT*
WT*, Mn- verarmt	-	-	-	0.016	Amplituden drastisch erhöht ab 2. Blitz
H332D	-	-	-	0.005	wie WT*

<sup>a</sup> Blitzabstand, <sup>b</sup> gemittelte Amplitude der Blitze 3 – 9, bzw. 3 – 4 bei Mn-verarmten Kernkomplexen,

<sup>c</sup> rechnerisch ermittelt

## VIII.2.5 Messung des Differenzspektrums unter erhöhtem $p(\text{O}_2)$

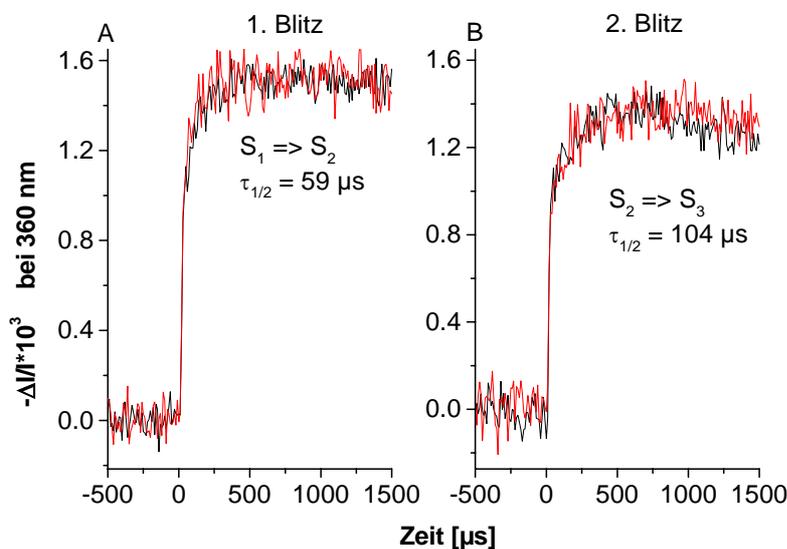
Auf Grund der fortgeschrittenen Zeit konnten die Arbeiten am gesamten Differenzspektrum unter erhöhtem Sauerstoffpartialdruck nur noch begonnen werden. Da unbekannt war, was für Kinetiken unter hohem Sauerstoffpartialdruck zu erwarten waren, wurden die Spuren mit einer vergleichsweise hohen Zeitaufklärung von 10  $\mu$ s/Punkt aufgenommen. Dies hatte ein schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis zur Konsequenz. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr ausreichend Zeit zur Verfügung stand, jede einzelne Wellenlänge im Sinne einer Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisse mit einer Vielzahl an dunkeladaptierten Proben abzufragen (Zeitaufwand pro Messung ca. eine Stunde, maximal fünf Messungen pro Tag), wurden der Einfachheit halber repetierend-semidunkeladaptierte Messungen (2 min Abstand pro Meßserie) ausgewertet. Damit verbesserte sich zwar das Signal/Rausch-Verhältnis, kritisch war allerdings die Tatsache, daß unbekannt war, wie schnell der *OEC* unter hohem  $p(\text{O}_2)$  im Dunkeln wieder (oder überhaupt ?) in den  $S_1$ -Zustand relaxierte. Außerdem konnten mit einer so hohen Zeitaufklärung maximal vier Blitze aufgenommen werden, da das Speicheroszilloskop nicht mehr Punkte aufnehmen konnte. Angesichts des geringen zeitlichen Spielraums war dies die beste Lösung, um überhaupt einen Eindruck davon zu bekommen, ob sich das Differenzspektrum unter hohem  $p(\text{O}_2)$  änderte und wo ggf. interessante, neue Prozesse sichtbar wurden.

Es wurden Messungen bei den Wellenlängen 295, 360, 402, 425, 465, 673 und 827 nm durchgeführt. Die Messungen bei 360 und 827 nm wurden größtenteils bereits beschrieben (Abschnitt VIII.2.1, VIII.2.4).

Bei 295 nm konnten keine verwertbaren Signale aufgenommen werden, weil die Meßlichtintensität und die Empfindlichkeit des Sekundärelektronenvervielfachers bei 295 nm zu gering waren. Die niedrige Meßlichtintensität verbot die Verwendung weiterer Filter, so daß das Laserstreulicht nicht herausgefiltert werden konnte, was dazu führte, daß der Meßbereich bereits durch den Blitzdurchschlag verlassen wurde und keine Messungen mehr möglich waren.

*i) Repetierend-semidunkeladaptierte Messungen bei 360 nm*

Komplette Meßserien bei 360 nm mit dunkeladaptierten Proben (und 50  $\mu$ s/Punkt

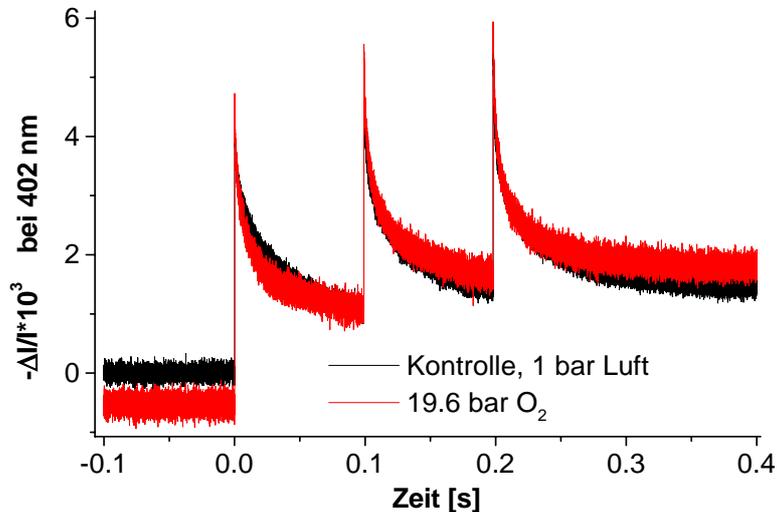


**Abbildung 79: Identischer Verlauf der Signale nach dem ersten und zweiten Blitz bei 360 nm und 19.7 bar  $O_2$  (rote Kurve) und der Kontrollmessung (schwarz, 1 bar Luft). Die Übergänge  $S_1 \Rightarrow S_2$  (erster Blitz) und  $S_2 \Rightarrow S_2$  (zweiter Blitz) hatten unverändert Halbwertszeiten. Lediglich die Amplituden waren bei 19.7 bar  $O_2$  in den Rohkurven kleiner, wurden in der Abbildung aber in der Größe an die Kontrollmessung (schwarz, 1 bar Luft, 8  $\mu$ M Chl) angepaßt. MW aus 25 (rot) bzw. 30 (schwarz) Messungen. Zeitauflösung 10  $\mu$ s/Punkt.**

Zeitauflösung) wurden bereits in Abbildung 63 dargestellt. Hier wurden nur noch die ersten beiden Blitze unter repetierend-semidunkeladaptierten Bedingungen abgebildet (Abbildung 79). Bei 360 nm waren die ansteigenden Signale bei Kontrollen und  $O_2$ -Proben identisch mit Ausnahme der Amplitudengröße im ersten Blitz (siehe VIII.2.1). Die Kinetiken in den Blitzen waren aber unverändert (Abbildung 79) zwischen  $O_2$ -Probe und Kontrollmessung. Die Halbwertszeiten (59  $\mu$ s und 104  $\mu$ s) für die S-Übergänge nach dem ersten Blitz ( $S_1 \Rightarrow S_2$ ) und nach dem zweiten Blitz ( $S_2 \Rightarrow S_3$ ) entsprachen den Ergebnissen aus Kapitel VI. Dies zeigte, daß die Übergänge  $S_1 \Rightarrow S_2$  und  $S_2 \Rightarrow S_3$  durch den hohen Sauerstoffpartialdruck unbeeinflusst waren. Das galt ebenso für die abfallenden Signale nach den Blitzen 1 und 2. Eine Veränderung zeigte lediglich das abfallende Signal nach dem dritten Blitz, welches im Mittelpunkt der Suche nach dem Zwischenprodukt der Wasseroxidation steht und in Abschnitt VIII.2.1 ausführlich analysiert wurde.

ii) *Repetierend-semidunkeladaptierte Messungen bei 402 nm*

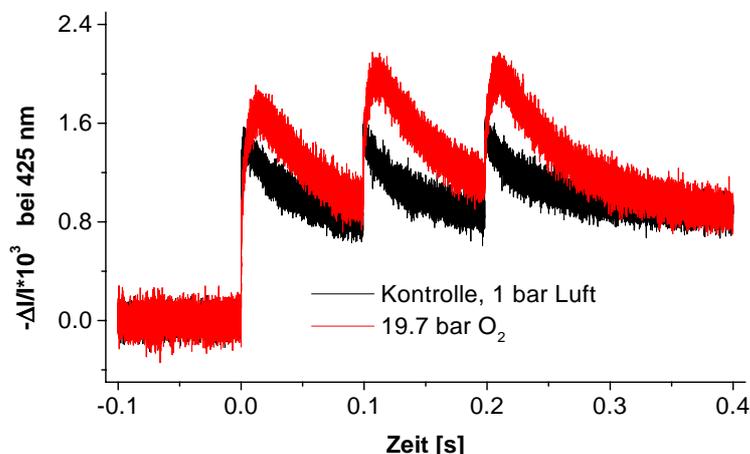
Bei 402 nm (FWHM = 6.5 nm) war das Differenzsignal zwischen Kontrollmessungen und



**Abbildung 80: Differenzsignal bei 402 nm.** Nahezu identischer Verlauf bei 19.6 bar O<sub>2</sub> (rot) und 1 bar Luft (schwarz). Die Kurven wurden auf den zweiten Blitz der Kontrolle (7.3 μM Chl) normiert. Ein charakteristischer Unterschied nach dem dritten Blitz, wie er bei 360 nm auftrat (Abbildung 63), war bei 402 nicht zu sehen. MW aus 30 (schwarz) bzw. 25 Messungen bei 10 μs/Punkt.

O<sub>2</sub>-Messungen im Rahmen des Signal/Rausch-Verhältnisses sehr ähnlich (Abbildung 80). Dies galt sowohl für den zeitlich nicht aufgelösten Anstieg als auch für die abfallenden Signale; also auch im dritten Blitz, wo bei 360 nm ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrollen und O<sub>2</sub>-Proben zu beobachten war. Innerhalb einer Serie waren die Signale nach Blitz #2 und #3 ebenfalls identisch, unterschieden sich aber bezüglich des abfallenden Signals vom abfallenden Signal nach dem ersten Blitz durch eine größere Amplitude. Der einzige deutliche Unterschied zwischen Kontrollen und O<sub>2</sub>-Proben war wiederum die unterschiedliche positive Amplitude des Signals nach dem ersten Blitz (vgl. Abbildung 27 und Abbildung 63). In diesem Fall war sie allerdings nach der Normierung auf den zweiten Blitz bei der O<sub>2</sub>-Probe größer als bei den Kontrollmessungen. Die abfallenden Signale waren dreiphasig mit Halbwertszeiten um 500 μs, 5 ms und 30 ms.

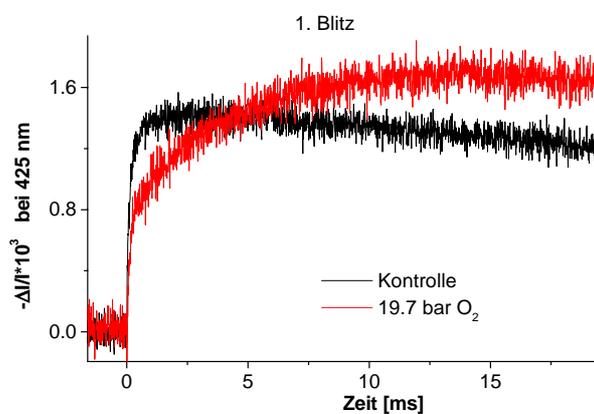
iii) *Repetierend-semidunkeladaptierte Messungen bei 425 nm*



**Abbildung 81: Differenzsignal bei 425 nm.** Die Signale bei 1 bar Luft (schwarz) und 19.7 bar O<sub>2</sub> unterschieden sich in allen drei Blitzen deutlich voneinander. Bei den O<sub>2</sub>-Messungen trat eine zusätzliche ms-Phase mit großem Δε im ansteigenden Signal auf. 10 μs/Punkt, MW aus 45 (Kontrolle) bzw. 40 Messungen (O<sub>2</sub>). Normiert auf 8 μM Chl.

Die vergleichenden, repetierend-semidunkeladaptierten Messungen bei 425 nm (FWHM 7 nm) lieferten ein völlig anders Ergebnis als bei 360 und 402 nm. Wie in Abbildung 81 zu sehen ist, unterschieden sich O<sub>2</sub>-Probe und Kontrollmessung in allen drei Blitzen deutlich voneinander. Dies wird durch die Vergrößerung der Signale nach dem ersten Blitz in Abbildung 82 hervorgehoben. Neben der unterschiedlichen Amplituden wurde deutlich, daß bei erhöhtem p(O<sub>2</sub>) von 19.7 bar eine neue langsame Phase mit großem Δε auftauchte. Bei der Kontrolle waren alle drei Blitze untereinander identisch (abgesehen von unterschiedlichen Gesamtamplituden, Tabelle 16). Die kinetische Analyse des ersten Blitzes wurde in Abbildung 83 dargestellt. Eine rechnerische Anpassung des ansteigenden Signals ergab eine Halbwertszeit von 104 μs. Das abfallende Signal war zweiphasig mit einer kleinen Phase ( $-\Delta I/I \cdot 10^3_{425\text{nm}} = 0.21$ ) mit  $\tau_{1/2} = 6$  ms und einer langsameren ( $\tau_{1/2} = 35$  ms) und größeren Phase ( $-\Delta I/I \cdot 10^3_{425\text{nm}} = 0.89$ ).

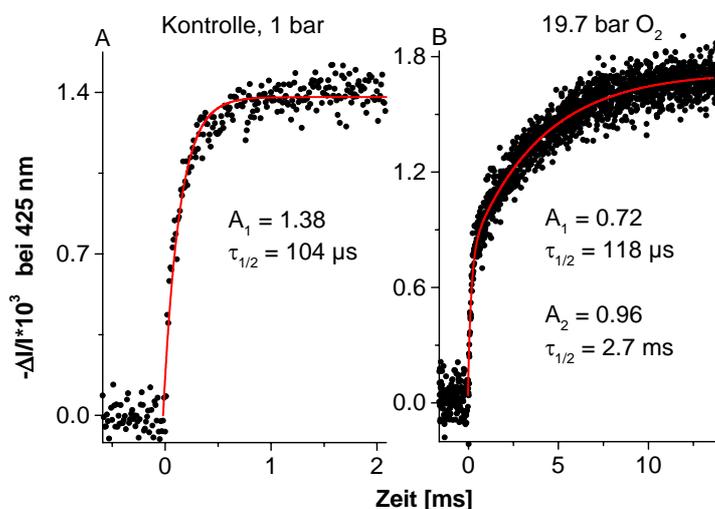
Die schnelle Phase des Anstiegs konnte unter 19.7 bar O<sub>2</sub> ebenfalls ermittelt werden (Abbildung 83 B). Sie hatte eine  $\tau_{1/2}$  von 118 μs, was im Rahmen des Signal/Rausch-Verhältnisses identisch war zur o.g. Kontrollmessung. Es lag jedoch noch eine zweite ansteigende, deutlich langsamere Phase über dieser ersten schnellen Phase. Die rechnerische Anpassung ergab eine Halbwertszeit von 2.7 ms und eine ausgesprochen große Amplitude  $-\Delta I/I \cdot 10^3_{425} = 1.68$ . Die Analyse des abfallenden Signals ergab nur eine große, langsame Phase mit  $\tau_{1/2} = 36$  ms, die der langsamen Phase der Kontrollmessung entsprach. Die kleine und schnelle ms-Phase des Abfalls (bei den



**Abbildung 82: Vergleich der Signale nach dem ersten Blitz bei 425 nm. Vergrößerung des ersten Blitzes aus Abbildung 81. Bei 19.7 bar O<sub>2</sub> taucht eine langsame neue Phase auf.**

Kontrollmessungen) konnte bei 19.7 bar O<sub>2</sub> nicht detektiert werden. Das lag wahrscheinlich daran, daß sie eine sehr kleine Amplitude hatte (Tabelle 16) und durch die vielfach größere langsame Phase des Anstiegs mit ähnlicher Halbwertszeit überlagert wurde. Die Ergebnisse der kinetischen Analyse wurden in Tabelle 16 zusammengefaßt und zeigen im Rahmen des nicht optimalen Signal/Rausch-Verhältnisses einheitliche Ergebnisse.

Der deutliche Unterschied zwischen Kontrollmessungen und O<sub>2</sub>-Proben war auch bei dunkeladaptierten Messungen (MW aus jeweils 2 Messungen) in allen drei Blitzen deutlich erkennbar, wurde aber wegen des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses nicht abgebildet. Dies belegte, daß der gemessene Unterschied kein Artefakt, resultierend aus den repetierend-semidunkeladaptierten Meßbedingungen, war, sondern vom ersten Blitz an, nach langer Dunkeladaptation, vorhanden war.



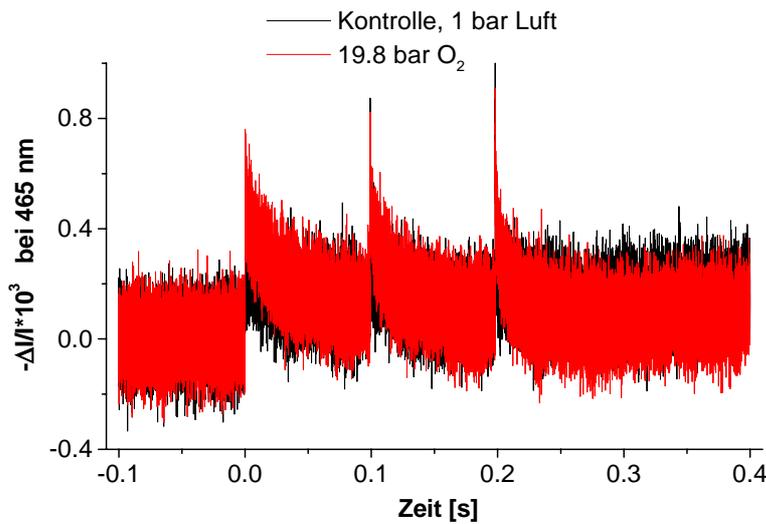
**Abbildung 83: Kinetische Analyse der Signale nach dem ersten Blitz. A) Kontrollmessung bei 1 bar Luft. Der Anstieg war einphasig mit  $\tau_{1/2} \approx 100 \mu\text{s}$ . MW aus 45 Messungen,  $10 \mu\text{s}/\text{Punkt}$ . B) 19.7 bar  $\text{O}_2$ . Zu der  $\mu\text{s}$ -Phase bei der Kontrollmessung kam eine langsame ms-Phase mit großem  $\Delta\epsilon$  hinzu.  $10 \mu\text{s}/\text{Punkt}$ , MW aus 40 Messungen. Beide Abbildungen wurden auf  $8 \mu\text{M}$  Chl normiert.**

**Tabelle 16: Kinetische Analyse der repetierend-semidunkeladaptierten Messungen bei 425 nm**

Probe	Anstieg 1. Blitz	Anstieg 2. Blitz	Anstieg 3. Blitz	Abfall 1. Blitz	Abfall 2. Blitz	Abfall 3. Blitz
Kontrolle, $8 \mu\text{M}$ Chl	$A_1 = 1.38$ $\tau_{1/2} = 104 \mu\text{s}$	$A_1 = 0.68$ $\tau_{1/2} = 111 \mu\text{s}$	$A_1 = 0.64$ $\tau_{1/2} = 111 \mu\text{s}$	$A_1 = 0.21$ $\tau_{1/2} = 6 \text{ ms}$ $A_2 = 0.68$ $\tau_{1/2} = 35 \text{ ms}$	$A_1 = 0.18$ $\tau_{1/2} = 7 \text{ ms}$ $A_2 = 0.46$ $\tau_{1/2} = 29 \text{ ms}$	$A_1 = 0.14$ $\tau_{1/2} = 8 \text{ ms}$ $A_2 = 0.41$ $\tau_{1/2} = 28 \text{ ms}$
19.7 bar $\text{O}_2$ , $8 \mu\text{M}$ Chl	$A_1 = 0.72$ $\tau_{1/2} = 118 \mu\text{s}$ $A_2 = 0.96$ $\tau_{1/2} = 2.7 \text{ ms}$	$A_1 = 0.32$ $\tau_{1/2} = 111 \mu\text{s}$ $A_2 = 0.81$ $\tau_{1/2} = 2.6 \text{ ms}$	$A_1 = 0.19$ $\tau_{1/2} = 111 \mu\text{s}$ $A_2 = 0.78$ $\tau_{1/2} = 2.6 \text{ ms}$	$A_1 = 1.4$ $\tau_{1/2} = 36 \text{ ms}$	$A_1 = 1.19$ $\tau_{1/2} = 33 \text{ ms}$	$A_1 = 1.21$ $\tau_{1/2} = 30 \text{ ms}$

*iv) Repetierend-semidunkeladaptierte Messungen bei 465 nm*

Bei 465 nm (FWHM 2 nm) war das Signal/Rausch-Verhältnis noch ungünstiger als bei den vorhergehenden Messungen, weil das Signal sehr klein war. Auf Grund des ausgeprägten Rauschbandes ließ sich lediglich feststellen, daß es keinen so deutlichen kinetischen Unterschied zwischen Kontroll- und  $\text{O}_2$ -Messungen (Abbildung 84) wie bei 425 nm gab. Die Amplituden bei den  $\text{O}_2$ -Messungen waren mit  $8.1 \mu\text{M}$  Chl ungefähr so groß wie mit  $6.6 \mu\text{M}$  Chl bei den Kontrollmessungen. Die ansteigenden Signale waren mit  $10 \mu\text{s}/\text{Punkt}$  nicht aufgelöst und nur als Sprung sichtbar. Die abfallenden Signale waren zweiphasig mit einer schnellen  $\mu\text{s}$ -Phase ( $\tau_{1/2}$  im Bereich von  $250 \mu\text{s}$ ) und einer langsamen ms-Phase mit einer Halbwertszeit von ca. 15 ms.

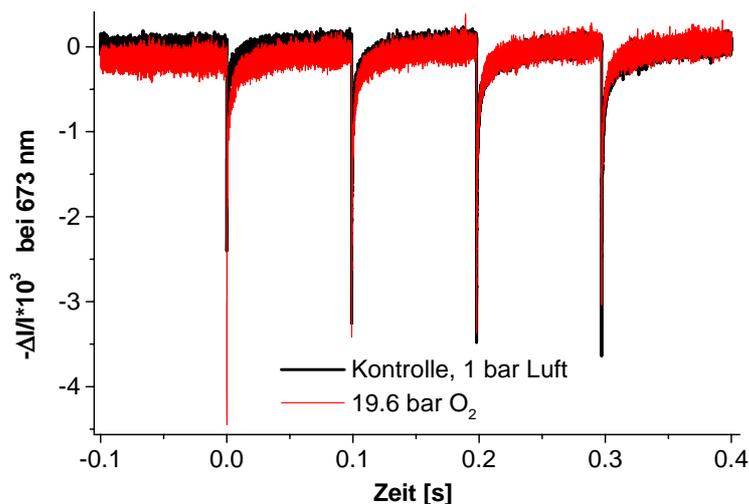


**Abbildung 84: Differenzsignal bei 465 nm. Kein deutlicher Unterschied bei Kontrollen (schwarz) und 19.8 bar O<sub>2</sub> (rot) sichtbar. MW aus 20 Messungen, 10 μs/Punkt und 6.6 μM Chl (Kontrolle) bzw. 8.1 μM (O<sub>2</sub>-Messungen)**

v) *Repetierend-semidunkeladaptierte Messungen bei 673 nm*

Bei 673 nm (FWHM 2 nm) wurden vier Blitze pro Meßserie aufgenommen. Da bei 673 nm der Beitrag der Fluoreszenz sehr groß ist (vgl. Abbildung 22) mußte das reine Fluoreszenzsignal von den Meßwerten abgezogen werden. Als Annäherung hierfür wurde eine Blitzserie aus vier Blitzen mit der jeweiligen Probe ohne Meßlicht aufgenommen. Diese Annäherung vernachlässigt eine ggf. abweichende Fluoreszenz bei anregendem Meßlicht (also bei den eigentlichen Messungen). Die Meßlichtintensität wurde deshalb niedrig gehalten, um möglichst identische Bedingungen zu haben.

Im ersten Blitz war die Amplitude identisch, aber in den nachfolgenden Blitzen war sie bei den O<sub>2</sub>-Proben ungefähr um die Hälfte verringert. Deshalb wurde in Abbildung 85 die rote

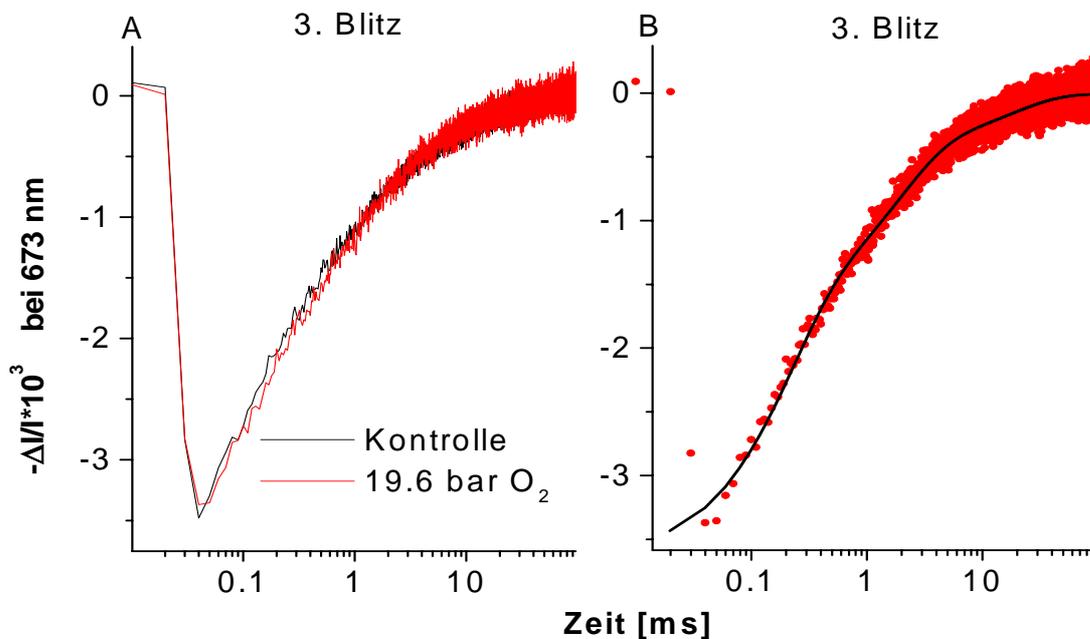


**Abbildung 85: Differenzsignal bei 673 nm von Kontrollmessungen (schwarz) und bei 19.6 bar O<sub>2</sub> (rot). Die Signale wurden auf den Auslauf des vierten Blitzes bei der Kontrolle (7.3 μM Chl) normiert. Mit Ausnahme der Amplituden (siehe Text) waren die Signale nahezu identisch. MW aus 15 (schwarz) bzw. 20 (rot) Messungen, 10 μs/Punkt.**

Transiente (19.6 bar O<sub>2</sub>) auf den Auslauf des vierten Blitzes der Kontrolle normiert. Die Kinetiken waren in allen Blitzen ähnlich. Der scheinbare Unterschied im ersten Blitz (Abbildung 85) lag in der unterschiedlichen Amplitude. Das abfallende Signal wurde nicht aufgelöst. Das ansteigende Signal war in Kontrollen und O<sub>2</sub>-Proben dreiphasig mit einer μs-Phase ( $\tau_{1/2} \approx 125 \mu\text{s}$ ), einer schnellen Millisekundenphase ( $\tau_{1/2} \approx 1.4 \text{ ms}$ ) und einer

langsamen ms-Phase ( $\tau_{1/2} \approx 15$  ms). Exemplarisch wurde eine genaue kinetische Analyse der Signale nach dem dritten Blitz in Abbildung 86 B abgebildet.

Der geringe Einfluß des Sauerstoffpartialdrucks auf die Signale bei 673 nm beweist, daß das deutlich veränderte Differenzsignal bei 425 nm [(siehe Punkt iii)] nicht auf ein Chlorophyll zurückzuführen war. Die Reduktion von  $P_{680}^{+}$ , wie sie in Abschnitt VIII.2.4 beschrieben wurde, konnte mit der hier verwendeten niedrigen Zeitaufösung von 10  $\mu$ s/Punkt nicht vollständig aufgelöst werden.



**Abbildung 86: Analyse der Signale nach dem dritten Blitz bei 673 nm. Logarithmische Darstellung A) Identischer Verlauf des Kontrollsignals (schwarz) und des Signals unter 19.6 bar  $O_2$  (rot). Amplituden normiert auf 8  $\mu$ M Chl (Kontrollmessung). B) Die rechnerische Anpassung (schwarze Linie) ergab ein dreiphasiges Signal mit  $A_1 = 1.9$  ( $\tau_{1/2} = 139$   $\mu$ s),  $A_2 = 1.2$  ( $\tau_{1/2} = 1.3$  ms) und  $A_3 = 0.4$  ( $\tau_{1/2} = 12.3$  ms). MW aus 15 (Kontrolle) bzw. 20 ( $O_2$ ) Messungen.**

Bei dieser ersten, relativ groben Analyse des Differenzspektrums ergab sich, daß sich die Differenzsignale bei 402, 465, 673 und 827 nm zwischen Kontrollproben und  $O_2$ -Proben im wesentlichen nicht in den Kinetiken unterschieden. Kleinere Unterschiede können ggf. nicht sichtbar gewesen sein, wegen des z.T. schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses. Den einzigen deutlichen Unterschied stellten kleinere Amplituden bei den  $O_2$ -Proben in den Blitzen 2 – 4 und i.d.R. eine nicht konforme Amplitude im ersten Blitz dar.

In Kontrast dazu zeigten Messungen bei 360 nm und 425 nm deutliche Unterschiede. Die bei 360 nm sichtbare Reduktion des OEC wurde durch hohen Sauerstoffdruck blockiert (vgl. VIII.2.1), wodurch die Signale nach dem dritten Blitz und nach dem fünften Blitz deutlich unterschiedlich waren. Bei 425 nm trat in allen drei Blitzen bei hohem Sauerstoffdruck ein neues Signal mit großer Amplitude und langsamer Halbwertszeit auf, das kein Chl-Molekül beschrieb [siehe oben, Punkt v)].

Die bisher gemessenen Daten der blitzinduzierten Absorptionsänderungen der S-Übergänge  $S_1 \Rightarrow S_2$  und  $S_2 \Rightarrow S_3$  bei den Wellenlängen 402 und 425 nm waren nicht präzise genug, um sie mit den aus der Literatur bekannten Spektrum ([Lavergne 91], Anhang XI.7) zu vergleichen.

## VIII.3 Diskussion

Die Diskussion wurde in drei Abschnitte unterteilt. Der erste Abschnitt befaßt sich mit dem Meßsystem und den Kontrollen. Im zweiten Teil werden die erhaltenen Ergebnisse mit Daten aus der Literatur verglichen. Im dritten Abschnitt, dem Kernstück dieses Kapitels, werden die Konsequenzen der Redoxtitration für den Mechanismus der Wasserspaltung diskutiert, gefolgt von einer abschließenden Betrachtung der Konsequenzen aus den hier durchgeführten Versuchen. Ein Unterkapitel (VIII.3.3.1) beschreibt den Versuch, die spektroskopischen Daten über die Progression eines weitgehend gehemmten *OEC* zu interpretieren.

### VIII.3.1 Definition des Meßsystems

Die Inkubation der PSII-Kernkomplexe unter erhöhtem Sauerstoffpartialdruck hatte deutlichen Einfluß auf die Größe des negativen Signals nach dem dritten Blitz. In der Kontrolle spiegelte dieses Signal die Reduktion des *OEC* vom höchsten Oxidationszustand  $S_4$  zum Ausgangszustand  $S_0$  unter Sauerstofffreisetzung wider. Eine Verringerung dieser negativen Amplitude reflektierte einen geringeren Anteil an Zentren, der diese Reduktion noch durchführte. Der Ansatz unseres Versuches, die spezifische Verschiebung des Gleichgewichts von Edukten und Produkten durch Erhöhung der Konzentration des Produktes Sauerstoff im letzten Reaktionsschritt, war also erfolgreich.

Die absolute Konzentration an gelöstem Sauerstoff in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck über der Lösung konnte zwar nicht direkt bestimmt werden (Abschnitt VIII.2.1.2), aber über Messungen mit unterschiedlicher Begasungsdauer des Meßpuffers in der Küvette, die alle identische Ergebnisse lieferten (Abbildung 57 B), war sichergestellt, daß der Puffer nach 10 min Begasung gesättigt war. Das stimmt mit den Angaben für ein vergleichbares System überein, bei dem die Gleichgewichtseinstellung zwischen gelöstem Sauerstoff und dem  $O_2$  der Gasphase innerhalb von 2 min beschrieben wird [Boveris und Chance 73]. Für verdünnte Lösungen konnte die Konzentration an gelöstem Sauerstoff über das *Henri*-Gesetz ermittelt werden, welches die Proportionalität des Gleichgewichtsdruckes einer Komponente  $p_i$  zur Konzentration derselben Komponente  $p_i$  in Lösung beschreibt ( $p_i * K_H \approx [p_i]$ ,  $K_H = \text{Henri-Konstante}$ ).

Zum Vergleich von Kontrollmessungen und  $O_2$ -inkubierten Proben (kurz „ $O_2$ -Proben“), mußten die Signale aufeinander normiert werden (siehe VIII.2.2.1). Eine Normierung auf die ermittelte Chl-Konzentration war nicht ratsam; denn durch die nachgewiesene, irreversible Schädigung (vgl. V.5.4) von ca. 30% der PSII-Kernkomplexe waren die Amplituden bei derselben Chl-Konzentration bei 20 bar  $O_2$  geringer als bei 1 bar Luft. Außerdem war die Bestimmung der Chl-Konzentration bei den verwendeten, geringen Mengen zu ungenau ( $\pm 2 \mu\text{M}$  Chl bei ca.  $8 \mu\text{M}$  eingesetztem Chl). Die Normierung auf den ersten Blitz war ungünstig, da die Schädigung (Seite 65) von Präparation zu Präparation unterschiedlich war (Abbildung 27) und keine einheitlichen Ergebnisse lieferte (siehe auch [Dekker *et al.* 84d; Hundelt 99; Lavergne 91]). Als beste Lösung wurde die Normierung auf die positive Amplitude des dritten Blitzes betrachtet. Diese zeigte in

Kontrollmessungen und O<sub>2</sub>-Proben lediglich einen hier zeitlich nicht aufgelösten Sprung, der die Q<sub>A</sub>-Reduktion (siehe V.3) beschrieb. Für alle weiteren Auswertungen galt dann die Annahme, daß dieselbe Anzahl von Zentren, die in Blitz #3 Q<sub>A</sub> und DCBQ reduzierte, auch nach Blitz #2 Q<sub>A</sub> und DCBQ reduziert hatte, so daß die Amplitude der DCBQ-Dismutation [Bögershausen 97] nach beiden Blitzen gleich groß war. Das war berechtigt, weil es keinen Grund zu der Annahme gab, daß die irreversible Schädigung von PSII-Kernkomplexen (siehe unten) durch hohen p(O<sub>2</sub>) nur spezifisch Zentren schädigte, die in S<sub>3</sub> vorlagen. Außerdem rechtfertigten die unveränderten Kinetiken und Amplitudenanteile der einzelnen Phasen der Reduktion von P<sub>680</sub><sup>+</sup> bei 20 bar O<sub>2</sub> (Abschnitt VIII.2.4) die oben gemachten Annahmen unveränderter akzeptorseitiger Reaktionen.

Wie in Abbildung 69 B beschrieben, war der S-Übergang S<sub>2</sub> ⇒ S<sub>3</sub> als Absatz nach der Differenzbildung aus dem dritten und zweiten Blitz sichtbar. Dieser Übergang hat eine Halbwertszeit von ca. 100 µs (Abbildung 79 und Kapitel VI) und war deshalb bei der hier gewählten Zeitauflösung (50 µs/Punkt) und digitalen Glättung über fünf Punkte nicht aufgelöst und konnte als Sprung vom Differenzsignal subtrahiert werden, ohne die Kinetik für den Übergang S<sub>4</sub> → S<sub>0</sub> zu beeinflussen, der eine wesentlich langsamere Halbwertszeit von τ<sub>1/2</sub> ≈ 1.3 ms hat (Kapitel VI und VII, Abbildung 65).

Die Inkubation der PSII-Kernkomplexe bei erhöhtem p(O<sub>2</sub>) schädigte nur zu einem geringen Anteil die PSII-Kernkomplexe dauerhaft (ca. < 30%, Abschnitt V.7 b). *Die Verringerung der negativen Amplitude nach dem dritten Blitz, als Meßgröße der Redoxtitration (Abbildung 67), war kein Resultat aus einer irreversiblen Zerstörung des OEC durch die hohe Sauerstoffkonzentration.* Dafür sprach bereits die Unabhängigkeit der Verringerung von ΔX (siehe VIII.2.2.1) von der Dauer der Sauerstoffinkubation (Abbildung 57). Bewiesen wurde die Reversibilität durch spektroskopische Messungen mit zuerst bei 20 bar O<sub>2</sub> inkubierten und dann wieder entgasten PSII-Kernkomplexen (Abbildung 58, Abbildung 66).

*Der hohe Druck allein veränderte das Oszillationsmuster nicht (mit Ausnahme des Signals nach dem ersten Blitz, Abbildung 60).* Dies war in Übereinstimmung mit Literaturdaten, die reine Druckeffekte auf Proteine erst bei wesentlich höheren Drücken (kbar) beschreiben: Die Entfaltung einzelkettiger Proteine setzt erst bei einem hydrostatischen Druck von 3000 bis 6000 bar ein (viele Zitate in [Ruan *et al.* 03]). Das 33-kDa-Protein aus Photosystem II liegt erst bei einem Druck von ca. 1700 bar vollständig entfaltet vor [Ruan *et al.* 03]. Auch die Sauerstofffreisetzung von BBY ist bei einem hydrostatischen Druck von 150 bar unverändert, und erst bei einer Exposition von 2500 bar für 150 min wird die Struktur von PSII geschädigt [Yu *et al.* 01]. Die Sauerstoffentwicklung von Algen beträgt bei ≈ 200 bar hydrostatischem Druck noch ungefähr 80–90% der Aktivität bei 1 bar Luft [Pope und Berger 73a; Pope und Berger 73c].

*Die veränderten Signale bei 360 nm waren auch kein Resultat einer pH-Verschiebung, hervorgerufen durch die erhöhte O<sub>2</sub>-Konzentration im Puffer, da der pH-Wert nach der O<sub>2</sub>-Inkubation unverändert war (Seite 118).* Ein scheinbarer Schwachpunkt der pH-Messung war, daß die Küvette hierzu aus der Druckkammer herausgenommen werden mußte, so daß der Sauerstoff theoretisch hätte entweichen können. Hierzu ist anzumerken, daß der O<sub>2</sub>-Gehalt in der Küvette noch nach dem Öffnen der Kammer extrem erhöht war, wie ein anschließendes Rühren der Lösung in der Küvette zeigte. Kurz nach Beginnen des Rührens kochte die Lösung in der Küvette auf. Dies ist auf den extremen Siedeverzug zurückzuführen, wenn sich die Lösung in der glattgeschliffenen, staubteilchenfreien Küvette befindet. Dieses Verhalten ist aus der Brauereiwirtschaft bekannt. Beim Öffnen der Druckkammer lag in der Küvette eine übersättigte Lösung vor. Obwohl der Sauerstoff auf Grund der Thermodynamik das Bestreben hat, aus der gelösten Form auszuperlen, ist die Bläschenbildung unwahrscheinlich, da sie mit kleinen Blasen anfangen muß. Der

Druck in diesen winzigen Blasen kann bei einem Durchmesser von nur 0.1  $\mu\text{M}$  etwa 30 bar betragen. Da die Löslichkeit von Gasen mit zunehmendem Druck wächst (Henri-Gesetz), wird das Gas ebenso schnell wieder in Lösung zurückgeführt, wie es austritt. Bläschenbildung kann deshalb nur an Staubteilchen, an Salzkristallen an den Wänden, an Oberflächenunregelmäßigkeiten und Kratzern stattfinden. Alles drei war im Fall der Küvette nicht gegeben (mit Ethanol gespült, glatt geschliffen). Solche „Keimbereiche“ sind wasserabstoßend und lassen Gaseinschlüsse wachsen, ohne daß sich anfangs winzige Blasen ausbilden. Sobald dann ein Gaseinschluß eine kritische Größe erreicht hat, stülpt er sich aus und rundet sich zu einer richtigen gewölbten Blase, deren Krümmungsradius so groß ist, daß es nicht zum Zusammenbruch kommt. Außerdem tritt dabei noch ein Kaskadeneffekt auf. Wenn die Zahl der Bläschen einen bestimmten Wert pro Volumeneinheit übersteigt, stellt dies eine physikalische Störgröße dar („neue Keimbereiche“), die noch mehr Bläschen freisetzt. Dies wurde in der Küvette erst nach heftigem Rühren erreicht.

Nach Normierung war die positive Amplitude der Signale bei 360 nm (bei 20 bar  $\text{O}_2$ ) nach dem ersten Blitz i.d.R. deutlich kleiner als bei den Kontrollen (Abbildung 63), während sie im zweiten und dritten Blitz bei Kontrollen und  $\text{O}_2$ -Proben identisch war. Die positive Amplitude nach dem ersten Blitz wurde also stärker beeinträchtigt. Wie bereits erklärt (Seite 65), tragen auf den ersten Blitz auch diejenigen PSII-Kernkomplexe zum Signal bei, die donatorseitig inaktiviert sind und im Zeitraum der Meßdauer nur einmal  $Q_A$  reduzieren. Die verringerte Amplitude nach dem ersten Blitz könnte bedeuten, daß die bei Kontrollmessungen labilen Zentren, mit nur einer akzeptorseitigen Reaktion im ersten Blitz, durch die  $\text{O}_2$ -Behandlung vollständig zerstört werden und bei 20 bar  $\text{O}_2$  nicht mehr zum Signal beitragen, was zur unverhältnismäßig kleinen Amplitude nach dem ersten Blitz führte. Neben der Elektronentransportrate sank auch die Amplitude von  $P_{680}^{+\bullet}$  bei 20 bar  $\text{O}_2$  auf ca. 70% ab. Beide Messungen sind nicht blitzabhängig, da sie im Dauerlicht oder repetierend durchgeführt wurden. Der Mechanismus der Schädigung wurde nicht weiter untersucht, könnte aber mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder anderen Sauerstoffverbindungen zusammenhängen. Für isolierte Mitochondrien wird berichtet, daß die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion bei erhöhtem Sauerstoffpartialdruck deutlich ansteigt und bei ca. 20 bar noch keine Sättigung erfährt. Allerdings hängt diese  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion vom Vorhandensein einer (zumindest teilweise) intakten Elektronentransportkette (Atmungskette) und eines reduzierten Substrates ab [Boveris und Chance 73]. Beides war in den hier beschriebenen Versuchen nicht der Fall. Bei pH 6.7 beträgt das Mittenpotential von  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons 2 \text{H}^+ + 2\text{O}_2 + 2\text{e}^-$  ungefähr 0.29 V. Das Redoxpotential des Puffers wurde nicht extra bestimmt, aber es wurde kein expliziter Elektronendonator hinzugegeben, so daß die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf diesem Wege wahrscheinlich vernachlässigt werden konnte.

Die direkte Reaktion von Wasser mit Sauerstoff ( $2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}_2\text{O}_2$ ) ist ebenfalls ungünstig, weil stark endotherm ( $\Delta_R H_m^0 = 196.2 \text{ kJ/mol}$ ). Das Gleichgewicht liegt auf der Seite der Edukte. Durch Erhöhung der Konzentration steigt natürlich auch die Gleichgewichtskonzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aber wahrscheinlich nicht derart signifikant, daß sie allein für die Inaktivierung von ca. 30% der Zentren verantwortlich ist. Noch sauerstoffreichere Wasserstoffverbindungen  $\text{H}_2\text{O}_n$  entstehen unter den hier herrschenden Bedingungen nicht [Holleman und Wiberg 85].

Gefährliche Sauerstoffverbindungen können aber nicht allein durch o.g. Reaktionen entstehen. Unter Belichtung kann der endogene, reduzierte Elektronenakzeptor Ferredoxin mit Sauerstoff eine Autoxidation durchführen, wodurch letztendlich Sauerstoff verbraucht wird und  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht. Informationen darüber, ob der hier verwendete künstliche Akzeptor 2,5-DCBQ auch die Autoxidation mit  $\text{O}_2$  durchführen kann, wurden nicht gefunden. Für andere künstliche Elektronenakzeptoren (z.B. Methylviologen) wird dies

aber in der Literatur beschrieben [Trebst 99]. Von besonderer Bedeutung ist die lichtabhängige Produktion von Superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), da in der photosynthetischen Elektronentransportkette fast alle Reaktionen 1-Elektronen-Transfer-Schritte sind. Superoxid wird durch die Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt und letzteres wird durch die Katalase zu Wasser und Sauerstoff entgiftet. Beide Enzyme sind in den PSII-Kernkomplex-Präparationen nicht mehr vorhanden. Sowohl  $H_2O_2$  als auch Superoxid können Hydroxyl- und Alkoxyradikale bilden, die für Proteine und Kofaktoren extrem schädlich sind und die oxidative Schädigung von PSII verursachen [Mishra *et al.* 93; Richter *et al.* 90; Tschiersch und Ohmann 93].  $H_2O_2$  zerstört außerdem direkt den Mn-Komplex (beschrieben in [Zhang *et al.* 03]).

Eine weitere gefährliche Sauerstoffverbindung, die unter Belichtung entsteht, ist Singulett-Sauerstoff. Angeregte Chlorophylle können mit gewisser (wenn auch geringer) Wahrscheinlichkeit durch Interkombination (engl. *Intersystem crossing*) vom Singulettzustand in den Triplettzustand übergehen. Triplettzustände haben große Halbwertszeiten, und es kann zu Wechselwirkung mit Triplett-Sauerstoff kommen („Sensibilisierung“), wodurch Singulett-Sauerstoff entsteht, der oxidative Zerstörungen von Proteinen, Pigmenten, Membranen usw. verursacht [Anderson 01].

Der Anteil der o.g. aggressiven Sauerstoffverbindungen an der hier beobachteten Schädigung von ca. 30% ist aber wahrscheinlich vernachlässigbar, da die PSII-Kernkomplexe bis zur ersten Meßreihe in völliger Dunkelheit gehalten wurden, so daß die lichtabhängige Produktion dieser Verbindungen durch die 5 Blitze nur in geringem Umfang erfolgen konnte. Ohnehin kann die deutlich verringerte Amplitude im ersten Blitz nicht auf lichtabhängige Reaktionen zurückzuführen sein.

Die irreversible Schädigung der PSII-Kernkomplexe bei hohem Sauerstoffdruck beruht daher wahrscheinlich auf oxidativer Schädigung durch direkte Oxidations-Reaktionen mit  $O_2$  einer Untermenge (durch die Präparation) vorgeschädigter Zentren. Das könnten z.B. lokale konformationelle Änderungen sein, die  $O_2$  eine bessere Zugänglichkeit zu kritischen Orten in PSII ermöglichen. Daß die oxidative Schädigung nur eine Subpopulation im Ensemble betrifft, ist im Einklang mit den Ergebnissen aus VIII.2.1, die nahelegen, daß (zumindest im Zeitraum von 10 – 30 min Inkubation) die Schädigung der PSII-Kernkomplexe nicht zeitabhängig fortschritt. Auch die Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  bei 20 bis 80 min Chl-Inkubation unter 20 bar  $O_2$  lieferte zeitunabhängige, nahezu identische Signale [Abschnitt VIII.2.4 *i*) und *iii*]).

Anschließend soll noch angemerkt werden, daß Sauerstoff nicht alleine zerstörerische Wirkung auf PSII hat. Sauerstoff spielt im Gegenteil eine wichtige Rolle beim Schutz von PSII bei hohen Lichtintensitäten. Kommt es auf Grund einer hohen Photosyntheseleistung und starker Belichtung (Schließung der Stomata) zum Mangel an  $CO_2$ , kann  $O_2$  als alternativer Elektronenakzeptor fungieren und PSII vor Lichtschäden bewahren [Ort und Baker 02].

Die Veränderungen des Oszillationsmusters nach dem dritten Blitz (Abbildung 63) bei 20 bar  $O_2$  waren keine Folge einer Voroxidation der PSII-Kernkomplexe durch die erhöhte Sauerstoffkonzentration. Dies wurde auf dreierlei Weise gezeigt:

1. Wäre die Verringerung der negativen Amplitude im dritten Blitz allein ein Resultat aus der vollständigen oder partiellen Voroxidation der PSII-Kernkomplexe nach  $S_2$  oder  $S_3$  im dunkeladaptierten Zustand gewesen, hätte die negative Amplitude nach dem zweiten Blitz bzw. nach dem ersten Blitz bei  $O_2$ -Proben vergrößert sein müssen. Ein Vergleich zwischen Kontrollmessungen und  $O_2$ -Proben zeigte, daß dies nicht der Fall war (Abbildung 59). Die Amplituden der abfallenden Signale nach dem zweiten Blitz waren bei Kontrollmessungen und  $O_2$ -Proben identisch oder geringfügig kleiner bei  $O_2$ -Proben (Tabelle 13), aber nicht vergrößert.

2. Dies schloß natürlich nicht generell die Voroxidation des Systems aus. Schließlich war es das Ziel dieser Versuche, den Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  zu hemmen. Es hätte also sein können, daß die Zentren bei 20 bar  $O_2$  nach  $S_2$ , nach  $S_3$  oder gleich verteilt in alle S-Zustände voroxidiert worden wären, ohne daß dies anhand einer vergrößerten (weil vollständig gehemmten) negativen Amplitude nach dem zweiten Blitz erkennbar gewesen wäre. Das Gegenteil belegte Abbildung 60. Die negative Amplitude nach dem dritten Blitz war gegenüber den ersten beiden Blitzen erhöht. Nach dem dritten Blitz liefen also andere Reaktionen (DCBQ-Dismutation + „Restreaktion  $S_4 \rightarrow ?$ “; siehe VIII.3.3) ab als nach dem ersten und zweiten Blitz (nur DCBQ-Dismutation). Wäre das System also zumindest partiell voroxidiert gewesen, hätte die negative Amplitude im ersten oder zweiten Blitz (Abbildung 59, siehe Punkt 1.) bei 20 bar  $O_2$  also größer sein müssen. Da dies nicht der Fall war, war dies ein weiterer Beleg dafür, daß die PSII-Kernkomplexe auch bei 20 bar  $O_2$  im unveränderten dunkeladaptierten Zustand von  $S_1/S_0 = 70 / 30$  vorlagen und ein Teil nach dem dritten Blitz den Übergang  $S_3 \Rightarrow S_4 \rightarrow S_0$ , zumindest noch partiell, durchlaufen konnte. Die Reaktionen nach dem dritten Blitz konnten demnach auch bei ca. 30 bar  $O_2$  nicht vollständig inhibiert werden, was der erste Hinweis auf ein Zwischenprodukt des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  war (siehe unten). Einschränkend muß erwähnt werden, daß bei einigen Meßreihen auch bereits nach dem zweiten Blitz die negative Amplitude gegenüber dem ersten Blitz vergrößert war. Dies war aber bei Kontrollmessungen genauso der Fall (Tabelle 13).

3. Die Analyse mit repetierenden Messungen bei 360 nm bewies, daß die ansteigenden Signale im ersten und zweiten Blitz zwischen Kontrollen und  $O_2$ -Proben dieselbe Kinetik hatten (Abbildung 79). Folgend auf den schnellen Sprung der  $Q_A$ -Reduktion (vgl. Abschnitt V.3 und Kapitel VI) liefen auch bei 20 bar  $O_2$  die Reaktionen  $S_1 \Rightarrow S_2$  und  $S_2 \Rightarrow S_3$  nach dem ersten bzw. zweiten Blitz in Mikrosekunden ab. Nach dem dritten Blitz hatte das ansteigende Signal bei 20 bar keine  $\mu s$ -Phase, die einen Hinweis auf Zentren mit den Übergängen  $S_1 \Rightarrow S_2$  oder  $S_2 \Rightarrow S_3$  gegeben hätte, sondern zeigte ausschließlich den positiven Sprung durch die  $Q_A$ -Reduktion und den mehrphasigen Abfall. Wären die PSII-Kernkomplexe durch den hohen  $O_2$ -Druck bereits im Dunkeln desynchronisiert gewesen, hätten sich die Kinetiken zwischen Kontrollen und  $O_2$ -Messungen unterscheiden müssen.

Die Dunkelverteilung von PSII-Präparationen wird in der Regel entweder über die Blitzabhängigkeit der Sauerstoffproduktion [Clausen *et al.* 01b; Haumann und Junge 94; Hundelt *et al.* 98a; Messinger und Renger 94] oder über den blitzabhängigen Anteil an ms-Phasen am abfallenden Signal [Bögershausen und Junge 95] bestimmt - also gerade die Reaktionen, die in diesem Versuchsansatz gehemmt wurden. Dennoch ließen die identischen Halbwertszeiten der ansteigenden Signale nach dem ersten und zweiten Blitz und die geringfügig größere negative Amplitude nach dem dritten Blitz unter 20 bar  $O_2$  darauf schließen, daß die Dunkelverteilung wie bei 1 bar Luft war. Eine Analyse mit dunkeladaptierten PSII-Kernkomplexen könnte theoretisch die Blitzabhängigkeit der 50- und 100  $\mu s$ -Phase bei 20 bar  $O_2$  überprüfen und damit die Dunkelverteilung genau bestimmen. Allerdings wäre dies auf Grund der benötigten hohen Zeitauflösung nur mit einer Vielzahl von Messungen (ca. 100) eindeutig nachweisbar, was bei einem Zeitaufwand von ca. 1 Stunde pro Messung nicht zu rechtfertigen ist. Zur Bestimmung der Blitzabhängigkeit der Millisekundenphase ( $S_4 \rightarrow S_0$ ) hätte zwar mit niedrigerer Zeitauflösung gemessen werden können, dafür hätte aber die kleine Signalamplitude bei 20 bar (Abbildung 65) ein schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis zur Folge gehabt, so daß der Meßaufwand ähnlich groß geblieben wäre. *Für die Auswertung wurde die auf Grund der oben genannten Ergebnisse (Punkte 1. – 3.) berechnete Annahme zu Grunde gelegt, daß bei 20 bar  $O_2$  die Dunkelverteilung der S-Zustände ( $S_0 \dots S_3$ ) unverändert zu PSII-Kernkomplexen bei 1 bar Luft war (70%  $S_1$  / 30%  $S_0$ ).*

Ursprünglich war für die Versuche mit erhöhtem Sauerstoffpartialdruck ein Zeitraum von drei Jahren vorgesehen. Durch die Verzögerungen bei der Herstellung der Geräte und die zwischenzeitliche Arbeit an anderen Projekten standen effektiv nur ca. 1 ½ Jahre für diese Messungen zur Verfügung. Das hatte zur Folge, daß oftmals nicht viele Wiederholungen einzelner Messungen durchgeführt werden konnten (vgl. Tabelle 14) und daß das Signal/Rausch-Verhältnis z.T. relativ schlecht war (z.B. Abbildung 65 C, Abbildung 84). In den letzten Tagen praktischer Laborarbeit wurden noch einige apparative Neuerungen eingeführt, so daß zukünftige Messungen wahrscheinlich noch genauere Ergebnisse liefern werden. Es wurde ein neuer Sekundärelektronenvervielfacher angeschafft, der bei 360 nm eine höhere Sensitivität hat, so daß in Zukunft Messungen mit besserem Signal/Rausch-Verhältnis möglich sind. Für Messungen bei 295 nm wurde eine andere Meßlichtquelle reaktiviert, die zusammen mit dem neuen, sensitiveren Sekundärelektronenvervielfacher wahrscheinlich auch Messungen bei 295 nm erlauben wird und damit die direkte Beobachtung des Redoxverhaltens von Tyrosin Z. Außerdem wurde ein neues System zur Injektion des Puffers in die Küvette unter Hochdruck entwickelt. Wenn dies funktioniert, könnte der Zeitbedarf pro Messung ggf. um die Hälfte verringert werden.

### VIII.3.2 Vergleich der Ergebnisse mit Literaturwerten

#### *i) Halbwertszeiten der S-Übergänge bei erhöhtem Sauerstoffdruck*

Die Halbwertszeiten für die S-Übergänge sind in der Literatur reichlich beschrieben worden (vgl. Abschnitt VI.2). In dieser Arbeit wurden sie zusätzlich unter 20 bar O<sub>2</sub> gemessen. Die hier ermittelten Halbwertszeiten für die Übergänge S<sub>1</sub> ⇒ S<sub>2</sub> (τ<sub>1/2</sub> = 59 μs) und S<sub>1</sub> ⇒ S<sub>2</sub> (τ<sub>1/2</sub> = 104 μs) stimmten mit Ergebnissen aus den Kontrollmessungen bei 1 bar Luft und mit früheren Daten [Clausen *et al.* 01b; Saygin und Witt 87] überein. Die Absorptionsänderungen durch diese beiden Übergänge waren nahezu gleich groß: das Verhältnis der differentiellen, molaren Extinktionskoeffizienten (Δε<sub>S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub></sub> / Δε<sub>S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub></sub>) betrug 1.1. Dasselbe Verhältnis wird bei [Haumann *et al.* 96] beschrieben. Bei [Dekker 92; Lavergne 91] sind die beiden Absorptionsänderungen bei 360 nm identisch mit einem Verhältnis von 1. *Der erhöhte Sauerstoffdruck hatte also keinen Einfluß auf die Kinetiken der S-Übergänge S<sub>1</sub> ⇒ S<sub>2</sub> und S<sub>2</sub> ⇒ S<sub>3</sub>.* Außerdem war die Anzahl an Zentren, die nach dem zweiten Blitz S<sub>2</sub> ⇒ S<sub>3</sub> durchliefen, unverändert zur Anzahl an Zentren, die S<sub>1</sub> ⇒ S<sub>2</sub> nach dem ersten Blitz durchlaufen hatten. Lediglich die Gesamtamplituden waren durch vollständige Schädigung einiger Zentren verringert.

Für den Übergang S<sub>4</sub> → S<sub>0</sub> ergaben sich ebenfalls Halbwertszeiten, die im Bereich der aus der Literatur bekannten Werte (Abschnitt VII.2, [Clausen *et al.* 04]) lagen. In Abbildung 65 wurden mit monoexponentiellen Anpaßfunktionen Halbwertszeiten von 1.5 – 0.8 ms ermittelt. Das Signal/Rausch-Verhältnis bei 19.8 bar (Abbildung 65 C) war relativ schlecht und sollte mit weiteren Messungen verbessert werden. In Abbildung 67 D war das abfallende Signal durch die digitale Glättung ungünstig verändert, so daß der Zerfall langsamer erschien. Die Abbildungen A, B und C bzw. die kinetischen Analysen (s.o.) belegten aber das Gegenteil. Die Kinetik des Übergangs S<sub>4</sub> → S<sub>0</sub> wurden in Abschnitt VIII.3.3 genauer erläutert.

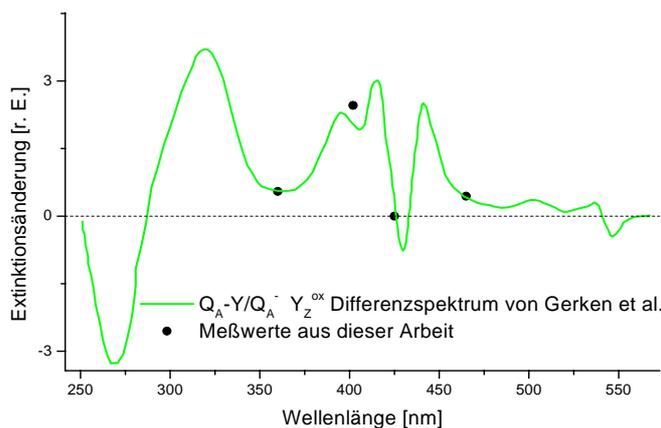
ii) Diskussion des  $Q_A Y_Z^{ox} / Q_A \cdot Y_Z$ -Differenzspektrums

Nach jedem Blitz war bei 360 nm (bei 1 bar Luft und 20 bar  $O_2$ ) als erstes der schnelle, zeitlich nicht aufgelöste Sprung der  $Q_A$ -Reduktion bzw. der Reduktion von 2,5-DCBQ erkennbar. Auch in den Differenzsignalen bei 402, 465 und 673 war ein schneller Sprung sichtbar, der deshalb als Annahme ebenfalls im wesentlichen dem  $Q_A/Q_A \cdot$  Differenzsignal zugeordnet wurde. In Abbildung 87 wurde das Differenzspektrum von  $Q_A Y_Z / Q_A \cdot Y_Z^{ox}$  aus [Gerken *et al.* 89] mit den Amplituden aus den Kontrollmessungen verglichen. Die Amplitude des schnellen Sprungs aus

**Tabelle 17:  $-\Delta I/I \cdot 10^3$  des schnellen Sprungs bei 8  $\mu M$  Chl in Kontrollproben in Abhängigkeit von  $\lambda$**

	360 nm	402 nm	425 nm	465 nm	673 nm
$-\Delta I/I \cdot 10^3$	1.04	4.65	0	0.84	-2.64

den spektroskopischen Messungen (Tabelle 17) wurde auf das  $\Delta \epsilon$  von [Gerken *et al.* 89] bei 360 nm normiert. Tendenziell stimmten die Werte gut überein, was die o.g. Annahme rechtfertigte. Nur bei 425 nm ergab sich hier ein Wert von Null, während Gerken *et al.* einen positiven Wert angeben. Allerdings verläuft das Differenzspektrum um diese



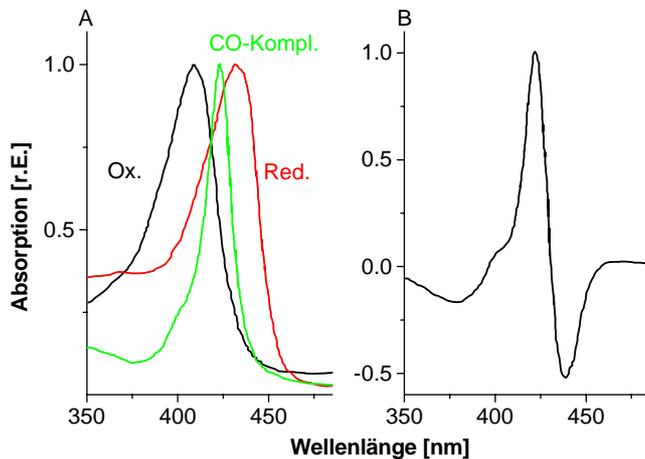
**Abbildung 87: Vergleich des Differenzspektrums von  $Q_A Y_Z / Q_A \cdot Y_Z^{ox}$  aus [Gerken *et al.* 89] mit den Differenzamplituden des schnellen Sprungs aus den spektroskopischen Messungen von Abschnitt VIII.2.5.**

Wellenlänge herum sehr steil von positiven zu negativen Extinktionsänderungen. Mit der FWHM von 7 nm des hier verwendeten Interferenzfilters war eine so genaue Messung wie bei [Gerken *et al.* 89] nicht möglich. Die Steilheit der Absorptionsänderung um diese Wellenlänge herum wird auch darin deutlich, daß in anderen  $Q_A/Q_A \cdot$  Differenzspektralen  $\Delta \epsilon$  bei 425 nm bereits stark negativ [Metz *et al.* 89; Schatz und van Gorkom 85] oder Null ist [Dekker *et al.* 84c]. Ein negativer Sprung hätte bei den hier durchgeführten Messungen nicht aufgelöst werden können,

weil der Blitzdurchschlag bei dieser Wellenlänge auf Grund ungünstiger Filterkombinationen sehr mächtig war und eventuelle, negative Signale überlagert hätte. Bei der Subtraktion der Blitzartefakte wären dann möglicherweise vorhandene, negative Signale bei dieser Wellenlänge entfernt worden. Das Differenzspektrum von  $Q_A Y_Z / Q_A \cdot Y_Z^{ox}$  bei 673 nm ist bei [Gerken *et al.* 89] nicht mehr beschrieben. Bei [Hillmann und Schlodder 95; van Gorkom 74; Haumann *et al.* 96; Schatz und van Gorkom 85] werden ebenfalls negative Werte angegeben. Insgesamt bleibt festzuhalten, daß diese ersten, groben Messungen eines Differenzspektrums auf Grund des z.T. schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses (besonders 465 nm) und der z.T. ungünstigen Filterkombinationen (große Blitzdurchschläge) noch wesentlich verbessert werden können. *Trotzdem konnte das  $Q_A/Q_A \cdot$ -Differenzspektrum im wesentlichen reproduziert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß beim Großteil der hier untersuchten Wellenlängen Kontrollproben (bei 1 bar Luft) und  $O_2$ -Proben (bei 20 bar  $O_2$ ) identisch waren. Das bedeutete einerseits, daß PSII im wesentlichen trotz der  $O_2$ -Behandlung intakt*

blieb und andererseits, daß es bei den untersuchten Wellenlängen keinen Hinweis auf das stabilisierte Intermediat gab [mit Ausnahme der Wellenlängen 360 und 425 nm; siehe Punkt iii)].

iii) Bedeutung der nur bei 20 bar  $O_2$  beobachteten Millisekundenphase (425 nm)



**Abbildung 88: Spektren des Häm-Proteins Myoglobin zwischen 350 und 485 nm. A) Absorptionsspektren (im Peak normiert auf 1) der oxidierten reduzierten und CO-komplexierten Form von Myoglobin. Die a-Banden lagen bei 579 nm (Ox.), 555 nm (Red.) und 542 und 578 nm (CO-komplexiert). B) Differenzspektrum von 10  $\mu$ M CO-komplexiertem Myoglobin und reduziertem Myoglobin (normiert auf 1)**

$\Delta\epsilon$  vom  $Q_A/Q_A^{\bullet}$ -Differenzspektrum ist bei 402 nm größer als bei 425 nm [Dekker *et al.* 84c; Gerken *et al.* 89; Haumann *et al.* 96; Metz *et al.* 89; van Gorkom 74] (siehe auch Abbildung 87). Es konnte sich hierbei aber auch nicht um das gesuchte Intermediat „B“ des Übergangs  $S_3 \Rightarrow S_4 \rightarrow B \rightarrow S_0$  handeln, weil die langsame Phase auch bei dunkeladaptierten Messungen bereits nach dem ersten und zweiten Blitz erkennbar war (trotz des mittelmäßigen Signal/Rausch-Verhältnisse bei zwei Messungen). Die gleiche Begründung gilt für den Übergang  $S_0 \Rightarrow S_1$ , dessen Differenzsignal bei 425 nm eine positive Spitze zeigt [Lavergne 91]. Das  $\Delta\epsilon$  der Übergänge  $S_1 \Rightarrow S_2$  und  $S_2 \Rightarrow S_3$  bei dieser Wellenlänge ist Null [[Lavergne 91] und Anhang XI.7]. Die hier beobachtete, langsame Phase beschrieb also einen Vorgang, der aus unterschiedlichen Startbedingungen im dunkeladaptierten Zustand von Kontrollproben und  $O_2$ -Proben resultierte. Tyrosin Z konnte ebenfalls nicht der Verursacher dieser Phase sein. 1. ist  $\Delta\epsilon$  von  $Y_Z/Y_Z^{ox}$  bei 425 nm  $\approx 0$  [Gerken *et al.* 89; Haumann *et al.* 99] und 2. hätte eine verlangsamte Reduktion von  $Y_Z^{ox}$  durch den OEC erst auf den vierten Blitz auftreten können, weil die S-Übergänge  $S_1 \Rightarrow S_2$  und  $S_2 \Rightarrow S_3$  unverändert waren. Vor den ersten drei Blitzen lag Tyrosin Z also immer in der reduzierten Form vor. Die Identität des Verursachers der langsam ansteigenden Intensitätsänderung konnte bisher nicht geklärt werden. Im folgenden werden weitere potentielle Verursacher diskutiert:

Ein möglicher Kandidat wäre eine Häm-Gruppe. Häm-Proteine haben einen großen Extinktionskoeffizienten um 425 nm herum (Soret- oder c-Bande). Die Absorptionseigenschaften der Häm-Proteine hängen stark vom Oxidationszustand und vom

Der zweite deutliche Unterschied, neben der Verringerung der „ $S_4 \rightarrow S_0$ “-Amplitude bei 360 nm (Abschnitte VIII.2.1 und VIII.3.1), war das Auftreten der neuen, langsamen und ausgeprägten (großes, positives  $\Delta\epsilon$ ) Kinetik bei 425 nm unter erhöhtem  $p(O_2)$  (Abschnitt VIII.2.5). Die Abhängigkeit dieser Phase von unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken muß in Zukunft noch genauer untersucht werden. Diese langsame Kinetik rührte nicht von einem Chlorophyllmolekül her, wie die Differenzsignale bei 673 nm zeigten oder einem Chinon, da dann auch bei 402 nm diese langsame Phase zu sehen hätte sein müssen; denn

Liganden des zentralen Eisens ab. Beispielsweise hat das Differenzspektrum zwischen reduziertem und CO-komplexierten Myoglobin eine deutliche Bande bei 422 nm (Abbildung 88). Die a-Bande der Häm-Proteine ist schwächer als die c-Bande und liegt im Wellenlängenbereich um 550 bis 600 nm. Zukünftige spektroskopische Messungen zwischen 550 und 600 nm könnten also weitere Hinweise zur Identität liefern.

In PSII von Cyanobakterien liegen zwei bis drei Häm-Proteine vor. Neben dem Cytochrom  $c_{550}$  existieren ein bis zwei Kopien von Cytochrom  $b_{559}$  vor. Die genaue Stöchiometrie ist noch ungeklärt, da sich die Angaben in der Literatur widersprechen [Kaminskaya *et al.* 99]. In den drei veröffentlichten Röntgenkristallstrukturen ist jeweils nur 1 Cytochrom  $b_{559}$  gefunden worden [Ferreira *et al.* 04; Kamiya und Shen 03; Zouni *et al.* 01b]. Andere Arbeiten mit His-Tag gereinigten Kernkomplexen geben 1 [Lakshmi *et al.* 02] oder 2 [Kashino *et al.* 02b] Cyt  $b_{559}$  für *Synechocystis* sp. PCC6803 an. Für höhere Pflanzen werden zwei Cyt  $b_{559}$  beschrieben [Garbers *et al.* 01].

Cytochrom  $c_{550}$  (PsbV) gibt es nur in Cyanobakterien. Es hat in Cyanobakterien, zusammen mit PsbU (siehe Tabelle 1), dieselben Funktionen wie die extrinsischen 17 und 23 kDa-Proteine bei höheren Pflanzen und Algen [Enami *et al.* 00] (Stabilisierung des OEC und Bereitstellung von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen). Eine Entfernung auf Genebene destabilisiert PSII und beeinträchtigt das Wachstum der Zellen [Shen *et al.* 95]. Bisher gibt es keine Berichte, daß Cytochrom  $c_{550}$  an Redoxreaktionen in PSII beteiligt ist, was Cyt  $c_{550}$  als Verursacher des o.g. Differenzsignals unwahrscheinlicher werden läßt.

Im Gegensatz dazu werden für Cyt  $b_{559}$  eine Vielzahl möglicher Elektronentransferfunktionen diskutiert. Als für am wahrscheinlichsten wird eine schützende Funktion bei Licht-Streß gehalten [Ortega *et al.* 88; Poulson *et al.* 95; Stewart und Brudvig 98; Thompson und Brudvig 88; Whitmarsh und Pakrasi 96]. Dies könnte auch die Entgiftung gefährlicher Sauerstoffspezies einschließen [Ananyev *et al.* 94]. Bei [Faller *et al.* 01; Miyake und Okamura 03; Miyake und Yokota 01; Ruffle *et al.* 01; Vavilin und Vermaas 00] wird eine Funktion als alternativer Elektronendonator für  $\text{P}_{680}^{+\bullet}$  im Rahmen des zyklischen Elektronentransports in PSII diskutiert. Bei Tieftemperaturen wird  $\text{P}_{680}^{+\bullet}$  direkt durch Cyt  $b_{559}$  reduziert [Hillmann und Schlodder 95]. Cyt  $b_{559}$  ist also in das Elektronentransfergeschehen im PSII involviert, und es ist möglich, daß durch die hier vorgestellten Versuche eine neue Tür zur Funktionsbestimmung von Cyt  $b_{559}$  aufgestoßen wurde.

Ein Carotinoid als möglicher Verursacher des langsamen Differenzsignals bei 20 bar Sauerstoff und 425 nm konnte ausgeschlossen werden. Carotinoide erfüllen ebenfalls wichtige Funktionen zur Lichtsammlung, Schutz vor Lichtschäden und Entgiftung gefährlicher Sauerstoffspezies [Anderson 01; Nayak *et al.* 02] und können mit hoher Effizienz an der Donator-Seite von PSII oxidiert werden [Schenck *et al.* 82]. Auch eine Funktion beim zyklischen Elektronentransport ist in Erwägung gezogen worden (zusammengefaßt in [Ruffle *et al.* 01]). Die elektrochromen Absorptionsänderungen von Carotinoiden bei dieser Wellenlänge sind jedoch negativ [Schmidt *et al.* 69; Schmidt *et al.* 71], genauso wie das Redox-Differenzspektrum [Mathis und Vermeglio 72; Schenck *et al.* 82] und kommen für das hier beobachtete, positive Signal nicht in Frage. Der Tripletübergang  $^1\text{Car} \rightarrow ^3\text{Car}$  hat zwar ein positives  $-\Delta I/I$  bei dieser Wellenlänge [Wolff und Witt 72], jedoch ist die Halbwertszeit viel zu klein ( $\tau_{1/2} < 25$  ns), als daß diese Reaktion hätte aufgelöst werden können.

*Eine abschließende Klärung zum Ursprung der durch hohen Sauerstoffdruck verursachten Absorptionsänderung bei 425 nm muß durch zukünftige Messungen erfolgen. Auf jeden Fall charakterisiert diese Absorptionsänderung nicht das beschriebene Intermediat B.*

iv) Diskussion der Kinetiken der  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion bei 20 bar Sauerstoffdruck

In Tabelle 18 wurden die Reduktionskinetiken von  $P_{680}^{+\bullet}$  mit Literaturwerten verglichen. Die identischen Ergebnisse zwischen Kontrollproben und  $O_2$ -Proben stimmen mit den aus der Literatur bekannten Werten überein (siehe auch Kapitel VI). Die Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$

**Tabelle 18: Vergleich der  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion mit Literaturwerten**

Material	Ergebnisse	Quelle
<i>Synechocystis</i> -Kernkomplexe	23-33 ns (53%), 280-360 ns (16%), 29-31% Absatz	[Hundelt <i>et al.</i> 98b]
Kernkomplexe (Erbse)	37 ns (57%), 320 ns (22%), 21 Absatz	[Hundelt 99]
<i>Thermosynechococcus</i> -Kernkomplexe	20 ns (43%), 50 ns (21%), 280 ns (21%), 15% Absatz	[Schlodder <i>et al.</i> 85]
<i>Thermosynechococcus</i> -Kernkomplexe	20 ns (30%), 50 ns (19%), 280 ns (19%), 32% Absatz	[Schlodder <i>et al.</i> 84]
Spinat-Chloroplasten	30 ns (50%), 250 ns (20%), 30% Absatz	[Brettel und Witt 83]
<i>Synechocystis</i> -Kernkomplexe	30 ns (38%), 260 ns (14%), 48% Absatz	[Clausen <i>et al.</i> 01b]
<i>Synechocystis</i> -Kernkomplexe	23 ns (47%), 272 ns (16%), 36% Absatz	Abschnitt VIII.2.4
<b><i>Synechocystis</i>-Kernkomplexe 20 bar <math>O_2</math></b>	<b>25 ns (52%), 250 ns (24%), 34% Absatz</b>	<b>Abschnitt VIII.2.4</b>

ist mehrphasig. Es gibt schnelle Kinetiken im Nanosekundenbereich und langsamere Kinetiken im Mikro- und Millisekundenbereich in Abhängigkeit vom Oxidationszustand des *OEC*. In den Zuständen  $S_0$  und  $S_1$  beträgt die Halbwertszeit der schnellsten Phase 20 ns, in den Zuständen  $S_2$  und  $S_3$  50 ns [Brettel *et al.* 84; Cherepanov *et al.* 98; Drevenstedt 97; Eckert und Renger 88]. Unter repetierenden Meßbedingungen findet eine Gleichverteilung der  $S$ -Zustände statt, so daß sich die einzelnen Kinetiken überlagern. Daraus resultieren eine 23 - 37 ns-, eine 250 - 320 ns- und eine Mikrosekundenphase ( $\tau_{1/2} \geq 3 - 5 \mu s$ ) [Brettel und Witt 83; Hundelt 99]. Nur die schnellen Nanosekundenphasen ( $\tau_{1/2} 20 - 50$  ns) repräsentieren den unmittelbaren Elektronentransport von  $Y_Z$  zu  $P_{680}^{+\bullet}$ . Die langsameren Phasen ( $\tau_{1/2} \approx 300$  ns und die  $\mu s$ -Phasen) werden als Folgereaktionen von Relaxationsvorgängen in der

Umgebung von  $Y_Z^{ox}$  aufgefaßt [Cherepanov *et al.* 98; Krishtalik 95; Rappaport und Lavergne 01], die das Redoxpotential von  $Y_Z$  gegenüber  $P_{680}^{+\bullet}$  absenken. Ursprünglich sind die unterschiedlichen Kinetiken der  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion (zumindest teilweise) zwei unterschiedlichen Elektronendonatoren für  $P_{680}^{+\bullet}$  zugewiesen worden [Brettel *et al.* 84].

Die langsamen Phasen mit  $\tau_{1/2} > 2 \mu s$  können inaktive Zentren anzeigen [Schlodder *et al.* 85], da die Inaktivierung der Wasseroxidation (z.B. durch Manganverarmung) die Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  verlangsamt [Boussac *et al.* 92]. Da aber auch eine Phase der  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion mit Halbwertszeiten von 25 – 35  $\mu s$  in der Literatur beschrieben wird, die eine Viereroszillation aufweist und somit einem aktiven *OEC* zugeordnet wird [de Wijn *et al.* 01; Jeans *et al.* 02; Schilstra *et al.* 98; Schlodder *et al.* 85], stellt der prozentuale Anteil von Kinetiken mit  $\tau_{1/2} > 2 \mu s$  nur eine obere Grenze für inaktives PSII dar.

Der Anteil der  $\mu s$ -Phase variierte zwischen PSII-Kernkomplexen aus unterschiedlichen Zellernten und Präparationen, obwohl die Präparationen nach demselben Protokoll [siehe IV.7.1] durchgeführt worden waren. In Kapitel VI wurde ein Anteil von 48% beschrieben. Bei der hier verwendeten Präparation lag der Anteil der  $\mu s$ -Phase bei 36%. Ein unterschiedlicher Grad an Aktivität der PSII-Kernkomplexe von Präparation zu Präparation wurde bereits bei den Elektronentransportraten im Dauerlicht (Abschnitt V.5) und den unterschiedlichen Signalen nach dem ersten Blitz bei 360 nm (Abschnitt VIII.3.1 und Seite 65) beschrieben und diskutiert. In anderen Organismen und abweichenden Präparationsprotokollen werden z.T. geringere Amplitudenanteile des Untergrunds gefunden. So berichten Schlodder *et al.* von minimal 15% Untergrund [Schlodder *et al.* 85]

mit PSII-Kernkomplexen aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus* sp. (< 16% für PSII-Kernkomplexe aus Erbsen nach [Cherepanov *et al.* 98]) und gehen davon aus, daß dieser Wert einer Probe mit ausschließlich intakten Kernkomplexen nahekommt.

Durch die O<sub>2</sub>-Behandlung erhöhte sich nicht der Anteil der  $\mu$ s-Phasen (34%; beide Messungen wurden mit PSII-Kernkomplexen aus derselben Präparation durchgeführt). Der Anteil an inaktiven Zentren war also nicht erhöht, im Gegensatz zur Gesamtamplitude, die bei den O<sub>2</sub>-Proben um  $\approx$  30% verringert war. Demzufolge wurden  $\approx$  30% der Zentren durch die Sauerstoffbehandlung vollständig zerstört, so daß selbst P<sub>680</sub> nicht mehr oxidiert werden konnte. Die verbleibenden Zentren zeigten bei 20 bar O<sub>2</sub> dieselbe Aktiv-/Inaktiv-Verteilung wie die Kontrollproben.

#### v) Die Blitzabhängigkeit der P<sub>680</sub><sup>+</sup>-Reduktion unter unterschiedlichen Bedingungen

Die Blitzabhängigkeit der Rekombination von P<sub>680</sub><sup>+</sup> mit Q<sub>A</sub><sup>•</sup> in Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen war identisch mit den aus der Literatur bekannten Spektren [Hundelt 99] (vergleiche Abschnitt VI.2.2). Die Abschätzung der Halbwertszeit der Rekombination von P<sub>680</sub><sup>+</sup> mit Q<sub>A</sub><sup>•</sup> in Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen ergab  $\tau_{1/2} \approx 500 \mu$ s. Für PSII-Kernkomplexe aus Erbsen werden drei Phasen mit  $\tau_{1/2} = 90 \mu$ s (44%), 500  $\mu$ s (42%) und zusätzlichen Millisekundenphasen (14%) angegeben [Haumann *et al.* 96] ähnlich zu PSII-Kernkomplexen aus PSI-haltigen *Synechocystis*-Zellen (140  $\mu$ s (45%), 630  $\mu$ s (39%) und > 3 ms (16%) [Hundelt 99] bzw. 170  $\mu$ s (60%), 800  $\mu$ s (25%) und 6 ms (15%) [Gerken *et al.* 89] oder PSII-Kernkomplexen aus *Thermosynechococcus elongatus* (180  $\mu$ s, 800  $\mu$ s und 6 ms) [Hillmann und Schlodder 95]. Diese drei Phasen konnten bei den hier durchgeführten Messungen nicht bestimmt werden, weil einerseits die Zeitauflösung zu niedrig war, um die schnelle Mikrosekundenphase aufzulösen und andererseits das Zeitfenster nicht groß genug war, um Millisekundenphasen mit  $\tau_{1/2} > 1$  ms ausreichend zu erfassen. Die hier ermittelten 500  $\mu$ s stimmten gut mit der mittleren Phase ( $\tau_{1/2} = 500 - 630 \mu$ s) aus o.g. Literaturdaten überein. Andere Quellen geben weitestgehend einphasige Verlaufskurven der Rekombination mit  $\tau_{1/2} = 130 - 180 \mu$ s [Conjeaud und Mathis 80; Haveman und Mathis 76; Renger 79; Rutherford 89] oder 800 - 900  $\mu$ s [Buser *et al.* 90; Hays *et al.* 98; Metz *et al.* 89; Reinman *et al.* 81] an.

Wie oben bereits beschrieben, war der kinetische Verlauf der P<sub>680</sub><sup>+</sup>-Reduktion bei Kontrollproben und O<sub>2</sub>-Proben bei 100 ms Blitzabstand identisch. 100 ms Dunkelphase reichten also aus, um Y<sub>Z</sub><sup>ox</sup> zwischen den Blitzen zu reduzieren. In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob auch bei einem Blitzabstand von 10 ms Y<sub>Z</sub><sup>ox</sup> in der Dunkelphase reduziert wurde. Hierzu wurde die Blitzabhängigkeit der P<sub>680</sub><sup>+</sup>-Reduktion wie in Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen (Abbildung 75) gemessen.

In Abschnitt VIII.2.1 und VIII.2.5 war gezeigt worden, daß die S-Übergänge S<sub>1</sub>  $\Rightarrow$  S<sub>2</sub> und S<sub>2</sub>  $\Rightarrow$  S<sub>3</sub> bei O<sub>2</sub>-Proben unverändert abliefen. Deshalb wurde auch erwartet, daß die Reduktion von P<sub>680</sub><sup>+</sup> nach den ersten drei Blitzen unverändert zur Kontrollmessung vonstatten ging, weil Y<sub>Z</sub> vor dem Blitz reduziert vorlag. Vor dem vierten Blitz konnte Y<sub>Z</sub><sup>ox</sup> nicht durch den OEC reduziert werden, da die Progression über den Zustand S<sub>3</sub> hinaus durch den hohen Sauerstoffpartialdruck gehemmt worden war (Abschnitt VIII.2.1). Es hätte also eine deutliche Vergrößerung der Amplitude auf den vierten Blitz, gleichsam wie in Mn-verarmten Kernkomplexen auf dem zweiten Blitz (Abbildung 75), erwartet werden können. Dies war aber nicht der Fall, und die P<sub>680</sub><sup>+</sup>-Reduktion lief im Vergleich zur Kontrollprobe unverändert ab (Abbildung 77). Die Amplituden der Transienten nach Blitz #4 waren gegenüber den Signalen auf den Blitzen 1 - 3 nicht um das Dreifache erhöht. Identische Ergebnisse wurden mit PSII-Kernkomplexen aus der Mutante D1-H332D

erzielt, die gar keinen Mn-Komplex mehr besitzen.  $Y_Z^{ox}$  konnte also auch in einer Dunkelphase von 10 ms wieder reduziert werden, auch wenn die Progression des OEC gestoppt war. Hierfür müssen alternative, endogene Elektronendonatoren verantwortlich sein, deren Identität in der vorliegenden Arbeit aber nicht weiter bestimmt wurde.

Einschränkend bleibt zu sagen, daß bei den Messungen mit 100 Hz Blitzfrequenz und einer Zeitauflösung von 10  $\mu$ s/Punkt nur festgestellt werden konnte, daß die Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  auf späteren Blitzen bei 20 bar nicht so verlangsamt war wie in Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen. Letztendlich war dies kein Beweis, daß die schnelle Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  bei 100 Hz Blitzfrequenz nicht durch alternative Elektronendonatoren für  $P_{680}^{+\bullet}$  hervorgerufen wurde. Es ist bereits gezeigt worden, daß  $P_{680}^{+\bullet}$  bei Tieftemperaturen auch durch Cyt  $b_{559}$  [Hillmann und Schlodder 95; Vermeiglio und Mathis 73], durch ein Carotinoid [Schenck *et al.* 82] und durch ein anderes Chl  $a$  Molekül [Visser *et al.* 77] reduziert werden kann. Zukünftige Vergleichsmessungen bei hoher Zeitauflösung (4 ns/Punkt) und 100 Hz Blitzfrequenz zwischen Luft- und  $O_2$ -Proben können zeigen, ob die Kinetiken der  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion bei 20 bar  $O_2$  und 100 Hz unverändert sind, was der letzte Beweis für die  $Y_Z^{ox}$ -Reduktion innerhalb von 10 ms Dunkelphase wäre.

Als Konsequenz für die  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion in Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen im Gegensatz zu PSII-Kernkomplexen mit inhibierter Progression des OEC (bei 20 bar  $O_2$ ) und PSII-Kernkomplexen ohne Mn-Komplex (D1-H332D) ergab sich, daß die Blitzabhängigkeit  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion in Mn-verarmten Kernkomplexen nicht allein auf dem Fehlen des OEC beruhte, sondern im wesentlichen ein Produkt der substantiellen, donatorseitigen Schädigung durch die pH-Behandlung war. Entweder konnte durch die Schädigung (evtl. pH-bedingte, irreversible konformationelle Veränderungen)  $P_{680}^{+\bullet}$  nicht mehr durch  $Y_Z$  reduziert werden oder  $Y_Z^{ox}$  wurde in den 10 ms Blitzabstand nicht mehr reduziert, wie es bisher erklärt worden ist [Conjeaud und Mathis 80; Hundelt 99]. Die erstgenannte Situation kann ausgeschlossen werden, wie es u.a. überzeugend anhand der pH-Abhängigkeit der Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  in Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen gezeigt worden ist [Ahlbrink *et al.* 98]. *Der Unterschied in der Blitzabhängigkeit der  $P_{680}^{+\bullet}$ -Reduktion (bei 100 Hz) zwischen  $p(O_2)$ -gehemmten PSII-Kernkomplexen und H332D-Kernkomplexen auf der einen Seite und Mn-verarmten PSII-Kernkomplexen auf der anderen Seite betont einmal mehr, daß Meßergebnisse aus Versuchen mit Mn-verarmten Kernkomplexen nur bedingt für Aussagen zum nativen System herangezogen werden können.*

Bei den dunkeladaptierten Messungen mit 100 Hz Blitzfrequenz und einer Zeitauflösung von 10  $\mu$ s/Punkt war weder bei den Kontrollproben, noch bei den  $O_2$ -Proben oder H332D-Kernkomplexen ein Signal auf den zweiten Blitz zu sehen. Dies ist ein Ergebnis, das bisher nicht erklärt werden kann. Die einzigen offensichtlichen Erklärungen wären, daß  $P_{680}^{+\bullet}$  durch den zweiten Blitz nicht oxidiert wurde, oder daß die Reduktion von  $P_{680}^{+\bullet}$  mit  $\tau_{1/2} < 2 \mu$ s erfolgte, so daß das Signal beim ersten Meßpunkt nach 10  $\mu$ s bereits wieder auf Null abgefallen war. Beide Erklärungen widersprechen den Literaturdaten für dunkeladaptierte PSII-Kernkomplexe aus Erbsen [Cherepanov *et al.* 98], die zeigen, daß  $P_{680}^{+\bullet}$  im zweiten Blitz gebildet, aber sogar langsamer als nach dem ersten Blitz reduziert wird.

### VIII.3.3 Diskussion der vorgeschlagenen Reaktionsschemata zum Mechanismus der Wasserspaltung

Auf den Seiten 122ff wurden drei Modelle zur Relaxation des OEC aus dem am höchsten oxidierten Zustand vorgeschlagen. Die Plausibilität der einzelnen Modelle wird im folgenden näher diskutiert.

Die zeitliche Entwicklung der Konzentrationen von  $A$ ,  $B$  und ggf.  $C$  wurde mit dem Programm Mathcad 2001i Professional (unter Verwendung des Runge-Kutta Algorithmus) simuliert. Dabei galt:

für eine Reaktion

ohne Intermediat:

$$dA/dt = -a * A + b' * B$$

$$dB/dt = a * A - b' * B$$

$$b' = b * p(O_2)$$

mit Intermediat:

$$dA/dt = -a * A + b * B$$

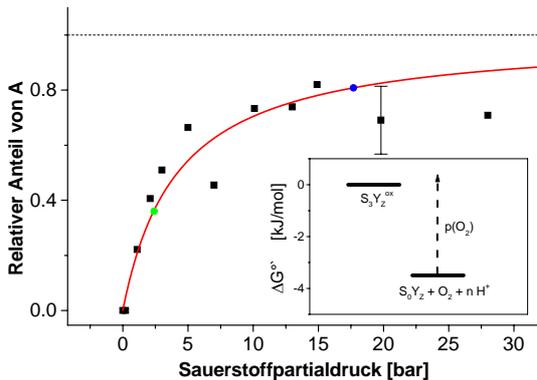
$$dB/dt = a * A - b * B - c * C + d' * C$$

$$dC/dt = c * B - d' * C$$

$$d' = d * p(O_2)$$

i) Reaktionsschema ohne Intermediat (Seite 129)

Dieses einfachste Modell  $A \rightleftharpoons B + O_2 + n H^+$  (entsprechend  $S_3Y_Z^{ox} \cdot (H_2O)_2 \rightarrow S_0Y_Z + O_2 + 4 H^+$ ) ist aus verschiedenen Gründen unwahrscheinlich:

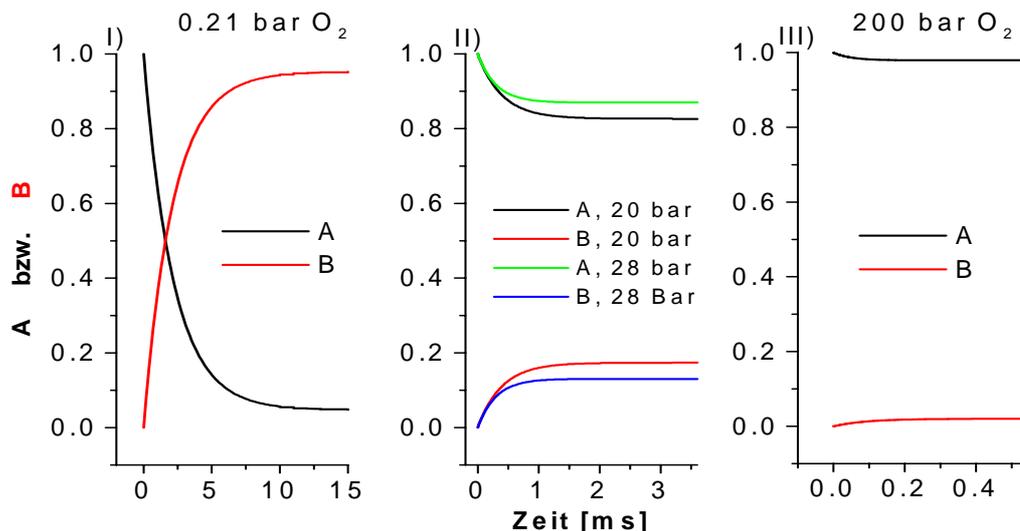


**Abbildung 89: Korrigierte (VIII.2.2.1) Absorptionsänderungen ( $A_\infty = 1 - \Delta X$ ) als Funktion des Sauerstoffpartialdrucks. Alle Meßpunkte (schwarze Quadrate) bei pH 6.7 außer einem (grüner Punkt) bei pH 5.7 und einem (blauer Punkt) bei pH 5.7 plus 20 bar  $O_2$ . Analyse der Titrationsdaten ohne Intermediat. Die rechnerische Anpassung (rote Linie, Gleichung 9) ergab eine halbmaximale Hemmung bei 4.2 bar und ein Verhältnis von  $a/b = 4.2$  bar. Die maximale Hemmung ist als gestrichelte Linie eingezeichnet ( $A_\infty = 1$ ). Im Einsatz wurde das errechnete freie Enthalpieprofil dargestellt. Bei 20 bar wurde die Standardabweichung ( $\sigma_{n-1} = 12.3$ ) für 17 Messungen mit sechs unterschiedlichen Präparationen eingetragen.**

1. Die mathematische Anpassung der Meßdaten (Abbildung 89) nach diesem Schema war deutlich schlechter als bei den rechnerischen Anpassungen mit einem Intermediat *B* (vgl. Abbildung 70, Abbildung 71 bzw. Abbildung 91). Die Meßdaten ergaben, daß sich das Signal im beobachteten Druckbereich um 70 – 80% herum einpendelte. Die rechnerischen Anpassungen mit Intermediat *B* erfaßten deshalb auch die letzten Meßwerte bei 20 und 28 bar besser. Bei der Auswertung ohne Intermediat fielen diese beiden letzten Meßwerte deutlicher heraus. Die Simulation zum zeitlichen Verlauf von *A* (Abbildung 90 II) ergab bei 28 bar einen Wert für  $\Delta X$  von 13%. Demzufolge hätte das Meßsignal bei 28 bar einen Wert für  $1 - \Delta X$  (siehe VIII.2.2.1) von 0.87 ergeben müssen. Der Meßwert betrug aber nur 0.709. Selbst mit dem äußersten Fehlerbereich der 20 bar Messungen (0.123, Tabelle 14) wurde das Meßsignal ( $1 - \Delta X = 0.709$ ) nicht abgedeckt. Der Anteil von  $A_\infty$  hätte nach diesem Modell bei 28 bar  $O_2$  signifikant größer sein müssen.
2. Versuche zum isotope-markierten Austausch von Substrat-Wasser am *OEC* haben gezeigt, daß noch im Zustand  $S_3$  beide Substratwassermoleküle ausgetauscht werden können [Hillier und Wydrzynski 00; Hillier und Wydrzynski 01]. Die Sauerstoff-Sauerstoffbindung kann also erst nach dem Zustand  $S_3$  erfolgen. Daß die vollständige Reaktionsfolge (Reduktion von Tyrosin Z, Reduktion des *OEC*, Bildung der O-O-Bindung und die  $O_2$ -Freisetzung), die beträchtliche Änderungen in der Reaktionskoordinate zur Folge hat, in einem einzigen Schritt  $S_4 \rightarrow S_0$  abläuft, ist unwahrscheinlich.
3. Die in Abbildung 90 dargestellten Simulationen zeigen den Zerfall von *A* bzw. die Entstehung von *B*. Zur Vereinfachung wurde die Rückreaktion als Reaktion pseudoerster Ordnung aufgefaßt. Diese Annahme ist berechtigt, da die Sauerstoffkonzentration im Puffer selbst bei 0.21 bar (287  $\mu M$ ) deutlich größer als die Konzentration an PSII-Kernkomplexen (ca. 200 nM) war und damit nahezu konstant. Bei einer Erhöhung des  $p(O_2)$  von 0.21 bar auf 20 bar verringert sich die Halbwertszeit von *A* in der Simulation ungefähr um den Faktor 5. Ausgehend von einem Wert von 1.5 ms für 0.21 bar Sauerstoff (1 bar Luft, Abbildung 69) hätte  $\tau_{1/2} \approx 0.3$  ms betragen müssen. Die freilaufende, monoexponentielle Anpassung der Meßdaten (Abbildung 65) ergab eine Halbwertszeit von  $0.8 \pm 0.2$  ms bei 20 bar  $O_2$  und war damit langsamer als nach diesem Modell erwartet, was ebenfalls gegen dieses Modell sprach. Das schlechte Signal/Rausch-Verhältnis kann aber eine eventuell schnellere Halbwertszeit vertuschen. Diese Messungen sollten wiederholt werden, um durch ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis eine zuverlässigere Aussage machen zu können.
4. Die Restamplitude bei einem  $\Delta pH$  von 5.7 betrug  $\Delta X = 64.4\%$  ( $1 - \Delta X = 0.36$ , Tabelle 14) und entsprach damit einem  $p(O_2)$  von 2.4 bar. Die Sauerstoff/Protonen-Stöchiometrie war also ungefähr 1. Über kinetische Analysen des Elektronen- und Protonen-Transfers und der Elektrochromie in PSII in Abhängigkeit von der Blitznummer ist eine Freisetzungs-Verteilung der chemischen Protonen im Zuge der Progression des *OEC* (Startpunkt  $S_0$ ) von 1:0:1:2 ermittelt worden. Dies ist das Ergebnis sehr detaillierter Untersuchungen (normiert unter der Annahme von einer Protonenfreisetzung von 1:1:1:1 bei repetierender Anregung [Haumann und Junge 94]) zur Unterscheidung von chemischen Protonen und bedingt durch Konformationsänderungen [Mulikidjanian 99] oder elektrostatisch (Bohr-Effekt) freigesetzten Protonen an der Peripherie [Haumann *et al.* 97a; Jahns *et al.* 91; Junge *et al.* 02; Lavergne und Junge 93; Rappaport und Lavergne 01]. Demzufolge hätten im hier beobachteten Übergang, nach dem dritten Blitz, zwei Protonen frei werden sollen. Als chemische Protonen werden solche bezeichnet, bei denen das Proton von der oxidierten Gruppe selbst oder von deren Ligand stammt. Eine Erhöhung der

Konzentration um das 10fache entspricht einer Verschiebung von  $\Delta E$  um ca. 60 mV. Da zwei Protonen freigesetzt werden, müssen diese 60 mV zweimal aufgebracht werden. Eine Veränderung des pH von 6.7 auf 5.7 hätte also eine Verschiebung von  $\Delta E \approx 120$  mV verursacht. Daher hätte eine Titration auf pH 5.7 dieselbe Verringerung von  $\Delta X$  haben müssen wie 20 bar Sauerstoff. Es muß aber angemerkt werden, daß die oben genannte Blitzabhängigkeit der Protonenfreisetzung abhängig ist vom pH, von der Präparation und sogar vom verwendeten Puffer [Junge *et al.* 02], und daß genau mit den hier verwendeten PSII-Präparationen die Blitzabhängigkeit der Protonenfreisetzung noch nicht bestimmt worden ist. Mit anderen PSII-Kernkomplexen ist beispielsweise keine Oszillation der Protonenfreisetzung in Abhängigkeit von der Blitznummer gefunden worden, und das Protonenfreisetzungsmuster ist 1:1:1:1 [Bögershausen und Junge 95; Lübbers *et al.* 93; Lübbers und Junge 90; Wacker *et al.* 90], was mit dem hier gefundenen Ergebnis übereinstimmen würde. Dieser Punkt bedarf genauerer Klärung durch weitere Messungen. Die Blitzabhängigkeit der Protonenfreisetzung spielt auch in die immer noch kontrovers geführte Diskussion zum Verbleib des phenolischen Protons von Tyrosin Z hinein (*hydrogen abstractor model* [Hoganson und Babcock 97; Tommos und Babcock 98; Tommos und Babcock 00]  $\leftrightarrow$  *proton-rocking model* [Haumann und Junge 96; Junge *et al.* 02; Lavergne und Junge 93]), deren Umfang den Rahmen dieser Diskussion sprengen würde [vgl. aber III.1 a) und Kapitel VI].

5. Die spektroskopische Einzelmessung bei 20 bar  $O_2$  und pH 5.7 ergab ein  $\Delta X = 0.192$ .  $A_\infty$  hatte also einen Wert von 0.808 (einem  $p(O_2)$  von 17.7 bar entsprechend). Das war weitaus niedriger als nach diesem Modell hätte erwartet werden können. Je nach Protonenstöchiometrie (siehe Punkt 4) hätte diese Messung dem Signal bei 210 bzw. 2100 bar  $O_2$  entsprechen sollen. Die zugehörigen Werte für  $A_\infty$  wären nach den Simulationen 0.98 und 0.998 gewesen und wichen damit deutlich vom tatsächlichen Meßwert ab.

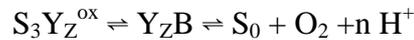


**Abbildung 90: Simulationen des Zerfalls von A bzw. der Bildung von B.** Mit  $dA/dt = -a \cdot A + b \cdot B$  und  $dB/dt = a \cdot A - b \cdot B$ . Mit  $a = 440.92 \text{ s}^{-1}$ ,  $b = 104.98 \text{ s}^{-1}$  und  $b \cdot p(O_2) = b \cdot I$  I) Zerfall von A (schwarze Kurve) mit  $\tau_{1/2} = 1.5 \text{ ms}$  bzw. Bildung von B (rote Kurve) mit derselben Halbwertszeit bei 0.21 bar  $O_2$  (1 bar Luft).  $A_\infty = 0.05$ ,  $B_\infty = 0.95$ . II) Zerfall von A bei 20 bar  $O_2$  (schwarze Kurve) und 28 bar  $O_2$  (grüne Kurve). Die entsprechenden Halbwertszeiten betragen 0.28 ms und 0.2 ms. III) Zerfall von A bei 200 bar  $O_2$ .  $A_\infty = 0.998$  und  $\tau_{1/2} = 0.03 \text{ ms}$ . B wird so gut wie gar nicht mehr gebildet.

ii) Reaktionsschemata mit Intermediat (Seite 122ff)

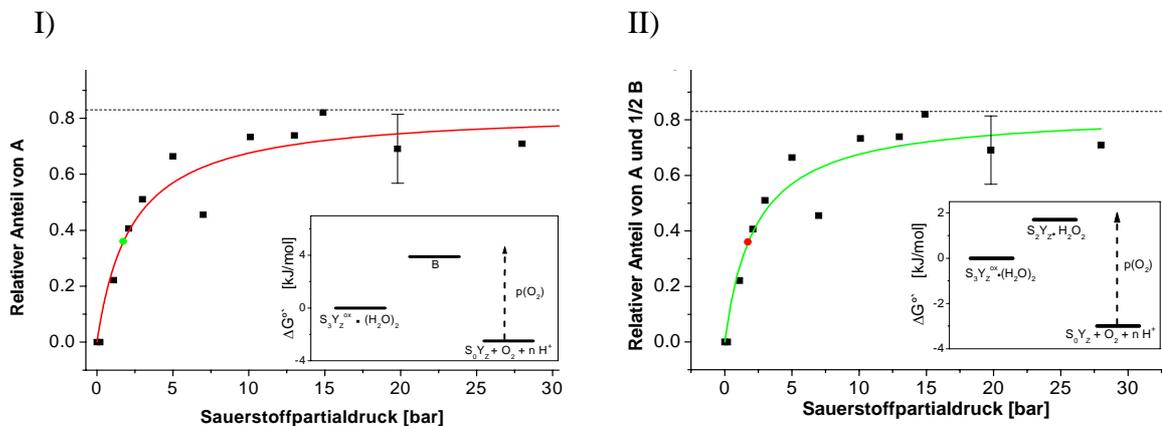


entsprechend



wobei B in einem Modell versuchsweise dem Zustand  $S_2 \bullet H_2O_2$  zugewiesen wird.

Die Reaktionsschemata mit gebundenem Intermediat, B, beschreiben die Meßwerte deutlich besser als die o.g. einstufige Reaktion. Diese Versuche waren damit der erste Nachweise auf ein Intermediat der Wasserspaltungsreaktion. Die Gründe, die für dieses Modell sprechen, werden im einzelnen aufgeführt.

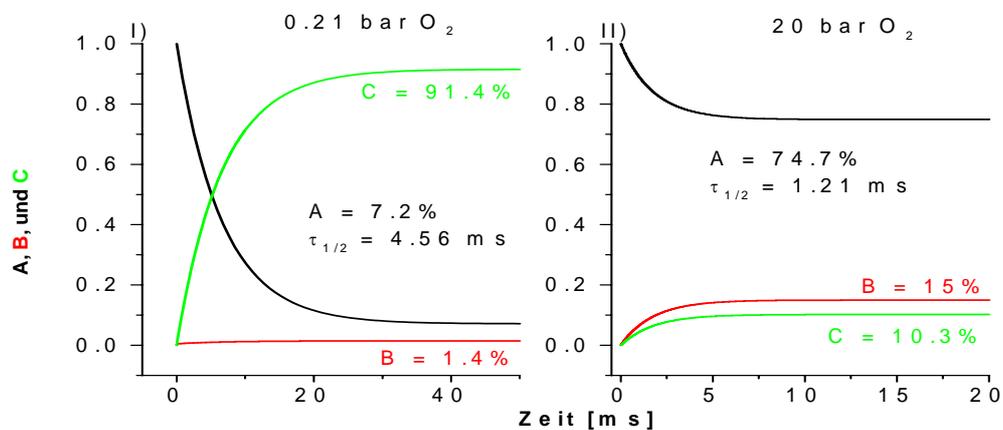


**Abbildung 91: Korrigierte (VIII.2.2.1) Absorptionsänderungen. Bei 20 bar wurden 17 Messungen mit 6 Präparationen durchgeführt und die Standardabweichung eingetragen ( $\sigma_{n-1} = 12.3$ ). Die gestrichelten Linien deutet  $A_\infty$  bzw.  $E_\infty$  bei  $p(O_2) \rightarrow \infty$  an. I)  $A_\infty$  als Funktion des Sauerstoffpartialdrucks ( $A_\infty = 1 - \Delta X$ ). Alle Meßpunkte (schwarze Quadrate) bei pH 6.7, außer einem (grüner Punkt) bei pH 5.7 und 1 bar Luft.  $a/b = 0.2$ ;  $c/d = 13.6$  bar. Der Einsatz illustriert das berechnete freie Standardenthalpieprofil, beginnend beim höchsten Oxidationszustand über ein unbestimmtes, nicht absorbierendes Intermediat zum völlig entspannten Zustand mit freigesetztem Sauerstoff. II)  $E_\infty$  ( $E_\infty = 1 - \Delta X$ ) als Funktion des Sauerstoffpartialdrucks ( $E_\infty = A_\infty + 1/2 B_\infty$ ). Alle Meßpunkte (schwarze Quadrate) bei pH 6.7 außer einem (roter Punkt) bei pH 5.7 und 1 bar Luft. Die rechnerische Anpassung (siehe Text) ergab 0.5 für  $a/b$  und 6.8 bar für  $c/d$ . Zur Absorption trugen sowohl der Ausgangszustand ( $S_3$ ) als auch das Intermediat [ $S_2 \bullet (H_2O_2)$ ] bei. Der Einsatz illustriert das berechnete freie Standardenthalpieprofil; beginnend beim höchsten Oxidationszustand über einen modifizierten  $S_2$ -Zustand (mit gebundenem Peroxid) zum völlig entspannten Zustand mit freigesetztem Sauerstoff.**

1. Unter Annahme eines Intermediates konnten die Meßwerte zwischen 0 und 28 bar (Abbildung 91) deutlich besser rechnerisch angepaßt werden, als mit dem einstufigen Modell [siehe Punkt *i*) 1].
2. Die kinetischen Simulationen zeigten eine geringere Verkleinerung der Halbwertszeit des Zerfalls von A von 0.21 bar O<sub>2</sub> auf 20 bar O<sub>2</sub>, als beim einstufigen Modell [Punkt *i*) 3]. Bei den Simulationen ohne absorbierendes Intermediat verkleinerte sich die Halbwertszeit um den Faktor 3.8 (Abbildung 92). Unter der Annahme, daß das Intermediat eine halb so große Absorption wie A hat, verringerte sich die Halbwertszeit nur um den Faktor 2.4 (Abbildung 93). Mit dem tatsächlich gemessenen Faktor (Abbildung 69, Abbildung 65)  $1.5 \text{ ms} / 0.8 \text{ ms} = 1.9$  wurde ersichtlich, daß die Messungen mit Intermediat die Verringerung der Halbwertszeiten bei hohen Drücken deutlich besser beschrieben. Die besten Ergebnisse lieferte die Annahme, daß auch das Intermediat bei 360 nm absorbiert. Deutlich wurde anhand der Simulationen, daß das postulierte Intermediat bei 0.21 bar O<sub>2</sub> praktisch nicht sichtbar ist, bei 20 bar O<sub>2</sub> aber stabilisiert wird. Für die Rückreaktion wurde in der Simulation eine Reaktion pseudoerster Ordnung angenommen, mit  $d'$  als Ratenkonstante [siehe Punkt *i*) 3];  $d' \cdot p(\text{O}_2) = d'$ .
3. Mit den in Abschnitt VIII.2.3 ermittelten absoluten Werten für die Ratenkonstanten *a* und *b* wurde die Zerfallskinetik für A simuliert und  $\tau_{1/2}$  bestimmt. Wenn das Intermediat nicht absorbierte, ergab sich eine Halbwertszeit für  $dA/dt$  bei 0.21 bar O<sub>2</sub> von  $\approx 4.6 \text{ ms}$  (Abbildung 92). Wenn das Intermediat absorbierte ergab sich eine Halbwertszeit von  $\approx 2.3 \text{ ms}$ , die viel näher an der gemessenen Halbwertszeit von 1.5 ms lag (Abbildung 93). Die Simulationen mit absorbierendem Intermediat spiegelten also wieder die Meßergebnisse am besten wieder. Die Halbwertszeiten waren nahezu unabhängig von *c* (Abbildung 94 A & B), solange  $c \gg a$  war (hier mind. Faktor 100). Die geringe Abweichung der Simulationsergebnisse mit absorbierendem Intermediat (2.3 ms) vom Meßwert (1.5 ms) beruhte auf der unter VIII.2.3 *ii*) gemachten Näherung ( $C \approx 0$ ) zur Bestimmung von *a* und *b*. Tatsächlich zeigten die Simulationen, daß bei 20 bar O<sub>2</sub> noch 10% C gebildet wurde (Abbildung 93). Das bedeutet, daß die tatsächliche Halbwertszeit bei  $C = 0$  kleiner gewesen wäre, als die verwendeten 0.8 ms. Damit wäre  $k_{\text{eff}}$  größer geworden, was größere absolute Werte für *a* und *b* zur Folge gehabt hätte (beim gleichen Verhältnis *a/b*). Die Simulation (Abbildung 94 C) zeigte, daß eine geringfügige (Faktor 1.7) Vergrößerung der absoluten Werte von *a* und *b* die Halbwertszeit für  $dA/dt$  auf 1.35 ms absenkte.
4. Die Verringerung des pH von 6.7 auf 5.7 lieferte Ergebnisse, die einem  $p(\text{O}_2)$  von 1.7 bar entsprachen. Damit ergab sich eine Protonen / O<sub>2</sub> – Stöchiometrie von ungefähr 1. Dieses Ergebnis war vergleichbar mit dem Modell ohne Intermediat [Punkt *i*) 4]. Dies widersprach auf dem ersten Blick der allgemein akzeptierten Erkenntnis einer Protonenfreisetzungszillation von 1:0:1:2, war aber vereinbar mit Kernkomplexen, die keine Oszillation der Protonenfreisetzung, sondern eine 1:1:1:1 – Verteilung zeigen. Dieser Punkt wurde ausführlich unter *i*) 4 (siehe oben) diskutiert. Eine Klärung dieses Verhaltens ist ohne weitere Messungen nicht möglich; zumal in den Simulationen die Protonen nicht berücksichtigt wurden. Eine Kombination der hier vorgestellten Möglichkeit zur Entzerrung der zwei Reaktionsschritte  $S_4 \rightarrow B$  und  $B \rightarrow S_0$  durch erhöhten Sauerstoffpartialdruck mit pH-Indikatormessungen könnte enthüllen, ob die zwei postulierten freigesetzten Protonen in unterschiedlichen Teilschritten  $S_3 \Rightarrow S_4 \rightarrow B$  und  $B \rightarrow S_0$  freigesetzt werden.
5. Die Erhöhung der Protonenkonzentration auf pH 5.7 und die gleichzeitige Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes auf 20 bar hätte einer reinen  $p(\text{O}_2)$ -Erhöhung auf  $\approx 200$  oder 2000 bar entsprechen sollen. Die Meßwerte entsprachen jedoch einem  $p(\text{O}_2)$  von

68 bar. Dies war zwar ein Ergebnis, daß näher an dem erwarteten Wert für ein freigesetztes Proton ( $\approx 210$  bar) lag als bei dem einstufigen Modell [Punkt *i*] 5], aber dennoch großzügig abwich. Wie vorher schon angedeutet, war die Messung bei pH 5.7 und 20 bar  $O_2$  eine Einzelmessung und sollte für genauere Auswertung wiederholt werden. Erschwerend kommt hinzu, daß bei obiger Annahme, wenn bereits ein Proton im Schritt  $S_4 \rightarrow B$  freigesetzt wird, der niedrige pH auch die Reaktion  $A \rightleftharpoons B$  beeinflussen sollte. Bevor weitere Aussagen diesbezüglich gemacht werden können, bleibt festzuhalten (wie oben bereits erwähnt), daß für weitere Diskussionen das Protonenfreisetzungsmuster mit diesen Kernkomplexen bestimmt werden muß und in die Simulationen einfließen muß.

**Zusammenfassend kann festgestellt werden: Die Reduktion des am höchsten oxidierten Zustand  $S_3Y_Z^{ox}$  verläuft in zwei Schritten zum Zustand  $S_0$ . Das Intermediat  $B$  absorbiert etwa halb so stark wie  $S_3Y_Z^{ox}$  und stellt daher vermutlich den Zustand  $S_2$  (wahrscheinlich mit gebundenem Peroxid) dar [vgl. VIII.2.3 ii)].**



**Abbildung 92: Simulation mit Intermediat  $B$ , das aber nicht absorbiert. Die Amplituden der einzelnen Komponenten nach  $t \rightarrow \infty$  wurden in Prozent angegeben, ebenso die Halbwertszeit für den Zerfall von  $A$ . Grün =  $C$ , rot =  $B$  und schwarz =  $A$ . Mit  $a/b = 0.2$ ,  $c/d = 13.6$ .  $a = 144.43$   $s^{-1}$ ,  $b = 722.17$   $s^{-1}$ . Für  $c$  wurde eine viel schnellere Rate von  $30000$   $s^{-1}$  angenommen. Die Rückreaktion  $C \rightarrow B$  wurde als Reaktion pseudo-erster Ordnung mit der Ratenkonstante  $d^{\wedge}$  beschrieben (siehe Text). I) 0.21 bar  $O_2$ ,  $\tau_{1/2} = 4.56$  ms. Das Intermediat,  $B$ , ist so gut wie nicht sichtbar. II) 20 bar  $O_2$ .  $\tau_{1/2} = 1.21$  ms. Durch den hohen  $p(O_2)$  wird das Intermediat,  $B$ , stabilisiert. Das Endprodukt  $C$  wird nur noch zu 10.3 % gebildet.**

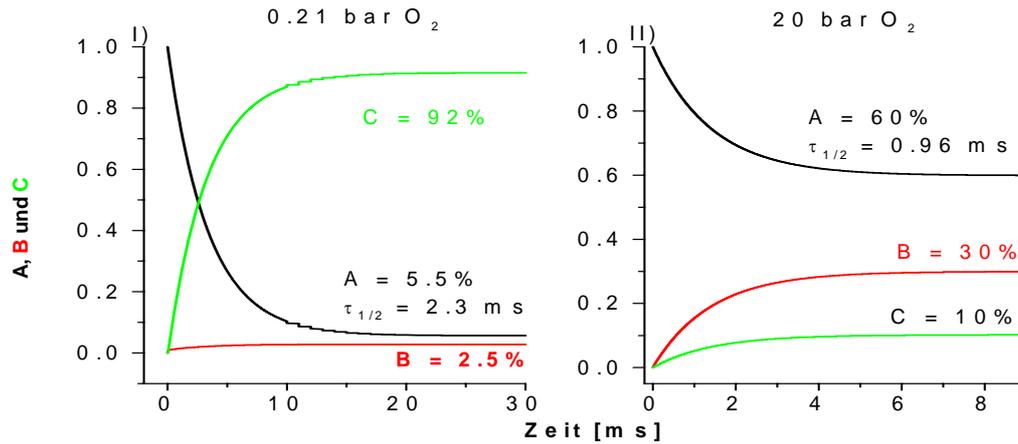
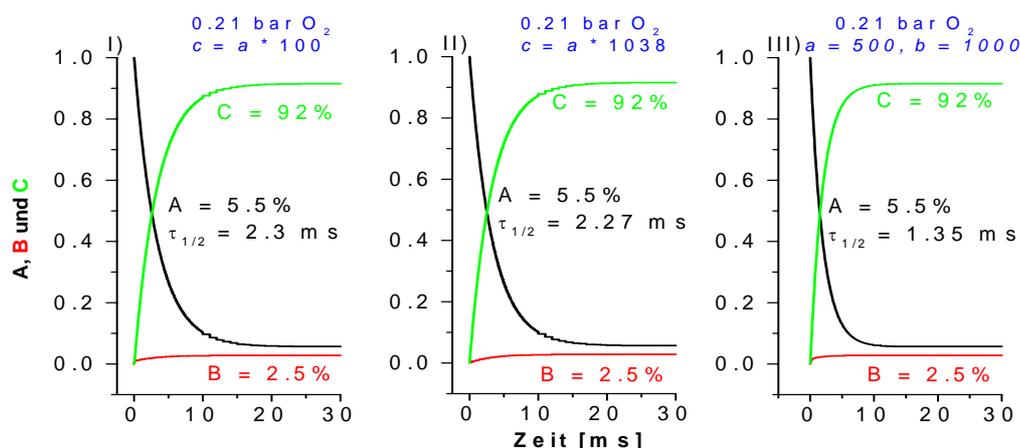


Abbildung 93: Simulation mit absorbierendem Intermediat *B* (halbe Extinktion von *A*). Die Amplituden der einzelnen Komponenten nach  $t \rightarrow \infty$  wurden in Prozent angegeben, ebenso die Halbwertszeit für den Zerfall von *A*. Grün = *C*, rot = *B* und schwarz = *A*. Mit  $a/b = 0.5$ ,  $c/d = 6.8$  bar.  $a = 288.9 \text{ s}^{-1}$ ,  $b = 577.7 \text{ s}^{-1}$ . Für  $c$  wurde eine viel schnellere Rate von  $28890 \text{ s}^{-1}$  angenommen. Die Rückreaktion  $C \rightarrow B$  wurde als Reaktion pseudo-erster Ordnung mit der Ratenkonstante  $\hat{d}$  beschrieben [ $\hat{d} = d \cdot p(\text{O}_2)$ , siehe Text]. I)  $0.21 \text{ bar O}_2$ .  $\tau_{1/2} = 2.3 \text{ ms}$ . Das Intermediat, *B*, ist so gut wie nicht sichtbar. II)  $20 \text{ bar O}_2$ .  $\tau_{1/2} = 0.96 \text{ ms}$ . Durch den hohen  $p(\text{O}_2)$  wird das Intermediat, *B*, stabilisiert. Das Endprodukt *C* wird nur noch zu 10% gebildet. Bei 20 bar entsprechen  $A_\infty + \frac{1}{2} B_\infty$  einem  $\Delta X$  von 25% in guter Übereinstimmung mit Tabelle 14. In Tabelle 19 wurden die Restamplituden von *A* in Abhängigkeit vom  $p(\text{O}_2)$  zusammengefasst.

Tabelle 19: Restamplituden von *A* in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck. Simulierte Werte nach dem Modell mit absorbierendem Intermediat.

$p(\text{O}_2)$ [bar]	Ratenkonstante <sup>a</sup> $\hat{d}$ [s <sup>-1</sup> ]	$A_\infty$ [%]	$B_\infty$ [%]	$C_\infty$ [%]	$\Delta X^b$ [%]	$\tau_{1/2}$ für den Zerfall von <i>A</i>
0.21	892.12	5.5	2.5	92	100 <sup>c</sup>	2.3 ms
20	84970.59	60	30	10	26.8	0.96 ms
200	849705.88	66	33	7	18.8	0.82 ms
2000	8497058.82	66.5	33.3	6.2	18.1	0.8 ms

<sup>a</sup> Die übrigen Ratenkonstanten waren  $a = 288.9 \text{ s}^{-1}$ ,  $b = 577.7 \text{ s}^{-1}$ ,  $c = 28890 \text{ s}^{-1}$ . <sup>b</sup> siehe VIII.2.2.1 und Anhang XI.8. <sup>c</sup> per Definition



**Abbildung 94: Simulation des Zerfalls von A mit absorbierendem Intermediat B unter variierenden Bedingungen. Die Amplituden der einzelnen Komponenten nach  $t \rightarrow \infty$  wurden in Prozent angegeben, ebenso die Halbwertszeit für den Zerfall von A. Grün = C, rot = B und schwarz = A. Mit  $a/b = 0.5$ ,  $c/d = 6.8$  bar.  $a = 288.9 \text{ s}^{-1}$ ,  $b = 577.7 \text{ s}^{-1}$ ,  $c = 28890 \text{ s}^{-1}$  (wenn anders, wurde dies unten extra angegeben). Die Rückreaktion  $C \rightarrow B$  wurde als Reaktion pseudo-erster Ordnung mit der Ratenkonstante  $d^{\wedge}$  beschrieben [ $d^{\wedge} = d \cdot p(\text{O}_2)$ , siehe Text]. I) Identisch zu Abbildung 93 I).  $0.21 \text{ bar O}_2$ .  $\tau_{1/2} = 2.3 \text{ ms}$ . Für  $c$  wurde eine Ratenkonstante angenommen, die tausendfach schneller als die Ratenkonstante  $a$  war. II) Die Vergrößerung der Ratenkonstante  $c$  um das ca. Zehnfache ( $c = 300000 \text{ s}^{-1}$ ) gegenüber Abbildung I hatte keinen signifikanten Einfluß auf den Zerfall von A.  $0.21 \text{ bar O}_2$ .  $\tau_{1/2} = 2.27 \text{ ms}$ . III) Eine geringfügige Vergrößerung der absoluten Werte von  $a$  und  $b$  ( $500 \text{ s}^{-1}$  und  $1000 \text{ s}^{-1}$ ) beschleunigte den Zerfall von A signifikant ( $\tau_{1/2} = 1.35 \text{ ms}$ ).  $a/b$  blieb bei  $0.5$ .**

### VIII.3.3.1 Modellvorschläge für die Redoxreaktionen des OEC unter erhöhtem $p(\text{O}_2)$

Die spektroskopischen Ergebnisse aus Kapitel VIII.2 werden hier mit den Simulationen aus VIII.3.3 ii) in Einklang gebracht.

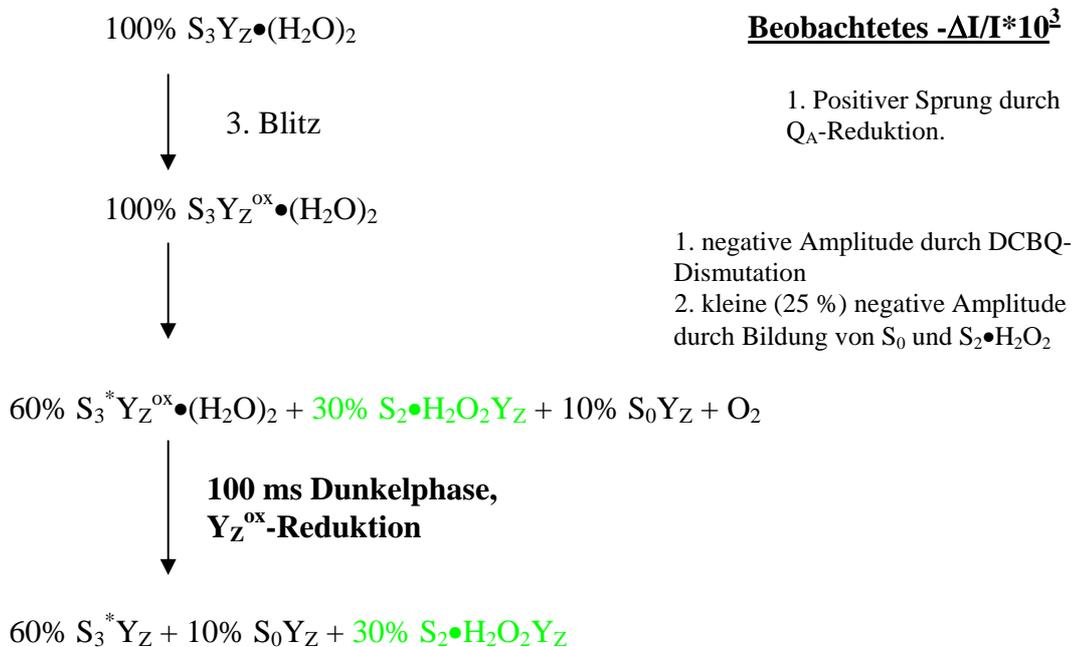
In Kapitel VIII.2.1 wurde dargestellt, daß bei  $20 \text{ bar O}_2$  der Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  blockiert wurde. Das war einerseits erkennbar an der Verringerung der negativen Amplitude auf dem 3. Blitz, andererseits am Signal auf dem 5. Blitz. Bei letzterem war die stabile Absorptionsänderung nach  $100 \text{ ms}$  bei den Kontrollmessungen positiv, durch den Übergang  $S_1 \Rightarrow S_2$ , der zum zweiten Mal in der Blitzserie durchlaufen wurde (Abbildung 63, Abbildung 28). Eine derartig ausgeprägte Erhöhung war bei  $20 \text{ bar O}_2$  nicht zu erkennen (Abbildung 57, Abbildung 63, Tabelle 12), wodurch deutlich wurde, daß bei  $20 \text{ bar O}_2$  im fünften Blitz nicht der Übergang  $S_1 \Rightarrow S_2$  durchlaufen wurde. Das System OEC blieb also weitestgehend stehen. Trotzdem waren noch positive und negative Signale bei  $20 \text{ bar O}_2$  auf dem 4. und 5. Blitz sichtbar. Bei dem positiven Signal handelte es sich um die Reduktion von  $Q_A$ . Da auch bei  $20 \text{ bar O}_2$   $Y_Z^{\text{OX}}$  zwischen den Blitzen reduziert wurde, konnte auf jedem Blitz  $P_{680}$  angeregt und im Sinne des linearen Elektronentransports (siehe Schema in Abbildung 7) durch Phaeophytin  $a$  zu  $P_{680}^{+\bullet}$  oxidiert werden.

Die Reduktion von  $Y_Z^{\text{OX}}$  soll hier noch einmal genauer betrachtet werden. Die Simulation (Abbildung 93) zeigte, daß bei  $20 \text{ bar O}_2$   $30\%$  B und  $10\%$  C gebildet wurden. Nach dem hier verwendeten Modell stellt die Reaktion  $A \rightleftharpoons B$  den Übergang  $S_3 Y_Z^{\text{OX}} \bullet (\text{H}_2\text{O})_2 \rightleftharpoons S_2 \bullet (\text{H}_2\text{O})_2 Y_Z$  dar. Der Anteil an  $S_2 \bullet (\text{H}_2\text{O})_2 Y_Z$  steigt dabei bei steigenden Sauerstoffpartialdrücken noch an (Tabelle 19). Demzufolge wird auch bei hohen

Sauerstoffpartialdrücken  $Y_Z^{ox}$  zu > 40% über die „normalen“ Wege reduziert. Wie die verbleibenden 60% innerhalb von 100 ms Dunkelphase reduziert wurden (Abschnitt VIII.2.4), wurde nicht geklärt.

Phaeophytin  $a$  reduzierte  $Q_A$  zu  $Q_A^{\bullet}$ , woraus die blitzinduzierte Absorptionsänderung resultierte (zusammen mit der Übertragung des Elektrons auf den künstlichen Akzeptor 2,5-DCBQ; siehe Seite 66). Auf diesen positiven Anstieg folgte ein abfallendes Signal. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um die bereits beschriebene (siehe VII.2.1) DCBQ-Dismutation [Bensasson und Land 73; Bögershausen 97; Bögershausen und Junge 95]. Da aber die negative Gesamtamplitude nach dem dritten Blitz gegenüber dem ersten und zweiten Blitz erhöht war, lief noch eine weitere Reaktion ab. Wie oben simuliert wurde, handelte es sich hierbei hauptsächlich um den ersten Teilschritt  $A \rightleftharpoons B$  der Reaktion aus Schema 2, (Seite 108, bzw. Schema 4, Seite 129), der zur Verringerung der Konzentration von  $A$  und damit zur Absorptionsabnahme (vgl. Abschnitt VIII.2.3) führte. Darüber hinaus zeigten die Simulationen, daß auch bei 20 bar  $O_2$  noch ein Restanteil von  $C$  (10%) gebildet wurde. Ein Teil der Zentren durchlief also nach dem dritten Blitz den Übergang  $A \rightleftharpoons B$ , der Großteil blieb aber in  $A$  stehen. Es ist wahrscheinlich, daß die ebenfalls vergrößerte, negative Gesamtamplitude nach dem vierten Blitz bei 20 bar  $O_2$  diejenigen Zentren darstellt, die nach dem dritten Blitz in  $S_3$  verharrten und nun auf dem vierten Blitz den Übergang  $A \rightleftharpoons B$  durchführten. Die negative Amplitude nach dem 5. Blitz war in  $O_2$ -Proben gegenüber dem ersten und zweiten Blitz noch immer erhöht (Tabelle 13), aber weniger als nach dem 3. und 4. Blitz. Das lag wahrscheinlich daran, daß ein Teil der Zentren bereits nach  $B$  abgeflossen war. Das mögliche Schicksal des Zustandes  $B$  wird in den beiden folgenden Schemata diskutiert.

**i) Ausgangsposition: OEC vor dem dritten Blitz.  $B = S_2 \bullet H_2O_2$**



$S_3^*$  kennzeichnet einen blockierten Zustand  $S_3$ , der nicht mehr weiter reagieren kann (auch nicht bei erneuter Anregung des Systems).  $S_2 \bullet H_2O_2$  war wahrscheinlich stabil und zerfiel nicht zu  $S_2$  und  $H_2O_2$ . Ansonsten hätte im 4. Blitz eine vergrößerte (30%), positive Amplitude durch den Übergang  $S_2 \Rightarrow S_3$  erscheinen müssen. Alternativ könnte man annehmen, daß  $S_2 \bullet H_2O_2$  zu  $S_3 \bullet H_2O_2$  oxidiert wurde mit einem  $\Delta \epsilon = 0$ . Dies ist aber

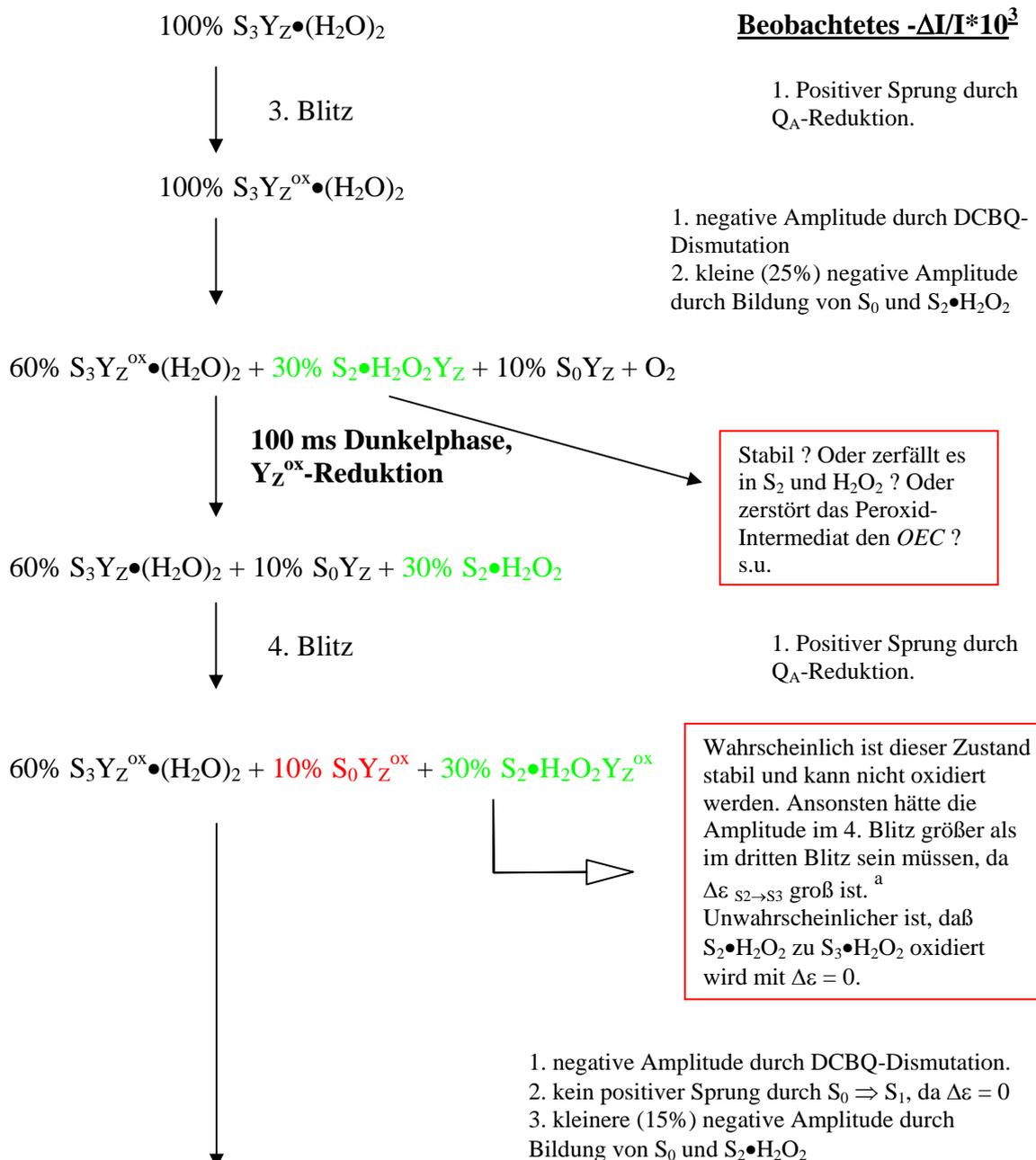
unwahrscheinlich wegen der großen Exktinktionsänderung von  $S_2 \Rightarrow S_3$ . Es ist möglich, daß durch die Blockade der schnellen Entgiftung von  $H_2O_2$  (durch Reduktion zu Wasser) die Stabilisierung von Wasserstoffperoxid zur irreversiblen Schädigung des *OEC* in diesen Zentren führte [Zhang *et al.* 03].

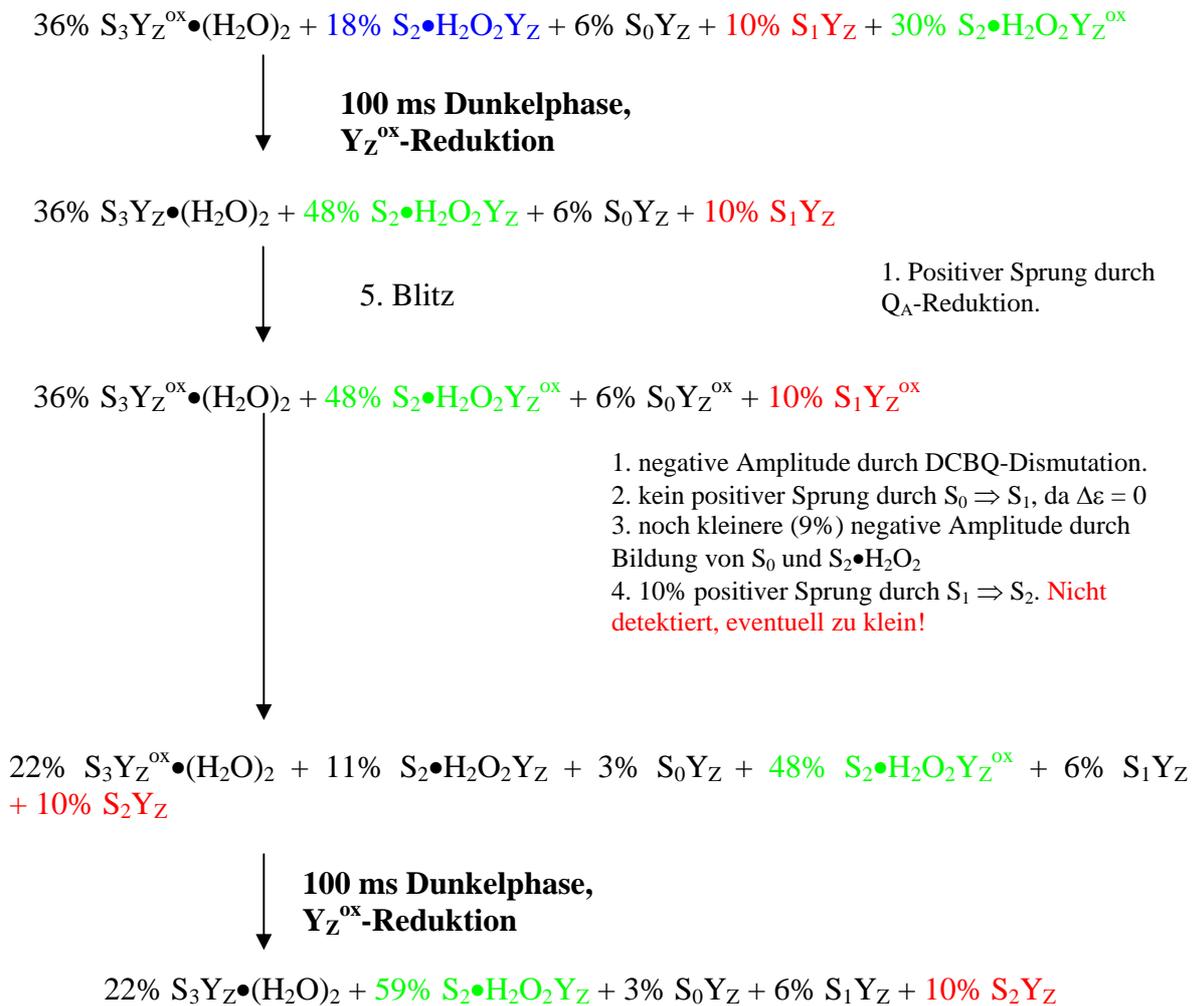
Die positiven Amplituden der Blitze #4 und #5 beschreiben die  $Q_A$ -Reduktion und die negative Amplitude die DCBQ-Dismutation. Die geringfügig vergrößerten, negativen Amplituden auf dem vierten und fünften Blitz könnten aus Fehlanregungen (*misses*) resultieren. Alternativ müßten sie anderen blitzinduzierten Reaktionen zugeschrieben oder als Ungenauigkeit durch das schlechte Signal/Rausch-Verhältnis interpretiert werden.

Als dritte Möglichkeit zur Erklärung der vergrößerten negativen Amplitude blieb die oben unberücksichtigte Dunkelverteilung der S-Zustände von 70 / 30 ( $S_1 / S_0$ ). Hiergegen sprach allerdings, daß die positive Amplitude auf dem 4. Blitz nicht vergrößert war.

Weitere Messungen sollten die unterschiedlichen Möglichkeiten klären können.

**ii) Ausgangsposition: *OEC* vor dem dritten Blitz.**





- 1. negative Amplitude durch DCBQ-Dismutation.
- 2. kein positiver Sprung durch S<sub>0</sub> ⇒ S<sub>1</sub>, da Δε = 0
- 3. noch kleinere (9%) negative Amplitude durch Bildung von S<sub>0</sub> und S<sub>2</sub>•H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 4. 10% positiver Sprung durch S<sub>1</sub> ⇒ S<sub>2</sub>. **Nicht detektiert, eventuell zu klein!**

*Es findet also eine Anreicherung des Intermediates statt.*

<sup>a</sup> Eine genauere Überprüfung ist möglich durch spektroskopische Messung des Signals auf dem vierten Blitz mit hoher Zeitauflösung. Die Abwesenheit einer 100 μs – Kinetik (Abbildung 79) würde den Zustand S<sub>2</sub> vor dem Blitz ausschließen. Außerdem muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß durch die Stabilisierung des Peroxid-Intermediats (die schnelle Entgiftung durch Reduktion ist blockiert!) der OEC in diesen PSII-Kernkomplexen, zumindest partiell, zerstört wird. Die schädigende Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf den OEC ist in [Zhang *et al.* 03] beschrieben.

Tendenziell beschreibt dieses Modell die spektroskopischen Daten gut. Die hier nicht erklärbare, gleich große negative Amplitude auf den dritten und vierten Blitz könnte ein Resultat aus Fehlanregungen (*misses*) sein oder aus der Ungenauigkeit auf Grund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses resultieren. Durch Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses und Messungen mit höherer Zeitauflösung kann dieses Modell überprüft werden.

### iii) Berücksichtigung der 70 / 30 Dunkelverteilung

Das zweite Modell vernachlässigt die Dunkelverteilung der PSII-Kernkomplexe von 70 / 30 (S<sub>1</sub> / S<sub>0</sub>). Bei Berücksichtigung wäre eine vergrößerte, positive Amplitude auf dem dritten Blitz gegenüber dem vierten Blitz zu fordern - durch Zentren, die erst auf dem

dritten Blitz den Übergang  $S_2 \Rightarrow S_3$  vollziehen. Eine vergrößerte Amplitude war aber zum einen nicht sichtbar, zum anderen war die Zeitauflösung zu schlecht, um die positive Amplitude in zwei Phasen ( $Q_A$ -Reduktion,  $S_2 \Rightarrow S_3$ ) unterscheiden zu können. Eine ungefähr gleich große positive Amplitude im dritten und vierten Blitz wäre unter Berücksichtigung der Dunkelverteilung nur dann zu erwarten, wenn der Zustand  $S_2 \bullet H_2O_2$  mit positiven  $\Delta\varepsilon$  doch oxidiert werden kann (bzw.  $S_2 \bullet H_2O_2$  in der Dunkelphase zu  $S_2$  und  $H_2O_2$  zerfällt und anschließend  $S_2$  „normal“ zu  $S_3$  oxidiert werden kann).

Die Berücksichtigung der 70 / 30 Dunkelverteilung würde die gleich großen negativen Amplituden nach den Blitzen 3 und 4 erklären.

### VIII.3.4 Konsequenzen und Ausblick

Mit den hier durchgeführten Versuchen konnte zum ersten Mal ein Intermediat des sauerstofffreisetzenden Schrittes der Photosynthese stabilisiert werden, nachdem alle vorherigen Ansätze bisher ergebnislos verlaufen sind (siehe Einleitung, Seite 107).

Die Versuchsergebnisse sind am besten verträglich mit einem Intermediat, das eine halb so große Absorption wie der höchste oxidierte Zustand  $S_3 Y_Z^{ox}$  hat. Da die negative Amplitude des Übergangs  $S_4 \rightarrow S_0$  bei 360 nm zwei gleich große, positive Absorptionssprünge ( $S_1 \Rightarrow S_2$ ,  $S_2 \Rightarrow S_3$ ) revertiert, lag es nahe, die Reduktion von  $S_3 Y_Z^{ox}$  durch Wasser in zwei 2-Elektronen-Schritte aufzuteilen, wovon der erste  $Y_Z^{ox}$  zu  $Y_Z$  und  $S_3$  zu  $S_2$  reduzierte. Da dieser erste Schritt eine vielfach größere Halbwertszeit als der folgende Schritt hatte, wurde er der Bildung der O-O-Bindung zugewiesen. Diese Überlegungen setzen voraus, daß der Zustand  $S_2 \bullet H_2O_2$  bei der Wellenlänge 360 nm die gleiche Absorption wie der „normale“ Zustand  $S_2 \bullet (H_2O)_2$  hat. Zukünftige Messungen bei 440 nm könnten die Stabilisierung von  $S_2$  unter hohem  $p(O_2)$  bestätigen: Nach den aus der Literatur bekannten Differenzspektren ([Lavergne 91], Anhang XI.7) ist  $\Delta\varepsilon_{S_2 \rightarrow S_3}$  bei 440 nm nahezu Null, wohingegen  $\Delta\varepsilon_{S_1 \rightarrow S_2}$  ungefähr die gleiche Größe wie bei 360 nm hat. Auf Grund der hier angestellten Überlegungen sollte deshalb  $\Delta X$  bei 440 nm ungefähr gleich 0 sein, was nachzuprüfen bleibt.

Die photosynthetische Wasseroxidation ist der bedeutendste biologische Prozeß auf der Erde, der die Lebensgrundlage nahezu aller eukaryontischer Lebewesen darstellt. Die energetisch gesehen aufwendige Reaktion läuft bei extrem positivem Redoxpotential ab ( $> 1.2$  V [Klimov *et al.* 79; Rappaport *et al.* 02; Rappaport und Lavergne 01]). Die Triebkraft der letzten Schritte zur Freisetzung von Sauerstoff ist mit  $\Delta G_{A \rightarrow C} = -6.8$  kJ/mol ( $\Delta G^{\circ}_{A \rightarrow C} = -3$  kJ/mol) ziemlich klein. Dies unterstreicht die Feststellung, daß PSII im äußersten Grenzbereich der möglichen Redoxspanne eines 680-nm-Photons arbeitet. Der überraschend niedrige Sauerstoffpartialdruck, der bereits bei 2.3 bar eine halbmaximale Inaktivierung des Katalyseschrittes bewirkt, hat eine gravierende Konsequenz: Der gegenwärtige Sauerstoffpartialdruck der Luft von 0.21 bar  $p(O_2)$  ist nicht sehr viel niedriger als der maximal erreichbare Sauerstoffpartialdruck, der die Wasserspaltungsreaktion weitgehend hemmen würde. Wenn man in Betracht zieht, daß der pH-Wert im Thylakoidlumen deutlich niedriger als bei den hier durchgeführten Versuchen ist ( $\approx 6$  [Raghavendra 98]), wird der energetische Spielraum für die Wasserspaltungsreaktion noch geringer. Die Hemmung von PSII durch zu hohe Sauerstoffpartialdrücke könnte eine der Ursachen sein, daß sich die gegenwärtige Umgebungsluft bei einem Sauerstoffanteil von  $\approx 21\%$  [Holleman und Wiberg 85] eingependelt hat. Photosystem II arbeitet hart an der Grenze zum energetisch möglichen.

Diese Hypothese erfährt Unterstützung von der Tatsache, daß einzellige Grünalgen bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken eine höhere Photosyntheserate haben als bei höheren Sauerstoffpartialdrücken, und daß die Photosyntheserate ab ungefähr 0.21 bar  $p(\text{O}_2)$  nicht weiter gesteigert werden kann [Pope und Berger 73b]. Bei der Interpretation dieser Befunde ist zu berücksichtigen, daß die Konzentration von gelöstem  $\text{O}_2$  in den Zellen bzw. im Thylakoidlumen nicht bekannt ist und durch den Organismus reguliert werden kann (z.B. durch Atmung). So ist beispielsweise das aerob lebende Bakterium *Azotobacter vinelandii* unter Umgebungsbedingungen in der Lage, Stickstoff zu fixieren, obwohl die dafür zuständige Nitrogenase extrem sauerstoffempfindlich ist. Wahrscheinlich hat *A. vinelandii* deshalb die höchste Respirationsrate aller bisher bekannten Organismen [Brock *et al.* 94], um die intrazelluläre Sauerstoffkonzentration niedrig zu halten.

Im Zuge dieser Diskussion wurden mehrere, zukünftig zu klärende Fragen bereits aufgeworfen. Darüber hinaus, wird es interessant sein, das Verhalten von PSII-Kernkomplexen, deren Sauerstofffreisetzung bereits durch Mutationen (D1-D61N und D1-D61A, siehe Kapitel VII) verlangsamt ist, unter erhöhtem  $p(\text{O}_2)$  zu vermessen oder die Gesamtphotosyntheseleistung von Zellen bei erhöhtem  $p(\text{O}_2)$  zu bestimmen.

Die hier eingeführte Methode zur Stabilisierung eines Intermediats der Wasserspaltungsreaktion gibt den Photosynthese-Forschern mit vielfältigem Methodenarsenal die Möglichkeit, neue Einblicke in den Mechanismus der Wasserspaltung zu gewinnen. Diese Öffnung eines „neuen Fensters“ könnte helfen, die sich andeutende Stagnation der letzten Jahre aufzulösen. Trotz der jüngsten Veröffentlichungen der Röntgenkristallstrukturen dreier PSII-Kernkomplexe [Ferreira *et al.* 04; Kamiya und Shen 03; Zouni *et al.* 01b] haben diese, wegen der geringen Auflösung und daraus resultierenden widersprüchlichen Ergebnissen, bisher nicht wesentliche neue Details der katalytischen Reaktionen des *OEC* enthüllen können.

## IX. Zusammenfassung

Aus PSI-freien *Synechocystis* sp. PCC 6803 Zellen wurden PSII-Kernkomplexe mit niedrigem Chl/PSII-Verhältnis und guter Stabilität präpariert. Diese Präparationen erlaubten spektroskopische Messungen im nahen UV mit auswertbarem Signal/Rausch-Verhältnis schon bei Einmal-Anregung von dunkeladaptierten Proben. Über spektroskopische und polarographische Meßmethoden wurden folgende wichtige Details des Mechanismus der photosynthetischen Wasseroxidation geklärt:

(i) Der Aminosäurerest D1-Glu189 ist nicht, wie bisher angenommen, am postulierten Abtransport des phenolischen Protons von  $Y_Z$  aus dem Reaktionszentrum beteiligt und hat wahrscheinlich allein eine strukturell-stabilisierende Funktion. Durch diese Ergebnisse wurde die Frage, ob D1-His190 tatsächlich der primäre Protonenakzeptor von  $Y_Z$  ist, erneut aufgeworfen. Eine Klärung werden zukünftige Röntgenkristallstrukturen mit höheren Auflösungen bringen, wenn sie eine Zuweisung der Elektronendichten zu Aminosäureseitenketten zulassen.

ii) Die Suche nach chemischen Intermediaten des letzten Reaktionsschrittes vor der Sauerstoffbildung hat zwei Ergebnisse hervorgebracht.

1. Mit Arrhenius-Analysen polarographischer und spektroskopischer Daten zum S-Übergang  $S_4 \rightarrow S_0$  konnte keine charakteristische Temperatur ermittelt werden, bei der sich die Aktivierungsenergie der Reaktion schlagartig änderte. Somit lieferte die Auswertung keinen Hinweis auf einen temperaturabhängigen Wechsel von einer bestimmten ratenlimitierenden zu einer anderen ratenlimitierenden Reaktion, also keinen Hinweis auf ein möglicherweise in einem bestimmten Temperaturintervall abgreifbares chemisches Zwischenprodukt der Wasseroxidation.

2. Mit einer neuen, druckfesten spektroskopischen Meßzelle wurde durch erhöhten Partialdruck des Sauerstoffs das Gleichgewicht der terminalen Reaktion in Richtung Edukte verschoben und ein Intermediat der Wasserspaltung stabilisiert. Bei diesem Intermediat handelt es sich wahrscheinlich um einen teilweise reduzierten *OEC* im Zustand  $S_2$ , der, zumindest anfangs, noch das gebildete Peroxid gebunden haben könnte.

Der hier beschrittene Weg zur Stabilisierung des Intermediates scheint nach ca. 30 Jahren intensiver aber erfolgloser Suche nach Zwischenprodukten dieser sowohl technisch als biologisch interessanten Reaktion eine Tür für Analysen der chemischen Reaktionsfolge zu öffnen.

Das  $\Delta G^{\circ}_{A \rightarrow C}$  dieser Reaktion ist mit  $-3$  kJ/mol sehr klein und läßt den oxygenen, photosynthetischen Organismen wenig Spielraum, den Sauerstoffanteil in der Atmosphäre über den gegenwärtigen Wert zu heben. Tatsächlich befinden sich die Organismen mit einem pH von  $\approx 6$  im Thylakoidlumen wahrscheinlich schon nah an der Grenze zur halbmaximalen Hemmung des Systems, die bei 2.3 bar Sauerstoff erreicht wird.

## X. Literaturverzeichnis

1. Adachi, A. and Kusunoki, M. (2003) Vol. 11<sup>th</sup> international symposium on *phototrophic prokaryotes*, 138, Density-function-theoretic studies on the proton and electron transfers associated with redox reactions of tyrosine Y<sub>Z</sub> in photosystem II. Possible roles of Gln-165, Tokyo institute of technology, Tokyo
2. Ahlbrink, R. (2002) Laserspektroskopie an Photosystem II, Doktorarbeit, Universität Osnabrück
3. Ahlbrink, R., Haumann, M., Cherepanov, D., Bögershausen, O., Mulkidjanian, A. und Junge, W. (1998) *Biochemistry* 37, 1131-1142. Function of tyrosine-Z in water oxidation by photosystem II: electrostatical promotor instead of hydrogen abstractor
4. Ahlbrink, R. and Junge, W. (1998) in *Photosynthesis: mechanisms and effects* (Garab, G., Ed.), Vol. 2, 997-1000, Topology of chromophores and cofactors in photosystem II: fine analysis of difference spectra by polarized spectroscopy, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
5. Allakhverdieva, Y.M., Mamedov, M.D., Ferimazova, N., Papageorgiou, G.C. und Gasanov, R.A. (1999) *Photosynthetica* 37, 423-432. Glycinebetaine stabilizes photosystem 1 and photosystem 2 electron transport in spinach thylakoid membranes against heat inactivation
6. Ananyev, G., Renger, G., Wacker, U. und Klimov, V. (1994) *Photosynth.Res.* 41, 327-338. The Photoproduction of superoxide radicals and the superoxide-dismutase activity of photosystem-II - the possible involvement of cytochrome B559
7. Anderson, J.M. (2001) *FEBS Lett.* 488, 1-4. Does functional photosystem II complex have an oxygen channel?
8. Aullon, G., Ruiz, E. und Alvarez, S. (2002) *Chemistry-A European Journal* 8, 2508-2515. Theoretical clues to the mechanism of dioxygen formation at the oxygen-evolving complex of photosystem II
9. Ayala, I., Kim, S. und Barry, B.A. (1999) *Biophys.J.* 77, 2137-2144. A difference fourier transform infrared study of tyrosyl radical Z. Decay in photosystem II.
10. Babcock, G. T. (1995) in *Photosynthesis: From light to biosphere* (Mathis, P., Ed.), Vol. 2, 209-215, The oxygen evolving complex of photosystem II as a metallo radical enzyme, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
11. Babcock, G.T., Barry, B.A., Debus, R.J., Hoganson, C.W., Atamian, M., McIntosh, L., Sithole, U. und Yocum, C.F. (1989) *Biochemistry* 28, 9557-9565. Water oxidation in photosystem II: from radical chemistry to multielectron chemistry

12. Babcock,G.T., Blankenship,R.E. und Sauer,K. (1976) FEBS Lett. 61, 286-289.  
Reaction kinetics for positive charge accumulation on the water side of chloroplast photosystem II
13. Babcock,G.T., Espe,M., Hoganson,C., Lydakiss-Simantiris,N., McCracken,J., Shi,W., Styring,S., Tommos,C. und Warncke,K. (1997) Acta Chem.Scand. 51, 533-540. Tyrosyl radicals in enzyme catalysis: some properties and a focus on photosynthetic water oxidation
14. Babcock,G.T., Ghanotakis,D.F., Ke,B. und Diner,B.A. (1983) Biochim.Biophys.Acta 723, 276-286. Electron donation to photosystem II in reaction center preparations
15. Babu,A., Su,H., Ryu,Y.J. und Gulati,J. (1992) J.Biol.Chem. 267, 15469-15474.  
Determination of residue specificity in the EF-hand of troponin-C for Ca<sup>2+</sup> coordination, by genetic-engineering
16. Bald,D., Kruij,J. und Rögner,M. (1996) Photosynth.Res. 49, 103-118.  
Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes - how is the phycobilisome connected with the photosystems
17. Baldwin,M.J. und Pecoraro,V.L. (1996) J.Am.Chem.Soc. 118, 11325-11326.  
Energetics of proton-coupled electron transfer in high-valent Mn<sub>2</sub>(μ-O)<sub>2</sub> systems - models for water oxidation by the oxygen-evolving complex of photosystem II
18. Barber,J. (2002a) Bioelectrochemistry 55, 135-138. P680: what is it and where is it?
19. Barber,J. (2002b) Curr.Opin.Struct.Biol. 12, 523-530. Photosystem II: a multisubunit membrane protein that oxidises water
20. Barber,J. (2003) Quarterly Reviews of Biophysics 36, 71-89. Photosystem II: the engine of life
21. Barber,J., Nield,J., Morris,E.P., Zheleva,D. und Hankamer,B. (1997) Physiol.Plant. 100, 817-827. The structure, function and dynamics of photosystem two
22. Barry,B.A., Boerner,R.J. und de Paula,J.C. (1994) in *The molecular biology of cyanobacteria* (Bryant,D.A., Ed.), 217-257, The use of cyanobacteria in the study of the structure and function of photosystem II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
23. Barry,B.A., El-Deeb,M.K., Sandusky,P.O. und Babcock,G.T. (1990) J.Biol.Chem. 265, 20139-20143. Tyrosine radicals in photosystem II and related model compounds. Characterization by isotopic labeling and EPR spectroscopy
24. Barten,R. und Lill,H. (1995) FEMS Lett. 129, 83-88. DNA-uptake in the naturally competent cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803
25. Barter,L.M.C., Durrant,J.R. und Klug,D.R. (2003) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 100, 946-951. A quantitative structure-function relationship for the Photosystem II reaction center: Supermolecular behavior in natural photosynthesis

26. Battino,R., Evans,F.D. und Danforth,W.F. (1968) Journal of the American Oil Chemists Society 45, 830 Solubilities of 7 gases in olive oil with reference to theories of transport through cell membrane
27. Bensasson,R. und Land,E.J. (1973) Biochim.Biophys.Acta 325, 175-181. Optical and kinetic properties of semireduced plastoquinone and ubiquinone: electron acceptors in photosynthesis
28. Bernard,M.T., MacDonald,G.M., Nguyen,A.P., Debus,R.J. und Barry,B.A. (1995) J.Biol.Chem. 270, 1589-1594. A difference infrared study of hydrogen bonding to the Z' tyrosyl radical of photosystem II
29. Bernarding,J., Eckert,H.J., Eichler,H.J., Napiwotzki,A. und Renger,G. (1994) Photochem.Photobiol. 59, 566-573. Kinetic studies on the stabilization of the primary radical pair  $P680^+ Pheo^-$  in different photosystem II preparations from higher plants
30. Berthold,D.A., Babcock,G.T. und Yocum,C.F. (1981) FEBS Lett. 134(2), 231-234. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes
31. Bialek-Bylka,G.E., Tomo,T., Satoh,K. und Koyama,Y. (1995) FEBS Lett. 363, 137-140. 15-cis- $\beta$ -carotene found in the reaction center of spinach photosystem II
32. Blomberg,M.R.A. und Siegbahn,P.E.M. (2003) Molecular Physics 101, 323-333. A quantum chemical study of tyrosyl reduction and O-O bond formation in photosystem II
33. Boekema,E.J., Nield,J., Hankamer,B. und Barber,J. (1998) Eur.J.Biochem. 252, 268-276. Localization of the 23 kDa subunit of the oxygen-evolving complex of photosystem II by electron microscopy
34. Boerner,R.J., Bixby,K.A., Nguyen,A.P., Noren,G.H., Debus,R.J. und Barry,B.A. (1993) J.Biol.Chem. 268, 1817-1823. Removal of stable tyrosine radical  $D^+$  affects the structure or redox properties of tyrosine Z in manganese-depleted photosystem II particles from *Synechocystis* 6803
35. Bögershausen,O. (1997) Oxygene Photosynthese: Die Kopplung von Elektronen- und Protonentransferreaktionen in Photosystem II, Doktorarbeit, Universität Osnabrück
36. Bögershausen,O. und Junge,W. (1995) Biochim.Biophys.Acta 1230, 177-185. Rapid proton transfer under flashing light at both functional sides of dark adapted photosystem II core particles
37. Boussac,A., Setif,P. und Rutherford,A.W. (1992) Biochemistry 31, 1224-1234. Inhibition of tyrosine Z photooxidation after formation of the  $S_3$  state in  $Ca^{2+}$ -depleted and  $Cl^-$ -depleted photosystem II
38. Boveris,A. und Chance,B. (1973) Biochem.J. 134, 707-716. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen

39. Brettel, K., Schlodder, E. und Witt, H.T. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 766, 403-415. Nanosecond reduction kinetics of photooxidized chlorophyll-aII (P<sub>680</sub>) in single flashes as a probe for the electron pathway, H<sup>+</sup>-release and charge accumulation in the O<sub>2</sub>-evolving complex
40. Brettel, K. und Witt, H.T. (1983) *Photobiochem. Photobiophys.* 6, 253-260. Reduction kinetics of the photooxidized chlorophyll a<sub>II</sub> in chloroplasts measured in the nanosecond range at 837 nm under repetitive flash excitation
41. Britt, R.D. (1996) in *Oxygenic photosynthesis: The light reactions* (Ort, D. und Yocum, C.F., Eds.), 137-164, Oxygen evolution, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
42. Brock, T.D., Madigan, M.M., Martinko, J.M. und Parker, J. (1994) *Biology of microorganisms*, Prentice-Hall International Inc., London
43. Bryant, D.A. (1994) *The molecular biology of cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
44. Burnap, R., Koike, H., Sotiropoulou, G., Sherman, L.A. und Inoue, Y. (1989) *Photosynth. Res.* 22, 123-130. Oxygen evolving membranes and particles from the transformable cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803
45. Buser, C.A., Thompson, L.K., Diner, B.A. und Brudvig, G.W. (1990) *Biochemistry* 29, 8977-8985. Electron-transfer reactions in manganese-depleted photosystem II
46. Campbell, K.A., Peloquin, J.M., Diner, B.A., Tang, X.S., Chisholm, D.A. und Britt, R.D. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119, 4787-4788. The  $\tau$ -nitrogen of D2 histidine 189 is the hydrogen bond donor to the tyrosine radical Y<sub>D</sub> of photosystem II
47. Candeias, L.P., Turconi, S. und Nugent, J.H.A. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 1-5. Tyrosine Y<sub>Z</sub> and Y<sub>D</sub> of photosystem II: comparison of optical spectra to those of tyrosine oxidised by pulsed radiolysis
48. Carrell, T.G., Tyryshkin, A.M. und Dismukes, G.C. (2002) *J. Biol. Inorg. Chem.* 7, 2-22. An evaluation of structural models for the photosynthetic water-oxidizing complex derived from spectroscopic and X-ray diffraction signatures
49. Catucci, L., Dörner, W., Nield, J., Hankamer, B., Vass, I., und Barber, J. (1998) in *Photosynthesis: Mechanism and effects* (Garab, G., Ed.), Vol. 2, 973-976, Isolation and characterization of oxygen evolving photosystem II core complexes from spinach in the presence of glycine betaine, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
50. Chen, K.S., Hirst, J., Camba, R., Bonagura, C.A., Stout, C.D., Burgess, B.K. und Armstrong, F.A. (2000) *Nature* 405, 814-817. Atomically defined mechanism for proton transfer to a buried redox centre in a protein

51. Cherepanov, D. A., Drevestadt, W., Krishtalik, L. I., Mulkidjanian, A., und Junge, W. (1998) in *Photosynthesis: mechanisms and effects* (Garab, G., Ed.), Vol. 2, 1073-1076, Protein relaxation and kinetics of  $P_{680}^+$  reduction in photosystem II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
52. Cherepanov, D.A. und Mulkidjanian, A.Y. (2001) *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1505, 179-184. Proton transfer in *Azotobacter vinelandii* ferredoxin I: entatic Lys84 operates as elastic counterbalance for the proton-carrying Asp15
53. Chu, H.A., Debus, R.J. und Babcock, G.T. (2001) *Biochemistry* 40, 2312-2316. D1-asp170 is structurally coupled to the oxygen evolving complex in photosystem II as revealed by light-induced fourier transform infrared difference spectroscopy
54. Chu, H.A., Nguyen, A.P. und Debus, R.J. (1994a) *Biochemistry* 33, 6150-6157. Site-directed photosystem II mutants with perturbed oxygen-evolving properties. 2. Increased binding or photooxidation of manganese in the absence of the 33-kDa polypeptide in vivo
55. Chu, H.A., Nguyen, A.P. und Debus, R.J. (1994b) *Biochemistry* 33, 6137-6149. Site-directed photosystem II mutants with perturbed oxygen-evolving properties. 1. Instability or inefficient assembly of the manganese cluster in vivo
56. Chu, H.A., Nguyen, A.P. und Debus, R.J. (1995a) *Biochemistry* 34, 5839-5858. Amino acid residues that influence the binding of manganese or calcium to photosystem II. 1. The lumenal interhelical domains of the D1 polypeptide
57. Chu, H.A., Nguyen, A.P. und Debus, R.J. (1995b) *Biochemistry* 34, 5859-5882. Amino acid residues that influence the binding of manganese or calcium to photosystem II. 2. The carboxy-terminal domain of the D1 polypeptide
58. Chu, H. A., Nguyen, A. P., und Debus, R. J. (1995c) in *Photosynthesis: from light to biosphere* (Mathis, P., Ed.), Vol. 2, 439-442, An improved host strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for introducing site-directed mutations into the D1 protein of photosystem II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
59. Chua, N.H. (1980) *Meth.Enzymol.* 69, 434-446. Electrophoretic analysis of chloroplast proteins
60. Clausen, J., Debus, R.J. und Junge, W. (2004) *Biochim.Biophys.Acta* 1655C, 184-194. Time-resolved oxygen production by PSII: Chasing chemical intermediates
61. Clausen, J., Winkler, S., Hays, A. M. A., Hundelt, M., Debus, R. J., und Junge, W. (2001a) in *PS2001 Proceedings - 12<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis* Vol. 1, 1-5, Mutations D1-E189K, R and Q of *Synechocystis* sp. PCC6803 are without influence on ns-to-ms electron transfer between OEC-Y<sub>Z</sub>-P<sub>680</sub> in photosystem II, Csiro Publishing, Collingwood, Vic. 3066, Australia

62. Clausen,J., Winkler,S., Hays,A.M.A., Hundelt,M., Debus,R.J. und Junge,W. (2001b) *Biochim.Biophys.Acta* 1506, 224-235. Photosynthetic water oxidation: Mutations of D1-Glu189K, R and Q of *Synechocystis* sp. PCC6803 are without any influence on electron transfer rates at the donor side of photosystem II
63. Cole,J., Boska,M., Blough,N.V. und Sauer,K. (1986) *Biochim.Biophys.Acta* 848, 41-47. Reversible and irreversible effects of alkaline pH on Photosystem II electron-transfer reactions
64. Conjeaud,H. und Mathis,P. (1980) *Biochim.Biophys.Acta* 590, 353-359. The effects of pH on the reductions kinetics of P-680 in Tris-treated chloroplasts
65. de Wijn,R., Schrama,T. und van Gorkom,H.J. (2001) *Biochemistry* 40, 5821-5834. Secondary stabilization reactions and proton-coupled electron transport in photosystem II investigated by electroluminescence and fluorescence spectroscopy
66. Debus,R.J. (1992) *Biochim.Biophys.Acta* 1102, 269-352. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution
67. Debus,R.J. (2000) *Met.Ions.Biol.Syst.* 657-711. The polypeptides of photosystem II and their influence on maganotyrosyl-based oxygen evolution
68. Debus,R.J. (2001) *Biochim.Biophys.Acta* 1503, 164-186. Amino acid residues that modulate the properties of tyrosine Y(Z) and the manganese cluster in the water oxidizing complex of photosystem II
69. Debus,R.J., Barry,B.A., Sithole,I., Babcock,G.T. und McIntosh,L. (1988) *Biochemistry* 27, 9071-9074. Directed mutagenesis indicates that the donor to  $P_{680}^+$  in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide
70. Debus,R.J., Campbell,K.A., Gregor,W., Li,Z.L., Burnap,R.L. und Britt,R.D. (2001) *Biochemistry* 40, 3690-3699. Does histidine 332 of the D1 polypeptide ligate the manganese cluster in photosystem II? An electron spin echo envelope modulation study
71. Debus,R.J., Campbell,K.A., Pham,D.P., Hays,A.M.A. und Britt,R.D. (2000) *Biochemistry* 39, 6275-6287. Glutamate 189 of the D1 polypeptide modulates the magnetic and redox properties of the manganese cluster and tyrosine  $Y_Z$  in photosystem II
72. Debus, R. J., Campbell, K. A., Pham, D. P., Hays, A. M. A., Peloquin, J. M., und Britt, R. D. (1998) in *Photosynthesis: mechanisms and effects* (Garab, G., Ed.), Vol. 2, 1375-1378, Influence of D1-Glu189 on the properties of  $Y_Z$  and the manganese cluster in photosystem 2, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
73. Debus, R. J., Nguyen, A. P., und Conway, A. B. (1990) in *Current Research in Photosynthesis* (Baltscheffsky, M., Ed.), Vol. 1, 829-832, Identification of ligands to manganese and calcium in photosystem II by site-directed mutagenesis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

74. Deisenhofer, J., Sinning, I., Epp, O. und Michel, H. (1995) *J. Mol. Biol.* 246, 429-457. Crystallographic refinement at 2.3-Angstrom resolution and refined model of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*
75. Dekker, J. P. (1985) Electron transfer in the oxygen-evolving system of photosynthesis, Doktorarbeit, University of Leiden
76. Dekker, J.P. (1992) in *Manganese redox enzymes* (Pecoraro, V.L., Ed.), 85-104, Optical studies on the oxygen-evolving complex of photosystem II, VCH Publishers, Inc., New York
77. Dekker, J.P., Ghanotakis, D.F., Plijter, J.J., van Gorkom, H.J. und Babcock, G.T. (1984a) *Biochim. Biophys. Acta* 767, 515-523. Kinetics of the oxygen-evolving complex in salt-washed photosystem II preparations
78. Dekker, J.P., Plijter, J.J., Ouwehand, L. und van Gorkom, H.J. (1984b) *Biochim. Biophys. Acta* 767, 176-179. Kinetics of manganese redox transitions in the oxygen evolving apparatus of photosynthesis
79. Dekker, J.P., van Gorkom, H.J., Brok, M. und Ouwehand, L. (1984c) *Biochim. Biophys. Acta* 764, 301-309. Optical characterization of photosystem II electron donors
80. Dekker, J.P., van Gorkom, H.J., Wensink, J. und Ouwehand, L. (1984d) *Biochim. Biophys. Acta* 767, 1-9. Absorbance difference spectra of the successive redox states of the oxygen-evolving apparatus of photosynthesis
81. Demmig-Adams, B. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 1-24. Carotenoids and photoprotection in plants - a role for the xanthophyll zeaxanthin
82. Demmig-Adams, B. und Adams, W.W. (1996) *Trends in Plant Science* 1, 21-26. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis
83. DeRose, V.J., Mukerji, I., Latimer, M.J., Yachandra, V.K., Sauer, K. und Klein, M.P. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116, 5239-5249. Comparison of the manganese oxygen-evolving complex in photosystem II of spinach and *Synechococcus* sp. with multinuclear manganese model compounds by X-ray absorption spectroscopy
84. Diner, B.A. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1503, 147-163. Amino acid residues involved in the coordination and assembly of the manganese cluster of photosystem II. Proton-coupled electron transport of the redox-active tyrosines and its relationship to water oxidation
85. Diner, B.A. and Babcock, G.T. (1996) in *Oxygenic photosynthesis: the light reactions* (Ort, D.R. und Yocum, C.F., Eds.), 213-247, Structure, dynamics, and energy conversion efficiency in photosystem II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
86. Diner, B.A., Force, D.A., Randall, D.W. und Britt, R.D. (1998) *Biochemistry* 37, 17931-17943. Hydrogen bonding, solvent exchange, and coupled proton and electron transfer in the oxidation and reduction of redox-active tyrosine Y<sub>Z</sub> in Mn-depleted core complexes of photosystem II

87. Diner, B. A. and Nixon, P. J. (1998) in *Photosynthesis: Mechanisms and effects* (Garab, G., Ed.), Vol. 2, 1177-1180, Evidence for D1-His190 as the proton acceptor implicated in the oxidation of redox-active tyrosine Y<sub>Z</sub> of PSII, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
88. Diner, B.A., Nixon, P.J. und Farchaus, J.W. (1991) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 546-554. Site mutagenesis of photosynthetic reaction centers
89. Diner, B.A., Ries, D.F., Cohen, B.N. und Metz, J.G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, no. 18, 8972-8980. COOH-terminal processing of polypeptide D1 of the photosystem II reaction center of *Scenedesmus obliquus* is necessary for the assembly of the oxygen-evolving complex
90. Dismukes, G.C. (2001) *Science* 292, 447-448. Photosynthesis: Splitting water
91. Dremel, B.A.A., Schmid, R.D. und Wolfbeis, O.S. (1991) *Analytica Chimica Acta* 248, 351-359. Comparison of 2 fiberoptic L-glutamate biosensors based on the detection of oxygen or carbon-dioxide, and their application in combination with flow-Injection analysis to the determination of glutamate
92. Drevenstedt, W. (1997) *Oxygene Photosynthese: Spektroskopische Untersuchungen zur Elektrostatik und Kinetik des Elektronentransportes in Photosystem II*, Doktorarbeit, Universität Osnabrück
93. Durrant, J.R., Klug, D.R., Kwa, S.L.S., van Grondelle, R., Porter, G. und Dekker, J.P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4798-4802. A multimer model for P<sub>680</sub>, the primary electron donor of photosystem II
94. Eckert, H.J. und Renger, G. (1988) *FEBS Lett.* 236, 425-431. Temperature dependence of P<sub>680</sub><sup>+</sup> reduction in oxygen-evolving PS II membrane fragments at different redox states S<sub>i</sub> of the water oxidizing system
95. Eckert, H.J., Wiese, N., Bernarding, J., Eichler, H.J. und Renger, G. (1988) *FEBS Lett.* 240, 153-158. Analysis of the electron transfer from Pheo- to QA in PS II membrane fragments from spinach by time resolved 325 nm absorption changes in the picosecond domain
96. Enami, I., Yoshihara, S., Tohri, A., Okumura, A., Ohta, H. und Shen, J.R. (2000) *Plant and Cell Physiology* 41, 1354-1364. Cross-reconstitution of various extrinsic proteins and photosystem II complexes from cyanobacteria, red algae and higher plants
97. Estabrook, R.W. (1967) *Meth. Enzymol.* 10, 41-47. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratios
98. Etienne, A.L. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 153, 895-897. Etude de l'etape thermique de l'emission photosynthetique d'oxygene par une methode d'ecoulement
99. Faller, P., Pascal, A. und Rutherford, A.W. (2001) *Biochemistry* 40, 6431-6440. Beta-carotene redox reactions in photosystem II: electron transfer pathway

100. Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J. und Iwata, S. (2004) *Science* 303, 1831-1838. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center
101. Fieser, L.F. and Fieser, M. (1979) *Organische Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim
102. Fischkoff, S. und Vanderkooi, J.M. (1975) *Journal of General Physiology* 65, 663-676. Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by fluorochrome pyrene
103. Force, D.A., Randall, D.W., Lorigan, G.A., Clemens, K.L. und Britt, R.D. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 13321-13333. ESEEM studies of alcohol binding to the manganese cluster of the oxygen evolving complex of photosystem II
104. Fromme, P., Kern, J., Loll, B., Biesiadka, J., Saenger, W., Witt, H.T., Krauss, N. und Zouni, A. (2002) *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 357, 1337-1344. Functional implications on the mechanism of the function of photosystem II including water oxidation based on the structure of photosystem II
105. Fujita, Y., Murakami, A., Aizawa, K. und Ohki, K. (1994) in *The molecular biology of cyanobacteria* (Bryant, D.A., Ed.), 677-692, Short-term and long-term adaptation of the photosynthetic apparatus: Homeostatic properties of thylakoids, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
106. Funk, C. (2000) *Plant Molecular Biology* 44, 815-827. Functional analysis of the PsbX protein by deletion of the corresponding gene in *Synechocystis* sp PCC 6803
107. Funk, C., Schröder, W.P., Napiwotzki, A., Tjus, S.E., Renger, G. und Andersson, B. (1995) *Biochemistry* 34, 11133-11141. The PSII-S protein of higher plants: A new type of pigment-binding protein
108. Garbers, A., Kurreck, J., Iakovleva, O., Renger, G. und Parak, F. (2001) *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 30, 485-493. Moessbauer study of iron centers in D1/D2/Cyt b(559) complexes isolated from photosystem II of spinach
109. Gerken, S., Dekker, J.P., Schlodder, E. und Witt, H.T. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 977, 52-61. Studies on the multiphasic charge recombination between chlorophyll  $A_{II}^+$  (P-680<sup>+</sup>) and plastoquinone  $Q_A^-$  in Photosystem II complexes. Ultraviolet difference spectrum of  $Chl-a_{II}^+/Chl-a_{II}$
110. Ghanotakis, D.F., Yerkes, C.T. und Babcock, G.T. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 682, 21-31. The role of reagents accelerating the deactivation reactions of water-splitting enzyme system Y (ADRY reagents) in destabilizing high-potential oxidizing equivalents generated in chloroplast photosystem II
111. Gilchrist, M.L., Ball, J.A., Randall, D.W. und Britt, R.D. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9545-9549. Proximity of the manganese cluster of photosystem II to the redox-active tyrosine  $Y_Z$

112. Gilmore, A.M. (1997) *Physiologia Plantarum* 99, 197-209. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves
113. Hankamer, B., Morris, E., Nield, J., Carne, A. und Barber, J. (2001) *FEBS Lett.* 504, 142-151. Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II
114. Haumann, M. (1996) *Oxygenic photosynthesis: electrons, protons, electrostatics*, Doktorarbeit, Universität Osnabrück
115. Haumann, M., Bögershausen, O., Cherepanov, D.A., Ahlbrink, R. und Junge, W. (1997a) *Photosynth.Res.* 51, 193-208. Photosynthetic oxygen evolution: H/D isotope effects and the coupling between electron and proton transfer during the redox reactions at the oxidizing side of photosystem II
116. Haumann, M., Drevenstedt, W., Hundelt, M. und Junge, W. (1996) *Biochim.Biophys.Acta* 1273, 237-250. Photosystem II of green plants: Oxidation and deprotonation of the same component (histidine?) on  $S_1^* \rightarrow S_2^*$  in chloride depleted centers as on  $S_2 \rightarrow S_3$  in controls
117. Haumann, M., Hundelt, M., Jahns, P., Chroni, S., Bögershausen, O., Ghanotakis, D. und Junge, W. (1997b) *FEBS Lett.* 410, 243-248. Proton release from water oxidation by photosystem II: Similar stoichiometries are stabilized in thylakoids and core particles by glycerol
118. Haumann, M. und Junge, W. (1994) *Biochemistry* 33, 864-872. Extent and rate of proton release by photosynthetic water oxidation in thylakoids: electrostatic relaxation versus chemical production
119. Haumann, M. und Junge, W. (1996) in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D. und Yocum, C.F., Eds.), 165-192, Protons and charge indicators in oxygen evolution, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
120. Haumann, M. und Junge, W. (1999) *Biochim.Biophys.Acta* 1411, 86-91. Photosynthetic water oxidation: A simplex-scheme of its partial reactions
121. Haumann, M., Mulkidjanian, A. und Junge, W. (1999) *Biochemistry* 38, 1258-1267. Tyrosine-Z in oxygen evolving photosystem II: a hydrogen-bonded tyrosinate
122. Haveman, J. und Mathis, P. (1976) *Biochim.Biophys.Acta* 440, 346-355. Flash-induced absorption changes of the primary donor of photosystem II at 820 nm in chloroplasts inhibited by low pH or tris-treatment
123. Hays, A.M., Vassiliev, I.R., Golbeck, J.H. und Debus, R.J. (1998) *Biochemistry* 37, 11352-11365. Role of D1-His190 in proton-coupled electron transfer reactions in photosystem II: a chemical complementation study
124. Hays, A.M., Vassiliev, I.R., Golbeck, J.H. und Debus, R.J. (1999) *Biochemistry* 38, 11851-11865. Role of D1-His190 in the proton-coupled oxidation of tyrosine YZ in manganese-depleted photosystem II

125. He, W.Z. and Malkin, R. (1998) in *Photosynthesis: a comprehensive treatise* (Raghavendra, A.S., Ed.), 29-43, Photosystem I and II, Cambridge University Press, Cambridge
126. Hendry, G. und Wydrzynski, T. (2002) *Biochemistry* 41, 13328-13334. The two substrate-water molecules are already bound to the oxygen-evolving complex in the S<sub>2</sub> state of photosystem II
127. Hendry, G. und Wydrzynski, T. (2003) *Biochemistry* 42, 6209-6217. O-18 isotope exchange measurements reveal that calcium is involved in the binding of one substrate-water molecule to the oxygen-evolving complex in photosystem II
128. Hienerwadel, R., Boussac, A., Breton, J., Diner, B.A. und Berthomieu, C. (1997) *Biochemistry* 36, 14712-14723. Fourier transform infrared difference spectroscopy of photosystem II tyrosine D using site-directed mutagenesis and specific isotope labeling
129. Hillier, W., Hendry, G., Burnap, R.L. und Wydrzynski, T. (2001) *J.Biol.Chem.* 276, 46917-46924. Substrate water exchange in photosystem II depends on the peripheral proteins
130. Hillier, W., Messinger, J. und Wydrzynski, T. (1998a) *Biochemistry* 37, 16908-16914. Kinetic determination of the fast exchanging substrate water molecule in the S<sub>3</sub> state of photosystem II
131. Hillier, W., Messinger, J., und Wydrzynski, T. (1998b) in *Photosynthesis: mechanisms and effects* (Garab, G., Ed.), Vol. 2, 1307-1310, Substrate water <sup>18</sup>O exchange kinetics in the S<sub>2</sub> state of photosystem II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
132. Hillier, W. und Wydrzynski, T. (2000) *Biochemistry* 39, 4399-4405. The affinities for the two substrate water binding sites in the O(2) evolving complex of photosystem II vary independently during S-state turnover
133. Hillier, W. und Wydrzynski, T. (2001) *Biochim.Biophys.Acta* 1503, 197-209. Oxygen ligand exchange at metal sites - implications for the O(2) evolving mechanism of photosystem II
134. Hillmann, B. und Schlodder, E. (1995) *Biochim.Biophys.Acta* 1231, 76-88. Electron transfer reactions in photosystem II core complexes from *Synechococcus* at low temperature - difference spectrum of P<sub>680</sub><sup>+</sup> Q<sub>A</sub><sup>-</sup>/P<sub>680</sub> Q<sub>A</sub> at 77 K
135. Hoganson, C.W. und Babcock, G.T. (1997) *Science* 277, 1953-1956. A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis
136. Hoganson, C.W. und Babcock, G.T. (2000) *Met.Ions.Biol.Syst.* 37, 613-656. Mechanistic aspects of the tyrosyl radical-manganese complex in photosynthetic water oxidation

137. Hoganson, C.W., Lydakis-Simantiris, N., Tang, X.S., Tommos, C., Warncke, K., Babcock, G.T., Diner, B.A., McCracken, J. und Styring, S. (1995) *Photosynth.Res.* 46, 177-184. A hydrogen-atom abstraction model for the function of Y<sub>Z</sub> in photosynthetic oxygen evolution
138. Hollemann, A.F. and Wiberg, E. (1985) *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin
139. Hundelt, M. (1999) *Photosynthetische Wasseroxidation in PSII: Elektronen und Protonentransfer im Wildtyp und in D1-Mutanten von Synechocystis sp. PCC 6803*, Doktorarbeit, Universität Osnabrück
140. Hundelt, M., Hays, A.M., Debus, R.J. und Junge, W. (1998a) *Biochemistry* 37, 14450-14456. Oxygenic photosystem II: the mutation D1-D61N in *Synechocystis* sp. PCC 6803 retards S-state transitions without affecting electron transfer from Y<sub>Z</sub> to P<sub>680</sub><sup>+</sup>
141. Hundelt, M., Hays, A. M. A., Debus, R. J., und Junge, W. (1998b) in *Photosynthesis: mechanisms and effects* (Garab, G., Ed.), Vol. 2, 1387-1390, The mutation D1-D61N in PSII of *Synechocystis*: retardation of ET from OEC -> Y<sub>Z</sub><sup>ox</sup> and no effect on Y<sub>Z</sub> -> P<sub>680</sub><sup>+</sup>, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
142. Ikeuchi, M. und Inoue, Y. (1986) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 247, 97-107. Characterization of O-2 evolution by a wheat photosystem-II reaction center complex isolated by a simplified method - disjunction of secondary acceptor quinone and enhanced Ca-2+ demand
143. Ioannidis, N., Nugent, J.H.A. und Petrouleas, V. (2002) *Biochemistry* 41, 9589-9600. Intermediates of the S-3 state of the oxygen-evolving complex of photosystem II
144. Ioannidis, N. und Petrouleas, V. (2002) *Biochemistry* 41, 9580-9588. Decay products of the S-3 state of the oxygen-evolving complex of photosystem II at cryogenic temperatures. Pathways to the formation of the S=7/2 S-2 state configuration
145. Jahns, P., Lavergne, J., Rappaport, F. und Junge, W. (1991) *Biochim.Biophys.Acta* 1057, 313-319. Stoichiometry of proton release during photosynthetic water oxidation: a reinterpretation of the response of Neutral red leads to a non-integer pattern
146. Jansson, C., Debus, R.J., Osiewacz, H.D., Gurevitz, M. und McIntosh, L. (1987) *Plant Physiol.* 85, 1021-1025. Construction of an obligate photoheterotrophic mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803: inactivation of a psbA gene family
147. Jeans, C., Schilstra, M.J., Ray, N., Husain, S., Minagawa, J., Nugent, J.H.A. und Klug, D.R. (2002) *Biochemistry* 41, 15754-15761. Replacement of tyrosine D with phenylalanine affects the normal proton transfer pathways for the reduction of P680(+) in oxygen-evolving Photosystem II particles from *Chlamydomonas*

148. Joliot,P., Barbieri,G. und Chabaud,R. (1969) Photochem.Photobiol. 10, 309-329. A New Model of Photochemical Centers in System-2
149. Joliot,P., Hofnung,M. und Chabaud,R. (1966) Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique 63, 1423-1441. Etude de l'émission d'oxygene par des algues soumises a un eclairement module sinusoidalement
150. Jordan,P., Fromme,P., Witt,H.T., Klukas,O., Saenger,W. und Krauss,N. (2001) Nature 411, 909-917. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 angstrom resolution
151. Joseph-Mccarthy,D., Rost,L.E., Komives,E.A. und Petsko,G.A. (1994) Biochemistry 33, 2824-2829. Crystal-Structure of the mutant yeast triosephosphate isomerase in which the catalytic base glutamic-acid-165 is changed to aspartic-acid
152. Junge,W. (1976) in *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (Goodwin,T.W., Ed.), 233-333, Flash kinetic spectrophotometry in the study of plant pigments, Academic Press, London, New York, San Francisco
153. Junge,W., Haumann,M., Ahlbrink,R., Mulkidjanian,A. und Clausen,J. (2002) Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol Sci. 357, 1407-1417. Electrostatics and proton transfer in photosynthetic water oxidation
154. Kaminskaya,O., Kurreck,J., Irrgang,K.D., Renger,G. und Shuvalov,V.A. (1999) Biochemistry 38, 16223-16235. Redox and spectral properties of cytochrome b559 in different preparations of photosystem II
155. Kamiya,N. und Shen,J.R. (2003) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 100, 98-103. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-angstrom resolution
156. Kaneko,T., Sato,S., Kotani,H., Tanaka,A., Asamizu,E., Nakamura,Y., Miyajima,N., Hirose,M., Suigura,M., Sasamoto,S., Kimura,T., Hosouchi,T., Matsuno,A., Muraki,A., Nakazaki,N., Naruo,K., Okumura,S., Shimpo,S., Takeuchi,C., Wada,T., Watanabe,A., Yamada,M., Yasuda,M. und Tabata,S. (1996a) DNA Res. 3, 109-136. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions
157. Kaneko,T., Sato,S., Kotani,H., Tanaka,A., Asamizu,E., Nakamura,Y., Miyajima,N., Hirose,M., Suigura,M., Sasamoto,S., Kimura,T., Hosouchi,T., Matsuno,A., Muraki,A., Nakazaki,N., Naruo,K., Okumura,S., Shimpo,S., Takeuchi,C., Wada,T., Watanabe,A., Yamada,M., Yasuda,M. und Tabata,S. (1996b) DNA Res. 3, 185-209. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement)

158. Karge, M., Irrgang, K.D. und Renger, G. (1997) *Biochemistry* 36, 8904-8913. Analysis of the reaction coordinate of photosynthetic water oxidation by kinetic measurements of 355 nm absorption changes at different temperatures in photosystem II preparations suspended in either H<sub>2</sub>O or D<sub>2</sub>O
159. Kashino, Y., Koike, H. und Satoh, K. (2001) *Electrophoresis* 22, 1004-1007. An improved sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of membrane protein complexes
160. Kashino, Y., Koike, H., Yoshio, M., Egashira, H., Ikeuchi, M., Pakrasi, H.B. und Satoh, K. (2002a) *Plant and Cell Physiology* 43, 1366-1373. Low-molecular-mass polypeptide components of a photosystem II preparation from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus*
161. Kashino, Y., Lauber, W.M., Carroll, J.A., Wang, Q.J., Whitmarsh, J., Satoh, K. und Pakrasi, H.B. (2002b) *Biochemistry* 41, 8004-8012. Proteomic analysis of a highly active photosystem II preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides
162. Kirilovsky, D.L., Boussac, A., van Mieghem, F.J.E., Ducruet, J.M., Setif, P., Yu, J., Vermaas, W.F.J. und Rutherford, A.W. (1992) *Biochemistry* 31, 2099-2107. Oxygen-evolving photosystem II preparation from wild type and photosystem II mutants of *Synechocystis* sp. PCC 6803
163. Klimov, V.V., Allakhverdiev, S.I., Demeter, S. und Krasnovsky, A.A. (1979) *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 249, 227-230. Photoreduction of pheophytin in the photosystem II of chloroplasts with respect to the redox potential of the medium
164. Koike, H., Hanssum, B., Inoue, Y. und Renger, G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 893, 524-533. Temperature dependence of S-state transition in a thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus vulcanus* Copeland measured by absorption changes in the ultraviolet region
165. Koike, H., Mamada, K., Ikeuchi, M. und Inoue, Y. (1989) *FEBS Lett.* 244, no. 2, 391-396. Low-molecular-mass proteins in cyanobacterial photosystem II: identification of *psbH* and *psbK* gene products by N-terminal sequencing
166. Kok, B., Forbush, B. und McGloin, M. (1970) *Photochem. Photobiol.* 11, 457-475. Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution - I. A linear four-step mechanism
167. Koneke, R., Comte, A., Jurgens, H., Kohls, O., Lam, H. und Scheper, T. (1998) *Chemie Ingenieur Technik* 70, 1611-1617. Fibre-optic oxygen sensors for biotechnology and environmental and food technology
168. Koulougliotis, D., Shen, J.R., Ioannidis, N. und Petrouleas, V. (2003) *Biochemistry* 42, 3045-3053. Near-IR irradiation of the S-2 state of the water oxidizing complex of photosystem II at liquid helium temperatures produces the metalloradical intermediate attributed to S1YZ center dot

169. Krieger,A. und Weis,E. (1993) *Photosynth.Res.* 37, 117-130. The role of calcium in the pH -dependent control of Photosystem II
170. Krishtalik,L.I. (1990) *Bioelectrochem.Bioenerg.* 23, 249-263. Activation energy of photosynthetic oxygen evolution: an attempt at theoretical analysis
171. Krishtalik,L.I. (1995) *Biochim.Biophys.Acta* 1228, 58-66. Fast electron transfers in photosynthetic reaction centre: effect of the time-evolution of dielectric response
172. Kuhl,H., Kruij,J., Seidler,A., Krieger-Liszkay,A., Bunker,M., Bald,D., Scheidig,A.J. und Rögner,M. (2000) *J.Biol.Chem.* 275, 20652-20659. Towards structural determination of the water-splitting enzyme. Purification, crystallization, and preliminary crystallographic studies of photosystem II from a thermophilic cyanobacterium
173. Kuhl,H., Rögner,M., van Breemen,J.F. und Boekema,E.J. (1999) *Eur.J.Biochem.* 266, 453-459. Localization of cyanobacterial photosystem II donor-side subunits by electron microscopy and the supramolecular organization of photosystem II in the thylakoid membrane
174. Kühlbrandt,W., Wang,D.N. und Fujiyoshi,Y. (1994) *Nature* 367, 614-621. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography
175. Kurisu,G., Zhang,H.M., Smith,J.L. und Cramer,W.A. (2003) *Science* 302, 1009-1014. Structure of the cytochrome b(6)f complex of oxygenic photosynthesis: Tuning the cavity
176. Laemmli,U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
177. Lakshmi,K.V., Reifler,M.J., Chisholm,D.A., Wang,J.Y., Diner,B.A. und Brudvig,G.W. (2002) *Photosynth.Res.* 72, 175-189. Correlation of the cytochrome c(550) content of cyanobacterial Photosystem II with the EPR properties of the oxygen-evolving complex
178. Lavergne,J. (1982) *Biochim.Biophys.Acta* 682, 345-353. Mode of action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. Evidence that the inhibitor competes with plastoquinone for binding to a common site on the acceptor side of photosystem II
179. Lavergne,J. (1991) *Biochim.Biophys.Acta* 1060, 175-188. Improved UV-visible spectra of the S-transitions in the photosynthetic oxygen-evolving system
180. Lavergne,J. und Junge,W. (1993) *Photosynth.Res.* 38, 279-296. Proton release during the redox cycle of the water oxidase
181. Lavorel,J. (1992) *Biochim.Biophys.Acta* 1101, 33-40. Determination of the photosynthetic oxygen release time by amperometry
182. Li,X.P., Bjorkman,O., Shih,C., Grossman,A.R., Rosenquist,M., Jansson,S. und Niyogi,K.K. (2000) *Nature* 403, 391-395. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting

183. Li,Z.L. und Burnap,R.L. (2001) *Biochemistry* 40, 10350-10359. Mutations of arginine 64 within the putative Ca<sup>2+</sup>-binding luminal interhelical a-b loop of the photosystem II D1 protein disrupt binding of the manganese stabilizing protein and cytochrome c(550) in *Synechocystis* sp PCC6803
184. Lichtenthaler,H.K. (1987) *Meth.Enzymol.* 148, 350-382. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes
185. Limburg,J., Szalai,V.A. und Brudvig,G.W. (1999) *J.Chem.Soc., Dalton Trans.* 1353-1362. A mechanistic and structural model for the formation and reactivity of a Mn<sup>V</sup>=O species in photosynthetic water oxidation
186. Loll,P.J. und Lattman,E.E. (1990) *Biochemistry* 29, 6866-6873. Active-site mutant Glu-43-Asp in staphylococcal nuclease displays nonlocal structural-changes
187. Lübbers,D.W. und Opitz,N. (1975) *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 30, 532-533. The P<sub>co2</sub>-optode-P<sub>o2</sub>-optode - new probe for measurement of Pco2 Or Po2 in fluids and gases
188. Lübbers,K., Haumann,M. und Junge,W. (1993) *Biochim.Biophys.Acta* 1183, 210-214. Photosynthetic water oxidation under flashing light. Oxygen release, proton release and absorption transients in the near UV - a comparison between thylakoids and a reaction-center core preparation
189. Lübbers,K. and Junge,W. (1990) in *Current research in photosynthesis*, vol. I (Baltscheffsky,M., Ed.), 877-880, Is the proton release due to water oxidation directly coupled to events at the manganese centre?, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
190. MacLachlan,D.J., Nugent,J.H.A., Warden,J.T. und Evans,M.C.W. (1994) *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1188, 325-334. Investigation of the ammonium-chloride and ammonium acetate inhibition of oxygen evolution by photosystem-II
191. Mamedov,F., Sayre,R.T. und Styring,S. (1998) *Biochemistry* 37, 14245-14256. Involvement of histidine 190 on the D1 protein in electron/proton transfer reactions on the donor side of photosystem II
192. Mathis,P. und Setif,P. (1981) *Isr.J.Chem.* 21, 316-320. Near infrared absorption spectra of the chlorophyll *a* cations and triplet state in vitro and in vivo
193. Mathis,P. und Verméglio,A. (1972) *Photochem.Photobiol.* 15, 157-164. Transient forms of carotenoids - triplet-state and radical cation
194. Mathis,P. und Verméglio,A. (1975) *Biochim.Biophys.Acta* 396, 371-381. Chlorophyll radical cation in photosystem II of chloroplasts. Millisecond decay at low temperature
195. Messinger,J. (1993) Untersuchungen über die reaktiven Eigenschaften der verschiedenen Redoxzustände S<sub>i</sub> der Wasseroxidase höherer Pflanzen, Doktorarbeit, Techn. Universität Berlin

196. Messinger, J., Badger, M. und Wydrzynski, T. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3209-3213. Detection of *one* slowly exchanging substrate water molecule in the S<sub>3</sub> state of photosystem II
197. Messinger, J. und Renger, G. (1994) Biochemistry 33, 10896-10905. Analyses of pH-Induced modifications of the period four oscillation of flash-induced oxygen evolution reveal distinct structural changes of the photosystem II donor side at characteristic pH Values
198. Messinger, J., Robblee, J.H., Bergmann, U., Fernandez, C., Glatzel, P., Visser, H., Cinco, R.M., McFarlane, K.L., Bellacchio, E., Pizarro, S.A., Cramer, S.P., Sauer, K., Klein, M.P. und Yachandra, V.K. (2001) J. Am. Chem. Soc. 123, 7804-7820. Absence of Mn-centered oxidation in the S-2 -> S-3 Transition: Implications for the mechanism of photosynthetic water oxidation
199. Metz, J.G., Nixon, P.J., Rögner, M., Brudvig, G.W. und Diner, B.A. (1989) Biochemistry 28, 6960-6969. Directed alteration of D1 polypeptide of photosystem II: evidence that tyrosine-161 is the redox component, Z, connecting the oxygen-evolving complex to the primary electron donor, P<sub>680</sub>
200. Minami, E. und Watanabe, A. (1985) Plant Cell Physiol. 26(5), 839-846. Detection of a precursor polypeptide of the rapidly-synthesized 32,000-Dalton thylakoid protein in spinach chloroplasts
201. Mino, H., Satoh, J., Kawamori, A., Toriyama, K. und Zimmermann, J.L. (1993) Biochim. Biophys. Acta 1144, 426-433. Matrix ENDOR of tyrosine D<sup>+</sup> in oriented Photosystem II membranes
202. Mishra, N.P., Mishra, R.K. und Singhal, G.S. (1993) J. Photochem. Photobiol. B 19, 19-24. Involvement of active oxygen species in photoinhibition of photosystem II: protection of photosynthetic efficiency and inhibition of lipid peroxidation by superoxide dismutase and catalase
203. Miyake, C. und Okamura, M. (2003) Plant and Cell Physiology 44, 457-462. Cyclic electron flow within PSII protects PSII from its photoinhibition in thylakoid membranes from spinach chloroplasts
204. Miyake, C. und Yokota, A. (2001) Plant Cell Physiol. 42, 508-515. Cyclic flow of electrons within PSII in thylakoid membranes
205. Mizrahi, V., Brooksbank, R.L. und Nkabinde, N.C. (1994) J. Biol. Chem. 269, 19245-19249. Mutagenesis of the conserved aspartic-acid-443, glutamic-acid-478, asparagine-494, and aspartic-acid-498 residues in the ribonuclease H-domain of P66/P51 human-immunodeficiency-virus type-I reverse-transcriptase - expression and biochemical-analysis
206. Mörschel, E. (1999) in *Photosynthese* (Häder, D.P., Ed.), 48-64, Architektur des Photosyntheseapparates, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
207. Mulkidjanian, A.Y. (1999) FEBS Lett. 463, 199-204. Conformationally controlled pK-switching in membrane proteins: one more mechanism specific to the enzyme catalysis?

208. Mulkidjanian,A.Y., Cherepanov,D.A., Haumann,M. und Junge,W. (1996) *Biochemistry* 35, 3093-3107. Photosystem II of green plants: Topology of core pigments and redox cofactors as inferred from electrochromic difference spectra
209. Nakamura,Y., Kaneko,T., Sato,S., Mimuro,M., Miyashita,H., Tsuchiya,T., Sasamoto,S., Watanabe,A., Kawashima,K., Kishida,Y., Kiyokawa,C., Kohara,M., Matsumoto,M., Matsuno,A., Nakazaki,N., Shimpo,S., Takeuchi,C., Yamada,M. und Tabata,S. (2003) *Dna Research* 10, 137-145. Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids
210. Nanba,O. und Satoh,K. (1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84, 109-112. Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome *b-559*
211. Nayak,L., Raval,M.K., Biswal,B. und Biswal,U.C. (2002) *Photochemical & Photobiological Sciences* 629-631. Topology and photoprotective role of carotenoids in photosystem II of chloroplast: a hypothesis
212. Nixon,P.J., Trost,J.T. und Diner,B.A. (1992) *Biochemistry* 31, 10859-10871. Role of the carboxy terminus of polypeptide-D1 in the assembly of a functional water-oxidizing manganese cluster in photosystem-II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 - assembly requires a free carboxyl group at C-terminal position 344
213. Ohno,T., Satoh,K. und Katoh,S. (1986) *Biochim.Biophys.Acta* 852, 1-8. Chemical composition of purified oxygen-evolving complexes from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp.
214. Ono,T. und Inoue,Y. (1986) *Biochim.Biophys.Acta* 850, 380-389. Effects of removal and reconstitution of the extrinsic 33, 24 and 16 kDa proteins on flash oxygen yield in Photosystem II particles
215. Ort,D.R. und Baker,N.R. (2002) *Current Opinion in Plant Biology* 5, 193-198. A photoprotective role for O-2 as an alternative electron sink in photosynthesis?
216. Ortega,J.M., Hervas,M. und Losada,M. (1988) *Eur.J.Biochem.* 171, 449-455. Redox and acid-base characterization of cytochrome b-559 in photosystem II particles
217. Pace,R.J. und Ahrling,K.A. (2004) *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1655, 172-178. Water oxidation in PSII-H atom abstraction revisited
218. Papageorgiou,G.C. und Murata,N. (1995) *Photosynth.Res.* 44, 243-252. The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex
219. Pecoraro,V.L., Baldwin,M.J., Caudle,M.T., Hsieh,W.Y. und Law,N.A. (1998) *Pure Appl.Chem.* 70, 925-929. A proposal for water oxidation in photosystem II

220. Pecoraro, V.L. und Hsieh, W.Y. (2000) *Met.Ions.Biol.Syst.* 37, 429-504. The use of model complexes to elucidate the structure and function of manganese redox enzymes
221. Penner-Hahn, J.E. (1998) in *Metal Sites in Proteins and Models* (Hill, H.A.O., Sadler, P.J. und Thomson, A.J., Eds.), 1-36, Structural characterization of the Mn site in the photosynthetic oxygen-evolving complex, Springer Verlag, Heidelberg
222. Peterman, E.J.G., Wenk, S.O., Pullerits, T., Palsson, L.O., van Grondelle, R., Dekker, J.P., Rögner, M. und van Amerongen, H. (1998) *Biophys.J.* 75, 389-398. Fluorescence and absorption spectroscopy of the weakly fluorescent chlorophyll *a* in cytochrome *b<sub>6</sub>f* of *Synechocystis* PCC6803
223. Polle, A. und Junge, W. (1986) *Biochim.Biophys.Acta* 848, 257-264. The slow rise of the flash-light-induced alkalization by photosystem II of the suspending medium of thylakoids is reversibly related to thylakoid stacking
224. Pope, D.H. und Berger, L.R. (1973a) *Archiv für Mikrobiologie* 89, 321-325. Algal photosynthesis at increased hydrostatic pressure and constant  $P_{O_2}$
225. Pope, D.H. und Berger, L.R. (1973b) *Biotechnology and Bioengineering* 15, 505-518. An apparatus to measure rate of oxygen evolution while maintaining  $pO_2$  constant during photosynthetic growth in closed culture vessels capable of operation at increased hydrostatic pressures
226. Pope, D.H. und Berger, L.R. (1973c) *Archiv für Mikrobiologie* 93, 367-370. Inhibition of metabolism by hydrostatic pressure - what limits microbial growth
227. Popova, A.V. und Busheva, M.R. (2001) *Cryoletters* 22, 293-298. Cryoprotective effect of glycine betaine and glycerol is not based on a single mechanism
228. Poulson, M., Samson, G. und Whitmarsh, J. (1995) *Biochemistry* 34, 10932-10938. Evidence that cytochrome *b559* protects photosystem II against photoinhibition
229. Pujols-Ayala, I. und Barry, B.A. (2002) *Biochemistry* 41, 11456-11465. Histidine 190-D1 and glutamate 189-D1 provide structural stabilization in photosystem II
230. Qian, M., Dao, L., Debus, R.J. und Burnap, R.L. (1999) *Biochemistry* 38, 6070-6081. Impact of mutations within the putative  $Ca^{2+}$ -binding luminal interhelical *a-b* loop of the photosystem II D1 protein on the kinetics of photoactivation and  $H_2O$ -oxidation in *Synechocystis* sp. PCC6803
231. Radmer, R. und Cheniae, G. (1977) in *Primary Processes of Photosynthesis* (Barber, J., Ed.), 304-348, Mechanisms of oxygen evolution, Elsevier,
232. Radmer, R. und Ollinger, O. (1986) *FEBS Lett.* 195, no. 1,2, 285-289. Do the higher oxidation states of the photosynthetic  $O_2$ -evolving system contain bound  $H_2O$ ?

233. Raghavendra,A.S. (1998) Photosynthesis, University Press, Cambridge
234. Ramesh,V.M., Fish,A., Michaeli,D., Keren,N., Ohad,I., Vorchovsky,L. und Nechushtai,R. (2002) *Photosynthetica* 40, 355-361. Isolation and characterization of an oxygen evolving photosystem 2 core complex from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*
235. Rappaport,F., Blanchard-Desce,M. und Lavergne,J. (1994) *Biochim.Biophys.Acta* 1184, 178-192. Kinetics of electron transfer and electrochromic change during the redox transition of the photosynthetic oxygen-evolving complex
236. Rappaport,F., Guergova-Kuras,M., Nixon,P.J., Diner,B.A. und Lavergne,J. (2002) *Biochemistry* 41, 8518-8527. Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II
237. Rappaport,F. und Lavergne,J. (2001) *Biochim.Biophys.Acta* 1503, 246-259. Coupling of electron and proton transfer in the photosynthetic water oxidase
238. Rappaport, F., Porter, G., Barber, J., Klug, D. R., und Lavergne, J. (1995) in *Photosynthesis: From light to biosphere* (Mathis, P., Ed.), Vol. 2, 345-348, Reinvestigation of the phases of reduction of  $P_{680}^+$  in the microsecond time domain, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
239. Razeghifard,M.R., Klughammer,C. und Pace,R.J. (1997) *Biochemistry* 36, 86-92. Electron paramagnetic resonance kinetic studies of the S states in spinach thylakoids
240. Razeghifard,M.R. und Pace,R.J. (1997) *Biochim.Biophys.Acta* 1322, 141-150. Electron paramagnetic resonance kinetic studies of the S states in spinach PSII membranes
241. Razeghifard,M.R. und Pace,R.J. (1999) *Biochemistry* 38, 1252-1257. EPR kinetic studies of oxygen release in thylakoids and PSII membranes: an intermediate in the  $S_3$  to  $S_0$  transition
242. Reinman,S., Mathis,P., Conjeaud,H. und Stewart,A. (1981) *Biochim.Biophys.Acta* 635, 429-433. Kinetics of reduction of the primary donor of photosystem II. Influence of pH in various preparations
243. Renger,G. (1978) in *Photosynthetic oxygen evolution* (Metzner,H., Ed.), 229-248, Theoretical studies about the functional and structural organization of the photosynthetic oxygen evolution, Academic Press, London
244. Renger,G. (1979) *Biochim.Biophys.Acta* 547, 103-116. A rapid vectorial back reaction at the reaction centers of photosystem II in Tris-washed chloroplasts induced by repetitive flash excitation
245. Renger,G. (1997) *Physiol.Plant.* 100, 828-841. Mechanistic and structural aspects of photosynthetic water oxidation
246. Renger,G. (2001) *Biochim.Biophys.Acta* 1503, 210-228. Photosynthetic water oxidation to molecular oxygen: apparatus and mechanism

247. Renger,G., Bittner,T. und Messinger,J. (1994) *Biochem.Soc.Trans.* 22, 318-322. Structure-function relationships in photosynthetic water oxidation
248. Renger,G. und Hanssum,B. (1992) *FEBS Lett.* 299, 28-32. Studies on the reaction coordinates of the water oxidase in PS II membrane fragments from spinach
249. Renger,G. und Weiss,W. (1986) *Biochim.Biophys.Acta* 850, 184-196. Studies on the nature of the water oxidizing enzyme. III. Spectral characterization of the intermediary redox states in the water-oxidizing enzyme system Y
250. Renger,G. und Wolff,C. (1975) *Z.Naturforsch.* 30c, 161-171. Studies on the nature of the primary reactions of photosystem II in photosynthesis
251. Rich,P.R. und Bendall,D.S. (1980) *Biochim.Biophys.Acta* 592, 506-518. The kinetics and thermodynamics of the reduction of Cytochrom c by substituted p-Benzoquinols in solution
252. Richter,M., Ruhle,W. und Wild,A. (1990) *Photosynth.Res.* 24, 237-243. Studies on the mechanism of photosystem-II photoinhibition. 2. The involvement of toxic oxygen species
253. Rippka,R. (1988) *Meth.Enzymol.* 167, 1-27. Isolation and purification of cyanobacteria
254. Rivas,J.D., Balsera,M. und Barber,J. (2004) *Trends in Plant Science* 9, 18-25. Evolution of oxygenic photosynthesis: genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins
255. Robblee,J.H., Cinco,R.M. und Yachandra,V.K. (2001) *Biochim.Biophys.Acta* 1503, 7-23. X-ray spectroscopy-based structure of the Mn cluster and mechanism of photosynthetic oxygen evolution
256. Rodriguez,I.D., Chandrashekar,T.K. und Babcock,G.T. (1987) in *Progress in Photosynthesis Research* (Biggins,J., Ed.), 471-478, Endor characterization of H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O exchange in the D+Z<sup>+</sup> radical in photosynthesis, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht
257. Roffey,R.A., Kramer,D.M., Govindjee,R.A. und Sayre,R.T. (1994a) *Biochim.Biophys.Acta* 1185, 257-270. Lumenal side histidine mutations in the D1 protein of photosystem II affect donor side electron transfer in *Chlamydomonas reinhardtii*
258. Roffey,R.A., van Wijk,K.J., Sayre,R.T. und Styring,S. (1994b) *J.Biol.Chem.* 269, 5115-5121. Spectroscopic characterization of TyrZ in histidine 190 mutants of the D1 protein in photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*: Implications for the structural model of the donor side of PSII
259. Rögner,M., Nixon,P.J. und Diner,B.A. (1990) *J.Biol.Chem.* 265, 6189-6196. Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803

260. Ruan, K.C., Xu, C.H., Li, T.T., Li, J., Lange, R. und Balny, C. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270, 1654-1661. The thermodynamic analysis of protein stabilization by sucrose and glycerol against pressure-induced unfolding - The typical example of the 33-kDa protein from spinach photosystem II
261. Ruffle, S.V., Donnelly, D., Blundell, T.L. und Nugent, J.H.A. (1992) *Photosynth. Res.* 34, 287-300. A three-dimensional model of the photosystem II reaction center of *Pisum sativum*
262. Ruffle, S.V., Wang, J., Johnston, H.G., Gustafson, T.L., Hutchison, R.S., Minagawa, J., Crofts, A. und Sayre, R.T. (2001) *Plant Physiol.* 127, 633-644. Photosystem II peripheral accessory chlorophyll mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochemical characterization and sensitivity to photo-inhibition
263. Rutherford, A.W. (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14, 227-232. Photosystem II, the water-splitting enzyme
264. Samuilov, V.D., Bezryadnov, D.B., Gusev, M.V., Kitashov, A.V. und Fedorenko, T.A. (2001) *Biochemistry (Moscow)* 66, 640-645. Hydrogen peroxide inhibits photosynthetic electron transport in cells of cyanobacteria
265. Saygin, Ö. und Witt, H.T. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 893, 452-469. Optical characterization of intermediates in the water-splitting enzyme system of photosynthesis - possible states and configurations of manganese and water
266. Schatz, G.H. und van Gorkom, H.J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 810, 283-294. Absorbance difference spectra upon charge transfer to secondary donors and acceptors in photosystem II
267. Scheer, H. (1991) *Chlorophylls*, CRC Press, Boston
268. Schenck, C.C., Diner, B., Mathis, P. und Satoh, K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 680, 216-227. Flash-induced carotenoid radical cation formation in photosystem-II
269. Schiller, H. und Dau, H. (2000) *J. Photochem. Photobiol. B* 55, 138-144. Preparation protocols for high-activity photosystem II membrane particles of green algae and higher plants, pH dependence of oxygen evolution and comparison of the S<sub>2</sub>-state multiline signal by X-band EPR spectroscopy
270. Schilstra, M.J., Rappaport, F., Nugent, J.H.A., Barnett, C.J. und Klug, D.R. (1998) *Biochemistry* 37, 3974-3981. Proton/hydrogen transfer affects the S-state-dependent microsecond phases of P<sub>680</sub><sup>+</sup> reduction during water splitting
271. Schlodder, E., Brettel, K., Schatz, G.H. und Witt, H.T. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 765, 178-185. Analysis of the Chl-*a*<sub>II</sub><sup>+</sup> reduction kinetics with nanosecond time resolution in oxygen-evolving photosystem II particles from *Synechococcus* at 680 and 824 nm
272. Schlodder, E., Brettel, K. und Witt, H.T. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 808, 123-131. Relation between microsecond reduction kinetics of photooxidized chlorophyll *a*<sub>II</sub> (P-680) and photosynthetic water oxidation

273. Schlodder, E. und Meyer, B. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 890, 23-31. pH dependence of oxygen evolution and reduction kinetics of photooxidized chlorophyll aII (P<sub>680</sub>) in photosystem II particles from *Synechococcus* sp.
274. Schmidt, S., Reich, R. und Witt, H.T. (1969) *Z. Naturforsch.* 24, 1428-1431. Absorption changes of chlorophyll *b* in an electric field
275. Schmidt, S., Reich, R. und Witt, H.T. (1971) *Naturwissenschaften* 58, 414 Electrochromism of chlorophylls and carotenoids in multilayers and in chloroplasts
276. Schönknecht, G., Althoff, G. und Junge, W. (1990) *FEBS Lett.* 277, 65-68. The electric unit size of thylakoid membranes
277. Schubert, W.D., Klukas, O., Saenger, W., Witt, H.T., Fromme, P. und Krauss, N. (1998) *J. Mol. Biol.* 280, 297-314. A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems: a comparison based on the structural model of photosystem I
278. Shen, G., Boussiba, S. und Vermaas, W.F.J. (1993) *Plant Cell* 5, 1853-1863. *Synechocystis* sp PCC 6803 strains lacking photosystem I and phycobilisome function
279. Shen, G. und Vermaas, W.F.J. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 13904-13910. Chlorophyll in a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant without photosystem I and photosystem II core complexes. Evidence for peripheral antenna chlorophylls in cyanobacteria
280. Shen, J.R. und Kamiya, N. (2000) *Biochemistry* 39, 14739-14744. Crystallization and the crystal properties of the oxygen-evolving photosystem II from *Synechococcus vulcanus*
281. Shen, J.R., Vermaas, W. und Inoue, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 6901-6907. The role of cytochrome *c*-550 as studied through reverse genetics and mutant characterization in *Synechocystis* sp. PCC 6803
282. Sidler, W.A. (1994) in *The molecular biology of cyanobacteria* (Bryant, D.A., Ed.), 139-216, Phycobilisome and phycobiliprotein structures, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
283. Siegbahn, P.E.M. (2002) *Current Opinion in Chemical Biology* 6, 227-235. Quantum chemical studies of manganese centers in biology
284. Siggel, U. (1975) in *Proceedings of the third international congress on photosynthesis* (Avron, M., Ed.), Vol. I, 645-654, The control of electron transport by two pH-sensitive sites, Elsevier, Amsterdam
285. Sinclair, J. und Arnason, T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 368, 393-400. Studies on a thermal reaction associated with photosynthetic oxygen evolution
286. Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A. (1991) *Strasburger Lehrbuch der Botanik*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

287. Smart,L.B., Anderson,S.L. und McIntosh,L. (1991) EMBO J. 10, 3289-3296.  
Targeted genetic inactivation of the photosystem I reaction center in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803
288. Stewart,D.H. und Brudvig,G.W. (1998) Biochim.Biophys.Acta 1367, 63-87.  
Cytochrome b<sub>559</sub> of photosystem II
289. Stryer,L. (1996) Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
290. Strzalka,K., Walczak,T., Sarna,T. und Swartz,H.M. (1990) Arch.Biochem.Biophys. 281, 312-318. Measurement of time-resolved oxygen concentration changes in photosynthetic systems by nitroxide-based EPR oximetry
291. Sugiura,M. und Inoue,Y. (1999) Plant Cell Physiol. 40, 1219-1231. Highly purified thermo-stable oxygen-evolving photosystem II core complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus* having His-tagged CP43
292. Sugiura,M., Minagawa,J. und Inoue,Y. (1999) Plant Cell Physiol. 40, 311-318.  
Properties of Chlamydomonas photosystem II core complex with a His-tag at the C-terminus of the D2 protein
293. Svensson,B., Etchebest,C., Tuffery,P., van Kan,P., Smith,J. und Styring,S. (1996) Biochemistry 35, 14486-14502. A model for the photosystem II reaction center core including the structure of the primary donor P<sub>680</sub>
294. Svensson, B., Minagawa, J., und Crofts, A. R. (1998) in *Photosynthesis: mechanisms and effects* (Garab, G., Ed.), Vol. 2, 1451-1454,  
Characterization of photosystem II donor-side mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
295. Svensson,B., Vass,I., Cedergren,E. und Styring,S. (1990) EMBO J. 9(7), 2051-2059. Structure of donor side components in photosystem II predicted by computer modelling
296. Szabo,I., Seraglia,R., Rigoni,F., Traldi,P. und Giacometti,G.M. (2001) J.Biol.Chem. 276, 13784-13790. Determination of photosystem II subunits by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
297. Szalai,V.A. und Brudvig,G.W. (1996) Biochemistry 35, 15080-15087. Reversible binding of nitric oxide to tyrosyl radicals in photosystem II. Nitric oxide quenches formation of the S<sub>3</sub> EPR signal species in acetate-inhibited photosystem II
298. Takahashi,M., Shiraiishi,T. und Asada,K. (1988) FEBS Lett. 240, no. 1,2, 6-8.  
COOH-terminal residue of D1 and the 44 kDa CPa-2 at spinach photosystem II core complex
299. Takahashi,Y., Hirota,K. und Katoh,S. (1985) Photosynth.Res. 6, 183-192. Multiple forms of P700-chlorophyll *a*-protein complexes from *Synechococcus* sp - the ion, quinone and carotenoid contents

300. Tang, X.S., Chisholm, D.A., Dismukes, G.C., Brudvig, G.W. und Diner, B.A. (1993) *Biochemistry* 32, 13742-13748. Spectroscopic evidence from site-directed mutants of *Synechocystis* PCC6803 in favor of a close interaction between histidine 189 and redox-active tyrosine 160, both of polypeptide D2 of the photosystem II reaction center
301. Tang, X.S. und Diner, B.A. (1994) *Biochemistry* 33, 4594-4603. Biochemical and spectroscopic characterization of a new oxygen-evolving Photosystem II core complex from cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803
302. Thompson, L.K. und Brudvig, G.W. (1988) *Biochemistry* 27, 6653-6658. Cytochrome  $b_{559}$  may function to protect photosystem II from photoinhibition
303. Tommos, C. (2002) *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 357, 1383-1394. Electron, proton and hydrogen-atom transfers in photosynthetic water oxidation
304. Tommos, C. und Babcock, G.T. (1998) *Account. Chem. Res.* 31, 18-25. Oxygen production in nature: a light-driven metalloradical enzyme process
305. Tommos, C. und Babcock, G.T. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1458, 199-219. Proton and hydrogen currents in photosynthetic water oxidation
306. Tommos, C., Davidsson, L., Svensson, B., Madsen, C., Vermaas, W.F.J. und Styring, S. (1993) *Biochemistry* 32, 5436-5441. Modified EPR spectra of the tyrosine D radical in photosystem II in site-directed mutants of *Synechocystis* sp. PCC 6803: Identification of side chains in the immediate vicinity of tyrosine D on the D2 protein
307. Tommos, C., Hoganson, C.W., di Valentin, M., Lydakis-Simantiris, N., Dorlet, P., Westphal, K.L., Chu, H.A., McCracken, J. und Babcock, G.T. (1998a) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 244-252. Manganese and tyrosyl radical function in photosynthetic oxygen evolution
308. Tommos, C., McCracken, J., Styring, S. und Babcock, G.T. (1998b) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 10441-10452. Stepwise disintegration of the photosynthetic oxygen-evolving complex
309. Tracewell, C.A., Vrettos, J.S., Bautista, J.A., Frank, H.A. und Brudvig, G.W. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 61-69. Carotenoid photooxidation in photosystem II
310. Trebst, A. (1999) in *Photosynthese* (Häder, D.P., Ed.), 115-131, Linearer und zyklischer Elektronentransport, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
311. Tschiersch, H. und Ohmann, E. (1993) *Planta* 191, 316-323. Photoinhibition in *Euglena-Gracilis* - Involvement of Reactive Oxygen Species
312. Vacha, F., Durchan, M. und Siffel, P. (2002) *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1554, 147-152. Excitonic interactions in the reaction centre of photosystem II studied by using circular dichroism

313. van den Hoek,C., Jahns,H.M. und Mann,D.G. (1993) Algen, Georg Thieme Verlag, New York
314. van Gorkom,H.J. (1974) *Biochim.Biophys.Acta* 347, 439-442. Identification of the reduced primary electron acceptor of photosystem II as a bound semiquinone anion
315. van Gorkom,H.J. and Gast,P. (1996) in *Biophysical techniques in photosynthesis* (Amesz,J. und Hoff,A.J., Eds.), 391-405, Measurement of photosynthetic oxygen evolution, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
316. van Leeuwen, P. J. (1993) The redox cycle of the oxygen evolving complex of photosystem II, Doktorarbeit, Universität Leiden
317. van Leeuwen,P.J., Nieveen,M.C., van de Meent,E.J., Dekker,J.P. und van Gorkom,H.J. (1991) *Photosynth.Res.* 28, 149-153. Rapid and simple isolation of pure photosystem II core and reaction center particles from spinach
318. van Rensen,J.J.S. (1989) in *Herbicides and plant metabolism* (Dodge,A.D., Ed.), 21-36, Herbicides interacting with photosystem II, Cambridge University Press, Cambridge
319. Vasil'ev,S., Orth,P., Zouni,A., Owens,T.G. und Bruce,D. (2001) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 98, 8602-8607. Excited-state dynamics in photosystem II: Insights from the x- ray crystal structure
320. Vass,I. und Styring,S. (1991a) *Biochemistry* 30, 830-839. pH-dependent charge equilibria between tyrosine-D and the states in photosystem II. Estimation of relative midpoint redox potentials
321. Vass,I. und Styring,S. (1991b) *Biochemistry* 30, 830-839. Time-resolved spectroscopy at 10 K of the photosystem II reaction center; deconvolution of the red absorption band
322. Vavilin,D.V. und Vermaas,W.F. (2000) *Biochemistry* 39, 14831-14838. Mutations in the CD-loop region of the D2 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803 modify charge recombination pathways in photosystem II in vivo
323. Vermeglio,A. und Mathis,P. (1973) *Biochim.Biophys.Acta* 292, 763-771. Photooxidation of cytochrome-B559 and electron-donors in chloroplast photosystem-II
324. Visser,J.W.M., Rijgersberg,C.P. und Gast,P. (1977) *Biochim.Biophys.Acta* 460, 36-46. Photooxidation of chlorophyll in spinach-chloroplasts between 10K and 180K
325. Vos,M.H., van Gorkom,H.J. und van Leeuwen,P.J. (1991) *Biochim.Biophys.Acta* 1056, 27-39. An electroluminescence study of stabilization reactions in the oxygen-evolving complex of photosystem II

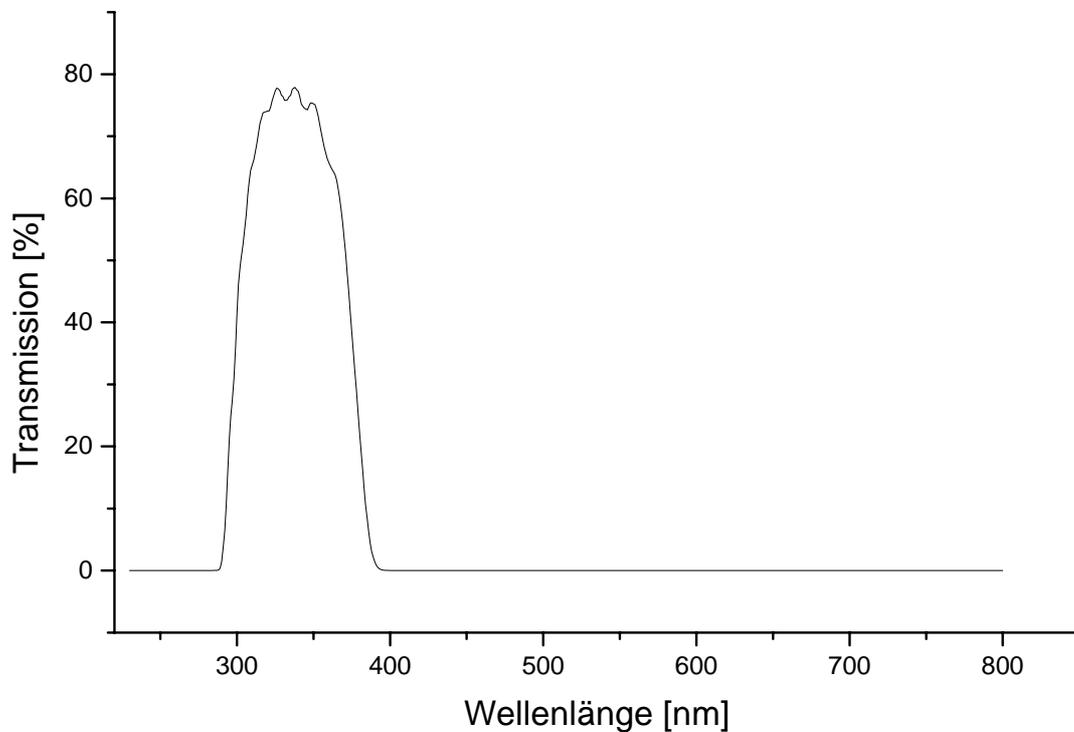
326. Vrettos, J.S. und Brudvig, G.W. (2002) *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 357, 1395-1404. Water oxidation chemistry of photosystem II
327. Vrettos, J.S., Limburg, J. und Brudvig, G.W. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1503, 229-245. Mechanism of photosynthetic water oxidation: combining biophysical studies of photosystem II with inorganic model chemistry
328. Wacker, U., Haag, E. und Renger, G. (1990) in *Current Research in Photosynthesis* (Baltscheffsky, M., Ed.), 869-872, Investigation of pH-change-patterns of photosystem-II membrane fragments from spinach, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
329. Weast, R.C. and Astle, M.J. (1979) *CRC Handbook of chemistry and physics*, CRC Press, Inc., Boca Raton, USA
330. Whitmarsh, J. and Pakrasi, H.B. (1996) in *Oxygenic photosynthesis: The light reactions* (Ort, D.R. und Yocum, C.F., Eds.), 249-264, Form and function of cytochrome b-559, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
331. Wilhelm, C. (1999) in *Photosynthese* (Häder, D.P., Ed.), 230-243, Photosynthese der Algen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
332. Williams, J.G.K. (1988) in *Methods in Enzymology* (Packer, L. und Glazer, A.N., Eds.), 766-778, Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803, Academic Press,
333. Wolff, C. and Witt, H. T. (1972) in *Proceedings of the II<sup>nd</sup> international congress on photosynthesis research* (Forti, G., Avron, M., und Melandri, A., Eds.), Vol. 2, 931-936, On metastable states of carotenoids in primary events of photosynthesis, Dr. W. Junk N.V. Publishers, The Hague
334. Yachandra, V.K., DeRose, V.J., Latimer, M.J., Mukerji, I., Sauer, K. und Klein, M.P. (1993) *Science* 260, 675-679. Where plants make oxygen: A structural model for the photosynthetic oxygen-evolving manganese cluster
335. Yachandra, V.K., Guiles, R.D., McDermott, A.E., Cole, J.L., Britt, R.D., Dexheimer, S.L., Sauer, K. und Klein, M.P. (1987) *Biochemistry* 26, 5974-5981. Comparison of the structure of the manganese complex in the S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> states of the photosynthetic O<sub>2</sub>-evolving complex: An x-ray absorption spectroscopy study
336. Yachandra, V.K., Sauer, K. und Klein, M.P. (1996) *Chem. Rev.* 96, 2927-2950. Manganese cluster in photosynthesis: Where plants oxidize water to dioxygen
337. Yu, Y., Tian, S.M., Ruan, K.C. und Xu, C.H. (2001) *Photosynthetica* 39, 115-117. The release of extrinsic polypeptides and manganese cluster from photosystem 2 membranes under high hydrostatic pressure

338. Zhang,S.P., Weng,J., Pan,J.X., Tu,T.C., Yao,S. und Xu,C.H. (2003)  
Photosynth.Res. 75, 41-48. Study on the photo-generation of superoxide radicals in Photosystem II with EPR spin trapping techniques
339. Zouni, A., Kern, J., Loll, B., Fromme, P., Witt, H. T., Orth, P., Krauss, N., Saenger, W., und Biesiadka, J. (2001a) in *PS2001 Proceedings - 12<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis* (Larkum, A. W. D., Ed.), Vol. 1, 1-7, Biochemical characterization and crystal structure of water oxidizing photosystem II from *Synechococcus elongatus*, Csiro Publishing, Collingwood, Vic. 3066, Australia
340. Zouni,A., Witt,H.T., Kern,J., Fromme,P., Krauss,N., Saenger,W. und Orth,P. (2001b) Nature 409, 739-743. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution

## XI. Anhänge

### XI.1 Spektrum eines DUG11-Filters

Das DUG11 Filter wurde verwendet, um bei spektroskopischen Messungen eine Überschneidung von Meß- und Anregungslicht möglichst vollständig zu unterdrücken. Obwohl der Aufbau des optischen Meßstandes derartig gewählt worden war, daß das anregende Licht senkrecht zum Meßlicht auf die Küvette einfiel, konnte anregendes Licht durch Streuung an der Probe und Reflexionen an der Küvette bzw. in der Meßkammer auf den SEV einfallen.



## XI.2 Ermittlung der optimalen Bedingungen zur Bestimmung der Elektronentransportraten mit PSII-Präparationen

Die Meßbedingungen wurden unter Abschnitt IV.12 detailliert beschrieben.

**Tabelle 20: Ermittlung der optimalen Parameter zur Bestimmung der Elektronentransportrate im Dauerlicht bei pH 6.6**

Material	Puffer-substanz <sup>a</sup>	Elektronenakzeptor	Elektronentransportrate
Kernkomplexe <sup>g</sup>		1 mM 2,5-DCBQ <sup>b</sup>	100%
Kernkomplexe	Succinat	1 mM 2,5-DCBQ	100%
Kernkomplexe	ACES <sup>c</sup>	1 mM 2,5-DCBQ	75%
Kernkomplexe		1 mM 2,6-DCBQ	87%
Kernkomplexe		1 mM 1,4-TCBQ <sup>f</sup>	27%
Kernkomplexe		2 mM Ferricyanid + 0.5 mM 2,5-DCBQ	100%
Kernkomplexe		1 mM 2,3-DMMBQ <sup>e</sup>	65%
Kernkomplexe		2 mM Ferricyanid	35%
Kernkomplexe		1 mM PBQ <sup>d</sup>	82%
Kernkomplexe		82.5 µM DCPIP	22%
Spinat-Kernkomplexe <sup>h</sup>		150 µM 2,5-DCBQ + 600 µM Ferricyanid	100%
Spinat-Kernkomplexe		1 mM 2,5-DCBQ	60%
Spinat-Kernkomplexe	BTS-400 <sup>b</sup>	1 mM 2,5-DCBQ	40%
Spinat-Kernkomplexe	BTS-400	150 µM 2,5-DCBQ + 600 µM Ferricyanid	70%
Thylakoide <sup>h</sup>		2 mM 2,5-DCBQ + 2 mM Ferricyanid	100%
Thylakoide	HMCS-HSB1	2 mM 2,5-DCBQ + 2 mM Ferricyanid	100%

<sup>a</sup> MES, wenn nicht anders angegeben; <sup>b</sup> Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis und in Kapitel IV erläutert, <sup>c</sup> N-(2-Acetamino)-2-amino-ethansulfonsäure, <sup>d</sup> Phenyl-*p*-Benzochinon, <sup>e</sup> 2,3-Dimethyl-5-methyl-1,4-Benzochinon, <sup>f</sup> Tetrachloro-*p*-benzochinon, <sup>g</sup> 1.5 µM (*Synechocystis* sp. PCC 6803), 5 µM (*Synechocystis* sp. PCC 6803), <sup>h</sup> 5 µM.

### XI.3 Haltbarkeit von DCBQ und anderen Elektronenakzeptoren

Eine 250 mM 2,5-DCBQ-Lösung konnte ohne Beeinträchtigung der Aktivität über mehrere Monate eingefroren gelagert werden. Bei eingefrorenem 2,6-DCBQ sank die Elektronentransportrate dagegen auf 73% ab. 2,5-DCBQ war bei Raumtemperatur deutlich stabiler als 2,6-DCBQ. Nach 5 min Inkubation war die Elektronentransportrate mit 2,5-DCBQ unverändert. Mit 2,6-DCBQ sank sie auf 50%, und nach 20 min war keine Sauerstoffproduktion mehr meßbar.

Unter Punkt V.5.4 wurde erläutert, daß eine gleichzeitige Inkubation von PSII-Kernkomplexen und 2,5-DCBQ als Elektronenakzeptor bei zu hohen Konzentrationen von 2,5-DCBQ zur Schädigung von PSII und zur Inaktivierung des Elektronenakzeptors führte. Die zeitabhängige Inaktivierung wurde auch mit Dimethyl-5-methyl-1,4-Benzochinon (DMMBQ) und Phenyl-*p*-Benzochinon (PBC) untersucht. Mit beiden Elektronenakzeptoren ist die absolute Elektronentransportrate geringer als mit 2,5-DCBQ (Tabelle 20). Aber die Beeinträchtigung der Probe durch Lagerung bei Raumtemperatur war geringer als mit 2,5-DCBQ. Mit 8  $\mu\text{M}$  Chl und 5.3 mM DMMBQ inkubierte Kernkomplexe zeigten nach 55 min noch 100% der Ausgangsaktivität und nach 6 h 75%. Mit PBC lag die Elektronentransportrate nach 60 min bei 88%. Nach 6 Stunden war sie auf 44% der Ausgangsaktivität abgesunken.

### XI.4 Theorie von Lavorel zur Diffusionslimitierung der Sauerstoffmessung mit einer Pt-Elektrode

Lavorel [Lavorel 92] hat eine Theorie der diffusionsbestimmten Kinetik des polarographischen Signals einer Pt-Elektrode als Antwort auf die sprunghafte Freisetzung von  $\text{O}_2$  in einer im Abstand  $X$  über der Elektrode befindlichen dünnen Quellschicht entwickelt. Diese Theorie beschreibt die diffusionslimitierte Sauerstofffreisetzung mit drei Parametern  $t_U / t_M / t_D$ , die im festen Verhältnis von 0.436:1:3.14 zueinander stehen.

$t_U$  = Halbwertszeit des ansteigenden polarographischen Signals

$t_M$  = Zeitpunkt des Maximums

$t_D$  = Halbwertszeit des abfallenden polarographischen Signals

Das polarographische Signal wird durch  $\Phi(t) = \frac{x}{2\sqrt{\pi Dt^3}} * e^{\left(\frac{-x^2}{4Dt}\right)}$  beschrieben.

Mit der Diffusionszeit  $\tau_D = x^2/4Dt$  folgt daraus:  $\Phi(t) = \sqrt{\frac{\tau_D}{\pi^3}} * e^{\left(\frac{-\tau_D}{t}\right)}$

Durch lineare graphische Extrapolation des ansteigenden Signals im Zeitbereich von  $t = \tau_D/3$  und  $t = \tau_D/5$  kann der Schnittpunkt der Abszisse  $t_{lag}$  ermittelt werden:

$$I) \Phi\left(\frac{\tau_D}{5}\right) = 1/\sqrt{\pi} * \sqrt{125} * \frac{1}{\tau_D} * e^{-5} \text{ und } \Phi\left(\frac{\tau_D}{3}\right) = 1/\sqrt{\pi} * \sqrt{27} * 1/\tau_D * e^{-3}$$

$$\text{Bestimmung der Steigung } m = \frac{(\Phi(\frac{\tau_D}{3}) - \Phi(\frac{\tau_D}{5}))}{\frac{2}{15} \tau_D}$$

$$\text{und dem Schnittpunkt mit der Ordinate } b = \Phi\left(\frac{\tau_D}{5}\right) - \left(\Phi\left(\frac{\tau_D}{3}\right) - \Phi\left(\frac{\tau_D}{5}\right)\right) * \frac{3}{2}$$

Bei  $p = t_{lag}$  ist  $y = 0$ .

$$\Rightarrow \frac{15}{2\tau_D} * t_{lag} = \frac{3}{2} + \frac{-\Phi\left(\frac{\tau_D}{5}\right)}{\Phi\left(\frac{\tau_D}{3}\right) - \Phi\left(\frac{\tau_D}{5}\right)}$$

Lavorel gibt für  $t_M$  die Beziehung  $t_M = x^2 / 6D = 0.6666 \tau_D$  an.

Durch Einsetzen der Gleichungen aus I) folgt:  $t_{lag} = 0.218 * t_M$

## XI.5 Sauerstoffpartialdruck bei 18.9 bar N<sub>2</sub> (hochrein)

Als Nullwert für die Abhängigkeit der Reaktion  $S_3Y_Z^{ox}(H_2O)_2 \rightarrow S_0Y_Z + O_2 + n H^+$  verwendeten wir eine Probe, welche ausgiebig mit N<sub>2</sub> gespült worden war und danach unter 18.9 bar N<sub>2</sub> gesetzt worden war, so daß sich ausschließlich N<sub>2</sub> in der Kammer befand. Die Druckkammer hatte ein Volumen von ca. 19 ml; darin war das Küvettenvolumen von 3.2 ml enthalten. Das reine N<sub>2</sub>-Gasvolumen über der Küvette betrug also 15.8 ml. In der Küvette befanden sich 3.2 ml Puffer, PSII-Kernkomplexe und der Elektronenakzeptor. Unter der Annahme, daß sich im Puffer Sauerstoff in der luftgesättigten Konzentration von 0.287 mmol/l befand (siehe IV.12), betrug die Gesamtmenge an Sauerstoff  $9.184 * 10^{-4}$  mmol.

Eine weitere Annahme war, daß der Sauerstoff anschließend vollständig durch N<sub>2</sub> aus der Lösung verdrängt wurde. Mit der allgemeinen Gasgleichung ( $p * V = n * R * T$ ) folgt daraus

$$\text{ein Sauerstoffpartialdruck von } p = \frac{9.184 * 10^{-4} \text{ mmol} * 8.314243 \text{ J} * 293.15 \text{ K}}{\text{mol} * \text{K} * 19 \text{ ml}} = 117.8 \text{ Pa}$$

= **0.001178 bar**.

Mit dieser Rechnung wurde der  $p(O_2)$  noch überschätzt, da nur in der Elektronenakzeptorlösung (160 µl) und der Kernkomplex-Lösung (durchschnittlich 50 µl) noch  $\approx 287 \mu\text{M}$  O<sub>2</sub> gelöst waren. Der Großteil der Pufferlösung (ca. 3000 µl) war vor der Inkubation in der Meßzelle schon mehr als 40 min mit N<sub>2</sub> voräquilibriert worden (siehe IV.15.3), wodurch die gelöste O<sub>2</sub>-Konzentration gegen Null gesunken sein mag. Der Zeitraum zwischen Öffnung der Pufferkammer (nach der Voräquilibrierung) und

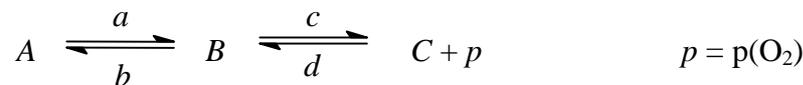
Überführung des voräquilibriumierten Puffers in die Meßzelle war  $< 1$  min - ein Zeitraum, der wahrscheinlich nicht ausreichte, um wieder eine Konzentration von  $287 \mu\text{M O}_2$  zu erreichen.

Mit der Annahme, daß in den  $2900 \mu\text{l}$  voräquilibriumiertem Puffer kein  $\text{O}_2$  vorhanden war, ergibt sich ein Sauerstoffpartialdruck von  $7.73 \cdot 10^{-5}$  bar  $p(\text{O}_2)$  bei  $18.9$  bar  $p(\text{N}_2)$  über der Küvette!

## XI.6 Kinetische Analyse von Folgereaktionen

i) Herleitung von  $A_\infty$

Es galt:



und

$$\text{I) } A_\infty + B_\infty + C_\infty = 1$$

$$\text{II) } \frac{dA}{dt} = -a * A + b * B$$

$$\text{III) } \frac{dB}{dt} = a * A - b * B - c * C + d * C * p$$

$$\text{IV) } \frac{dC}{dt} = c * B - d * C * p$$

$$\text{Im Gleichgewicht (} t \rightarrow \infty \text{) gilt: } \frac{dA}{dt} = \frac{dB}{dt} = \frac{dC}{dt} = 0$$

$$\text{Dann gilt für } t_\infty: \frac{dA}{dt} = 0 \Rightarrow 0 = -a * A_\infty + b * B_\infty \quad \text{und}$$

$$\text{V) } B_\infty = \frac{a}{b} * A_\infty$$

Dementsprechend gilt für :

$$\text{VI) } C_\infty = \frac{c}{d} * \frac{B_\infty}{p} \quad \text{bzw.} \quad B_\infty = \frac{d}{c} * C_\infty * p$$

**Gleichung 10**

Eliminierung nach  $A_\infty$ :

$$\text{Gleichung V - I: } B_\infty - A_\infty - B_\infty - C_\infty = \frac{a}{b} * A_\infty - 1$$

$$\Rightarrow 1 = A_\infty + C_\infty + \frac{a}{b} * A_\infty$$

Einsetzen von VI:

$$\Rightarrow 1 = A_{\infty} + \frac{c}{d} * \frac{B_{\infty}}{p} + \frac{a}{b} * A_{\infty}$$

Einsetzen von V:

$$\Rightarrow 1 = A_{\infty} + \frac{c}{d * p} * \frac{a}{b} * A_{\infty} + \frac{a}{b} * A_{\infty} \Rightarrow 1 = A_{\infty} \left( 1 + \frac{c}{d * p} * \frac{a}{b} + \frac{a}{b} \right)$$

$$\Rightarrow A_{\infty} = \frac{1}{1 + \frac{a}{b} + \frac{c}{d * p} * \frac{a}{b}}$$

Gleichung 4

ii) Herleitung von  $E_{\infty}$

Die gemessene Absorption setzte sich aus  $A_{\infty} + \frac{1}{2} B_{\infty}$  zusammen.

$$E_{\infty} = A_{\infty} + \frac{1}{2} B_{\infty}$$

Nach Einsetzen von Gleichung V [siehe XI.6 i)]:

$$E_{\infty} = A_{\infty} + \frac{1}{2} * \frac{a}{b} * A_{\infty} = A_{\infty} * \left( 1 + \frac{1}{2} * \frac{a}{b} \right)$$

$A_{\infty}$  wurde oben bereits aufgelöst (Gleichung 4). Nach Einsetzen folgt:

$$E_{\infty} = \frac{1 + \frac{1}{2} * \frac{a}{b}}{\left( 1 + \frac{a}{b} + \frac{c}{d * p} * \frac{a}{b} \right)} = \frac{1 + \frac{1}{2} * \frac{a}{b}}{1 + \frac{a}{b} * \left( 1 + \frac{c}{d * p} \right)}$$

iii) Herleitung der Zerfallskinetik von  $E$

Wie unter VIII.2.3 i) beschrieben galt  $C = 0$  bei hohem  $p(\text{O}_2)$  und  $B = 1 - A$ . Beobachtet wurde der Zerfall von  $E$ :

$$\frac{d \left( A + \frac{1}{2} B \right)}{dt} = -aA + bB + 0.5 * aA - 0.5 * bB = -0.5 * aA + 0.5 * bB$$

$A$  wurde bereits unter VIII.2.3 i) hergeleitet (Gleichung 7, Seite 126).

$$\Rightarrow A + 0.5 * B = A + 0.5 * (1 - A) = A = \frac{b}{a + b} + \frac{a}{a + b} * e^{-(a+b)*t} + 0.5 * (1 - A)$$

Nach erneutem Einsetzen von  $A$  folgt:

$$A + 0.5 \cdot B = E = \frac{1}{2} \cdot \left( 1 + \frac{1}{a+b} \cdot (b + a \cdot e^{-(a+b) \cdot t}) \right)$$

iv) Herleitung von  $A_\infty$  bei einer Reaktion ohne Intermediat

Zur Vereinfachung wurden die Protonen nicht berücksichtigt.



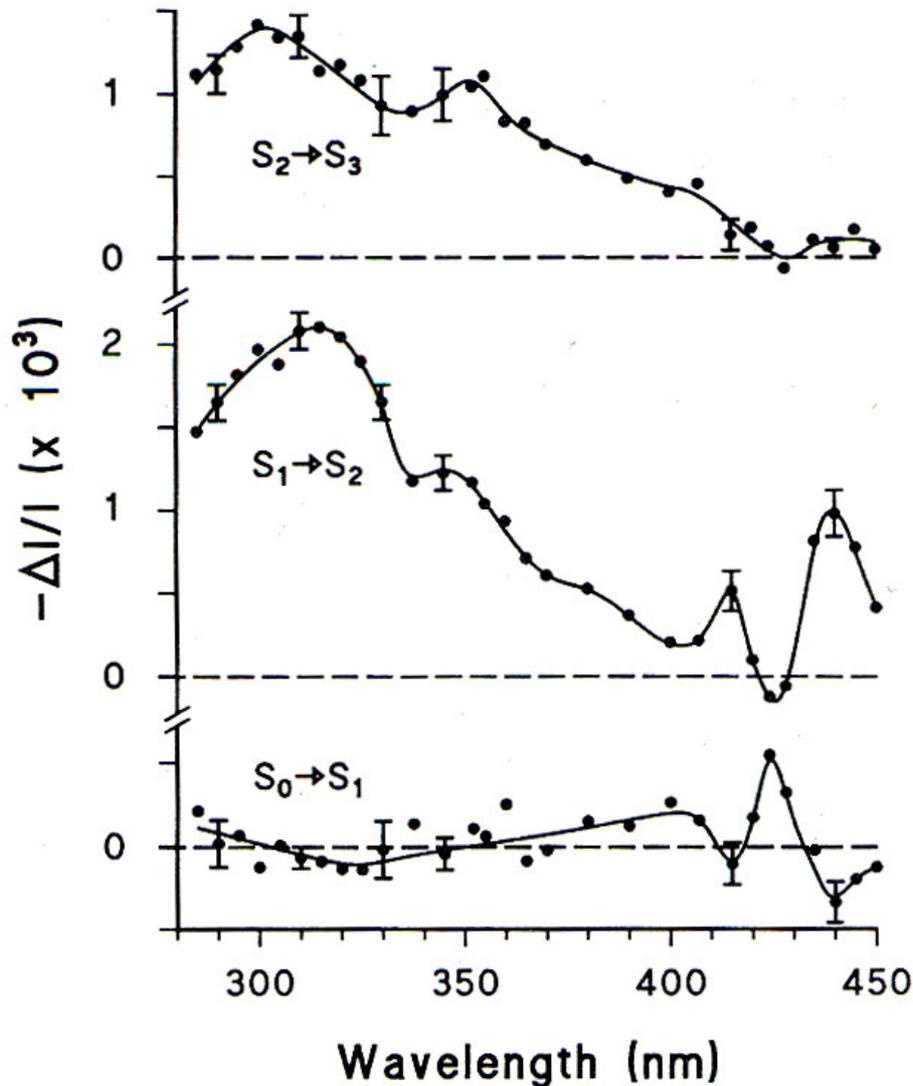
Analog zu Gleichung V aus XI.6 i) galt:  $B_\infty = \frac{a}{b \cdot p} \cdot A_\infty$  und  $B_\infty = 1 - A_\infty$

$$\Rightarrow A_\infty = \frac{p \cdot b}{a} \cdot B_\infty = \frac{p \cdot b}{a} \cdot (1 - A_\infty)$$

$$\Rightarrow A_\infty = \frac{p}{\frac{a}{b} + p}$$

## XI.7 Spektren der S-Übergänge

nach [Lavergne 91]



## XI.8 Berechnung von $\Delta X$ (siehe VIII.2.2.1) aus den Simulationen

Bei der Auswertung der Originalmeßspuren wurde die Größe der negativen Amplitude (der Zerfall von A) bei 1 bar Luft bzw. 0.001 bar  $p(\text{O}_2)$  einer Absorptionsänderung von 100% bzw. 1 gleichgesetzt. Das  $\Delta X$  (Tabelle 14) errechnete sich dann als prozentualer Anteil der verbleibenden negativen Amplitude bei  $p$  bar  $p(\text{O}_2)$  von der maximalen negativen Amplitude.

Die Simulationen zeigten bei 0.21 bar, daß noch 5.5% A und 2.5 % B nach  $t \rightarrow \infty$  übrigblieben. Da sich nach diesem Modell die Absorption aus  $A + \frac{1}{2} B$  zusammensetzte, war die maximale Größe der negativen Amplitude nicht 100% sondern 93.25%. Die übrigen simulierten Werte für A, B, C  $\rightarrow \infty$  mußten daher erst mit 93.25% normiert werden, bevor das vergleichbare  $\Delta X$  zu Tabelle 14 erhalten wurde.

Beispiel für 20 bar O<sub>2</sub> :  $A_{\infty} = 60\%$ ,  $B_{\infty} = 30\%$   $\Rightarrow$  Restabsorption = 75%  $\Rightarrow$  Die negative Amplitude ist nur noch 25% so groß wie bei 0.21 bar O<sub>2</sub>.

Normierung  $\Delta X$ :  $100\% \cdot 25 / 93.25 = 26.8 \%$ .

## XI.9 Publikationsliste

1. Clausen, J., Winkler, S., Hays, A. M. A., Hundelt, M., Debus, R. J., und Junge, W. (2001) in *PS2001 Proceedings - 12<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis* Vol. 1, 1-5, Mutations D1-E189K, R and Q of *Synechocystis* sp. PCC6803 are without influence on ns-to-ms electron transfer between OEC-Y<sub>z</sub>-P<sub>680</sub> in photosystem II Csiro Publishing, Collingwood, Vic. 3066, Australia
2. Clausen, J., Winkler, S., Hays, A. M. A., Hundelt, M., Debus, R. J. und Junge, W. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1506, 224-235. Photosynthetic water oxidation: Mutations of D1-Glu189K, R and Q of *Synechocystis* sp. PCC6803 are without any influence on electron transfer rates at the donor side of photosystem II
3. Jung, H., Buchholz, M., Nietschke, M. and Clausen, J. (2001) *Biospektrum Sonderausgabe* 2001, S. 56, Purification, reconstitution and characterization of CaiT, a new carnitine transporter of *Escherichia coli*
4. Buchholz, M., Nietschke, M., Clausen, J. and Jung, H. (2001) *Biological Chemistry* 382, S. 144, CaiT - a new carnitine transporter of *Escherichia coli*
5. Jung, H., Buchholz, M., Clausen, J., Nietschke, M., Revermann, A., Schmid, R. und Jung, K. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 39251-39258. CaiT of *Escherichia coli*, a new transporter catalyzing L- carnitine/gamma-butyrobetaine exchange
6. Junge, W., Haumann, M., Ahlbrink, R., Mulkidjanian, A. und Clausen, J. (2002) *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol Sci.* 357, 1407-1417. Electrostatics and proton transfer in photosynthetic water oxidation
7. Clausen, J., Debus, R. J. und Junge, W. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1655C, 184-194. Time-resolved oxygen production by PSII: Chasing chemical intermediates
8. Clausen, J. und Junge, W. (2004) *Nature* 430, 480-483. Detection of an intermediate of photosynthetic water oxidation

## XI.10 Lebenslauf

**Name:** Jürgen Clausen

**Geburtstag,  
Geburtsort:** 27.01.74 in Bremen

**Schulbildung:** 1980 - 1984 Grundschule Barrien  
1984 - 1986 Orientierungsstufe Syke  
1986 - 1993 Gymnasium Syke (Abitur)

**Grundwehrdienst:** 01.07.93 - 30.06.94

**Weitere Ausbildung:**  
Student der Biologie in Osnabrück seit dem 01.10.94  
Vordiplom bestanden am 23.08.96  
Studentische Hilfskraft in der Biologie/Arbeitsgruppe  
Biophysik vom 1.3.99 - 31.12.99  
Diplom bestanden am 23.11.99  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter im SFB 431 der  
Universität Osnabrück vom 1.2.00 – 30.4.02  
Seit 1.5.02 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im DFG-Projekt:  
„Photosynthetische Wasseroxidation:  
Zwischenschritte der Sauerstoffproduktion“

Osnabrück, den 15.6.2004

## **XI.11 Eidesstattliche Versicherung**

### **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

Hiermit versichere ich an Eides Statt, daß ich diese Abhandlung selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfaßt habe. Die benutzten Hilfsmittel wurden vollständig angegeben.

Osnabrück, den 15.6.2004

## XI.12 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolfgang Junge für die Überlassung der ertragreichen Themen, für die hervorragende Betreuung, das entgegengebrachte Vertrauen, die moralische Unterstützung und die stets vorhandene Bereitschaft, sofort Zeit einzuräumen, wenn es Probleme zu diskutieren gab. Vor allem möchte ich dafür danken, daß ich auf der einen Seite absolut freie Hand hatte, aber auf der anderen Seite sofort hundertprozentiges Engagement erfahren habe, wenn es Unklarheiten bei den Ergebnissen oder Schwierigkeiten mit den Anlagen gab.

Herrn Dr. Ralf Ahlbrink danke ich für die bestmögliche gemeinsame Arbeitszeit sowie für die netten Stunden, die wir zusammen in diversen Kneipen verbracht haben. Außerdem danke ich für die vielen Erklärungen schwieriger Sachverhalte, für die Lösung zahlreicher Computerprobleme und besonders für die absolute Hilfsbereitschaft, wenn es darum ging, Störungen an den Meßanlagen zu beseitigen.

Für die unbedingte Bereitschaft, mir alle meine Fragen zu beantworten und für die vielen Diskussionen über gesellschaftliche Themen danke ich Herrn PD Dr. Armen Mulkidjanian. Dank für letzteres geht auch besonders an Frau Dr. Natalia Voskoboinikova, durch die die ersten 15 Minuten eines Arbeitstages durch z.T. erheiternde z.T. lehrreiche Gespräche geprägt waren, wodurch ein guter Start in den Tag gewährleistet war.

Herrn apl. Prof. Dr. Heinrich Jung danke ich für das stets gezeigte Interesse an meiner Arbeit und an meinem Werdegang, und besonders für die Loyalität, daß meine Beiträge zur Erforschung des Carnitintransporters CaiT immer berücksichtigt wurden, selbst nachdem meine Beteiligung schon Jahre zurücklag.

Ich danke Herrn apl. Prof. Dr. Hans-Wilhelm Trissl für die vielen aktiven Hilfen und Ratschläge während der Promotionszeit, für die vielen guten Gespräche und die Versorgung mit interessanten, gesellschaftspolitischen Informationen.

Frau Dr. Monika Hundelt danke ich für die aufmunternden Worte und die hervorragende Einweisung in die Anzucht von Cyanobakterien sowie für die hervorragende Einführung in die Meßmethoden, die das Fundament dieser Doktorarbeit bilden.

Für die unermüdliche Unterstützung bei den Präparationen der PSII-Kernkomplexe und bei den übrigen biochemischen Arbeiten sowie für die stets mit äußerster Sorgfalt durchgeführten Kontrollmessungen und für die Vorschläge hinsichtlich weiterer Messungen danke ich Frau Hella Kenneweg. Ohne Ihre Hilfe hätte diese Doktorarbeit nicht den derzeitigen Umfang haben können, und viele Detailfragen wären offen geblieben.

Für die Unterstützung im Labor und bei der Aufarbeitung der PSII-Literatur danke ich Gabriele Hikade, Sigrid Gross-Hardt und Alexandra Breitenkamp.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biophysik danke ich für die ausgesprochen schöne Zeit.

Ich danke dem EDV-Team, und hier besonders Herrn Dr. Ulrich Kunze und Herrn Hendrik März, für die vielen Hilfen und für die gute Wartung und Pflege der Computer und des Servers, was erheblich zu den außergewöhnlich guten Arbeitsbedingungen in der Abteilung Biophysik beigetragen hat.

Für die Geduld bei Verwaltungsfragen und den reibungslosen Ablauf aller Verwaltungsangelegenheiten danke ich Frau Gitta Moehrke, Frau Inge Hasslöver, Frau Bertraud Riepenhausen und Frau Marlene Schmidlin.

Für die guten Ratschläge und Hilfen bei der Konstruktion von diversen Apparaturen danke ich Herrn Holger Heine, Herrn Herbert Lutter und der gesamten feinmechanischen Werkstatt sowie Herrn Gerd Reinfeld. Herrn Norbert Spreckelmeier und Herrn Werner Domanski danke ich für die Hilfe in allen elektrotechnischen Fragen und Herrn Walter Klingspon für die Lösung der alltäglichen „Problemchen“.

Meinen Eltern danke ich dafür, daß sie mit äußerstem Einsatz immer alles in ihrer Macht stehende getan haben, um mir das Studium und die Promotion auf jede erdenkliche Weise zu erleichtern. In diesem Sinne danke ich auch meinem Bruder Dr. Christian Clausen für die aufmunternden Worte und die vielen Hilfen.

Für die gute Freundschaft über all die vielen Jahre hinweg danke ich ganz besonders Herrn Tobias Wehmeier sowie Svenja Feldmann, Gernot Kurtz, Sinnikka Menke, Patrick Meyer/Heinemann, Marc Münstermann, Grita Oley, Nicki Petras, Diane und Markus Timke und Sandra und Marcell von den Driesch. *Amicus certus in re incerta cernitur.*

Darüber hinaus danke ich Regina Bartel, Marion Blume, Wilken Brüning, Michèle und Udo Friedrich, Mary Fursman, Heiko Gerken, Knut Hänjes, Jens Harting, Andrea Hohmann, Nadine Jost, Mechthild Klann, Anna Klocke, Michael Kühnapfel, Marc Lammers, Fabia Markstein, Werner Petersmann, Ingo Rathke, Simone Reinert, Sebastian Richter, René Rübenhagen, Gerlinde Schmitz, Stephanie Spark, Anne Tuukkanen, Kai Wehmeier. Außerdem Frau Dr. Veronica Carstens, Frau Astrid Gärtner, Familie Große-Bokermann, Familie Hohmann, Frau Marlene Herrmann, Frau Waltraud Leigraf mit Roy und Edo, Frau Ute-Elisabeth Montag, Frau Gretel Schmidt und Familie Zwinzscher.

Und *last but not least* danke ich Marion und Jens Koldehoff dafür, daß ich in Georgsmarienhütte stets einen ruhigen Hafen mit vorzüglicher Bewirtung und herzlicher Freundschaft vorgefunden habe.