

Laserspektroskopie an Photosystem II

Zur Proton-Elektron-Kopplung bei Tyrosin Z und über die Natur der Chlorophyll α Entität P₆₈₀

Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

von
Ralf Ahlbrink

genehmigt vom Fachbereich Biologie/Chemie der



Osnabrück, im September 2002

Hauptberichterstatter: Prof. Dr. W. Junge

Berichterstatter: Prof. Dr. H. J. van Gorkom

Datum der Einreichung: 2. September 2002

Datum der Prüfung: 26. September 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Oxygene Photosynthese	1
1.2	Photosystem II	3
1.2.1	Struktur	4
1.2.2	Dynamik	6
1.2.3	Energetik	9
1.3	Grundlagen der transienten Absorptionsspektroskopie	12
1.4	Präparative und experimentelle Methoden	13
1.4.1	Präparation von Photosystem II Kernkomplexen	13
1.4.2	Laser-/Blitzlicht-Absorptionsspektroskopie	15
2	Protonen-Kopplung des Elektronentransfers $Y_Z \rightarrow P_{680}$	19
2.1	Einführung	19
2.2	Grundlagen	21
2.2.1	Das reaktionskinetische Modell $A \rightleftharpoons B \rightarrow C$	21
2.2.2	Protolytische Reaktionen im wässrigen Lösungsmittel	23
2.3	Material und Methoden	25
2.3.1	Probenmaterial	25
2.3.2	Aufbau der Messapparatur	26
2.4	Ergebnisse	29
2.4.1	Elektronentransferzeiten zum primären Donator P_{680}^+	29
2.4.2	Die Protonenfreisetzung in das Medium	40
2.4.3	Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Reduktion von P_{680}^+	43
2.5	Diskussion	49
2.5.1	Y_Z -Oxidation im System A erfolgt analog zu nativen Zentren	50
2.5.2	Y_Z -Oxidation im Zustand S ist Proton-limitiert	53
2.5.3	Tyrosin Z im nativen PS II	56
3	Linear-dichroitische Charakterisierung von „P_{680}“	61
3.1	Einführung	61
3.2	Grundlagen	63
3.2.1	Linearer Dichroismus	63
3.2.2	Spektroskopie an Chlorophyll-Kofaktoren	67
3.3	Material und Methoden	72
3.3.1	Probenmaterial	72
3.3.2	Aufbau der Messapparatur	73

3.4	Ergebnisse	77
3.4.1	Versuche bei Raumtemperatur	77
3.4.2	Versuche bei Tieftemperatur	84
3.5	Diskussion	96
3.5.1	Deutung der Tieftemperatur-Spektren mit Monomer-Banden	99
3.5.2	Exzitonische Wechselwirkungen	106
3.5.3	P_{680}^+ bei Raumtemperatur – Delokalisation der Ladung	109
4	Zusammenfassung	113
A	Verwendete Chemikalien und Abkürzungen	117
	Literaturverzeichnis	119
	Publikationsliste	133

Abbildungsverzeichnis

1.1	Thylakoid-Modell & Chloroplast	1
1.2	Schema der photosynthetischen Elektronentransportkette	2
1.3	Mittenpotentiale der Kofaktoren der Elektronentransportkette	3
1.4	Schema über die Lage der Kofaktoren im Reaktionszentrum	4
1.5	Struktur von PS II	5
1.6	Elektronentransferzeiten in PS II	7
1.7	Aufbau für die Blitzlicht-Spektralphotometrie	15
1.8	Laserdioden-basierter Aufbau für P ₆₈₀ -Messungen	16
2.1	Laserblitzinduzierte Absorptionsänderungen bei 825 nm im alkalischen und neutralen pH-Bereich	29
2.2	Laserblitzinduzierte Absorptionsänderungen bei 825 nm im Sauren	30
2.3	Schnelle Kinetiken im Alkalischen	31
2.4	Zweixponentielle Beschreibung der schnellen P ₆₈₀ ⁺ -Reduktion	33
2.5	Arrhenius-Diagramm	35
2.6	Zweixponentielle Beschreibung der schnellen P ₆₈₀ ⁺ -Reduktion in D ₂ O	37
2.7	Das Gleichgewicht P ₆₈₀ ⁺ Y _Z ⇌ P ₆₈₀ Y _Z ^{ox}	38
2.8	Die Reduktionsrate von P ₆₈₀ ⁺ durch Y _Z	39
2.9	Die Rate der Protonenfreisetzung	40
2.10	Die Gesamtamplitude der Protonenfreisetzung im sauren pH-Bereich	41
2.11	Die totale Pufferkapazität einer PS II-Kernkomplexlösung	42
2.12	Protonenabgabe pro Reaktionszentrum	42
2.13	Einfluss von Mn ²⁺	44
2.14	Untersuchungen zur Irreversibilität von Kationen-Effekte	44
2.15	Konzentrationsabhängigkeit des Fe ²⁺ -Effekts	45
2.16	H/D-Isotopen- und Fe ²⁺ -Effekt	45
2.17	Relativer Anteil des Subensembles A beeinflusst durch Ca ²⁺ /Mg ²⁺	46
2.18	Einfluss von Ca ²⁺ und Mg ²⁺	47
2.19	Simultaner Einfluss von Ca ²⁺ und Fe ²⁺	47
3.1	Anisotropie bei Anregung eines Antennensystems	66
3.2	Chlorophyll a	67
3.3	Optisches Layout des Coherent Infinity Nd:YAG-Pulslasers	73
3.4	Anregungsspektrum der Anisotropie	77
3.5	P ₆₈₀ ⁺ -Reduktionskinetiken bei zwei relativen Polarisationen des Anregungs- und Messlichtes	78

3.6	Zeitliche Entwicklung des Anisotropiefaktors	79
3.7	Dichroitischer Effekt bei Kernkomplexen aus Spinat, Erbse und <i>Synechocystis</i>	79
3.8	Linear-dichroitisch aufgelöste P_{680} -Reduktionskinetiken im roten Spektralbereich	81
3.9	Bei Raumtemperatur gewonnene Anisotropieparameter	82
3.10	P_{680} -Kinetik bei Tieftemperatur und sättigender Anregung – Amplitudenverlust bei Akkumulation von stabilen sekundären Donatoren	84
3.11	Differenzspektrum $P_{680}^+ Q_A^- / P_{680} Q_A$ bei 77 K	85
3.12	Beispiele für Polarisations-aufgelöste Kinetiken in offenem PSII bei 77 K	86
3.13	Beispielgraphen zur numerischen Bestimmung von Anisotropieparametern in offenem PSII	87
3.14	Absorptions- und Anisotropie-Spektrum von $P_{680}^+ Q_A^- / P_{680} Q_A$ bei 77 K	89
3.15	Beispielkinetiken für Polarisations-aufgelöst gemessenen $^3P_{680}$ -Zerfall bei 77 K	92
3.16	Beispielgraph zur numerischen Bestimmung der Anisotropieparameter in geschlossenem PSII	93
3.17	$^3P_{680} / ^1P_{680}$ -Spektrum	94
3.18	Über die Ausrichtung der zentralen 6 Chlorin-Ringe im PSII	98

Tabellenverzeichnis

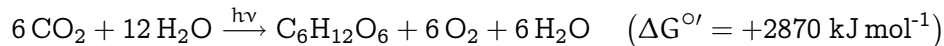
2.1	Isotopeneffekt der Protonenfreisetzung	43
3.1	Parameter des Absorptions- und Anisotropie-Spektrums von $P_{680}^+ Q_A^- / P_{680} Q_A$ bei Raumtemperatur	83
3.2	Parameter des Absorptions- und Anisotropie-Spektrums von $P_{680}^+ Q_A^- / P_{680} Q_A$ bei Tieftemperatur	90
3.3	Parameter des Absorptions- und Anisotropie-Spektrums von ${}^3P_{680} / {}^1P_{680}$ bei Tieftemperatur	94
3.4	Exzitonische Wechselwirkungen	107
A.1	Für die Präparation von PSII-Kernkomplexen verwendete Medien und Puffer	117
A.2	Medien und pH-Puffer für Probenansätze	117
A.3	pH-Indikatoren	118

1 Einleitung

1.1 Oxygene Photosynthese

Im Proteinkomplex Photosystem II (PS II) findet die lichtgetriebene Wasserspaltung der Pflanzen und Cyanobakterien statt. Dieser Prozess ist Ausgangspunkt der oxygenen Photosynthese⁽¹⁾, der Reduktionsmittel und Energieäquivalente (ATP) bereitstellt, die in nachfolgenden „Dunkelreaktionen“ dazu verwendet werden, C, N, S und H zu assimilieren.

Bei Betrachtung der Fixierung von atmosphärischem Kohlendioxid und nachfolgender Reduktion zu Glucose (im Calvin-Zyklus) lautet die Bilanzgleichung der oxygenen Photosynthese folgendermaßen:



Die photosynthetische Wasseroxidation läuft im Thylakoid ab, dies ist eine in sich geschlossene Lipiddoppelmembran (Abbildung 1.1). Sie grenzt das Lumen vom Aussenraum ab, welcher in Cyanobakterien das Cytoplasma und in Pflanzen der Stroma genannte Innenraum spezieller Organellen, den Chloroplasten, ist. Thylakoide in Pflanzen sind hochstrukturiert und enthalten – daher als integral bezeichnete – Proteine in differenzierter Verteilung. PS II ist überwiegend in gestapelten Bereichen, den Grana, lokalisiert, Photosystem I (PS I) und die ATP-Synthasen vornehmlich in den Stromalamellen.

Antennensysteme (Lichtsammelkomplexe, LHC, sowie Phycobilisomen in Cyanobakteri-

1 Aktuelle Monographien über Photosynthese sind (Raghavendra, 1998; Häder, 1999).

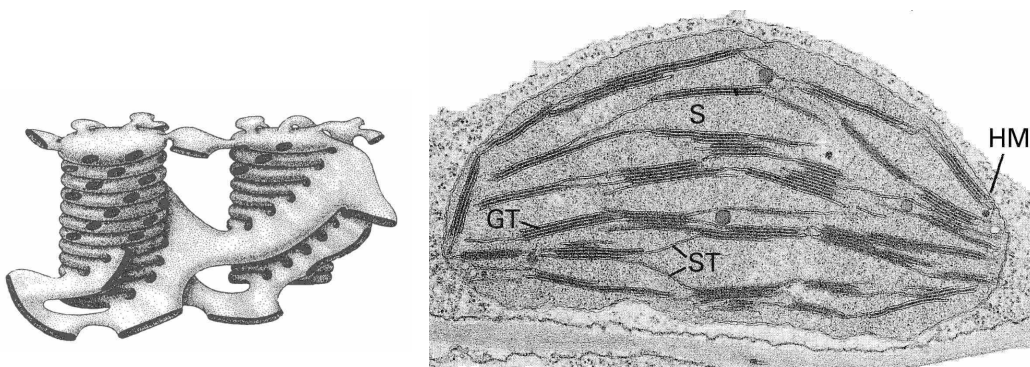


Abbildung 1.1: Links: Modell eines Thylakoids; rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Chloroplasten, (HM) innere und äußere Hüllmembran, (S) Stroma, (GT) Granathylakoid, (ST) Stromathylakoid, Breite des gezeigten Ausschnittes ca. 6 μm ; aus Staehelin & van der Staay (1996), modifiziert.

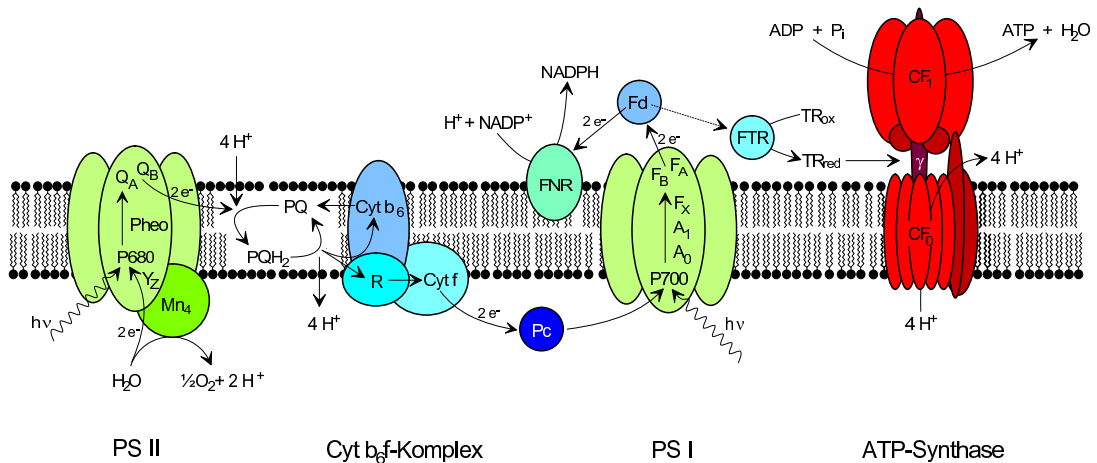


Abbildung 1.2: Die Komponenten und Redoxreaktionen der photosynthetischen Elektronentransportkette in schematischer Darstellung. Im PS II (Mn_4) wasserspaltendes Zentrum, auch OEC (*oxygen evolving complex*) genannt, (Y_Z) Tyrosin Z, (P_{680}) primärer Elektronendonator, (Pheo) Pheophytin, (Q_A , Q_B) Plastochinone; im Cyt(ochrom) b_6/f -Komplex (R) Rieskeprotein; im PS I (P_{700}) primärer Elektronendonator, Chl α -Chl α' -Dimer, (A_0) Chl α , (A_1) Phyllochinon, (F_A , F_B , F_X) Eisen-Schwefel-Zentren; in der ATP-Synthase (CF_0) membranständig, Protonentranslokation, (CF_1) Kopfteil, durch konformationelle Änderungen (*binding change*) Bildung von ATP, Adenosintriphosphat, aus ADP und P_i (Orthophosphat); mobile Komponenten sind (PQ, PQH_2) Plastochinon bzw. -hydrochinon, (Pc) Plastocyanin; (Fd) Ferredoxin reduziert (FNR) Ferredoxin- $NADP^+$ -Reduktase, was zur Bildung von NADPH, Nicotin-amid-adenin-dinucleotid-phosphat, führt, sowie (FTR) Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase, $[TR_{ox}] / [TR_{red}]$ moduliert die ATPase-Aktivität vermittels einer Disulfidbrücke auf der γ -Untereinheit.

en) stellen den Großteil der Pigmente zur Verfügung. LHCs enthalten Chlorophylle (Chl α/b), die exzitonisch gekoppelt sind – dies führt zu nichtlokalisierten Anregungszuständen. Ausserdem enthalten sie (und die Photosysteme) Carotinoide, die neben Energieeinfang und -transfer auch Schutz vor Photoinhibition bieten durch Abbau von Chlorophyll-Tripletts (3Chl) und Singulett-Sauerstoff. Die Energie absorbiertes Lichtquanten gelangt mittels Förster-Resonanztransfer über Kernantennen (CP 43 und 47 des PS II bzw. integrale Chl des PS I) zu den zentralen Pigmenten der Photosysteme, was – mit hoher Quantenausbeute – zur Ladungstrennung führt. Diese wird durch nachfolgende Redoxreaktionen mit weiteren Kofaktoren (funktionelle Gruppen) stabilisiert. Die Gesamtheit dieser Transferschritte wird als Elektronentransportkette bezeichnet (siehe Abbildung 1.2). Im linearen Transport sind die Elektronentransfers der beiden Photosysteme über den 2-Elektronenträger Plasto(hydro)chinon, dem Cytochrom- b_6/f -Komplex und dem Plastocyanin miteinander verbunden, so dass mit den Elektronen aus der Wasseroxidation die Reduktion des primären Donators im PS I, P_{700} , und damit letztlich die Bildung des NADPH erfolgt. Der Elektronentransport und die (approximativen) Standard-Redoxpotentiale der Kofaktoren werden im sogenannten Z-Schema, Abbildung 1.3, zusammengefasst.

Die sekundären Reaktionen der Ladungsseparierung führen zu protolytischen Reaktionen: Protonenaufnahme an der Membranaußenseite und -abgabe in das Lumen. Diese Ansäuerung des Lumens gegenüber dem Stroma (bzw. Cytoplasma bei Cyanobakterien) zusammen

mit dem vektoriellen Charakter der Elektronentransfers, wodurch eine elektrische Spannung über der Thylakoidmembran erzeugt wird, schafft eine protonmotorische Kraft, die die Phosphorylierung von ADP durch die ATP-Synthase antreibt.

1.2 Photosystem II

An der lumenalen Seite von PSII, im OEC (*oxygen evolving complex*), findet die Oxidation des terminalen Elektronendonators der oxygenen Photosynthese, Wasser, statt. Mit der Netto-Reaktion $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ wird klar, dass durch Absorption von 4 Lichtquanten ebenso viele Oxidationsäquivalente im katalytischen Zentrum des Photosystems akkumuliert werden, die zur Wasserspaltung führen. $\text{S}_0 \Rightarrow \text{S}_1 \Rightarrow \text{S}_2 \Rightarrow \text{S}_3 \Rightarrow \text{S}_4$ beschreibt formal die lichtinduzierte Sequenz der auftretenden Redoxzustände, der Zyklus wird geschlossen mit dem spontanen Schritt $\text{S}_4 \rightarrow \text{S}_0$, in dem die Sauerstoffabgabe erfolgt (Kok et al., 1970).

Der physiologische pH im Lumen liegt bei $\text{pH} = 5$, so dass ein extrem positives Redox-Mittelpotential von über $+0.9\text{ V}$ von den Kofaktoren der Donatorseite aufgebracht werden muss, um die Wasserspaltung antreiben zu können. Aber neben der Abhängigkeit vom pH oder anderen Parametern, gibt es weitere Gründe, warum die angegebenen Mittelpotentiale in Abbildung 1.3 nur bedingt den operativen Werten der photosynthetischen Elementarreaktionen entsprechen. So sagt das genannte Potential für die Wasserspaltung nichts über die

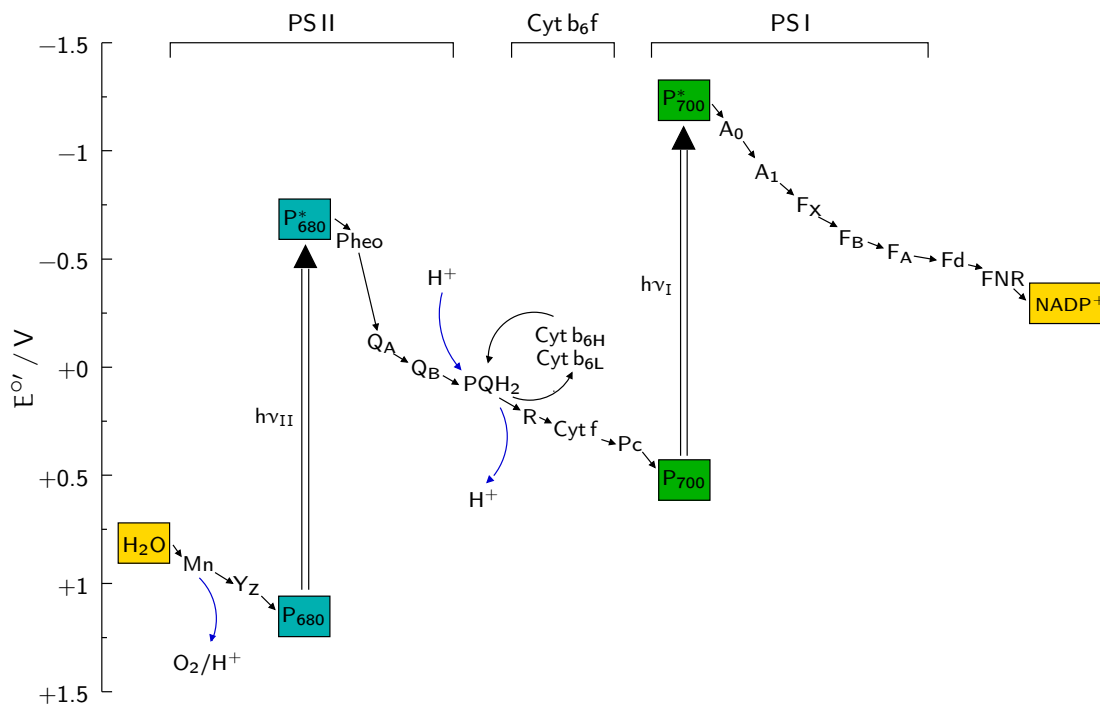


Abbildung 1.3: Approximative Standard-Redoxpotentiale E° der Kofaktoren der Elektronentransportkette. Zur Bedeutung der Abkürzungen siehe Abbildung 1.2; $h\nu_I/h\nu_{II}$ sind die Anregungsenergien der primären Donatoren von PSI bzw. PSII mit ca. 1.77 und 1.82 eV.

energetischen Verhältnisse für die Einzelreaktionen aus, sondern ist ein Mittelwert für die Gesamtreaktion. Auf Einzelheiten energetischer Aspekte der Donatorseite von PS II wird im Abschnitt 1.2.3 eingegangen.

1.2.1 Struktur

PS II ist ein Pigment-Protein-Komplex, welches aus mehr als 20 Untereinheiten besteht (Staehein & van der Staay, 1996). Die Polypeptide D1 und D2 (Genprodukte von *psbA* und *psbD*) bilden das Zentrum. Dieser Heterodimer koordiniert nahezu alle Redoxkofaktoren dieses Photosystems (Abbildung 1.4).

Die kleinste Einheit, die nur in der Lage ist, eine kurzzeitige Ladungstrennung zwischen P_{680} und Pheo durchzuführen, sind Reaktionszentren, die aus D1/D2, Cytochrom b_{559} (α/β) und dem *psbI* Genprodukt bestehen (Nanba & Satoh, 1987; Debus, 2001), wobei das Cyt vor Photoinhibierung schützt (Thompson & Brudvig, 1988; Whitmarsh & Pakrasi, 1996). Präparationen von diesem Typ enthalten folgende Pigmente: zwei Pheophytine sowie (maximal) 2 β -Carotine und 6 Chlorophylle (Satoh, 1996). Die minimale Konfiguration, in der eine stabile Ladungstrennung zwischen P_{680} und Q_A stattfindet, und die (bei Anwesenheit von externen Akzeptoren) dazu befähigt ist, Wasser zu oxidieren, wird als Kernkomplex bezeichnet. Entsprechende Präparationen von Pflanzen sind von Ghanotakis et al. (1987) und van Leeuwen et al. (1991) beschrieben worden. Ein stabiler Kernkomplex besteht neben dem Reaktionszentrum und mehreren kleinen Polypeptiden (*psbH*–*psbW*) aus den Chl-a-bindenden Kernantennen. Insgesamt befinden sich 32–35 Chl a im PS II-Kernkomplex (van Leeuwen et al., 1991; Zouni et al., 2001; Vasil'ev et al., 2001; Smith et al., 2002). Auf der lumenalen Seite stabilisiert ein extrinsisches Protein („33 kDa“, *psbO*) den katalytischen Mangan-Komplex. Im Gegensatz zu den anderen Proteinen, die Plastid-kodiert sind, wird dieses sowie 2 weitere extrinsische Komponenten (nur bei Pflanzen: „23 kDa“, „16 kDa“) und *psbW* vom Zellkern kodiert (Pakrasi, 1995).

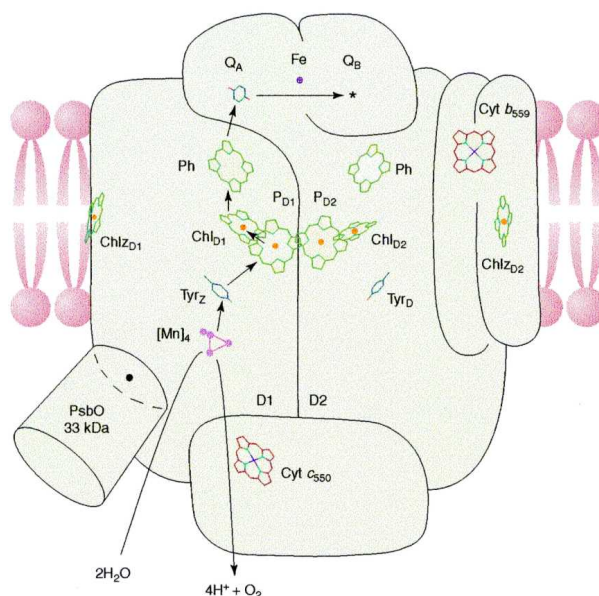


Abbildung 1.4: Schema über die Lage der Kofaktoren im Reaktionszentrum. Die Pfeile zeigen den Weg der Ladungstrennung an. Die Kernantennen fehlen in der Darstellung. Cyt c_{550} mit dem Genprodukt *psbV* ist nur bei Cyanobakterien vorhanden. Abbildung ist aus (Rutherford & Faller, 2001), die Lage der Kofaktoren ist gemäß der Bestimmung von (Zouni et al., 2001), siehe auch Abbildung 1.5.

als die des *special pair* von Purpurbakterien, liegen aber wie diese orthogonal zur Membranebene (also parallel zur Pseudosymmetrieachse des Heterodimers). B_A und B_B liegen analog zu den akzessorischen BChl: sie bilden einen Winkel von ca. 30° zur Membranebene. Sie weisen ebenfalls einen 10 \AA Mg-Mg-Abstand zum nächstgelegenen zentralen Chl a auf. Die Lage der 2 β -Carotine ist nicht bekannt.

Die beiden redoxaktiven Tyrosine in PS II, Y_Z (D1-161) und Y_D (D2-161 in höheren Pflanzen, D2-160 in Cyanobakterien), sind symmetrisch zur zentralen Achse angeordnet (Diner & Babcock, 1996; Koulougliotis et al., 1995). Tyrosin Z ist der sekundäre Elektronendonator; nach seiner erstmaligen spektroskopischen Charakterisierung durch ESR (Babcock et al., 1983) und Absorption im UV (Gerken et al., 1987) erfolgte die Lokalisierung in D1 durch ortsspezifische Mutagenese (Debus et al., 1988; Metz et al., 1989).

Da P_A mit einer Distanz von 12 \AA Y_Z am nächsten ist, ist es naheliegend, dieses Chlorophyll als Träger der positiven Ladung im Zustand der stabilen Ladungstrennung ($P_{680}^+ Q_A^-$) anzusehen (Zouni et al., 2001). Die Natur des primären Donators ist allerdings nicht vollständig verstanden: Strukturell sind bisher die konjugierten π -Elektronensysteme der Chlorine nur als Ebene erkennbar, die Ausrichtung des Ringes „V“ (ein Cyclopentanon- am zyklischen Tetrapyrrol-Ring, siehe Abschnitt 3.2.2.1) oder des Phytolrestes ist ungewiss. Zu diesem – jetzt noch unvollständigem – statischen Bild muss dann die Zuordnung aus den kinetischen Prozessen mit Hilfe zeitauflösender Spektroskopie erfolgen. Es zeichnet sich zunehmend ein Bild ab, das den gegenüber BRC und PSI nicht äquivalenten Charakter des PS II-Reaktionszentrums verdeutlicht (Übersichtsartikel sind Barber & Archer, 2001; Diner & Rappaport, 2002). Im Kapitel 3 wird darauf näher eingegangen.

Das katalytische Zentrum der Wasseroxidation besteht aus einem Komplex aus 4 Mangan-Atomen sowie Ca^{2+} und Cl^- -Ionen als essentielle Kofaktoren (Debus, 1992). Die Lage des Mn-Komplexes ist in der Röntgenstrukturanalyse erkennbar, nicht aber die interne Geometrie, für Ca und Cl konnte keine Zuordnung getroffen werden (s.a. Rutherford & Faller, 2001). Mittels Röntgenstrahlen-Spektroskopie, insbesondere Streuexperimente mit Röntgenphotoelektronen (EXAFS), wurde versucht die Nahordnung im OEC aufzuklären (Yachandra et al., 1996; Robblee et al., 2001). Eine mögliche Anordnung des Mn-Komplexes besteht aus zwei μ -oxo-verbundenen Mn-Atomen, die wiederum über eine mono- μ -oxo-Gruppe miteinander koordiniert sind (Dau et al., 1995). Diese Zuordnung ist aber keineswegs eindeutig. Die kaum zu unterscheidenden Wechselwirkungen von Mn-Mn und Mn-Ca sowie mögliche Beiträge (mit geringerer Amplitude) durch Cl, C, N und O erschweren die Analyse (Penner-Hahn, 1998; Robblee et al., 2001).

1.2.2 Dynamik

Die Verknüpfung von Antennenanregung und Ladungstrennung in Photosystemen ist mit dem Exziton-Radikalpaar-Gleichgewichtsmodell beschrieben worden (Schatz et al., 1988; van Grondelle et al., 1994). Im Gegensatz zum bakteriellen Reaktionszentrum sind alle Chlorophylle des PS II spektral, dementsprechend auch energetisch, stark überlagert. Insbesondere gibt es keine deutliche Absenkung eines der Exzitonenzustände, wie sie im BRC durch die starke exzitonische Aufspaltung des *special pair* gegeben ist, sondern nur eine *shallow trap*. Im einfachsten Fall ist die Anregungsenergie eines absorbierten Lichtquants über alle

Chromophore im PSII-Kernkomplex äquilibriert. Aufgrund der Strukturdaten mit 3.8 Å Auflösung, bei denen die Ringebenen der Chlorine deutlich erkennbar sind, wurde eine Zuordnung der Dipolübergangsmomente vorgenommen (Vasil'ev et al., 2001). Diese ist aber bei der derzeitigen Qualität der Strukturdaten fehlerträchtig (P. Fromme, persönliche Mitteilung). Vasil'ev et al. (2001) nehmen an, dass die räumliche Anordnung der Pigmente die Gültigkeit des Gleichgewichtsmodell auf die zentralen 6 Pigmente reduziert, nach Groot et al. (1997) könnte selbst im Reaktionszentrum der Energietransfer limitierend sein. So ist der Energietransfer z.B. von den peripheren Chl_z des Reaktionszentrums mit etwa 30 ps (Schelvis et al., 1994) langsam im Vergleich zur Entstehung des Radikalpaares $\text{P}_{680}^+\text{Pheo}^-$, welches apparent in 3–20 ps entsteht (Klimov et al., 1977). Die intrinsische Rate wird von Vasil'ev et al. (2001) mit mehr als $(0.7 \text{ ps})^{-1}$ abgeschätzt, Groot et al. (1997) bestimmte mittels selektiver Anregung von „ P_{680} “ eine Rate von $(0.4 \text{ ps})^{-1}$. Im Gegensatz zum *trap*-limitierten Fall ist dann nicht die intrinsische Rate der Ladungstrennung gewichtet mit der reziproken Antennengröße die bestimmende Rate, sondern der „diffusive“ Energietransfer von den Antennenpigmenten zum primären Donator, wie dies auch im BRC und PSI der Fall ist (van Grondelle et al., 1994). Einen Überblick über verschiedene Modelle des Energietransfers und der Ladungstrennung gibt Dekker & van Grondelle (2000).

Durch die Reduktion von Q_A in etwa 200 ps (Stiehl & Witt, 1969; Trissl et al., 1987; Eckert et al., 1988) wird die Ladungstrennung stabilisiert (s.a. das Schema 1.6).

Der primäre Akzeptor Q_A^- wird mit einer Halbwertszeit von $\sim 100 \mu\text{s}$ von Q_B reoxidiert, welches nach zweifacher Reduktion und Protonierung als Plastochinol freigesetzt wird. Die Bindungsstelle wird durch ein Plastochinon wiederbesetzt (Ort & Yocum, 1996a).

P_{680}^+ wird überwiegend in Nanosekunden vom Tyrosin Z reduziert (Gerken et al., 1987).

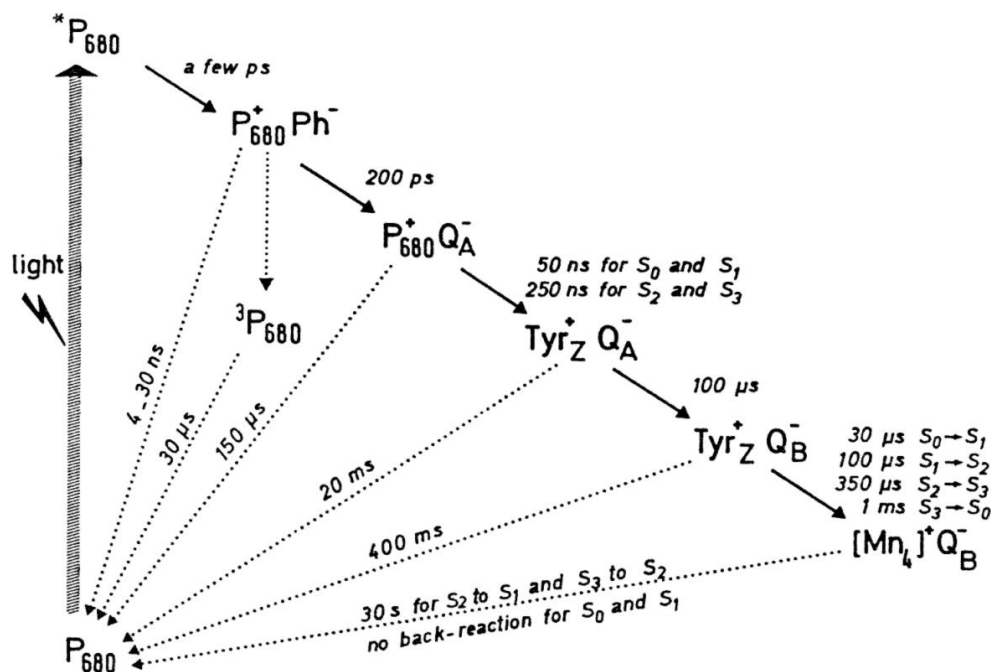


Abbildung 1.6: Typische Werte der Elektronentransferzeiten in PSII; aus Rutherford (1989).

Die charakteristischen Zeiten (20–50 ns, 200–300 ns und Mikrosekunden) und relativen Amplituden einer multiexponentiellen Beschreibung der Kinetik sind abhängig vom S-Zustand (Brettel et al., 1984; van Leeuwen et al., 1992; Jeans et al., 2002). Die Nanosekunden-Komponenten ändern sich im physiologisch relevantem pH-Bereich von 5–8 nur geringfügig (Meyer et al., 1989), die Aktivierungsenergie ist mit 10 kJ mol^{-1} (Eckert & Renger, 1988) bzw. $4\text{--}7 \text{ kJ mol}^{-1}$ (in S_1 und S_2 , Jeans et al., 2002) niedrig, und es wird kein kinetischer Isotopeneffekt durch die Substitution von H_2O durch D_2O gefunden (Karge et al., 1996). Der geringere kinetische Anteil der P_{680} -Bildung in Mikrosekunden ist dagegen protonisch beeinflusst (Schlodder & Meyer, 1987; Schilstra et al., 1998).

Eine irreversible Inaktivierung der Sauerstoffproduktion durch diverse Behandlungen von PS II-Präparaten, durch die Mangan freigesetzt wird (sog. *Mn-depletion*, Cheniae & Martin, 1978; Cole et al., 1986), verlangsamt die Reduktion von P_{680}^+ durch Y_Z deutlich, es wird eine signifikante pH-Abhängigkeit der Reduktionsraten gefunden (Reinman et al., 1981), und es erfolgt eine Rekombinationsreaktion von Y_Z^{ox} mit Q_A^- in $\gtrsim 10 \text{ ms}$ (Rappaport & Lavergne, 1997).

Y_D ist in oxidiertem Form stabil. In Mn-verarmten Präparationen wird Y_D von P_{680}^+ im Millisekundenbereich oxidiert (Buser et al., 1990), für alkalische pH-Werte kann die Oxidation auch in kürzeren Zeiten (bis zu 200 ns), ablaufen (Faller et al., 2001). Der stabilste Zustand (S_1) des Mn-Komplexes wird durch Oxidation von S_0 durch Y_D in $\sim 20 \text{ min}$ generiert (Styring & Rutherford, 1987), für $S_{2/3}$ reduziert sich die Lebensdauer des Y_D^* zu $\sim 1 \text{ s}$ (Babcock & Sauer, 1973).

Die Rereduktion des Y_Z^{ox} durch den Mn-Komplex erfolgt mit zunehmender Akkumulation von Oxidationsäquivalenten langsamer, mit Halbwertszeiten von $50 \mu\text{s}$ aus S_0 heraus bis 1.3 ms (Dekker et al., 1984b). In Kernkomplexen nach van Leeuwen ist die Oxidation des Zustandes S_3 etwa 4-mal langsamer, wahrscheinlich aufgrund des Fehlens der 2 kleinsten extrinsischen Polypeptide; in Gegenwart von Glycerin und ohne Detergens gleicht sich das kinetische Verhalten jedoch dem von intakteren Präparaten an (Haumann et al., 1997b).

Die ersten beiden Oxidationsäquivalente werden auf Mangan selbst generiert, wobei in $S_{0/2}$ aufgrund charakteristischer ESR-Signale Mn-Paare mit gemischtem Valenzzustand vorliegen ($\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$ bzw. $\text{Mn}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{IV}}$). Die chemische Natur von S_3 unterscheidet sich von den vorhergehenden durch einen signifikanten H/D-Isotopeneffekt und erhöhter Aktivierungsenergie im Übergang $S_2 \Rightarrow S_3$. Aufgrund kontroverser XANES-Untersuchungen zur chemischen Verschiebung und Radikalcharakterisierung durch ESR wurden die Oxidation eines Mangans oder eines seiner Liganden, möglicherweise Histidin oder gebundenes Wasser diskutiert. Messungen der Mn- K_β -Fluoreszenz (Messinger et al., 2001) lassen letztendlich die Entstehung eines Ligandenradikals am wahrscheinlichsten erscheinen (siehe Robblee et al., 2001, und darin genannte Referenzen). Mittels zeitaufgelöster Massenspektrometrie von ^{18}O wurden zwei gebundene Wassermoleküle nachgewiesen, die in heterogener Weise, mit Zeiten von 8 und 300 ms in S_2 bzw. 30 und 500 ms in S_3 , austauschbar sind (Hillier et al., 1998; Hillier & Wydrzynski, 2000).

Die Halbwertszeiten der Sauerstoffabgabe stimmen mit der der Y_Z^{ox} -Reduktion beim Übergang $S_3 \Rightarrow S_0$ überein (Babcock et al., 1976; van Leeuwen et al., 1993). Aus dem höchsten Oxidationszustand des OECs, S_4 (S_4' in (Haumann & Junge, 1999b)) entsteht ein intermediärer Zustand (S_4'' , möglicherweise eine $\text{Mn}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{III}}$ -Peroxid Einheit), der vergleichsweise

kurzlebig ist und daher – wenn überhaupt – nur andeutungsweise durch eine Verzögerungsphase in den Kinetiken der Sauerstoffabgabe und $\text{Mn-}/\text{Y}_Z^{\text{ox}}$ -Reduktion erkennbar ist (Rapaport et al., 1994; Haumann et al., 1997a; Razeghifard & Pace, 1999), falls nicht geeignete Mutationen die Einzelschritte kinetisch entzerren können (Hundelt, 1999).

1.2.3 Energetik

Die katalytische Funktion des Photosystems II zeichnet sich im Vergleich zu anderen Systemen durch zwei Merkmale aus.

- Die Reaktion erfolgt bei einem extrem positiven Redoxpotential.

Das operative Potential des primären Donators ist nicht bekannt. Während in BRC eine *direkte* Bestimmung der Mittenpotentiale durch Titration möglich ist (Prince & Dutton, 1978), scheitert sie bei den Kofaktoren des PS II auf der Donatorseite wegen irreversibler Schädigung des Apoproteins. Es wurde eine Abschätzung für $\text{P}_{680}^+/\text{P}_{680}$ durchgeführt, $E_m \approx 1.1\text{--}1.2\text{ V}$, die auf eine Titration des redoxaktiven Pheophytins und auf eine nahezu unveränderte energetische Lage des Radikalpaares in Relation dazu beruht (Klimov et al., 1979). Im Vergleich zu Purpurbakterien ergibt sich daraus eine Differenz von mindestens 0.6 V. Diese indirekte Abschätzung muss gegebenenfalls zu höheren Werten korrigiert werden (siehe Diner & Rapaport, 2002, und darin genannte Referenzen), weil sowohl eine Stabilisierung des Radikalpaares $\text{P}_{680}^+\text{Pheo}^-$ durch elektrostatische Wechselwirkung (mit $\sim 0.1\text{ V}$) nicht berücksichtigt wurde, als auch eine weitere indirekte Bestimmung eine um 0.26 V geringere Differenz der Mittenpotentiale des primären Radikalpaares und $\text{P}_{680}^+\text{Q}_A^-$ ergab. Offene Fragen verbleiben, egal, ob das operative Mittenpotential des Redoxpaares $\text{P}_{680}^+/\text{P}_{680}$ nun eher bei 1.1 V liegt – wie wird dann die katalytische Wasserspaltung mit Effizienz angetrieben? – oder bei 1.3 V – eine enorme Potentialverschiebung der innersten Chl α -Moleküle ist dann zu erklären und für eine sinnvolle Nutzung für die Wasserspaltung ist ein etwas größerer Wert als 1.0–1.1 V (Diner & Babcock, 1996) für Y_Z anzusetzen.

Wie werden die Unterschiede in den Redoxeigenschaften von Chl-Kofaktoren realisiert? In Purpurbakterien konnte durch Punktmutationen das Redoxpotential von P_{BRC} mittels elektrostatischer Effekte und Bindungen mit veränderten Liganden moduliert werden (Williams et al., 2001). Es konnte sogar eine derart elektropositive Form des bakteriellen primären Donators kreierte werden, die – ähnlich dem PS II – imstande war, ein Tyrosin zu oxidieren (Kalman et al., 1999). Die Variabilität von BChl und Chl durch Einflüsse der Umgebung sind vergleichbar: Das Redox-Mittenpotential von Chl α in Lösung beträgt 0.8 V (Watanabe & Kobayashi, 1991). Der primäre Donator von PSI – P_{700} , ein Dimer aus Chl α und Chl α' – liegt mit 0.6 V auf dem Niveau von P_{BRC} . Mit -1.2 V im angeregten Zustand ist er eine äußerst reduzierend wirkende Komponente (Webber & Lubitz, 2001). Modulationen durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Apoprotein und Chromophor bestimmen auch die Redoxeigenschaften von P_{700} . Damit und durch Installation von polaren Gruppen muss die exzessive Oxidationskraft von P_{680} begründet sein (Mulikdjanian, 1999). Sie bedingt eine weitere Besonderheit im PS II (Barber & Archer, 2001): Der Schutz vor reaktivem $^1\text{O}_2$, der durch ^3Chl gebildet werden kann, erfolgt in Reaktionszentren und Lichtsammelkomplexen durch Carotinoide im Van-der-Waals-Kontakt mit Chlorophyllen. Durch

Triplet-Transfer – dies ist ein Energietransfer nach Dexter – wird ^3Car gebildet, das energetisch unterhalb von $^1\text{O}_2$ liegt, so dass eine gefahrlose Relaxation von überschüssiger Energie erfolgt. Für P_{680}^+ ist dieser Schutzmechanismus aber nicht geeignet, da ein benachbartes Car (mit $E_m \approx 1 \text{ V}$) mit hoher Wahrscheinlichkeit oxidiert werden würde. Dass dieser Mechanismus der Triplettlöschung für P_{680} nicht gilt, zeigt die Abhängigkeit der Triplet-Lebensdauer vom Sauerstoff-Partialdruck. Da die Bildung von Singulett-Sauerstoff in der Umgebung von P_{680} somit nicht verhindert werden kann, treten Schäden auf. Die Natur hat Mechanismen entwickelt, die D1-Untereinheit des PS II-Reaktionszentrums (mit Wechselzeiten von $\sim 1 \text{ h}$) zu erneuern.

Die energetische Effizienz der Ladungstrennung ist im Vergleich zum evolutionären Vorgänger, dem BRC, mit ca. 67% (1.2 eV zu 1.8 eV; bei *Rb. sphaeroides*: 0.5 eV zu 1.44 eV) nahezu verdoppelt (Diner & Babcock, 1996). Die Verluste, die für eine stabile Ladungstrennung notwendig sind, scheinen auf das Wesentliche reduziert.

- Der Energiebedarf aller vier Teilschritte der Wasseroxidation ist auf die Energieversorgung durch „rote“ Lichtquanten zurechtgeschnitten.

Die enzymatische Leistung besteht darin, die vier einzelnen Oxidationsstufen der elektrochemischen Wasserspaltung – bei der der erste Schritt bei (mindestens) 2.3 V operierte, wenn er in Wasser stattfände (s. z.B. Britt, 1996) – derart auf vier Schritte umzuschichten, dass sie mit dem von $\text{P}_{680}^+/\text{P}_{680}$ bereitgestelltem Redoxpotential angetrieben werden können. Das für die Oxidation des Mn-Komplexes oder des Substrats intermediäre Tyrosin Z ist für die weitergehende Stabilisierung der Ladungstrennung wichtig. Deshalb ist der Elektronentransfer zwischen primärem und sekundärem Donator schnell. Darüber hinaus wird in der Literatur die Möglichkeit eines energetischen Ausgleichs bei der Y_Z^{ox} -Reduktion durch eine Verknüpfung von primärem Elektronen- und sekundärem Protonentransport diskutiert:

Von Krishtalik (1986, 1990) wird für die Energetik der Wasserspaltung nicht die Standard-Gibbsenergie, sondern die Aktivierungsenergien der elementaren Elektronentransfer-Schritte („Elementarreaktion“) als entscheidend angesehen. Daher ist der „konfigurationelle“ Anteil⁽²⁾ wichtig, der dann im Exponent der Marcus-Gleichung (Marcus, 1956) zusammen mit der Reorganisationsenergie enthalten ist. Wird die am Anfang genannte Nettoreaktion als 4-Elektronen-Übergang aufgefasst, bei dem der OEC in allen S-Übergängen bis auf den letzten Oxidationsäquivalente akkumulieren würde, erfordert dann der letzte Schritt das „konfigurationelle“ Potential von 1.4 V – unabhängig vom pH. Nach Krishtaliks Analyse ist der Prozessablauf kinetisch favorisiert, bei dem H_2O_2 durch einen 1- oder 2-Elektronenprozess gebildet wird, dem sich zwei Oxidationsschritte bis zur Freisetzung von O_2 anschließen. Der energetische Aufwand der Oxidationsschritte kann herabgesetzt werden durch Bindung von Protonen an eine geeignete Base, wie z.B. ein Hydroxylanion, oder sogar eine, die gleichzeitig ein Elektron akzeptiert. Hierfür kommt Y_Z^\bullet in Frage, wie von G.T. Babcock im „hydrogen abstractor“-Modell vorgeschlagen. Das Tyrosinradikal akzeptiert danach gleichzeitig ein Elektron vom Mn-Cluster und ein Proton von koordiniertem Wasser (oder Hydroxoliganden) (Tommos & Babcock, 1998; Westphal et al., 2000), s.a. die Diskussion in (Diner, 2001). Diese

² Es wurde die Änderung der Gibbsenergie ohne Konzentrations-abhängige, entropische Anteile (Solvatation), also nur die Enthalpieänderung betrachtet.

Hypothese wird gestützt durch die – scheinbare? – Gleichzeitigkeit von Sauerstoffabgabe und Y_Z^{ox} -Reduktion und experimentelle Befunde – an inhibierten Präparaten – über protonische Wechselwirkungen des Y_Z^* mit seiner Umgebung. In seiner einfachsten Form – der vorgeschlagene Mechanismus gelte generell, für alle S-Übergänge – ist eine Konsequenz dieses Modells die Abgabe *eines* Protons in das Lumen für *jeden* S-Übergang, somit verbliebe keine positive Ladung im OEC. Dem widersprechen Messungen der lokalen Elektrochromie, i.e. die Detektion von Ladungsänderungen im Protein durch Bandenverschiebungen von Chromophoren, und Detektion der Protonenabgabe durch pH-Indikatoren oder Glaselektrode. Die elektrochrom detektierten Überschussladungen der S-Zustände betragen 0:0:1:1 (S_0 bis S_3), siehe (Saygin & Witt, 1985; Haumann et al., 1994; Kretschmann et al., 1996; Haumann & Junge, 1996). Daraus kann unmittelbar auf die Anzahl abgegebener intrinsischer Protonen (siehe Abschnitt 2.2.2.2) pro S-Übergang geschlossen werden: 1:0:1:2 (beginnend mit $S_0 \Rightarrow S_1$). Diese Stöchiometrie lässt sich bei Präparationen, bei denen nur eine oder wenige periphere Gruppen elektrostatisch induziert Protonen abgeben, direkt aus der Messung der Protonenabgabe ableiten (Förster & Junge, 1985; Haumann & Junge, 1994; Hundelt et al., 1997; Schlodder & Witt, 1999; Junge et al., 2002).

Das redoxaktive Tyrosin (Y_Z) erfüllt wahrscheinlich nicht nur die Aufgabe des intermediären Elektronenüberträgers zwischen P_{680} und dem Mn-Komplex, sondern ermöglicht die energetisch ungünstige Wasseroxidation. Ein Elektronentransfer zwischen dem primären und sekundären Donator, der nicht limitiert ist durch Abgabe eines Protons, erzeugt eine positive Ladung in der Umgebung des Tyrosins, die Auslöser für die Bildung von Sauerstoff sein kann.

Zielsetzung

Die Protonenkopplung des Elektronentransfers von Tyrosin Z zum primären Donator in inaktivierten (Mn-verarmten) PS II-Kernkomplexen wird in dieser Arbeit mittels laserinduzierten Absorptionsänderungen von P_{680}^+ untersucht (Kapitel 2). Im Ergebnis wurden klare Evidenzen für reinen Elektronentransfer zwischen Y_Z und P_{680}^+ sowie – bei künstlich veränderter Struktur – auch solche für einen durch Protonentransfer geführte Oxidation des Tyrosins Z gefunden. Damit war es möglich, zwischen zwei unterschiedlichen Mechanismen zu unterscheiden. Es wurde die Relevanz der durch Protonentransfers unbeeinflussten Variante für das native Enzym verdeutlicht.

Der Frage „Was und wo ist P_{680} ?“ wird im Kapitel 3 nachgegangen. Im Zusammenhang mit dem extrem positiven Redoxpotential der Donatorseite ist evident, dass *alle* vier inneren Chl a ein sehr hohes Mittenpotential besitzen müssen, weil sie sonst irreversibel oxidiert würden in Konkurrenz zu Y_Z . Dies führt auf die Frage, ob das Elektronenloch kollektiv verteilt oder lokalisiert ist während der Lebensdauer von P_{680}^+ . Zur Klärung wurde an Kernkomplex-Präparaten das Differenzspektrum von $P_{680}^+Q_A^-/P_{680}Q_A$ und auch dasjenige von ${}^3P_{680}/P_{680}$ transient vermessen. Mittels photoselektiver Anregung und polarisierter Detektion war es möglich, die spektroskopischen Unterbanden mit „dichroitischen Marken“ auszuzeichnen. Hier konnten die Reaktionen von mindestens drei Komponenten unterschieden werden.

1.3 Grundlagen der transienten Absorptionsspektroskopie

Bei der in Abschnitt 1.4.2 technisch beschriebenen Laser-/Blitzlicht-Absorptionsspektroskopie werden photochemische Reaktionen synchron durch Lichtpulse angeregt. Die zeitliche Auflösung von Elektronentransferschritten sowie Änderungen der Protonenkonzentration des Mediums erfolgt durch die Messung von dabei entstehenden Absorptionsänderungen durch monochromatisches Messlicht geeigneter Wellenlänge (Junge, 1976).

In wässriger Lösung verändert sich die einfallende Intensität I' elektromagnetischer Strahlung der Wellenlänge λ nach dem Lambert-Beer-Gesetz exponentiell mit der optischen Weglänge l sowie mit den Konzentrationen c_i und den molaren Absorptionskoeffizienten $\varepsilon_i(\lambda)$ der absorbierenden Komponenten der Probe:

$$I(A) = I'10^{-A} \quad , \quad A = \sum_i \varepsilon_i(\lambda)c_i l \quad (1.1)$$

Die transiente Änderung der Absorption $\Delta A(t) = \sum_j \varepsilon_j \Delta c_j(t) l$ nach der Anregung (zur Zeit $t \equiv 0$ mit infinitesimaler Dauer) wird durch die zeitaufgelöste Messung der Intensität $I(t)$ hinter der Probe sichtbar.

$$\begin{aligned} \Delta I(t) &= I(t) - I_0 = I(A + \Delta A(t)) - I(A) \stackrel{(1.1)}{=} I(A) \left(10^{-\Delta A(t)} - 1 \right) \\ \Rightarrow \frac{\Delta I(t)}{I_0} &= 10^{-\Delta A(t)} - 1 \quad \Leftrightarrow \quad -\log_{10} \left(\frac{\Delta I(t)}{I_0} + 1 \right) = \Delta A(t) \end{aligned} \quad (1.2)$$

$$\boxed{-\frac{\Delta I(t)}{I_0} \approx 2.3 \Delta A(t)} \quad (1.3)$$

In der Praxis sind die Absorptionsänderungen oft $< 10^{-2}$, so dass die untere Gleichung (1.3), die durch eine Taylorentwicklung von (1.2) bis zur ersten Ordnung resultiert, zur Anwendung kommt.

Signal-Rausch-Verhältnis Für das Signal-Rausch-Verhältnis S/N bei der Messung von Absorptionsänderungen ΔA resultiert aus dem statistischen Charakter der Lichtquanten und deren Umwandlung in elektrischen Strom folgende Proportionalität:

$$S/N \propto \Delta A 10^{-\frac{1}{2}A} \frac{\sqrt{\phi n}}{\sqrt{Bw}} \quad (1.4)$$

ϕ ist die detektierte Quantenflussdichte bei einer Messung, sie kann direkt durch Intensitätserhöhung und indirekt durch Mittelung über n gleichartige Messungen vergrößert werden. Bw ist die elektrische Bandbreite des Detektionssystems; dies ist der Frequenzbereich, der bis zu einem gewissen Grade unverfälscht übertragen wird. Sie ist reziprok zur Integrationszeit für einen Messpunkt ($Bw \approx \frac{0.3}{\Delta\tau}$).

Für Messungen bei Wellenlängenbereichen, in denen die Probe signifikant absorbiert, bei PS II also im Bereich der Chlorophyllbanden, ist die eingesetzte Konzentration so zu wählen, dass das Signal-Rausch-Verhältnis optimal ist. Unter Annahme einer linearen Abhängigkeit

von A und ΔA ergibt sich der optimale Absorptionswert zu $A_{\text{opt}} = 2/\ln 10 \approx 0.87$.

1.4 Präparative und experimentelle Methoden

Dieser Abschnitt umfasst allgemeine methodische Erläuterungen. Einzelheiten sind in den nachfolgenden zwei Kapiteln separat aufgeführt.

1.4.1 Präparation von Photosystem II Kernkomplexen

Durch bestimmte biochemische Verfahrensschritte erhält man wässrige Suspensionen der photosynthetischen Untereinheit PS II, so genannte Kernkomplexe. Diese Proben ermöglichen die später beschriebenen Experimente, welche besondere Anforderungen stellen:

- Reinheit der PS II Präparation
Insbesondere für Messungen im roten Spektralbereich (Kapitel 3) ist das Chl/PS II-Verhältnis zu minimieren.
- Intaktheit der Probe
Es wurden Präparate mit hoher Aktivität (ETR, Abschnitt 1.4.1.3) eingesetzt. Für im Kapitel 2 beschriebene Messungen wurde das katalytische Zentrum gezielt deaktiviert (Abschnitt 2.3.1.2).
- Optische Eigenschaften
Die besondere Geometrie des Laserdioden-Aufbaus (Abschnitt 1.4.2.1) erfordert eine Probe mit minimaler Streuung.

1.4.1.1 Präparationsmethode

Ausgangsmaterial waren entweder 10–12 Tage alte Erbsenkeimlinge (*Pisum sativum* L., cv. Kleine Rheinländerin), die im Hause angezogen wurden, oder auf dem Markt erhältlicher, frischer Spinat (*Spinacia oleracea* L.).

Die Präparation entsprach für Spinat als Ausgangsmaterial dem in (van Leeuwen et al., 1991; van Leeuwen, 1993) beschriebenem Vorgehen, bei Verwendung von Erbsenkeimlingen wurde gemäß (Lübbbers & Junge, 1990; Bögershausen & Junge, 1995; Bögershausen, 1997) variiert. Es folgt ein prinzipieller Abriss der Präparationsmethode. Hier fehlende technische Einzelheiten sind in den gegebenen Zitaten zu finden, die benutzten Chemikalien und Pufferlösungen sind in den Tabellen im Anhang A aufgelistet.

PS II-angereicherte Membranfragmente Das erste Zwischenprodukt sind mit PS II angereicherte Thylakoid-Membranfragmente. Die Präparationsvorschrift für die so genannte „BBY-Membran“ (nach Berthold, Babcock & Yocum, 1981) nutzt aus, dass das Photosystem II sich überwiegend im Granabereich der Thylakoidmembran befindet. Sie umfasst einen Zellaufbruch im Mixer, Filtration (Maschenweite ca. 25 μm) und Zentrifugation in einem Medium mit hoher BSA-Konzentration. Die dann im Zentrifugationsniederschlag befindlichen Chloroplasten werden durch Resuspension und Homogenisierung in einem Waschmedium (ohne BSA) osmotisch bedingt aufgebrochen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt

werden die im Pellet befindlichen Thylakoide weiter aufgetrennt: Durch dreißigminütige Inkubation in einer Triton-Pufferlösung (im Dunkeln, auf Eis) werden die Stromabereiche der Thylakoide solubilisiert. Mittels weiterer Zentrifugationsschritte in BTS-Puffer (ohne/mit β -DM) erhält man eine aufkonzentrierte Lösung aus Grana-Membranfragmenten.

Die resultierenden Chlorophyllkonzentrationen lagen bei 2 mg ml^{-1} . Die Lagerung der Präparate erfolgte bei -80°C .

PS II-Kernkomplexe Die Präparation von Kernkomplexen erfolgt aus PS II-angereicherten Membranfragmenten. Durch hochkonzentrierte Detergenzugabe (β -DM) und Inkubation bei Raumtemperatur werden die integralen Membranproteine solubilisiert, eine Trennung der einzelnen Proteine erfolgt durch Ionenaustauscherchromatographie (z. B. Stryer, 1996; Rehm, 2000) (hier: Anionenaustauschsäule Q-Sepharose-FF von Pharmacia, Vol. 200 ml). Durch Waschen mit BTS400 wird die erste grüne Bande, welche LHC II enthält, entfernt (eine Quantifizierung kann über das Chl a zu b-Verhältnis – $A_{675 \text{ nm}}/A_{650 \text{ nm}}$ – erfolgen). Mit dem Elutionspuffer werden aufgrund der konkurrierenden Sulfationen die Kernkomplexe herausgewaschen.

Das Eluat wurde in sechs Fraktionen aufgeteilt. Sie wiesen im mittleren Anteil eine Chlorophyllkonzentration von 0.5–1 mM auf, die Elektronentransportrate (s. Abschnitt 1.4.1.3) lag bei ca. $1 \text{ mol}(e^-)/\text{mol}(\text{Chl}) \text{ s}$ bei den Präparationen aus Erbsen. Bei Spinat als Ausgangsmaterial verbesserte sich dieser Wert auf $1.5(-2) \text{ mol}(e^-)/\text{mol}(\text{Chl}) \text{ s}$. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -80°C .

1.4.1.2 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration

Zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration nach (Porra et al., 1989) wird eine Probe in 80% Aceton verdünnt und gefiltert. Absorptionsmessungen bei 646.6 nm und 663.6 nm erfolgten mit einem Zweistrahlenspektrophotometer (Hitachi 150-20).

1.4.1.3 Bestimmung der Elektronentransportrate

Durch polarographische Messungen mit einer Clark-Elektrode im weißen Dauerlicht wurde die Sauerstoffentwicklung der PS II-Kernkomplexe bestimmt (siehe z.B. van Gorkom & Gast, 1997; Hitchman, 1978).

Von der Probe entwickelter Sauerstoff diffundiert durch eine Teflonmembran in den Elektrolyten (gesättigte KCl-Lösung) und wird an einer Platinelektrode reduziert. Einer lokalen Sauerstoffverarmung wird durch Rühren der Probe entgegengewirkt. Bei einer Überspannung von etwa -600 mV ist der entstehende Strom proportional zur Sauerstoffkonzentration.

Der Stromverlauf wurde mit einem x-y-Schreiber aufgezeichnet. Eine Kalibrierung fand durch den photochemischen Sauerstoffabbau mittels Flavinmononukleotid (0.4 mM) in einem sauerstoffgesättigten Puffer (50 mM Tricine; bei $\text{pH} = 8$, 21°C : $c_e \approx 0.25 \text{ mM O}_2$) statt.

Der auf 4–5 μM mit (β -DM enthaltenden) BTS400-Puffer verdünnten Probe wurde ein künstlicher Elektronenakzeptor für PS II (600 μM DCBQ) oder 150 μM DCBQ als Mediator mit 600 μM Ferricyanid als Endakzeptor hinzugefügt.

Die Elektronentransportrate (ETR) errechnet sich wie folgt:

$$\text{ETR} = 4 \frac{I_m}{[\text{Chl}]t} \frac{c_e}{I_e} ,$$

I_m : Messwert
 I_e : Eichwert
 t : Belichtungsdauer
 c_e : $[\text{O}_2]$ in H_2O , luftgesättigt

Der Faktor 4 berücksichtigt, dass pro gebildetem, an der Platinelektrode reduziertem Sauerstoffmolekül vier Elektronen transferiert werden.

1.4.2 Laser-/Blitzlicht-Absorptionsspektroskopie

Die klassische Messanordnung lichtinduzierter Absorptionsänderungen ist die eines Blitzlicht-Spektralphotometers (Einzelheiten in Junge (1976), siehe auch Abschnitt 1.3). Der schematische Aufbau wird in Abbildung 1.7 gezeigt. Die Ladungstrennung im PS II wird durch einen Anregungsblitz (Blitzlampe mit geeigneten Kantenfiltern oder ein Pulslaser) quasi instantan hervorgerufen. Nachfolgende Redoxkomponenten werden absorptionsspektroskopisch durch eine zeitlich aufgelöste Intensitätsmessung des durch die Probe strahlenden Messlichtes mit einem Photomultiplier erfasst. Eine Wellenlängenselektion erfolgt durch Interferenzfilter oder Monochromatoren.

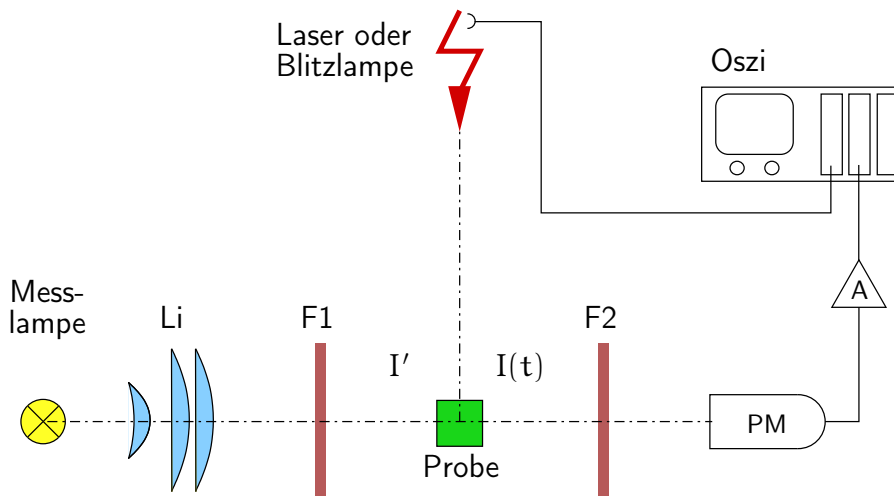


Abbildung 1.7: Aufbau für die Blitzlicht-Spektralphotometrie. ((Li) Kollimatoroptik, (F1/F2) Interferenz-/Kantenfilter oder Monochromator, (PM) Photomultiplier, (A) Verstärker, ggf. mit Kompensationsspannung (*sample & hold*), (Oszi) Speicheroszilloskop, (I' , $I(t)$) s. Abschnitt 1.3).

Der Einfachheit halber fehlen in der Zeichnung ein Photoverschluss zur Begrenzung des Messlichtes auf die Messdauer, sowie elektronische Details zur Messansteuerung. Die Synchronisation von Anregungslicht und Speicheroszilloskop wird allerdings angedeutet.

Nach Gleichung (1.3) ist die gemessene Intensitätsänderung proportional zur induzierten Absorptionsänderung. Bei linearer Intensitätsmessung und Verstärkung ist somit die gemess-

sene Spannungsänderung $\Delta U(t) = U(t) - U_0$ proportional⁽³⁾ zu der durch den Anregungsblitz entstandenen Konzentrationsänderung $\Delta c(t)$ der chemischen Spezies:

$$\Delta U(t) \propto \Delta c(t) \quad (1.5)$$

1.4.2.1 Messung von P_{680}^+ mit extremer Fluoreszenz-Unterdrückung

P_{680}^+ besitzt bei 825 nm ein breites Absorptionsmaximum mit einem Absorptionskoeffizienten von 6500–7500 $M^{-1}cm^{-1}$ (Mathis & Verméglio, 1975; Mathis & Setif, 1981). Man nimmt bei der Beobachtung im Infraroten im Vergleich zum Absorptionsmaximum des primären Donators im Grundzustand bei 680 nm ($\epsilon \approx 7 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ bei Raumtemperatur, s. Kapitel 3) ein wesentlich kleineres Signal in Kauf. Dadurch wird aber der Anteil der Aktivierung durch das Messlicht vernachlässigbar klein, Außerdem sind Artefakte durch Fluoreszenz- und Anregungslicht („Blitzdurchschlag“) zum einen kleiner und zum anderen gegenläufig zum entstehenden Absorptionssignal des Radikalkations und daher besser zu erkennen. Messungen im NIR bieten sich daher für kinetische Untersuchungen (wie in Kapitel 2) an, während für linear-dichroitische Spektralanalysen von Chlorophyll-Kofaktoren, wie sie in Kapitel 3 behandelt werden, der rote Spektralbereich interessanter, aber auch technisch problematischer ist.

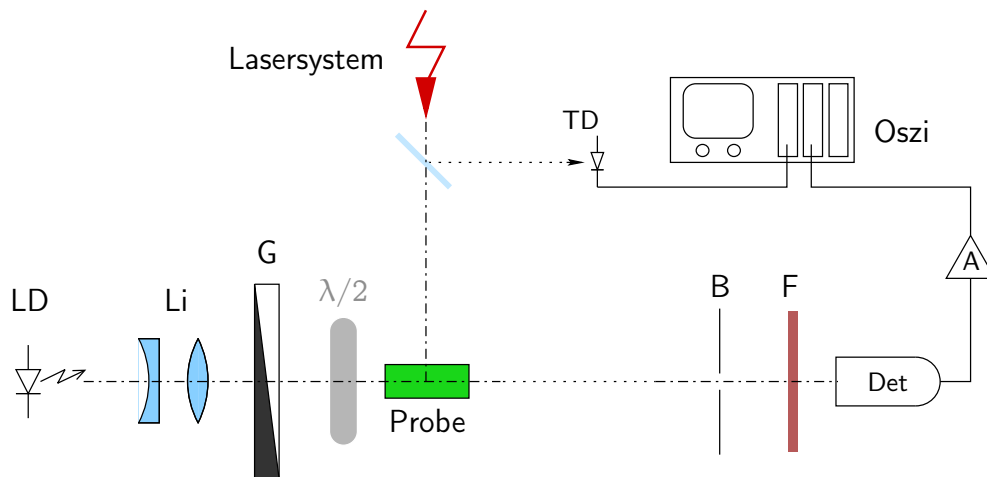


Abbildung 1.8: Laserdioden-basierter Aufbau für P_{680} -Messungen ((LD) Laserdioden-Modul, mit Kollimationsoptik, ggf. gepulst betrieben und Wellenlängen-durchstimmbar, (Li) Linsensystem zur Strahlausrichtung, (G) Graukeil zur Intensitätskontrolle, ($\lambda/2$) Halbwellen-Verzögerungsplatte, (B) Lochblende, (F) Interferenz-/Kantenfilter, (Det) Detektor, (Oszi) Speicheroszilloskop, (TD) Trigger-Photodiode).

Abbildung 1.8 skizziert den Aufbau eines geeigneten Messplatzes. Eine besondere Anforderung bei der Messung von Absorptionsänderungen eines speziellen Chlorophylls im Photosyntheseapparat ist die Unterdrückung der induzierten Fluoreszenz, die in alle Richtungen abgestrahlt wird. Durch einen großen Abstand zwischen Probe und Detektor wird der betrachtete Raumwinkel eingeschränkt, diese Reduktion von Fluoreszenz- und Anregungslicht

³ Bei mehreren Komponenten gilt die Proportionalität für $\sum \epsilon_j \Delta c_j$.

im Verhältnis zur Messlichtintensität wird durch eine Fokussierung des Messlichtstrahles auf eine kleine Detektorfläche bzw. Blendenöffnung (van Best & Mathis, 1978) noch verbessert. Für solch einen gerichteten Strahlengang wurden Laserdioden als Messlichtquelle verwendet. Die Intensität des Messlichtes wurde mittels eines Graukeils (ggf. mit zusätzlichen Neutralgraufiltern) variiert, die Polarisationsrichtung wurde gegebenenfalls mit einer Halbwellen-Verzögerungsplatte verändert.

Besonderheiten von Laserdioden als Messlichtquelle Eine Laserdiode ist im einfachsten Fall ein pn-Übergang (LED) aus einem Halbleiterkristall, dessen Spaltflächen die Endspiegel eines Fabry-Perot-Resonators formen. Die Charakteristiken der Laser-Emission sind durch die Materialien und den speziellen Aufbau gegeben, hierzu gehört u.a. die Zentralwellenlänge. Die Veränderung der emittierten Wellenlänge kann im geringen Maße durch Veränderung des Betriebsstromes und insbesondere durch Temperatur-Variation (typischerweise mittels Peltier-Elemente) erfolgen. Dadurch wird die emittierende Resonatormode modifiziert. Es handelt sich also nicht um eine kontinuierliche Änderung, sondern es treten Modensprünge auf. Bei dem Durchstimmen der Wellenlänge liegt dann die Schwierigkeit im Finden geeigneter Resonatormoden und einer hinreichenden Stabilisierung durch konstante Stromversorgung und Temperierung.

Die hohe Intensität von Laserdioden kann man z.B. ausnutzen für Messungen im NIR mit hoher Zeitauflösung bei relativ guten S/N-Werten (1.4). Die Emission von Laserdioden ist linear polarisiert (typisches Polarisationsverhältnis von $> 100 : 1$), sie sind daher ebenfalls vorteilhaft für Linear-Dichroismus-Messungen (Kapitel 3). Die eben angesprochenen Schwierigkeiten der Modenselektion beim Durchstimmen der Emissions-Wellenlänge und die nur geringe Variabilität von < 10 nm können durch Laserdioden mit externer Resonatorkavität herabgesetzt werden. Ein solches System mit einem Gitter als End- und Austrittsspiegel und Verwendung von Antireflex-beschichteten Laserdioden, die dann als Verstärkermedium mit einem integrierten Endspiegel dienen, wurde für die linear-dichroitischen Tieftemperatur-Spektren von P₆₈₀ genutzt.

Technische Einzelheiten der verwendeten Messaufbauten sind in den Methodenabschnitten der nachfolgenden Kapitel aufgeführt (2.3.2 und 3.3.2).

2 Protonen-Kopplung des Elektronentransfers $Y_Z \rightarrow P_{680}$ bei inaktiviertem Mn-Komplex

2.1 Einführung

Um Aussagen über den Mechanismus des Elektronentransfers vom Y_Z zum primären Donator P_{680}^+ unter Beachtung möglicher protonischer Wechselwirkungen machen zu können, werden hier Untersuchungen an *inaktivierten* PSII-Kernkomplexen bei *variiert*er Protonenkonzentration im Messmedium vorgestellt (Abschnitt 2.4.1).

Vergleichende optische und ESR-Messungen (Conjeaud & Mathis, 1980; Reinman et al., 1981; Boska et al., 1983; Diner & de Vitry, 1984; Conjeaud & Mathis, 1986) an PSII mit inaktiviertem Mn-Zentrum zeigen, dass für $\text{pH} \geq 5$ eine Reduktion von P_{680}^+ durch Y_Z stattfindet. Für die P_{680}^+ -Reduktion werden Halbwertszeiten von ca. 40 μs bei $\text{pH} = 4$ bis 1 μs für $\text{pH} \geq 9$ angegeben. In (Schlodder & Meyer, 1987) wird bei *Synechococcus* für den alkalischen Bereich $\text{pH} \geq 9$ eine Halbwertszeit von 200 ns bestimmt. Diese Auswertungen erfolgten durch eine monoexponentielle Anpassung der Daten für die Oxidation des Tyrosins Z.

Die Kopplung des Elektronentransfers $P_{680}^+ Y_Z \rightarrow P_{680} Y_Z^{\text{ox}}$ an eine Protonenabgabe oder eine Verschiebung innerhalb einer Wasserstoffbrücke ist notwendig, wenn vor diesem Prozess Y_Z protoniert war (Tyrosin statt Tyrosinat)⁽¹⁾. Denn in wässrigen Lösungen gibt Tyrosin das Hydroxylproton des Phenolringes durch Oxidation ab, da der pK dieser Gruppe von normalerweise 10.3 auf ca. -2 für das Radikal verschoben ist (Land et al., 1961). Auf eine dementsprechende pK-Verschiebung wird für beide redoxaktiven Tyrosin-Radikale des PSII geschlossen, da ESR-Experimente unter anderem einen isotropen g-Faktor liefern, der charakteristisch für das neutrale Radikal ist (Barry & Babcock, 1987). Bei ESR-Untersuchungen werden aufgrund der sehr geringen Spindichte große Anforderungen an die Nachweisempfindlichkeit gestellt, dem die zugleich geforderte hohe Zeitauflösung entgegensteht (Möbius et al., 1996). Protonische Wechselwirkungen mit energetischen Beiträgen charakteristisch für Wasserstoffbrücken sind festgestellt worden. In der Diskussion wird ein Abriss der dazu vorliegenden Literatur gegeben.

Die Oxidation von Y_Z kann optisch im blauen bis ultravioletten Spektralbereich detektiert werden (Diner & de Vitry, 1984; Gerken et al., 1987). Diese Messungen sind aber erschwert durch spektrale Überlagerungen mit anderen Redoxkomponenten und durch Rayleigh-Streu-

¹ Die Aminosäure-Seitenkette des Tyrosins besteht aus einem Phenolring an einer Methylengruppe (siehe z.B. Stryer, 1996).

ung, die zum UV hin stark zunimmt. Daher wurde in dieser Arbeit die Oxidation von Tyrosin beobachtet über Reduktionskinetiken von P_{680}^+ durch Messungen von laserinduzierten Absorptionsänderungen im Nah-Infraroten (NIR).

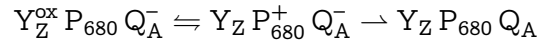
Weiterhin wurden die Änderung der Protonenkonzentration, die durch Folgereaktionen auf der Donatorseite induziert wird, auf Korrelationen mit den Elektronentransferraten hin untersucht (Abschnitt 2.4.2). Diese Messungen sind in Zusammenarbeit mit Oliver Bögershausen und Michael Haumann entstanden.

Abschnitt 2.4.3 baut auf die vorhergehenden Ergebnisse auf und untersucht den Einfluss von zweiwertigen Kationen (Mn, Fe, Ca, Mg) auf die Reduktionskinetiken von P_{680}^+ . Dieser Teil ist in Zusammenarbeit mit Dr. Boris Semin (Moskau) entstanden.

2.2 Grundlagen

2.2.1 Das reaktionskinetische Model $A \rightleftharpoons B \rightarrow C$

Der Elektronentransfer zwischen Y_Z und P_{680}^+ werde durch ein einfaches kinetisches Modell beschrieben:



Es wird folgende Symbolik benutzt:

$$A(t) \xrightleftharpoons[b]{f} B(t) \xrightarrow{r} C(t)$$

Diese Modellvorstellung soll hier zur Auswertung der im Ergebnisteil vorgestellten Messdaten herangezogen werden.

2.2.1.1 Berechnung der zeitlichen Entwicklung

Die intrinsische Rate der *Vorwärtsreaktion* sei f (*forward*), die der zugehörigen *Rückreaktion* b (*back*) und die der *Rekombination* r . Zur Zeit $t = 0$ liege nur das System vor, welches genau eine metastabile Ladungstrennung durchgeführt hat: $(Y_Z P_{680}^+ Q_A^-)_{\text{init}} = B(0) \equiv 1$. Zu lösen ist ein gekoppeltes Differentialgleichungssystem mit konstanten Koeffizienten. Mit den Anfangsbedingungen $A(0) = 0$, $B(0) = 1$ erhält man z.B. mittels einer Laplacetransformation (s. z.B. Bronstein & Semendjajew, 1991) die Lösungen $A(t)$, $B(t)$, letztere wird hier nur angegeben:

$$B(t) = \frac{k_1 - b}{w} \exp(-k_1 t) + \frac{b - k_2}{w} \exp(-k_2 t) \quad (2.1)$$

wobei

$$k_{1,2} = \frac{1}{2}(f + b + r \pm w), \quad w = \sqrt{(f + b + r)^2 - 4br} \quad (2.2)$$

$\dot{C} = rB$ kann dann mit der Lösung $B(t)$ integriert werden. Das Ergebnis ist (für $C(0) = 0$):

$$C(t) = 1 - \frac{r - k_2}{w} \exp(-k_1 t) - \frac{k_1 - r}{w} \exp(-k_2 t) \quad (2.3)$$

2.2.1.2 Vereinfachungen für bestimmte Rekombinationsraten r

a) **Vorgelagertes Gleichgewicht:** Die Näherung des vorgelagerten Gleichgewichtes ist $r \ll f, b$ (Atkins, 1996).

Die Einstellung des Gleichgewichtes ($K := f/b$) zwischen A und B wird durch r nicht gestört. Das Gleichgewichtssystem wird dann wegen $A = KB$ mit der apparenten Rate $k_r = r/K$ entvölkert. Trifft die Näherung zu, beobachtet man bei der Messung von P_{680}^+ – vereinfacht – erst die Einstellung des Gleichgewichtes (in oben genanntem Differentialgleichungssystem setze $r = 0$, stationäre Lösung $B(t \rightarrow \infty) = b(f + b)^{-1} = (K + 1)^{-1}$) und dann den Abbau

von B (und A) durch C (Q_A^-).

$$B(t) \approx \frac{K}{K+1} \exp\left(-f\left(1 + \frac{1}{K}\right)t\right) + \frac{1}{K+1} \exp\left(-\frac{r}{K}t\right) \quad (2.4)$$

$$C(t) \approx 1 - \exp\left(-\frac{r}{K}t\right) \quad (2.5)$$

b) Quasi-Gleichgewicht für kurze Zeiten: Für $r \approx 2(b-f)$ wird $w \approx b+f$. Dann vereinfachen sich (2.1) und (2.3):

$$B(t) \approx \exp\left(-\frac{r}{2}t\right) \left(\frac{f + \frac{r}{2}}{f+b} \exp(-(f+b)t) + \frac{b - \frac{r}{2}}{f+b}\right) \quad (2.6)$$

$$C(t) \approx 1 - \exp\left(-\frac{r}{2}t\right) \left(\frac{f+b - \frac{r}{2}}{f+b} + \frac{\frac{r}{2}}{f+b} \exp(-(f+b)t)\right) \quad (2.7)$$

$r = 2(b-f)$ kann nur für $K = f/b < 1$ gelten. Für $r > b$, f gilt diese Näherung für $K \lesssim 1$.

Die Gleichung (2.6) weist die gleiche Form auf wie die Lösung des „ungestörten“ Systems $A \rightleftharpoons B$ bis auf den Faktor $\exp(-r/2t)$. Bei einer Rekombinationsrate $r < b$, z.B. $b = 5r$, liegt der Wert dieses Vorfaktors für $t < (2b)^{-1} \stackrel{z.B.}{=} (10r)^{-1}$ im Bereich 0.95–1. Man kann also für genügend kurze Zeiten von einem Quasi-Gleichgewichtszustand sprechen, vergleichbar mit einem vorgelagerten Gleichgewicht.

Die Abweichung der relativen Amplitude der Exponentialfunktion mit der *apparenten* Rate $k_1 \approx f+b$ in Gleichung (2.6) im Vergleich zu der im ungestörten System (siehe erster Term in Gleichung (2.4)) wächst stark an, wenn die Werte von f und r die gleiche Größenordnung besitzen. Der Fehler ist $0.5rf^{-1}$, dieser wird durch den Vorfaktor mit der Ratenkonstanten $r/2$ allerdings abgeschwächt.

Einen direkten Vergleich zwischen der korrekten Lösung (2.1) und den hier gemachten Näherungen kann man nur bei konkreter Angabe der intrinsischen Raten machen. Man muss allerdings beachten, dass durch diese beiden Näherungen ein großer Wertebereich der Gleichgewichtskonstanten K abgedeckt werden kann.

Ein System, welches mit dem Modell $A \rightleftharpoons B \rightarrow C$ beschrieben wird, verhält sich für genügend kurze Zeiten nach der Relaxation des Anfangszustandes $B(t \equiv 0) = 1$ wie das ungestörte System $A \rightleftharpoons B$, wenn nur gilt, dass die Rekombinationsrate r kleiner ist als die Raten der Vorwärts- und Rückreaktion (f und b) zwischen A und B .

2.2.1.3 Kritische Anmerkungen

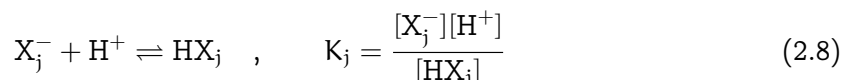
Für einen direkten Vergleich der Messergebnisse, bei denen zeitaufgelöst P_{680}^+ beobachtet wurde, und der hier berechneten zeitlichen Entwicklung $B(t)$ darf keine Ensemblemischung unterschiedlicher Systeme vorliegen, wenn sich diese in ihren Ratenkonstanten grundlegend unterscheiden. Es muss gewährleistet sein, dass unter bestimmten Bedingungen, z.B. ein eingeschränkter pH-Bereich, P_{680}^+ mit B identifiziert werden kann.

Weiterhin vernachlässigt dieses Modell den Einfluss weiterer Elektronenakzeptoren und -donatoren auf das kinetische Verhalten der drei Komponenten. Konkret sind das hinzugefügte Reagenzien oder intrinsische Komponenten, z.B. Cyt b_{559} , Y_D als Donatoren für

P_{680}^+ (die Raten sind zu r zu addieren), der direkte Elektronentransfer von Q_A^- nach Y_Z^{ox} sowie Ferricyanid oder DCBQ als Oxidationsmittel für Q_A^- . Diese Prozesse laufen alle im Millisekundenbereich oder langsamer ab (Dekker et al., 1984a; Buser et al., 1990).

2.2.2 Protolytische Reaktionen im wässrigen Lösungsmittel

Nach Eigen (1963) ist eine protolytische Reaktion eine Säure-Base-Reaktion vom Typ:



Dabei ist K_j die Säuredissoziationskonstante. Der Protolysegrad ist

$$\alpha = \frac{[X_j^-]}{[X_j^-] + [HX_j]} = \left(\frac{[H^+]}{K_j} + 1 \right)^{-1} \quad (2.9)$$

Aufgetragen über $pH = -\log([H^+])$ ergibt sich dann eine Titrationskurve mit $pK = -\log(K_j)$.

Die Protonierung einer Base X_j^- in Wasser kann diffusionskontrolliert mit sehr hoher Rate (k_+) erfolgen. Die Protonenabgabe ist dann durch K_j bestimmt:

$$k_- = K_j k_+ \quad \text{mit} \quad k_+ \approx 2 * 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (2.10)$$

2.2.2.1 Absorptionsänderungen von Indikatoren durch kleine pH-Änderungen

Die Änderung der Protonenkonzentration lässt sich spektroskopisch über pH-Indikatoren detektieren, wenn die beiden Indikatorformen ($X_j^- \equiv \text{Ind}^-$ in (2.8)) unterschiedliches Absorptionsverhalten besitzen, d.h. das der Absorptionskoeffizient der protonierten Form $\epsilon_H(\lambda)$ bei der Beobachtungswellenlänge λ_{obs} klein ist gegenüber dem der unprotonierten Form $\epsilon(\lambda)$ (bzw. umgekehrt). Nach (Junge et al., 1979; Junge & Polle, 1986; Junge & McLaughlin, 1987) ist die Absorptionsänderung bei *kleinen* Änderungen des pH's:

$$\Delta A \approx dA = -(\epsilon - \epsilon_H) l \frac{\beta_{\text{ind}}}{\beta_{\text{tot}}} dh^{\text{tot}}$$

wobei dh^{tot} die totale Änderung der Protonenkonzentration ist und β^{tot} die Gesamtpufferkapazität:

$$\beta^{\text{tot}} := -\frac{d}{dpH} \left([H^+] + \sum_j [HX_j] \right) \quad (2.11)$$

Für eine Komponente j ist die Pufferkapazität⁽²⁾ :

$$\begin{aligned}\beta_j &\approx 2.3 [H^+] \frac{d}{dH^+} ([HX_j]) = -2.3 [H^+] [X_j^- + HX_j] \frac{d}{dH^+} (\alpha_j) \\ &= 2.3 [H^+] [X_j^{\text{tot}}] \frac{K_j}{([H^+] + K_j)^2}\end{aligned}\quad (2.12)$$

Die auf ein Reaktionszentrum bezogene Protonenabgabe ΔH_{RC} ergibt sich dann aus der gemessenen relativen Intensitätsänderung, aus dem bei der gewählten Beobachtungswellenlänge maßgeblichen Absorptionskoeffizienten (z.B. $\varepsilon_H(\lambda_{\text{obs}})$), aus der Pufferkapazität des Indikators β_{ind} nach (2.12) und der Gesamtpufferkapazität einer Probe ohne Indikator $\beta_{-\text{ind}}^{\text{tot}}$ aus der Ableitung einer gemessenen Titrationskurve (gemäß (2.11)), aus der Chlorophyllanzahl N_{RC} pro Reaktionszentrum sowie der verwendeten Chlorophyllkonzentration der Probe:

$$-\frac{\Delta I(t)}{I_0} \approx 2.3 \varepsilon_H(\lambda_{\text{obs}}) l \frac{\beta_{\text{ind}}}{\beta_{\text{ind}} + \beta_{-\text{ind}}^{\text{tot}}} \Delta H_{RC}(t) \frac{[\text{Chl}]}{N_{RC}} \quad (2.13)$$

2.2.2.2 „Chemische“ und „elektrostatische“ Protonen

Vier Protonen werden insgesamt bei der Oxidation von Wasser und Bildung eines Sauerstoffmoleküls freigesetzt. Ihre Abgabe erfolgt durch die katalytischen Reaktionen im PS II verteilt über den S-Zyklus. Blitzinduzierte Absorptionsänderungen von pH-Indikatoren zeigen aber nicht nur die intrinsischen oder „chemischen“ Protonen an, die direkt von den Redoxreaktionen der Kofaktoren oder deren Liganden stammen, sondern auch „elektrostatische“. Auf der Donatorseite erwartet man eine Protonenabgabe vom ersten Typ mit ganzzahligen Werten pro Elektron. Durch die photochemisch generierten Ladungen erfahren Aminosäuren eine elektrostatische Potentialänderung. Die äquivalente pK-Änderung der Säure-Base-Gruppen führt zur nicht-stöchiometrischen Protonenabgabe (bzw. -aufnahme an der Akzeptorseite) peripherer Gruppen. Die elektrostatisch induzierte Protonenabgabe stellte sich als stark variierend in Abhängigkeit vom verwendeten Typ der Präparation, vom Lösungsmittel, vom pH und vom S-Übergang heraus (Lavergne & Junge, 1993; Haumann & Junge, 1996; Haumann et al., 1997b; Schlodder & Witt, 1999; Junge et al., 2002).

² Siehe z.B. (Stoll & Blanchard, 1990) und dort genannte Literatur. Der oben angegebene Ausdruck umfasst nur die Pufferkapazität des gelösten Stoffes, nicht aber die des Wassers.

2.3 Material und Methoden

2.3.1 Probenmaterial

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden die in Abschnitt 1.4.1 beschriebenen PS II-Präparate genutzt.

2.3.1.1 Probenansätze

Bei Messungen von P_{680}^+ (Abschnitt 2.4.1) wurde eine Chlorophyllkonzentration von 50 μM verwendet. Falls nicht anders angegeben, sind als künstliche Elektronenakzeptoren 1 mM Ferricyanid und 0.5 mM DCBQ sowie als künstlicher Elektronendonator 0.5 mM Ferrocyanid dem Messmedium A (s. Anhang A) hinzugefügt worden. Zu den verwendeten Messpuffern siehe Tabelle A.2, sie sind mit einer Konzentration von 20-50 mM eingesetzt worden.

Für Protonenmessungen (Abschnitt 2.4.2) geeignete Präparate dürfen keine zusätzlichen Puffer enthalten, eine Absorptionsänderung wäre sonst aufgrund einer zu hohen Gesamtpufferkapazität nicht messbar. Daher wurde jeweils 2.5 ml der vorher mit Tris (pH = 10) gewaschenen Probe mehrfach (hier dreimal) auf eine Gelfiltrationssäule (Pharmacia PD-10) gegeben, die mit dem (pufferfreien) Messmedium äquilibriert war.

2.3.1.2 Inaktivierung der Sauerstoffentwicklung

Die Kernkomplex-Suspension wurde auf pH \sim 9.5 titriert und inkubiert für mindestens fünf Minuten bei schwachem Licht. Durch diese Behandlung sinkt die Rate der Sauerstoffentwicklung auf unter 10% des Wertes der voll aktiven Probe.

Eine Verwendung von Tris-Puffer in hoher Konzentration (0.2 mM) ist zur Inaktivierung der PS II-Kernkomplexe nicht notwendig; denn es werden keine reaktionskinetischen Unterschiede zwischen diesen beiden Verfahren gefunden (Renger, 1979; Kuwabara & Murata, 1983).

2.3.1.3 Einstellung der Temperatur der Probe

Zur Bestimmung der Aktivierungsenergie (Abschnitt 2.4.1.4) wurde die Temperatur des zu untersuchenden Materials variiert. Die Probe befand sich dazu in einer $2 \times 2 \text{ cm}^2$ -Küvette, die von einer Stahlhalterung mit Sichtlöchern und Durchflussskammern gehalten wurde. Zur Temperierung diente ein Wasserbad (Colora). Zur Überprüfung der Temperatur war zusätzlich ein thermoelektrischer Sensor innerhalb der Küvette (außerhalb des Strahlenganges) angebracht.

Bei allen anderen Messungen wurde die Probe mindestens 10 min vor der Messung der Umgebungstemperatur von 18–21°C ausgesetzt.

2.3.1.4 Messungen in schwerem Wasser und die Bestimmung des pL-Wertes

Zur Messung von H/D-Isotopeneffekten wurden zum Vergleich die PS II-Kernkomplexpräparate in ein Messmedium mit D_2O (99.7% rein) als Lösungsmittel gegeben. Die Inkubation

erfolgte mindestens 5 min lang, wobei nach Christen et al. (1997) 1 min auch schon ausreichend sein sollte.

Die Messung des pL-Wertes (*Lyonium*: *Hydrogenium* oder *Deuterium*) erfolgte mit einer Glaselektrode. Aufgrund der unterschiedlichen Aktivität der beiden Isotope erfolgte für die D_2O -Lösungen eine Korrektur des gemessenen Wertes nach Glasoe & Long (1960):

$$pD = pD_{\text{Messwert}} + 0.40$$

Bei den Versuchen mit schwerem Wasser bestand die Lösung nach der Inaktivierung und Einstellung des gewünschten pD's aus mindestens 90% D_2O .

2.3.2 Aufbau der Messapparatur

2.3.2.1 Messaufbau für P_{680}^+

Der von Dr. Wolfgang Drevenstedt aufgebaute Messplatz (Drevenstedt, 1997) wurde mit geringen Modifikationen für die in Abschnitt 2.4 beschriebenen Experimente benutzt. Der Aufbau ist prinzipiell in Abbildung 1.8 (Abschnitt 1.4.2.1) dargestellt.

Etwa 2 ml Probenmaterial befand sich in einer Küvette mit einer optischen Weglänge von 5 cm (Fa. Helma, optisches Spezialglas, 5 mm Tiefe). Bei der temperaturabhängigen Messung ist eine Küvette mit 2 cm Weglänge benutzt worden.

Eine *single mode* Laserdiode im Dauerstrichbetrieb diente als Messlichtquelle (Sharp LTO15MDO, 827 nm bei 25°C, 30 mW, Laserdiodenkopf Melles Griot 06DLL503, Treibergerät Melles Griot 06DLD203).

Eine Destabilisierung der Laserdiode durch Rückreflexionen an optischen Komponenten und durch Fluoreszenz der Probe äußert sich in vermehrtem Auftreten von Modensprüngen. Um die daraus resultierenden Intensitätsschwankungen zu verhindern, wurde ein Faraday-Rotator mit endständigen Polarisationsfiltern (Gsänger FR800, 30 dB Dämpfung in Rückrichtung) als eine optische Diode eingesetzt.

Rotglasfilter (Schott RG9), ein schmalbandiges Interferenzfilter (Transmissionsmaximum bei der Messwellenlänge), ein Notchfilter, das das Anregungslicht reflektiert, sowie ein bis etwa 810 nm absorbierendes Rotglasfilter (Schott, polierter RG830) selektierten das Messlicht.

Eine Avalanche-Photodiode mit einer Ansprechzeit (*rise/fall time*) von 0.5 ns diente als Detektor (Advanced Photonix SD6123, aktive Fläche $\varnothing 1.5$ mm, Betriebsspannung 120 V).

Die an einem Ladewiderstand von 50 Ω abfallende Spannung (typischer Wert bei den durchgeführten Messungen 30 mV) wurde von einem linearen Breitbandverstärker (Comlinear Corporation CLC100, DC–500 MHz) zehnfach verstärkt.

Die Aufzeichnung des Messsignals erfolgte mit einem Speicheroszilloskop von Tektronix (DSA602, Einschub 11A33 mit 20, 100 oder 150 MHz Bandbreite⁽³⁾, 50 Ω Eingangsimpedanz). Dieses Gerät ist dazu befähigt, simultan weitere Messungen mit um mindestens zwei Größenordnungen verringerter Zeitauflösung durchzuführen. Mit einer Vertikalauflösung von 8 Bit bei einem benutzten Messbereich von 20 oder 50 mV (min. 10 mV) ist die Größe der

³ Es ist immer ein Tiefpassfilter zur Anwendung gekommen, der eigentliche Frequenzgang ist also DC–Bv.

Digitalisierungsschritte limitiert. Durch Mittelung (*averaging*-Modus) über N verrauschte Signale kann die Bit-Auflösung mit $\log_2(N)$ erhöht werden.

Senkrecht zum Verlauf des Messlichtes wurde ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser eingestrahlt zum Anregen des zu untersuchenden Präparates bei 532 nm (Quantel Brilliant: Pulsbreite 6 ns FWHM, max. 150 mJ bzw. Coherent Infinity: Pulsbreite 3 ns FWHM, max. 350 mJ, weitere Merkmale siehe Abschnitt 3.3.2). Durch ein Linsensystem wurde der Laserstrahl aufgeweitet und mit einer Zylinderlinse der Küvettenform angepasst.

Die Synchronisation des Messvorganges mit dem Anregungsblitz wurde durch *optisches Triggern*, d.h. durch die Messung eines mit einer Glasscheibe ausgekoppelten Teiles des Laserpulses mit einer Photodiode realisiert. Das Triggersignal wurde mit einem 1 GHz-Einschub (11A72) des Oszilloskops empfangen. Aus dem kurz vor dem anregenden Puls gemessenem Signal (Oszilloskop im *Pretrigger*-Modus), der so genannte „Vorlauf“, wurde durch Mittelung die Spannung U_0 (siehe Gleichung (1.5)) gewonnen.

Die Signalmittelung erfolgte durch repetierende Messungen (30 bis 100 Wiederholungen) im Abstand von 5 s.

2.3.2.2 Messung von protolytischen Reaktionen

Zur Messung von Blitzlicht-induzierten protolytischen Reaktionen an Kernkomplex-Präparationen wurden hydrophile Indikatoren eingesetzt (siehe Tabelle A.3). Die in ihrem jeweiligen Titrationsbereich eingesetzten Indikatoren haben einen maximalen Absorptionskoeffizienten von $2\text{--}6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei einer Wellenlänge im Bereich von 550–575 nm durch die spektralen Unterschiede zwischen protonierter und deprotonierter Form. In der Abbildung 1.7 ist ein Schema der Messanlage dargestellt.

Die Probe befand sich in einer Glasküvette (Helma, optische Weglänge 1 oder 2 cm, für Messungen im UV aus Quarzglas).

Als Messlichtquelle diente eine Halogenlampe (Radium RJ6620, 200 W), betrieben mit einem spannungstabilisiertem Netzgerät (Heinzinger TNs65-2600, $\Delta U/U \leq 10^{-6}$). Durch geeignete schmalbandige Interferenzfilter (Schott, ca. 6 nm Halbwertsbreite) vor der Küvette bzw. vor dem Photomultiplier wurde die Beobachtungs-Wellenlänge selektiert. Weitere Filter im Strahlengang des Messlicht waren gegebenenfalls Neutralgraufilter (Schott) und ein Wärmeschutzfilter (Schott KG2).

Der Detektor (THORN EMI 9558QB, 6 Dynoden) wurde mit einem stabilisiertem Hochspannungsnetzgerät (Heinzinger HNCs 2000-15) mit 500–1000 V betrieben.

In dem hier verwendeten Spektralbereich wurde die Probe auch durch das Messlicht angeregt, so dass dessen Intensität so niedrig gewählt wurde, dass der Anteil ungewünschter Anregung 5% nicht überstieg. Mittels eines Photoverschlusses (Compur E3) wurde der Messlichtstrahl außerhalb eines Messintervalls geblockt.

Die zeitliche Abfolge einer Einzelmessung war: Nach der Spannungstabilisation des Photomultipliers (ungefähr 100 ms nach Öffnung des Photoverschlusses) detektierte der Halteverstärker (*sample & hold*, Eigenbau Norbert Spreckelmeyer) die momentan über den Abschlusswiderstand (1 oder 10 k Ω) des Detektors abfallende Spannung (gemittelt über einige Millisekunden, typisch 0.4–1 V) und gab sie als Referenzwert U_0 an den negativen Eingang eines Differenzverstärkers (Tektronix AM 502, Verstärkung 500 oder 1000). Dann

wurde durch einen Triggerpuls das Speicheroszilloskop (Nicolet Pro 92, max. Bandbreite 70 MHz) aktiviert und nach der Vorlaufzeit der anregende Lichtblitz oder Blitzsequenzen gegeben. Die Messungen mit einem Laser als Anregungsquelle und mit hoher Zeitaufösung wurden wie im oben beschriebenen Versuchsaufbau mittels einer Photodiode synchronisiert.

Die Lichtblitze wurden mit einer Blitzlampe (Eigenbau N. Spreckelmeyer, Xenon-Blitzröhre FX249 von Polytec, mit Rotglasfilter Schott RG610), mit einem Rubin-Laser (JK-Laser, 694 nm, Pulsbreite 60 ns FWHM mittels Güteschaltung) oder mit dem oben beschriebenen Nd:YAG-Laser (Quantel Brilliant) erzeugt.

Dieses Blitzlicht-Spektralphotometer kann im gesamten sichtbaren Spektralbereich und im nahen UV für Messungen von Relaxationskinetiken im Bereich von Mikrosekunden bis Sekunden eingesetzt werden. Dabei können Absorptionsänderungen $\Delta A \geq 5 \cdot 10^{-5}$ gemessen werden.

2.4 Ergebnisse

2.4.1 Elektronentransferzeiten zum primären Donator P_{680}^+

Einen Überblick über die Variabilität der beobachteten Reduktionskinetik von P_{680}^+ bei Veränderung der Protonenkonzentration in einem Bereich von $\text{pH} = 3.7$ bis 10.0 geben die Abbildung 2.1 und Abbildung 2.2. Um den gesamten untersuchten Zeitbereich über fünf Größenordnungen gut darstellen zu können, ist eine logarithmische Zeitskala gewählt worden. Der Mn-Komplex der verwendeten PS II-Präparate war gemäß Abschnitt 2.3.1.2 inaktiviert.

Der Anregungsblitz erfolgte bei $t \equiv 0$, P_{680} wird in Pikosekunden oxidiert, die Zunahme der Absorption ist bei dieser Messtechnik ein „Sprung“ der gemessenen Spannungswerte um ΔU , verzerrt mit der durch die elektrische Bandbreite gegebenen Integrationszeit. Die Anfangsamplitude ist auf $-\Delta I/I_0 = 0.03$ normiert. Dies entspricht ungefähr der Anfangsamplitude bei Messungen im Bereich $\text{pH} 5$. Die Amplituden schwankten – anhand der langsameren Signale ermittelt – bei diesen Messungen um $\pm 5\%$. Die Normierung der schnelleren Signale erfolgte durch weitere Messungen mit höherer Zeitaufösung (Bw bis 150 MHz , s. den nächsten Abschnitt). Die Wiederholung der Messungen zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erfolgte alle 5 s . Bei diesen Versuchen enthielt das Messmedium künstliche Elektronendonatoren und -akzeptoren (s. Abschnitt 2.3.1.1). Damit war gewährleistet, dass

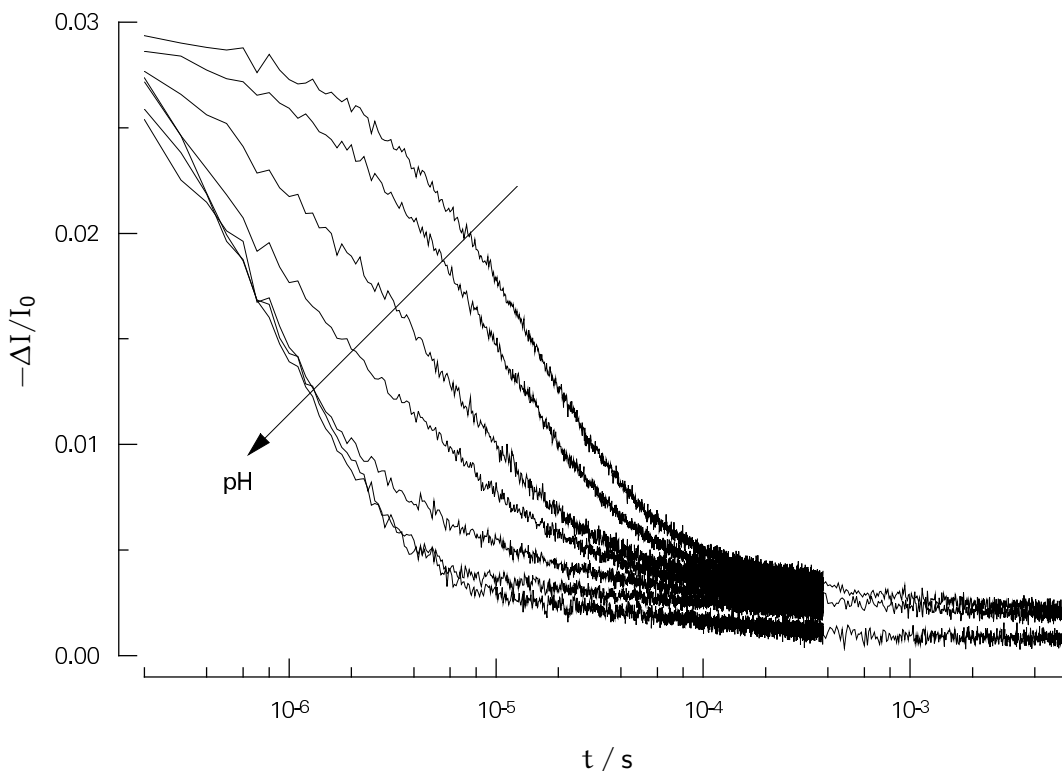


Abbildung 2.1: Laserblitzinduzierte Absorptionsänderungen bei 825 nm bei folgenden pH -Werten: 6.0 , 6.3^* , 7.0 , 7.5^* , 8.0 , 9.0 und 10.0^* (beginnend bei der oberen Kurve (für $t = 1 \cdot 10^{-5} \text{ s}$); *: Verlauf bis $6 \cdot 10^{-3} \text{ s}$ gezeigt); weiteres in Abbildung 2.2 und Abschnitt 2.3.1.1.

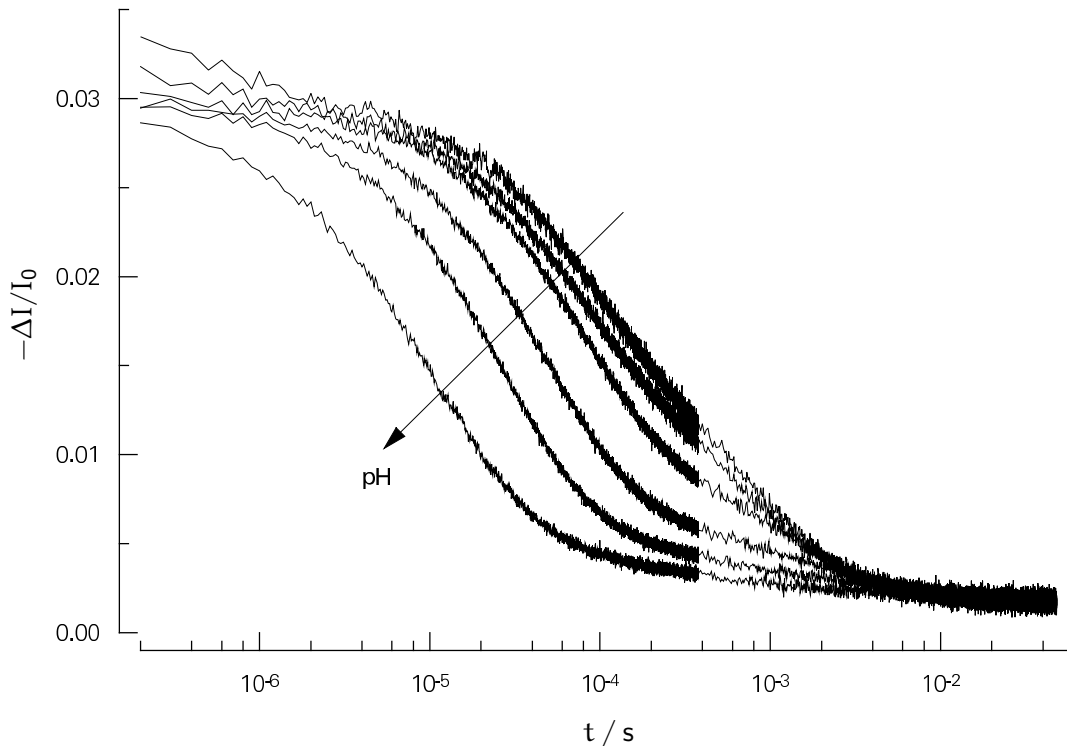


Abbildung 2.2: Laserblitzinduzierte Absorptionsänderungen bei 825 nm bei folgenden pH-Werten: 3.7, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 und 6.3 (beginnend bei der oberen Kurve (für $t = 1 \cdot 10^{-4}$ s)); 20 MHz, 100 ns/Punkt, Mittelung über 30 Messungen (#), Graufilter $T = 0.34$, normiert (s. Text).

zu Anfang jeder Messung vor dem Anregungsblitz die PS II-Kernkomplexe in der Konfiguration $Y_Z P_{680} Q_A$ vorlagen.

Global betrachtet ist die Reduktion des angeregten primären Donators zum alkalischen Bereich hin beschleunigt. Dort „zerfällt“ P_{680}^+ überwiegend mit einer Halbwertszeit von $1 \mu\text{s}$. Im Sauren überwiegen dagegen Zerfallszeiten im Bereich von $10 \mu\text{s}$ bis 1ms . Im neutralen pH-Bereich erfolgt ein kontinuierlicher Übergang zwischen diesen Extremen.

Die Reduktionskinetik besteht offensichtlich nicht nur aus einer monoexponentiell abfallenden Funktion, die Veränderung der mehrphasigen Kinetik durch die Variation des pH's ist somit nicht eindeutig beschreibbar.

Im Folgenden werden die Ergebnisse daher analysiert durch eine numerische Anpassung der Daten mit Funktionen der Form $\sum_{i=1}^n a_i \exp(-k_i t) + a_0$ mit $n = 2, 3$.

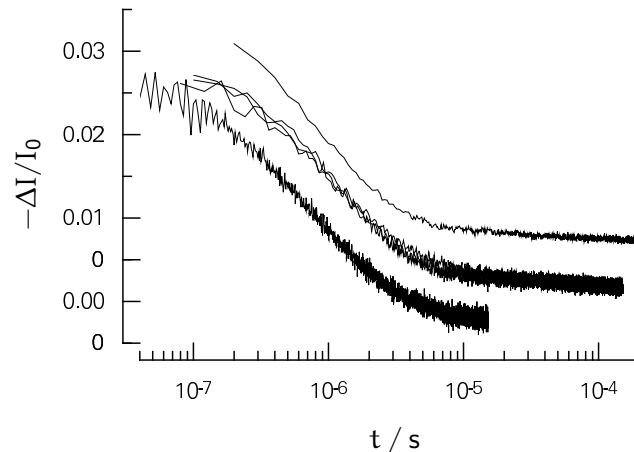
2.4.1.1 Der alkalische und neutrale pH-Bereich

Wie in Abbildung 2.1 zu sehen ist, wird P_{680} im Bereich $\text{pH} > 7.5$ zum überwiegenden Teil innerhalb einer Mikrosekunde gebildet. Bei diesen Messungen ist allerdings etwa 15% der Kinetik nicht aufgelöst, da bei der gewählten elektrischen Bandbreite des Oszilloskops nur Kinetiken mit $t_{1,2} > 300 \text{ns}$ unverfälscht wiedergegeben werden können.

Messungen mit besserer Zeitaufösung zeigt Abbildung 2.3. Die numerische Anpassung

der unteren Kurve im Bereich $30 \text{ ns} < t < 1 \text{ }\mu\text{s}$ mit zwei Exponentialfunktionen ergibt einen 30% Anteil mit $t_{1/2} = 200 \text{ ns}$ sowie 55% mit $t_{1/2} = 1.0 \text{ }\mu\text{s}$. Diese Messung wird mit der entsprechenden Kurve aus Abbildung 2.1 und drei weiteren Messungen im Alkalischen verglichen.

Abbildung 2.3: Schnelle Kinetiken im Alkalischen: untere und obere Kurve pH=9 (letzte aus Abbildung 2.1, um $-\Delta I/I_0 = \mp 5 \cdot 10^{-3}$ versetzt), mittlere Kurven pH = 8.5, 9.5, 10.5; Bw = 100 MHz, 40(50) ns/Punkt, Mittelung 30#.



Die Ergebnisse sind bis zum Zeitpunkt $t = 1 \text{ }\mu\text{s}$ für pH = 10.5 bis 8.5 sehr ähnlich, die Raten verändern sich praktisch nicht. Über den Anteil der 200 ns-Phase bei verändertem pH kann man allein mit den Messungen in Abbildung 2.1 keine Aussage machen. Hier sieht man, dass der relative Anteil dieser Exponentialfunktion unter 35% liegt. Tendenziell nimmt der Anteil zum neutralen pH-Bereich hin ab. Dieses Verhalten zeigt aber auch die Mikrosekundenkinetik. Die Abbildung 2.1 ist mit Hilfe dieser Messdaten normiert worden. In der nachfolgenden Auswertung werden überwiegend Messungen mit einer geringeren Bandbreite von 20 MHz analysiert, die dafür ein wesentlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis besitzen. Die in Abschnitt 2.4.1.3 genauer beschriebene Auswertung dieser Daten ergibt zum Vergleich für pH ~ 9 als kürzeste Halbwertszeit circa $1 \text{ }\mu\text{s}$ – die schnellste Kinetik wird nicht korrekt wiedergegeben, ihr Anteil ist aber auch geringer. Diese Kinetik hat eine relative Amplitude von 80%, was gut mit der Summe der oben angegebenen Anteile der Exponentialfunktionen mit $t_{1/2} = 200 \text{ ns}$ und $1 \text{ }\mu\text{s}$ übereinstimmt.

Ab pH = 8 steigt der Anteil einer langsameren Reduktionsrate, bei pH = 7.5 signalisiert der gestreckte Verlauf über mindestens eine Größenordnung in der Zeit das Vorliegen mehrerer Zerfallsprozesse mit ähnlicher Amplitude. Weiter zum Säuren nimmt der Anteil einer um mindestens eine Größenordnung langsameren Kinetik schnell zu.

Bis pH = 6 ist der Beitrag des exponentiellen Abfalls mit Raten $k < 10^4 \text{ s}^{-1}$ nur geringfügig von 5% bei pH = 10 auf 20% gestiegen.

Im Alkalischen wird P_{680}^+ im wesentlichen mit einer Halbwertszeit von $1 \text{ }\mu\text{s}$ reduziert. Im neutralen pH-Bereich ist die Reduktionskinetik stark verlangsamt. Der Übergang bei pH ~ 7.5 ist eine Komposition aus den Kinetiken beider Bereiche, wobei die Gesamtamplitude angenähert konstant bleibt.

2.4.1.2 Der saure pH-Bereich

Vom neutralen pH-Bereich zum Säuren hin nimmt die Rate der dominierenden Abklingkinetik kontinuierlich ab (siehe wieder Abbildung 2.2). Zusätzlich nimmt deutlich der Anteil einer im Neutralen langsameren Kinetik zu, die Raten dieser Prozesse lassen sich hier nur abschätzen mit $10^4 > k > 3 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$.

Ab pH = 4.5 beobachtet man wieder das Auftreten eine Phase mit einer Halbwertszeit von 2 μs oder schneller. Gleichzeitig nimmt die Gesamtamplitude des detektierten P_{680}^+ -Signals ab. Es wird hier davon ausgegangen, dass sich ein Anteil der PS II-Kernkomplexe bei diesen extremen Bedingungen durch Proteindenaturierung funktionell verändert hat. Daher wird dieser Anteil bei der Amplitudennormierung nicht miteinbezogen. Die Messkurve mit pH=3.7 ist mit einem Faktor 1.5 korrigiert worden.

Bei pH = 5 liegt der Anteil von P_{680} , der mit $t_{1/2} = 1 \mu\text{s}$ oder schneller gebildet wird, unter 5%. Nach (Schlodder & Meyer, 1987), deren Messungen an den thermophilen Cyanobakterien *Synechococcus* sp. durchgeführt wurden, wird bei diesem pH an sauerstoffproduzierenden Proben P_{680}^+ zu über 50% mit Raten $k > 3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ abgebaut. Da es sich bei der Inaktivierung der Probe um einen irreversiblen Prozess handelt, ist hier, wie auch aus der Sauerstoffmessung (Abschnitt 1.4.1.3), die Inaktivierung offensichtlich.

Übergehend vom neutralen in den sauren pH-Bereich ist eine deutliche pH-Abhängigkeit der Reduktionsrate zu erkennen. Für pH < 5 wird zusätzlich der Anteil einer langsamen Reduktionskinetik größer.

2.4.1.3 Die pH-Abhängigkeit der Vorwärtsreaktion $P_{680}^+ Y_Z \rightarrow P_{680} Y_Z^{\text{ox}}$

Um der Mehrphasigkeit der Reduktionskinetiken gerecht zu werden, wird hier zur numerischen Anpassung der Daten ein zweixponentieller Ansatz gewählt. Trotzdem soll nur die „Vorwärtsreaktion“ (der apparenten Rate $k_1 \approx f + b$, Gleichung (2.2), entsprechend) betrachtet werden. Daher wird hier untersucht, ob sich der schnellere Anteil der P_{680}^+ -Kinetik aus der Vorwärtsreaktion zweier Untermengen der PS II-Präparation zusammensetzt. Die Anpassung der Daten erfolgt bis 30 μs nach dem Anregungsblitz (eine Vergrößerung des Intervalls auf 50 μs gibt keine signifikanten Unterschiede). Es wird somit davon ausgegangen, dass Rekombinationskinetiken in diesem Zeitbereich vernachlässigbar sind.

Die Abbildung 2.4 zeigt die resultierenden Raten, die zugehörigen relativen Amplituden sowie die verbleibenden Restamplituden a_0 .

Der Anteil der schnelleren Rate k_1^A überwiegt deutlich für pH > 7.5 (80%), die Rate selbst variiert in diesem Bereich kaum: $k \approx 9 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$. Zum neutralen Bereich hin nimmt der relative Anteil kontinuierlich ab bis praktisch Null für den pH-Bereich 4.5–5.5.

Im ganz sauren Bereich steigt der Anteil von Mikrosekundenkinetiken wieder auf maximal 10% (pH = 3.7), sie beschreiben dann den oben angesprochenen Anteil (teilweise) denaturierten Proteins. Daher wird die schnelle Rate auch im Säuren beibehalten, für die Berechnung der Restamplitude werden sie aber *nicht* berücksichtigt.

Der Verlauf der relativen Amplitude der schnellen Kinetik im Alkalischen ist der einer leicht abgeflachten Titrationskurve mit $\text{pK} = 7.0$ (Gleichung (2.9) als Funktion von $\exp(-a \text{pH})$, $a \approx 1.9$). Bei Vernachlässigung der kleinen Amplituden bei pH = 6 erhält man eine Titrationskurve ($a = 2.3$) mit einem leicht erhöhten $\text{pK} = 7.3$.

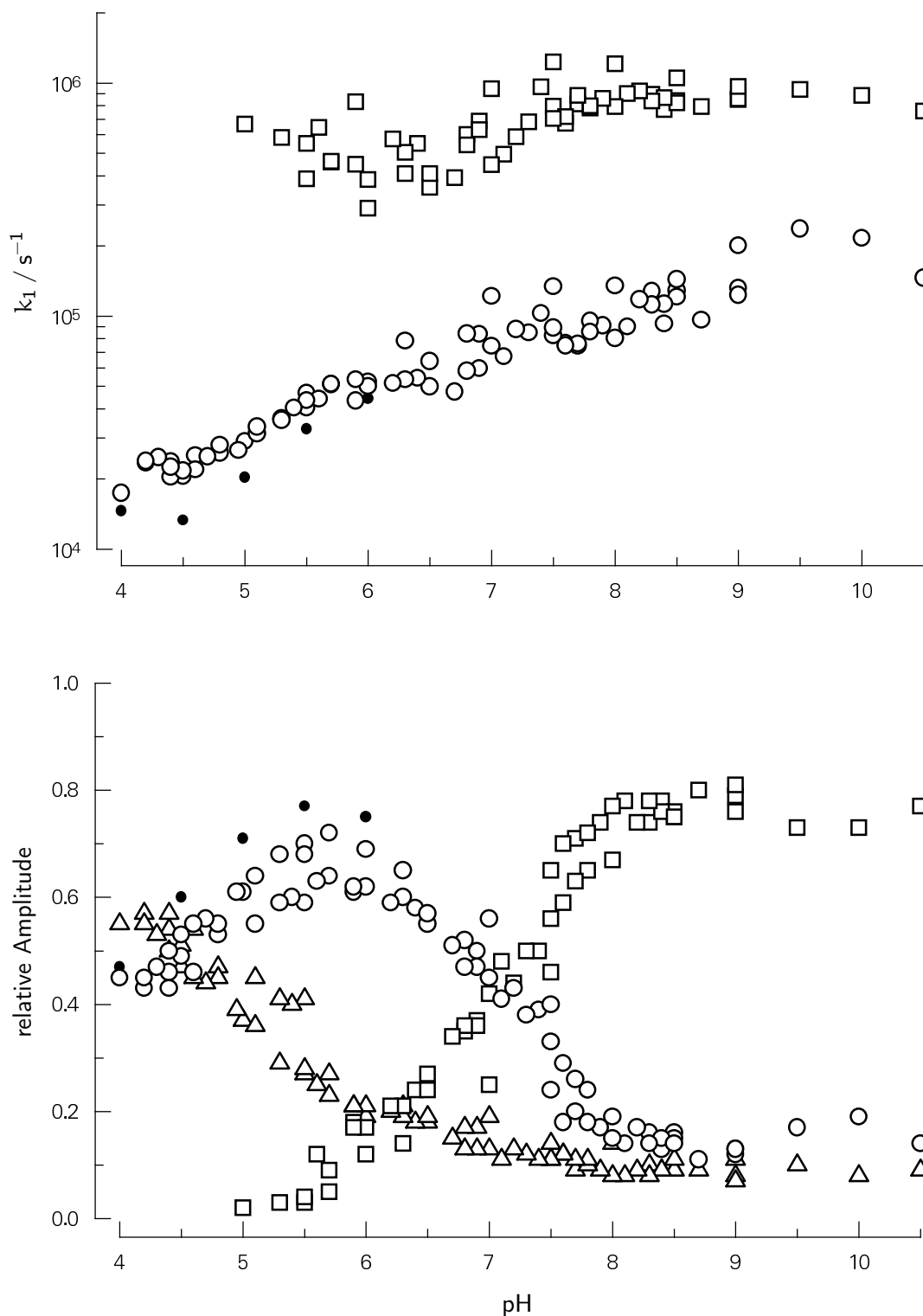


Abbildung 2.4: Zweixponentielle Beschreibung der schnellen P_{680}^+ -Reduktion: Oben Raten, unten relative Anteile; (\square) schnelle, (\circ) langsame Phase, (\triangle) verbleibender, noch langsamerer Anteil (hier als konstanter Untergrund bestimmt), (\bullet) korrigierte Werte der langsamen Phase bei Hinzunahme einer Kinetik mit $k \sim 1 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$; Bedingungen wie Abbildung 2.2.

Der Anteil der langsameren Rate k_1^S steigt entsprechend an von 10–15% im Alkalischen bis maximal 70% im Bereich pH 5–6. Diese Rate ist deutlich pH-abhängig, sie fällt von $1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ bei pH = 7.5 bis $1\text{--}2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ im Sauren. Die Restamplitude steigt von einem konstant niedrigen Wert (5–10%) für pH > 8 zum Sauren hin immer stärker an. Bei pH = 4 überwiegen also Kinetiken mit Raten kleiner als $1 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ mit einem Anteil von ungefähr 60–70%.

Um eine Abschätzung zu bekommen, wie groß der Fehler ist, der durch die Vernachlässigung des restlichen Anteils der Reduktionskinetik entsteht, werden im Sauren zusätzlich noch einige Messpunkte mit einem zweixponentiellen Ansatz (ohne Restamplitude) angepasst. Es wird der Zeitbereich $1 \mu\text{s} < t < 1 \text{ ms}$ betrachtet. Es resultiert eine mit der langsamen Phase vergleichbaren Kinetik und eine mit einer wesentlich kleineren Rate $k \approx 0.7\text{--}1.2 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$. Die letztgenannte gibt die Rekombinationsreaktion $P_{680}^+ Q_A^- \rightarrow P_{680} Q_A$ wieder. Durch diese Prozedur erhält man eine um einen Faktor ~ 1.3 verringerte Rate k_1^S mit einer um etwa 15% vergrößerten Amplitude, die Hauptmerkmale dieser Kinetik bleiben aber bestehen.

Eine zweixponentielle Anpassung der Daten bis zu einem Zeitpunkt $t = 30 \mu\text{s}$ ergibt klar getrennte Ratenkonstanten: k_1^A ist groß ($\sim 7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$) und als Funktion des pH nahezu konstant, k_1^S ist um mindestens eine Größenordnung kleiner und verändert sich mit der Protonenkonzentration des Mediums. Im Alkalischen überwiegt das Subensemble A mit der schnelleren Kinetik. Der Übergang zum Subensemble S erfolgt mit einem apparenten $pK_{Y_Z}^{app} = 7.3$. Einer Verlangsamung der Raten dieses Systems zum Sauren hin geht mit einer Verringerung der Amplituden zugunsten der noch langsameren Rekombinationsreaktion einher (siehe Abbildung 2.4 B).

2.4.1.4 Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeiten bei pH = 9.0, 6.3, 5.0 und 4.0 sind im Bereich von 278 K bis 303 K untersucht worden. Die Messdaten haben im Vergleich zu den oben gezeigten ein um den Faktor 2.5 verringertes Signal-Rausch-Verhältnis. Abbildung 2.5 zeigt die Ergebnisse für die ersten drei pH-Werte, wie sie mit der gleichen Auswertungsmethode wie im vorigen Abschnitt erhalten wurden. Es ist nur die Rate dargestellt, die bei dem jeweiligen pH den größten Anteil hat.

Im alkalischen Bereich ist die Aktivierungsenergie am geringsten, ungefähr 14 kJ mol^{-1} ($7\text{--}20 \text{ kJ mol}^{-1}$). Der relative Anteil der schnellen Rate verändert sich nicht. Für die drei größeren Temperaturwerte sind noch die Ergebnisse einer zweixponentiellen Anpassung von Daten bis $t < 5 \mu\text{s}$ wiedergegeben, die mit besserer Zeitauflösung gemessen worden sind. Es wird annäherungsweise der gleiche Mittelwert der Aktivierungsenergie wiedergegeben.

Im neutralen pH-Bereich (pH = 6.3) ist die langsamere Kinetik k_1^S vorherrschend, die zugehörige Aktivierungsenergie ist deutlich höher: circa 28 kJ mol^{-1} , der relative Anteil ist auch temperaturunabhängig. Die schnellere Rate hat einen maximalen Anteil von 20% und wird daher nicht genauer ausgewertet.

Bei pH = 5 erhält man einen ähnlich hohen Wert, dort sind es $24\text{--}27 \text{ kJ mol}^{-1}$. Diesen Wert erhält man mit der bisher angewandten Auswertungsmethode, die relative Amplitude der Vorwärtsreaktion fällt dann jedoch von 50–60% bei den hohen Temperaturen auf 20% bei 278 K. Diese Veränderung kann nicht durch die Temperaturabhängigkeit der Gleich-

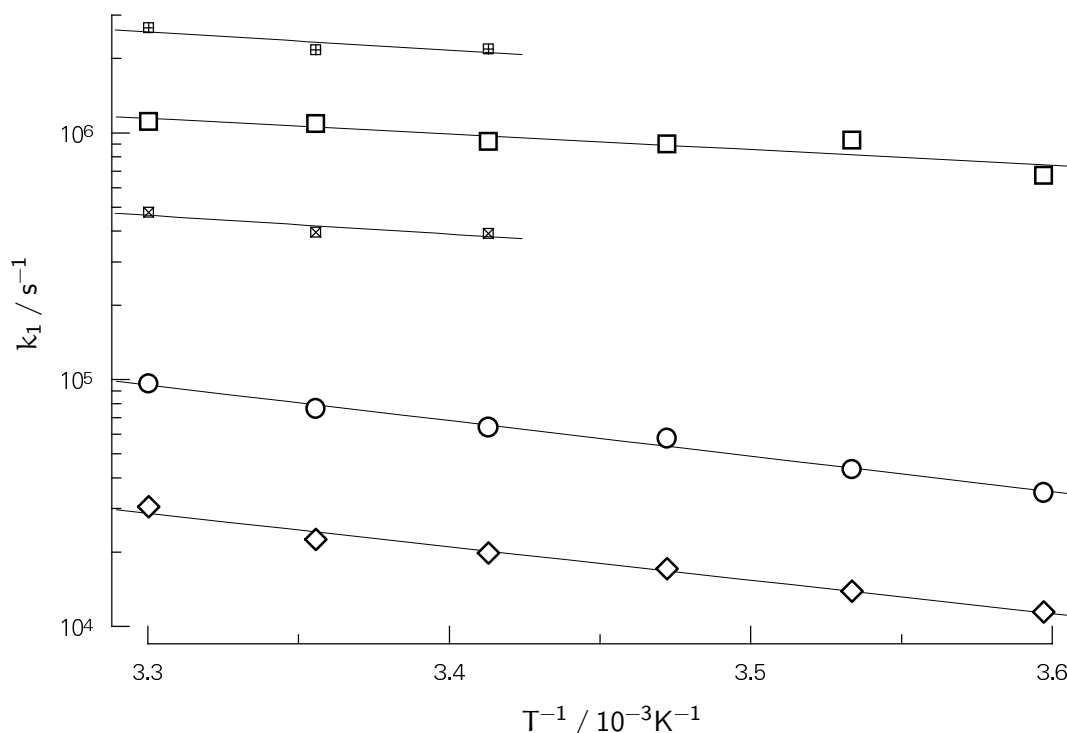


Abbildung 2.5: Arrhenius-Diagramm der *bestimmenden* Raten: (□) bzw. (⊠, ⊞) pH = 9.0 ((⊠, ⊞) sind Messungen mit höherer Zeitaufösung, $B_w = 100$ MHz und 20 ns/P., und einer zweiexponentiellen Anpassung der Reduktionskinetik bis 5 μs), (○) pH = 6.3, (◇) pH = 5.0, (—) lineare Anpassungen; Bedingungen wie Abbildung 2.2.

gewichtskonstanten K erklärt werden. Ein etwas größerer Wert der Aktivierungsenergie von 30–33 kJ mol^{-1} ergibt sich, wenn in der numerischen Anpassung der Daten zusätzlich die Rekombination explizit berücksichtigt wird mit einer Rate von ca. 1000 s^{-1} (s. Abschnitt 2.4.1.3 und 2.4.1.6). Die Amplitude der Vorwärtsreaktion verkleinert sich nur noch von 50% auf 35%.

Im äußerst sauren Bereich (pH = 4) fällt der relative Anteil der Raten mit $k \sim 10^4 \text{ s}^{-1}$ von 30% bei der höchsten Temperatur auf einen vernachlässigbaren Anteil von 5%. Eine genaue Trennung von Vorwärtsreaktion und Rekombination ist allerdings nicht mehr möglich.

In (Reinman & Mathis, 1981) wird für Tris-behandelte Chloroplasten eine Aktivierungsenergie von 48 kJ mol^{-1} angegeben. Diese Messungen erfolgten bei pH = 7.5, in diesem Bereich verändert sich der Verlauf der Reduktion allerdings stark.

Die Aktivierungsenergie des Elektronentransfers im alkalischen pH-Bereich (System A) ist nur etwa halb so groß wie die im Sauren (S), bei dem der Elektronentransfer protonisch gekoppelt ist.

2.4.1.5 H/D-Isotopeneffekt

In Abbildung 2.6 ist die zweiexponentielle Analyse einer Messreihe mit schwerem Wasser (D_2O) als Lösungsmittel dargestellt. Die wesentlichen Merkmale sind die gleichen wie in Abschnitt 2.4.1.3.

Die den alkalischen Bereich beherrschende schnelle Kinetik weist eine nahezu konstante Rate auf, die sich praktisch nicht von der in H_2O unterscheidet. Der relative Anteil fällt von 70% auf nahezu Null bei $pD = 6$ und lässt sich mit einer Titrationskurve beschreiben, die einen pK von ~ 7.8 hat. Die pK -Verschiebung entspricht mit 0.5 Einheiten dem zu erwartenden Betrag; denn für „normale“ Säuren wird nach Schowen & Schowen (1982) ein Isotopeneffekt des protolytischen Gleichgewichts von $\Delta pK = 0.45\text{--}0.52$ erwartet.

Die langsamere Rate ist signifikant pD -abhängig, sie ist im Vergleich zu der in H_2O (Abbildung 2.4) um einen Faktor 2 langsamer, insbesondere im Bereich pD 5–7. Die maximale relative Amplitude beträgt 60–70%.

Der verbleibende Anteil steigt von nahezu konstanten 10–15% im Alkalischen für $pD < 7$ steil an. Unter $pD = 5.5$ kommen Raten mit etwa $1 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ nur zu maximal 20% vor. Die Amplituden und Raten hängen hier von der Grenze für die numerische Anpassung ab. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse für die Auswertung der Daten bis $t = 30 \mu\text{s}$ (wie in Abschnitt 2.4.1.3). Bei Betrachtung der Daten bis $t = 60 \mu\text{s}$ erhält man verlangsamte Raten mit einem maximalen Anteil von 35% im Säuren.

Übereinstimmend mit diesen Abweichungen durch leichte Veränderungen der Auswertung ist das Ergebnis der Datenanpassung, wenn direkt eine apparente Rate der Rekombination miteinbezogen wird (wie oben in Abschnitt 2.4.1.3). Insbesondere ist die Reduktion des relativen Anteils der langsamen Rate längst nicht so drastisch. Ein Vergleich zwischen den hier erhaltenen Werten für die pH -abhängige Vorwärtsreaktion mit den Ergebnissen in leichtem Wasser ergibt eine Verlangsamung der Raten um einen Faktor ~ 3 .

Eine Beschränkung auf einen kurzen Zeitabschnitt nach dem Zeitpunkt der Anregung führt hier zu größeren Ungenauigkeiten im Vergleich zu den Versuchen mit H_2O . Dies ist auf die stark verlangsamte Vorwärtsreaktion für $pH \lesssim 5.5$ zurückzuführen.

In schwerem Wasser ist für die Untermenge S die apparente Rate der Vorwärtsreaktion um einen Faktor 2–3 verringert, während im Alkalischen der H/D-Isotopenaustausch keinen Effekt auf die Rate der Untermenge A bewirkt.

2.4.1.6 Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K und der intrinsischen Rate f der Vorwärtsreaktion bei Annahme einer langsamen Rekombinationsrate

In Metz et al. (1989) ist eine PS II-Mutante von *Synechocystis* beschrieben, in der durch ortsspezifische Mutagenese Y_Z mit Phenylalanin substituiert wurde. Die dort gemessene Rate der Rekombination von 1400 s^{-1} entspricht dann der intrinsischen Rate r (siehe das in 2.2.1 vorgestellte kinetische Modell). Es wird angenommen, dass dieser Wert relativ unabhängig von der Protonenkonzentration des Mediums ist. Davon ausgehend werden Daten, die in den Abbildung 2.4 und 2.6 dargestellt sind und die aus einer Messreihe und von einer Präparation stammen, zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K und der Reduktionsrate f von P_{680}^+ durch Y_Z herangezogen.

Es soll hier nicht explizit eine intrinsische Rekombinationsrate verwendet werden. Erstens wird eine „effektive“ Rate vorliegen, verursacht durch Elektronenakzeptoren für Q_A^- oder andere Reduktionswege für P_{680}^+ . Zweitens könnte bei der besagten PS II-Mutante zusätzlich eine – wenn auch geringfügige – strukturelle Modifizierung der Akzeptorseite existieren. Die Anpassung der Daten unter Einbeziehung einer Rate, die im Bereich $700\text{--}1200 \text{ s}^{-1}$

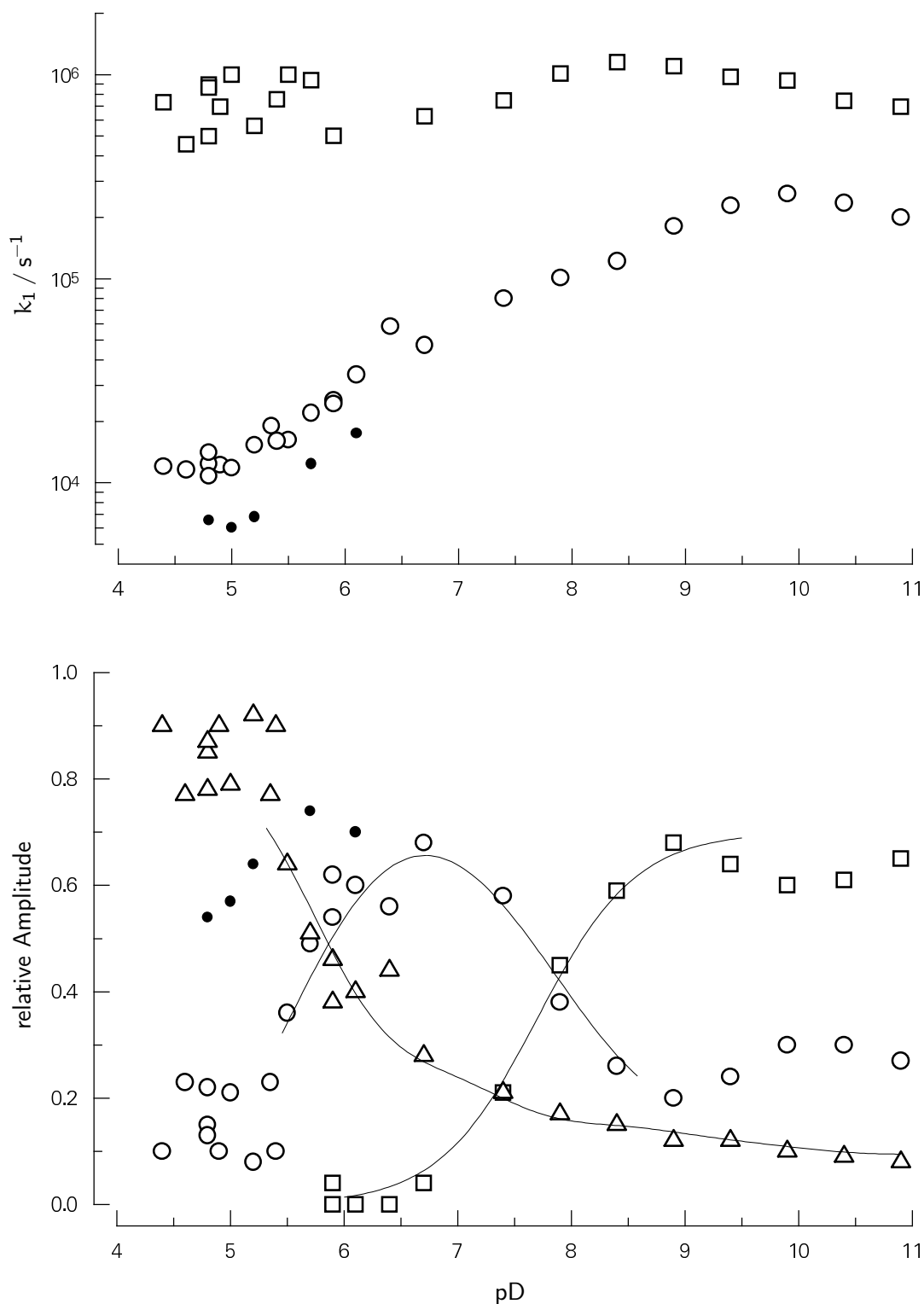


Abbildung 2.6: Zweiexponentielle Beschreibung der schnellen P_{680}^+ -Reduktion in D_2O : Oben Raten, unten relative Anteile; (\square) schnelle, (\circ) langsame Phase, (\triangle) verbleibender Anteil, (\bullet) langsame Phase bei Hinzunahme einer Kinetik mit $k \sim 1 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$, (—) graphische Hilfe zur besseren Übersicht; Bedingungen wie Abbildung 2.2 (s.a. Abschnitt 2.3.1.4).

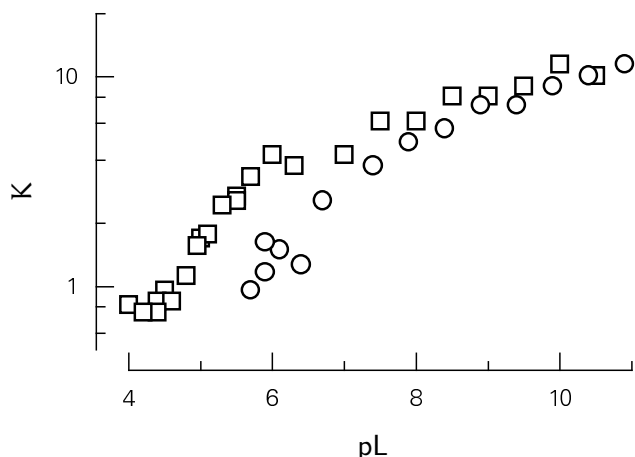


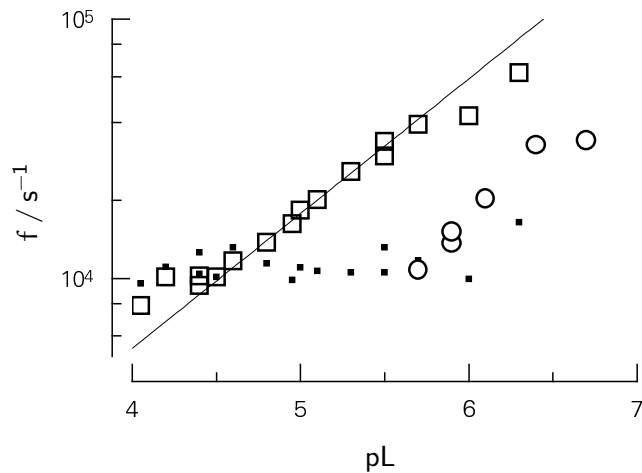
Abbildung 2.7: Das Redox-Gleichgewicht $P_{680}^+ Y_Z \xrightleftharpoons{K} P_{680} Y_Z^{\text{ox}}$. Die Gleichgewichtskonstante K , bestimmt aus der Restamplitude a_0 mit Messdaten in H_2O , Abbildung 2.4 (□) und D_2O , Abbildung 2.6 (○).

liegt, wie in Abschnitt 2.4.1.3 beschrieben, spricht dafür, dass die „effektive“ Rate der Rekombination im Rahmen der Näherung (2.6) im Sauren maximal 2500 s^{-1} ist. Wie Messergebnisse im UV (Detektion von Q_A^- bei 320 nm) und bei 825 nm bei voroxidiertem Y_Z zeigen (eigene Daten nicht gezeigt, diese decken sich aber mit denen von (Gerken et al., 1989; Christen et al., 1997)), wird eine mehrphasige Rekombinationskinetik beobachtet. In (Christen et al., 1997) sind pH-abhängige Messungen beschrieben, bei denen die Reduktion von P_{680}^+ durch Y_Z nach UV-Bestrahlung der Präparate nicht mehr erfolgte; das Ergebnis ist, dass der Anteil der schnellsten Rekombinationskinetik von 10% bei pH = 4 ($250 \mu\text{s}$) und pH = 5 ($150 \mu\text{s}$) zum Alkalischen hin ansteigt (bei pH = 7 beträgt sie 30–40%), die vorherrschende Komponente hat eine Halbwertszeit von 0.7–1.1 ms. Aufgrund dieser Mehrphasigkeit muss man die hier betrachtete Rate r als einen „Mittelwert“ für diese Rekombinationskinetiken ansehen. Je höher diese Rate im Vergleich zu den Raten der Gleichgewichtseinstellung zwischen Y_Z und P_{680} ist, um so stärker wird der Anteil und die Rate der apparenten Vorwärtsreaktion überschätzt, also auch die Gleichgewichtskonstante K und die intrinsische Rate f .

Die in der bisherigen Auswertung erhaltene Restamplitude a_0 wird als der „stationäre“ Anteil von P_{680}^+ interpretiert. Nach Gleichungen (2.4) und (2.6) ergibt sich dann die Gleichgewichtskonstante aus $K \approx a_0^{-1} - 1$. Abbildung 2.7 zeigt das Ergebnis dieser Auswertung. Im Titrationsbereich $pL = pK_{Y_Z}^{\text{app}}$ (also für pH ~ 7.3 bzw. pD ~ 7.8) ist a_0 allerdings zwei Systemen zuzurechnen. Die Titrationskurve soll hier der Einfachheit halber nicht explizit verwendet werden, so dass es bei der Bestimmung von K (und f) in dem Bereich, der circa eine pH-Einheit um den pK liegt, zu Ungenauigkeiten kommen kann. Weiterhin sind große Ungenauigkeiten genau dort zu erwarten, wo die Kinetik der Vorwärtsreaktion durch kleine Veränderungen der Datenanalyse stark schwankt. Denn dies weist auf das Verlassen des Gültigkeitsbereiches der in Abschnitt 2.2.1 gemachten Näherungen hin. Daher werden die Ergebnisse aus Messungen mit schwerem Wasser als Lösungsmittel nur für pD > 5.5 berücksichtigt.

Für pH ≈ 4.5 –5.0 ist $K \approx 1$. Wenn für das Mittenpotential von P_{680}^+/P_{680} ein konstanter Wert von 1.1 V angesetzt wird, errechnet sich für Tyrosin Z in Mn-verarmten Präparaten ein Wert von 1.0 V bei pH 6.5, in Übereinstimmung mit einer Abschätzung von Metz et al. (1989).

Abbildung 2.8: Die Reduktionsrate von P_{680}^+ durch Y_Z : aus Messungen in H_2O (\square) und D_2O (\circ) unter Verwendung von k_1^s und K (Abbildung 2.7); (\blacksquare) die Rate der Rückreaktion (b); (—) lineare Anpassung.



Im Alkalischen ist die so ermittelte Gleichgewichtskonstante nur als eine Abgrenzung zum anderen System (S) zu verstehen. Erstens existieren mehrere schnelle Kinetiken, die in dem einfachen kinetischen Modell nicht berücksichtigt werden. Eine Erklärung für die mehrexponentielle Reduktion von P_{680}^+ durch Y_Z , wie sie auch in Sauerstoff-entwickelnden Präparaten beobachtet wird, ist die Beeinflussung des Elektronentransfers durch Proteinrelaxationen (Cherepanov et al., 1998, 2001). Zweitens wird bei großen Gleichgewichtskonstanten der Beitrag weiterer vorliegender Systeme wichtig, z.B. durch Reaktionszentren, bei denen infolge der Präparation Y_Z nicht mehr am Elektronentransfer teilhaben kann. Der Anteil der Zentren, bei denen Q_A^- mit P_{680}^+ rekombiniert, wurde durch Messungen bei 320 nm bestimmt (Daten nicht gezeigt). Im Alkalischen liegt dieser Anteil bei $\leq 10\%$, so dass das globale Gleichgewicht (unter Einbezug von Proteinrelaxationen) zwischen P_{680} und Tyrosin Z hier mit $K > 10$ abgeschätzt werden kann.

Die Bestimmung des Gleichgewichtes ist aufgrund der erörterten Unsicherheiten im alkalischen pH-Bereich und der Störung durch die Rekombinationsreaktion im sehr sauren Bereich nur in einem kleinen Bereich um pH 5 zuverlässig. Dort ist die Steigung von $\log K$ am größten, liegt aber etwas unterhalb von 1 pro pH-Einheit (0.5–0.8).

Aus der apparenten Rate der Vorwärtsreaktion k_1 kann man weitergehend die intrinsische Rate der Vorwärtsreaktion bestimmen: $f \approx k_1 K (K + 1)^{-1}$. Daraus wird die Rate der Rückreaktion berechnet: $b = K^{-1} f$. Diese Rate ist hier nahezu konstant, ihr Wert liegt bei $9\text{--}13 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$. Eine Erklärungsmöglichkeit für eine scheinbar konstante Rate wäre ein kurzlebiger Zwischenzustand zwischen A und B (Notation aus 2.2.1), der in der Vorwärtsreaktion nicht beobachtet wird, aber limitierend für die Rückreaktion ist.

Die eingezeichnete Gerade in Abbildung 2.8 gibt die logarithmische Abhängigkeit der Vorwärtsreaktion f^s vom pH an. Dabei wird der ganz saure Bereich wegen der kleinen Rate der Vorwärtsreaktion sowie der Bereich in der Nähe des Titrationsüberganges vernachlässigt. In leichtem Wasser resultiert etwa $\log(f) \propto 0.5 \text{ pH}$. Die Schwankung der Proportionalitätskonstanten liegt bei ± 0.1 . Die intrinsischen Raten der Vorwärtsreaktion zeigen einen H/D-Isotopeneffekt von 3–3.5. Der Anstieg der internen Rate um eine Größenordnung bei Anstieg des pH's um etwa zwei Einheiten könnte mit einem dem Elektronentransfer vorgelagertem Säure-Base-Gleichgewicht erklärt werden, dass durch kooperative Effekte beein-

flusst wird. Geht man von einem gemeinsamen Übergangszustand durch einen gleichzeitigen Elektron-Proton-Transfer aus, so erwartet man in erster Näherung bei geringer Triebkraft (im Gültigkeitsbereich einer *linear free energy relationship*, LFER) eine Ratenveränderung mit $\exp(\Delta G^\circ/2)$. Dies wird in der Diskussion weiter ausgeführt.

Im Alkalischen liegt das Gleichgewicht weit auf der Seite von Y_Z^{ox} , die intrinsische stimmt mit der gemessenen Rate – soweit sie messtechnisch aufgelöst wurde – überein.

Im Gegensatz zum alkalischen pH-Bereich verändert sich das Gleichgewicht zwischen P_{680} und Y_Z und die intrinsische Rate der Vorwärtsreaktion im Säuren deutlich mit der Protonenkonzentration des Mediums. Die Gleichgewichtskonstante ist etwa 1 bei $\text{pH} = 4.5$. f^{s} nimmt etwa um eine Größenordnung zu bei Vergrößerung des pH's um zwei Einheiten.

2.4.2 Die Protonenfreisetzung in das Medium

Die Protonenfreisetzung, die durch Oxidation von P_{680}^+ oder Y_Z^{ox} hervorgerufen wird, wurde in Abhängigkeit vom pL durch hydrophile Indikatoren gemessen. Die Ergebnisse resultieren aus der Differenzbildung von Messungen ohne Puffer und bei Anwesenheit eines Puffers in hoher Konzentration (10 mM). Dadurch werden zusätzliche Absorptionsänderungen bei der Beobachtungswellenlänge eliminiert. In der Auswertung ist die Protonenaufnahme auf der Akzeptorseite berücksichtigt (Raten $\sim 100 \text{ s}^{-1}$, (Bögershausen & Junge, 1995)). Die numerische Anpassung der Daten erfolgt mit Funktionen der Form $-\Delta I/I_0 = (-\Delta I/I_0)_{\text{max}}[a_1(1 - \exp(-k_1 t)) + a_2(1 - \exp(-k_2 t))]$ mit $a_1 + a_2 = 1$.

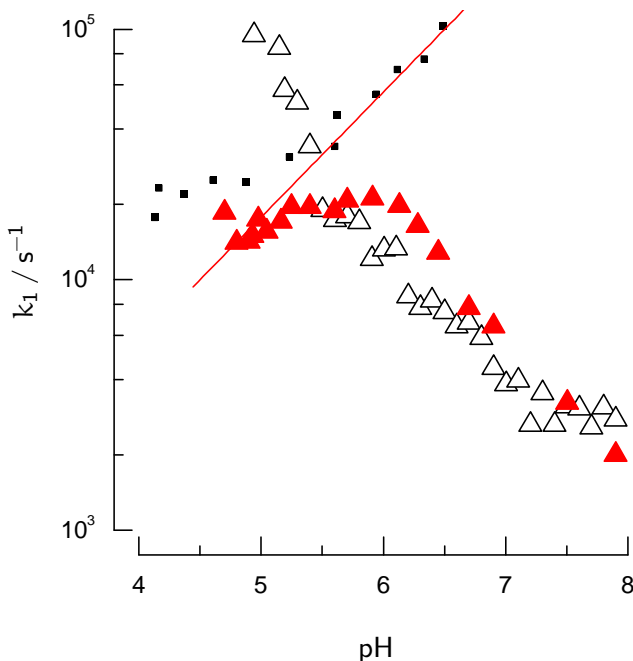


Abbildung 2.9: Die Rate der Protonenfreisetzung in das Medium: Mn-Zentrum inaktiviert (▲) bzw. aktiv (△, aus Bögershausen & Junge (1995)), (■) apparente Raten der Y_Z -Oxidation aus Abbildung 2.4, (—) Verlauf der intrinsischen Rate f aus Abbildung 2.8; [Ind] = 30 μM (s. Tabelle A.3), [Chl] = 4 μM , 0.2 mM Ferricyanid, 0.2 mM DCBQ, 100 kHz, 10 k Ω .

2.4.2.1 Raten der Protonenabgabe

Der relative Anteil der langsameren Rate ($\sim 0.5\text{--}3 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$) beträgt maximal 25%. Betrachtet wird hier nur der überwiegende Anteil. Die Auftragung der zugehörigen Raten zeigt Abbildung 2.9.

Man findet einen logarithmischen Anstieg der Raten von $\text{pH} = 8$ bis 6. Dies folgt aus der Gleichung (2.10), wenn gleichmäßig im gesamten pH -Bereich periphere Aminosäuren elektrostatisch induziert ihr Proton abgeben können. Dann gilt $k_- \approx k_+ \text{pH}$ (Gutman & Nachliel, 1995). Dieses Ergebnis stimmt mit dem an O_2 -entwickelnden Proben ermittelten Daten überein (Bögershausen & Junge, 1995).

Für $\text{pH} < 6$ knickt der Verlauf der Raten ab, die maximale Rate liegt bei $2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$. Weiter in den sauren Bereich hinein nimmt die Rate der Protonenfreisetzung dann tendenziell wieder ab. Zum Vergleich ist die gemessene und berechnete Rate der P_{680}^+ -Reduktion durch Y_Z zusätzlich dargestellt.

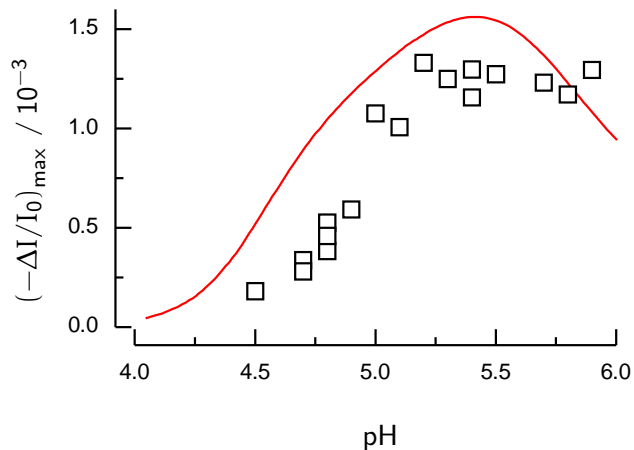
Es wird keine pH-Änderung detektiert, die schneller als die Oxidation von Y_Z erfolgt. Im Säuren findet man einen parallel verlaufenden Protonen- und Elektronentransfer.

Für den stark sauren pH -Bereich, in dem die Rekombinationsreaktion überwiegt, erwartet man eine durch P_{680}^+ elektrostatisch induzierte Protonenabgabe. Diese ist im Ratenverlauf aber nicht sichtbar. Siehe dazu auch den nächsten Unterabschnitt und 2.5.2 in der Diskussion.

2.4.2.2 Amplituden der Protonenabgabe

Abbildung 2.10 zeigt die mit Methylrot bei 560 nm gemessenen maximalen Absorptionsänderungen für $\text{pH} < 6$. Aufgetragen sind die aus der numerischen Anpassung stammenden maximalen relativen Intensitätsänderungen $(-\Delta I/I_0)_{\text{max}}$ sowie die nach der Gleichung (2.13) zu erwartende Amplitude bei Abgabe ungefähr eines Protons pro Reaktionszentrum.

Abbildung 2.10: Die Gesamtamplitude der Protonenfreisetzung in das Medium im sauren pH -Bereich: (\square), (—) die theoretisch zu erwartende Amplitude bei Freisetzung eines Protons pro Reaktionszentrum (unabhängig vom pH); $\Delta H_{\text{RC}} \varepsilon_{\text{H}}(560 \text{ nm}) N_{\text{RC}}^{-1} = 330 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $[\text{MR}] = 30 \text{ } \mu\text{M}$, $\text{pK}_{\text{MR}} = 5.2$, $[\text{Chl}] = 4 \text{ } \mu\text{M}$, $l = 1 \text{ cm}$, weitere Bedingungen wie in Abbildung 2.9.



Zur Berechnung sind die in der Bildunterschrift genannten Daten benutzt worden. Der Faktor $\Delta H_{\text{RC}} \varepsilon_{\text{H}}(560 \text{ nm}) N_{\text{RC}}^{-1} = 330 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ setzt sich zusammen aus $\Delta H_{\text{RC}} = 1.0$, $\varepsilon_{\text{H}} = 2.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (siehe Tabelle A.3) und dem Chl/PS -Verhältnis, $N_{\text{RC}} = 75$ (dieser Wert ist für die verwendeten Kernkomplex-Präparate aus Erbse als optimal anzusehen, siehe Bögershausen (1997)).

Die einzusetzende Pufferkapazität der Probe $\beta_{\text{-ind}}^{\text{tot}}$ stammt aus der Anpassung der in der Abbildung 2.11 gezeigten Messdaten (aus (Bögershausen, 1993)) mittels eines Polynoms genügend hohen Grades. Für $\text{pH} < 5.5$ entspricht die gemessene Absorptionsänderung nicht mehr der Abgabe eines „ganzen“ Protons. Selbst für $\text{pK}_{\text{ind}} = 5.3$, $N_{\text{RC}} = 100$ und mit der Pufferkapazität des Wassers $\beta_{\text{H}_2\text{O}} \approx 2.3 [\text{H}^+]$ als $\beta_{\text{-ind}}^{\text{tot}}$, die bei $\text{pH} 4.2\text{--}4.8$ einen etwas größeren Wert haben sollte als die gemessene, liegen die Messpunkte im sauren pH-Bereich deutlich unter der theoretisch zu erwartenden Absorptionsänderung bei Detektion eines Protons pro Reaktionszentrum. Nur im Bereich um $\text{pH} = 6$ ist – übereinstimmend mit Messungen unter Verwendung des Indikators Bromkresolpurpur – die Signalamplitude unter Verwendung des oben genannten Wertes $N_{\text{RC}} = 75$ und den entsprechenden Extinktionswerten (MR und BKP, siehe Tabelle A.3) konsistent mit der Abgabe etwa eines Protons pro Anregungsblitz und Reaktionszentrum.

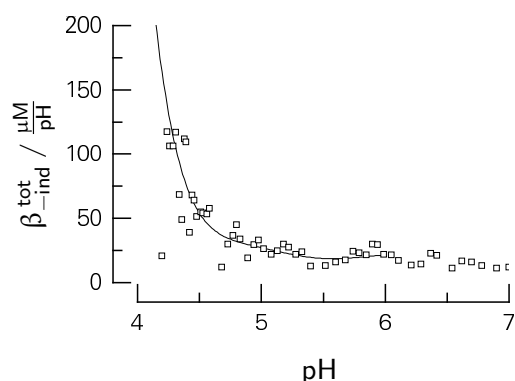


Abbildung 2.11: Die aus einer Titration gewonnene totale Pufferkapazität einer PS II-Kernkomplexlösung (aus Bögershausen (1993)): (\square), (—) Anpassung der Datenpunkte durch ein Polynom 6. Grades.

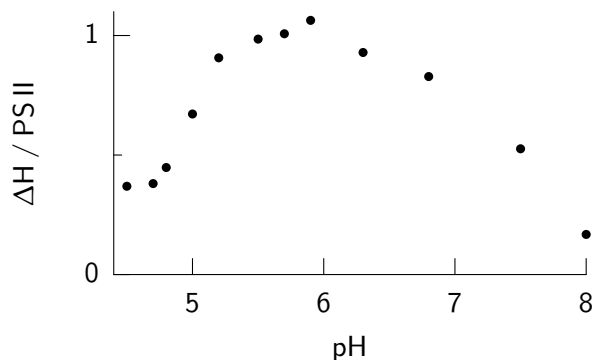


Abbildung 2.12: Blitzinduzierte Protonenabgabe in das Medium pro (funktionellem) PS II-Reaktionszentrum, Berechnung nach Gleichung (2.13) mit gemittelten $-\Delta I/I_0$ -Werten unter Annahme von $N_{\text{RC}} = 75$, Parameter für die eingesetzten Puffer gemäß Tabelle A.3.

Die Abbildung 2.12 zeigt die anhand der Anfangsamplituden der Absorptionsänderungen errechnete Protonenabgabe bezogen auf 1 PS II-Reaktionszentrum für den gesamten untersuchten pH-Bereich (bei gleichem pH-Wert wurde über die vorhandenen Datensätze gemittelt). Für den Bereich $\text{pH} \sim 6.0$ wird demnach etwa 1 Proton pro Reaktionszentrum abgegeben. Die Intaktheit der Präparate für den pH-Bereich 4.5–8 ist dabei durch Messungen bei 825 nm sowie bei 320 nm (Q_A^-) sichergestellt. Für $\text{pH} < 4.5$ war eine Absorptionsänderung des Indikators nicht mehr detektierbar.

Die Protonenabgabe pro Reaktionszentrum liegt für $\text{pH} \sim 6$ bei etwa Eins. Zum sauren und alkalischen Bereich hin nimmt der Anteil der Zentren, die ein Proton abgeben, ab mit Pseudo- pK -Werten von ca. 5 bzw. 7.5. Die für verschiedene pH-Bereiche vorherrschenden Elektronentransfers, Rekombination sowie langsame und schnelle Tyrosin-

Oxidation, finden hier ihre Entsprechung.

In Zusammenhang mit dem Ergebnis des vorherigen Abschnittes kann man folgern: *Die Protonenabgabe im Säuren wird überwiegend durch Y_Z^{ox} induziert.* Denn in Reaktionszentren mit inaktiviertem Mn-Komplex ist für diese pH-Werte eine durch P_{680}^+ induzierte Protonenabgabe von durch Y_Z^{ox} induzierte Ereignisse diskriminierbar.

2.4.2.3 Messungen in schwerem Wasser

Die Ergebnisse von Messungen in D_2O werden in Tabelle 2.1 tabellarisch zusammengefasst.

Die angegebenen Raten sind wieder der schnelle Anteil der Protonenfreisetzung. Die Isotopeneffekte k_H/k_D ergeben sich zusammen mit den entsprechenden Raten aus Abbildung 2.9. Es ist deutlich zu erkennen, dass im alkalischen Bereich die Raten durch Deuteriumersetzung kaum beeinflusst werden, während im Säuren ein signifikanter Unterschied auftritt.

Tabelle 2.1:

Isotopeneffekt der Protonenfreisetzungsrates; Indikatoren KR und BKP mit Konzentrationen bis zu 360 μM , $[Chl] = 5 \mu M$, 0.1 mM Ferricyanid, 10 kHz – 1 MHz, 1 oder 10 k Ω .

pD	$k_D / 10^3 \text{ s}^{-1}$	k_H/k_D
8.4	1.2	1–1.5
7.5	2.5	1–2
6.3	5.5	3
5.4	3–4	3–5

2.4.3 Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Reduktion von P_{680}^+

Der Einfluss von Mn^{2+} und anderen zweiwertigen Kationen auf die Reduktionskinetik von P_{680}^+ bei inaktiviertem PS II (BBY-Membranfragmente) ist in (Magnuson & Andreasson, 1997; Hoganson et al., 1991) im neutralen pH-Bereich untersucht worden und wurde interpretiert mit einem elektrostatischen Effekt auf den Elektronentransfer. Hier werden Ergebnisse vorgestellt, die mit der oben beschriebenen Kernkomplex-Präparation bei höherer Zeitauflösung erzielt wurden. Es wird die im Abschnitt 2.4.1 vorgestellte Analyseverfahren angewandt.

2.4.3.1 Mn^{2+} und Fe^{2+}

Um den Einfluss von Mangan- und Eisenkationen zu untersuchen, sind Versuche bei pH = 6.2 und 7.4 durchgeführt worden. Abbildung 2.13 zeigt die Veränderung der bei 825 nm detektierten Absorptionsänderungen durch Zugabe von Mn^{2+} . Der untere Teil (B) lässt erkennen, dass im Rahmen der Messgenauigkeit ein Effekt nur auf die langsame Rate zu erkennen ist, sie wird von 9 auf 17 μs verlangsamt. Bei pH = 6.2 wird die Verlangsamung deutlicher, Messungen bei unterschiedlichen Konzentrationen von $MnCl_2$ ergeben ungefähr eine Dissoziationskonstante $K_d \gtrsim 10 \mu M$ (Teil A von Abbildung 2.13, Ergebnis mit 500 μM $MnCl_2$ nicht gezeigt, da praktisch identisch mit dem bei 50 μM). Die Amplitudenanteile

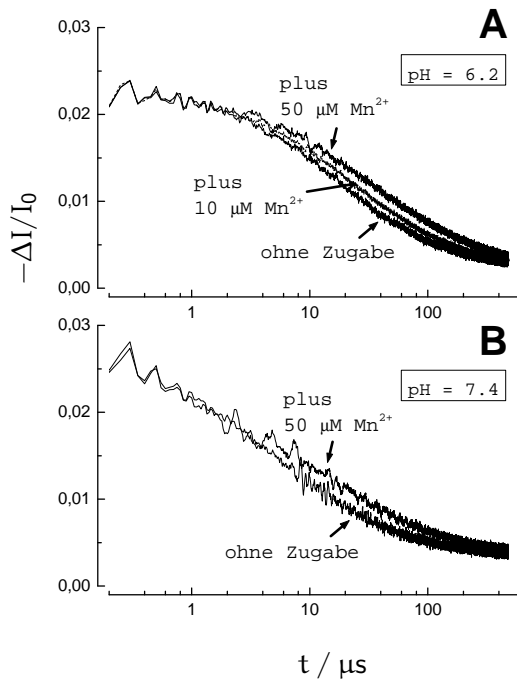


Abbildung 2.13: Laserblitzinduzierte Absorptionsänderungen bei 825 nm – Einfluss von Mn^{2+} auf die P_{680}^+ -Reduktionskinetik.

(A) pH = 6.2 (MES-Puffer), Kontrollmessung ohne $MnCl_2$ -Zugabe sowie mit 10 bzw. mit 50 μM $MnCl_2$.

(B) pH = 7.4 (HEPES-Puffer), Kontrollmessung ohne $MnCl_2$ -Zugabe, sowie mit 50 μM $MnCl_2$.

Probenansatz: 50 μM Chl, Messpuffer B (Tabelle A.2) mit 30% (v/v) Glycerin, 0.5 mM DCBQ; $B\nu = 100$ MHz, 50 ns/Punkt, 30# (weiteres s. Abschnitt 2.3).

des langsamen und schnellen Kinetikanteils sind nicht verändert, dies wurde bei weiteren pH-Werten überprüft (Daten nicht gezeigt). Somit ist pK_{YZ}^{app} unbeeinflusst.

Weitere Messungen mit unterschiedlichen divalenten Kationen ergaben eine Wirkungsreihe, wie sie vergleichbar auch in den oben genannten Referenzen gefunden wurde: $Co^{2+}/Zn^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+}$. Da aber – abgesehen von Mangan – nur Fe^{2+} an die so genannte *high-affinity* Bindungsstelle koppelt (Semin et al., 1995), wird im Folgenden die Reversibilität

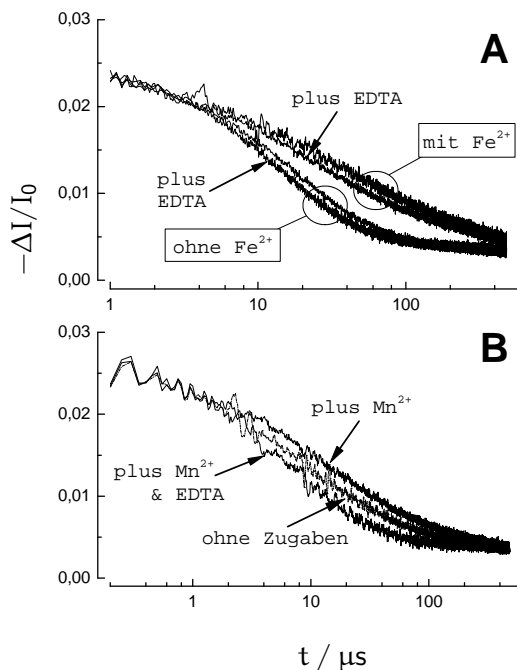


Abbildung 2.14: Untersuchungen zur Irreversibilität von Kationen-Effekten auf die P_{680}^+ -Reduktion durch Zugabe von EDTA.

(A) Zugabe von 10 μM $FeSO_4$ und/oder 20 μM EDTA, pH = 6.2.

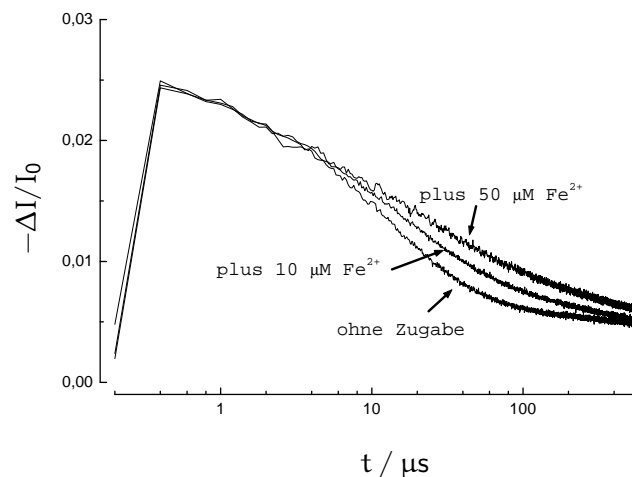
(B) Zugabe von 50 μM $MnCl_2$ und 100 μM EDTA, pH = 7.4.

Probenansätze sonst wie in Abbildung 2.13, in (A) aber ohne Glycerin.

der Effekte von Fe^{2+} bzw. Mn^{2+} auf die langsame Kinetik untersucht durch Zugabe von EDTA, einem Chelator für zweiwertige Metallionen. Teil A von Abbildung 2.14 zeigt anhand der Kontrollmessung (ohne Fe^{2+}), dass durch 20 μM EDTA der langsame Anteil der P_{680}^+ -Reduktionskinetik sehr geringfügig beschleunigt wird. Dies kann durch das Binden geringer Konzentrationen von zweiwertigen Kationen in der Kontrolllösung erklärt werden. Bei Anwesenheit von 10 μM Fe^{2+} findet man einen gleich großen EDTA-Effekt, d.h. EDTA vermag nicht die Eisenionen zu binden, die den hier spektroskopisch wahrnehmbaren Effekt ausmachen.

Abbildung 2.15: Konzentrationsabhängigkeit des Fe^{2+} -Effekts auf die Reduktion von P_{680}^+ .

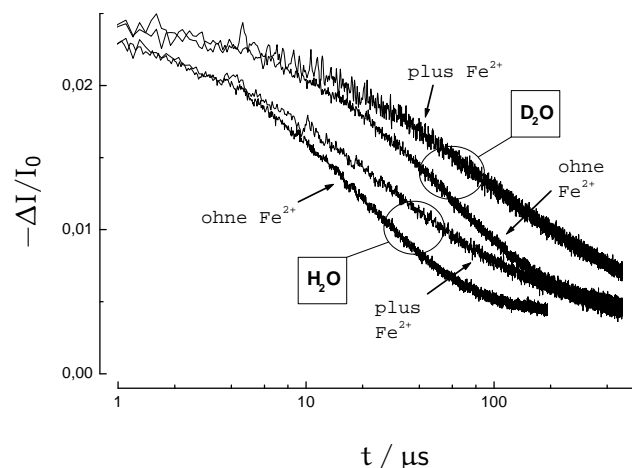
Kontrollmessung ohne FeSO_4 -Zugabe sowie mit 10 bzw. 50 μM FeSO_4 , pH = 6.2. Probenansätze wie in Abbildung 2.13, aber ohne Glycerin, pH = 6.2; Bw = 200 MHz, 200 ns/Punkt.



Bei Mn^{2+} hingegen (Teilbild B von 2.14, 50 μM MnCl_2) bewirkt der Zusatz von EDTA eine Beschleunigung der Reduktionskinetik wie in einer Kontrollmessung ohne Zusatz von Kationen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fe^{2+} im Gegensatz zu Mn^{2+} irreversibel an der Donatorseite von PS II gebunden ist, was mit einer höheren Quantenausbeute der Oxidation von Fe^{2+} im Vergleich zu Mn^{2+} gedeutet werden kann.

Abbildung 2.16: H/D-Isotopen- und Fe^{2+} -Effekt auf die P_{680}^+ -Reduktion. pH = 6.2, weitere Bedingungen wie in 2.15.



Auch für Fe^{2+} ist die Konzentrationsabhängigkeit untersucht worden (Abbildung 2.15, Messkurven bei Zugabe von 50 bzw. 500 μM FeSO_4 nahezu identisch, daher ist letztere

nicht dargestellt). Es wird bei $\text{pH} = 6.2$ durch Zugabe von $50 \mu\text{M Fe}^{2+}$ eine Verlangsamung nur von k_1^S auf etwa die doppelte Halbwertszeit, $27 \mu\text{s}$, gefunden. Bei etwa $10 \mu\text{M Fe}^{2+}$ ist die Konzentration mit dem halbmaximalen Effekt erreicht (K_d).

Abbildung 2.16 zeigt den Einfluss von Fe^{2+} auf die P_{680}^+ -Reduktion von Kernkomplexen, die in H_2O bzw. D_2O gelöst waren. Unabhängig vom Vorliegen der Kationen wird, konsistent mit den obigen Ergebnissen, durch den Austausch von H^+ mit D^+ eine Verlangsamung der Rate um einen Faktor $\gtrsim 2$ gefunden, gleichzeitig verschwindet bei diesem pL die Restamplitude der schnellen Phase. Ebenso wird die langsame Rate der P_{680}^+ -Reduktionsrate durch $50 \mu\text{M FeSO}_4$ unabhängig vom Wasserstoffisotop um einen Faktor ~ 2 verringert. Beide Effekte sind also additiv.

Während das protonisch ungekoppelte System \mathcal{A} nicht beeinflusst wird, verlangsamen hinzugefügte Kationen (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}) die Rate k_1^S . Dies kann mit einem (elektrostatischen) Effekt allein auf die Protonenabgabe bei Y_Z -Oxidation interpretiert werden.

2.4.3.2 Ca^{2+} und Mg^{2+}

Bei der hier maximal eingesetzten Konzentration (100 mM) wird die chaotropische Wirkung dieser Kationen sichtbar durch eine zusätzliche ns-Komponente. Messungen mit 4 ns Zeitauflösung zeigten eine sehr schnelle Kinetik ($\lesssim 10 \text{ ns}$) mit einer relativen Amplitude von etwa $15\text{--}20\%$. Dies lässt auf eine Schädigung der Akzeptorseite in diesem Anteil der PSII-Zentren schließen. Es wird wahrscheinlich die Rekombinationsreaktion von Pheo^- mit P_{680}^+ beobachtet, dessen Halbwertszeit typisch 8 ns beträgt (Schlodder & Brettel, 1988). Im Folgenden wird von dieser heterogenen Verteilung ausgegangen. Deshalb sind die Amplituden der gezeigten Kinetiken bezüglich der intakten PSII-Zentren kalibriert.

In hoher Konzentration beschleunigt Ca^{2+} die Reduktionsrate von P_{680}^+ mit $K_d \approx 10 \text{ mM}$ (Abbildung 2.18 A). Bei $\text{pH} = 5.5$ wird praktisch die gesamte Amplitude von der langsamen Kinetik (S) bestimmt. Die Zugabe von Ca^{2+} verringert aber nicht nur dessen Halbwertszeiten von 27 auf $18 \mu\text{s}$, sondern erhöht den Anteil der schnellen Rate k_1^A , bedingt durch die geringe Zeitauflösung wird dies in Teilabbildung A durch eine etwas geringere Anfangsampli-

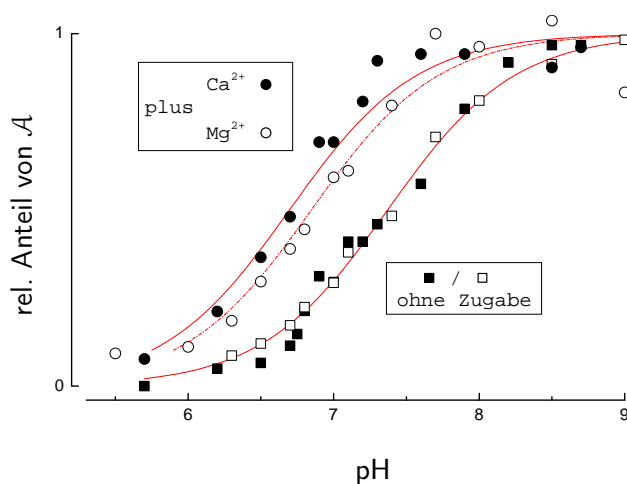


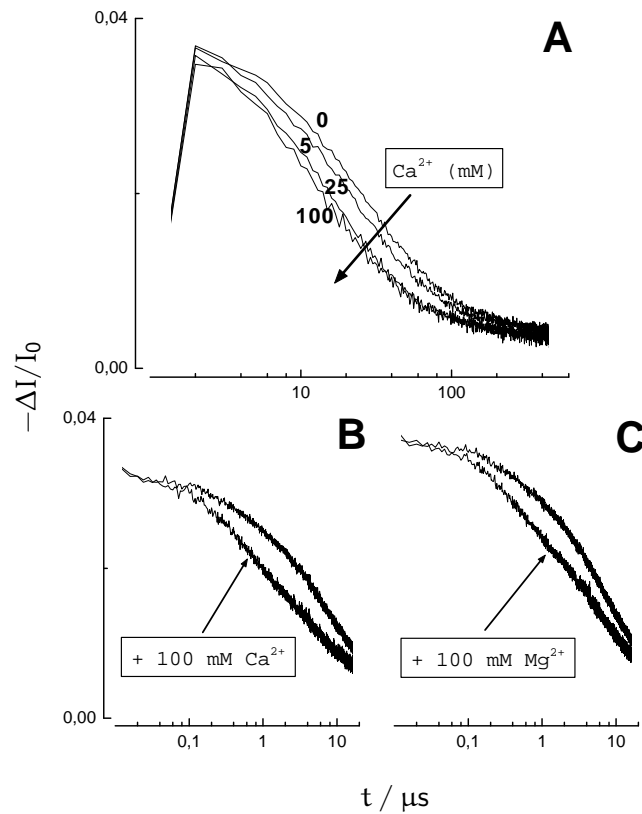
Abbildung 2.17: pH-Abhängigkeit des relativen Anteils des Subensembles \mathcal{A} (mit der schnellen Rate k_1^A), beeinflusst durch Ca^{2+} oder Mg^{2+} .

(■, □) Kontrollmessungen, (●) 100 mM CaCl_2 , (○) 100 mM MgCl_2 , (—) numerische Anpassung; weitere Bedingungen wie in Abbildung 2.18 B,C.

Abbildung 2.18: Einfluss von Ca^{2+} und Mg^{2+} auf die Reduktion von P_{680}^+ .

(A) Kontrollmessung ohne Zugabe von CaCl_2 sowie 5, 25 bzw. 100 mM CaCl_2 , pH = 5.5 (MES-Puffer), Zeitauflösung 1 μs /Punkt.

(B,C) Veränderung durch Zugabe von 100 mM CaCl_2 bzw. MgCl_2 , pH = 7.0 (HEPES-Puffer), Zeitauflösung 4 ns/Punkt ($B_w = 150$ MHz). Weitere Bedingungen wie in Abbildung 2.15

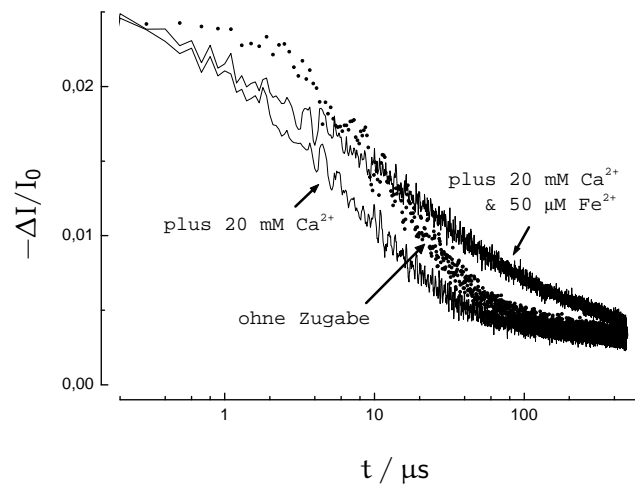


tude deutlich, simultane hochauflösendere Messungen ergeben einen Anteil von etwa 5–10%. Analoge Messungen mit Mg^{2+} ergeben ebenfalls eine, wenn auch geringere, Beschleunigung von k_1^S ($t_{1/2} = 23$ μs).

Die Verschiebung der relativen Anteile von S und A wird bei neutralem pH deutlicher. Die Abbildungen 2.18 B und C zeigen die Veränderung durch Zugabe von 100 mM CaCl_2 bzw. MgCl_2 . Die Zunahme der schnellen Komponente ist offensichtlich.

Abbildung 2.19: Simultaner Einfluss von Ca^{2+} und Fe^{2+} auf die Reduktionskinetik von P_{680}^+ .

Kontrollmessung sowie Zugabe von 20 mM CaCl_2 bzw. zusätzlich 50 μM FeSO_4 ; weitere Bedingungen wie in Abbildung 2.15



In Abbildung 2.17 sieht man die Ergebnisse für verschiedene pH-Werte, ausgewertet analog zum Abschnitt 2.4.1.3. Man erkennt eine Verschiebung von $\text{pK}_{YZ}^{\text{app}}$ von 7.4 nach 6.7 durch

Ca^{2+} und nach 6.8 durch Mg^{2+} .

Die Zugabe von 20 mM $CaCl_2$ und dann zusätzlich 50 μM $FeSO_4$ zu einer PSII-Probe bewirkt die jeweiligen charakteristischen Veränderungen dieser Kationen auf die P_{680}^+ -Reduktionskinetik (Abbildung 2.19). Die resultierende Kinetik zeigt den gleichsam vergrößerten Anteil der schnellen Komponente wie bei der Kurve mit 20 mM Ca^{2+} aber ohne Fe^{2+} , aber zusätzlich eine deutliche Verlangsamung im Bereich um $\sim 20 \mu s$. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf unterschiedliche Bindungsstellen von Ca^{2+} und Fe^{2+} .

Ca^{2+} und Mg^{2+} beeinflussen die unmittelbare Säure-Base-Umgebung um Y_Z ($pK_{Y_Z}^{app}$).

Zweiwertige Kationen wirken auf die Y_Z -Oxidation in komplexer Weise. Sieht man von schädigenden Einflüssen auf die Akzeptorseite von PSII ab, die bei hohen Konzentrationen der Kationen auftraten, gab es Modifikationen der Säure-Base-Umgebung von Y_Z : Einmal ein Einfluss auf die langsame, vom pH des Mediums abhängige Rate (k_1^S). Zum Zweiten eine Umverteilung der schnellen und langsamen Phasen, die sich mit einer Verschiebung des $pK_{Y_Z}^{app}$ beschreiben lässt. Dabei scheinen unterschiedliche Bindungsorte im Spiel zu sein, da Fe^{2+} und Ca^{2+} voneinander unabhängig wirken.

2.5 Diskussion

Die Geschwindigkeit des Elektronentransfers zwischen dem primären und sekundären Donator, P_{680} und Y_Z , hängt in Mn-verarmten Präparaten von der Protonenkonzentration des Mediums ab. Im sauren Bereich überwiegt eine langsame (S : 10–100 μ s), im alkalischen eine schnelle Komponente (A : 1 μ s). Der Übergang zwischen den beiden kinetischen Komponenten $A^A \exp(-k^A t)$ und $A^S \exp(-k^S t)$ weist einen pK von 7 auf. Die genaue Lage wird durch zweiwertige Kationen beeinflusst. Das Säure-Base-Gleichgewicht stellt sich im Dunkeln in weniger als 1 s ein. Es kann durch eine titrierbare Gruppe in unmittelbarer Umgebung von Y_Z beschrieben werden:



Anregung mit Licht führt zunächst zur Bildung von $Q_A^- P_{680}^+ Y_Z$ und schließlich zum für > 10 ms (Rappaport & Lavergne, 1997) stabilen $Q_A^- P_{680} Y_Z^{ox}$ (in Gl. Abschnitt 2.2.1 A genannt), wobei das oxidierte Tyr über (eine) Wasserstoffbrücke(n) gebunden ist: $Y_Z^{ox} \equiv Y_Z^\bullet \cdots H B$.

Die langsame und die schnelle Komponente des Elektronentransfers, S und A , unterscheiden sich damit in der Protonierung eines Systems aus Tyr Z und einer Base B , die auch stellvertretend für ein Netzwerk von Basengruppen stehen kann. Auf die möglichen Formen der Notierung $Y_Z \cdots H \cdots B$ wird weiter unten eingegangen. Der Amplitudenverlauf der Kinetiken lässt sich gut mit einer einzigen Säure-Base-Gruppe beschreiben, es können aber auch mehrere Gruppen sein, mit pK-Werten, die unmittelbar nebeneinander liegen. Apparente pK-Werte um 6–8, die die Titration einer Säure-Base-Einheit anzeigt, die funktionell mit Y_Z verknüpft ist, wurden auch von anderen Autoren gefunden durch transiente optische und ESR-Spektroskopie im Zeitbereich der Rereduktion von Y_Z^{ox} (Shigemori et al., 1997; Rappaport & Lavergne, 1997; Mamedov et al., 1998). Ergebnisse optischer Detektion der Y_Z -Oxidation bei einexponentieller Auswertung sowie von FTIR-Differenzspektren wurden mit einem pK ≈ 8 für eine zu Y_Z benachbarte Base interpretiert (Diner et al., 1998; Berthomieu et al., 1998).

Eine weitere Auftrennung in 3 Komponenten für Zerfallszeiten < 100 μ s (also ohne Rekombinationsreaktion) und dementsprechend 2 pK-Werten (6.3 und 7.5), wie sie aufbauend auf hier vorgestellte Ergebnisse in (Hays et al., 1999) erfolgt, erfordert aber wegen einer im Prinzip nicht eindeutigen numerischen Anpassung von Exponentialfunktionen selbst bei sehr gutem Signal-Rausch-Verhältnis weitere Unterscheidungsmerkmale. Aufgrund weiterer Kriterien, wie hier Isotopeneffekt und Aktivierungsenergie, können mehrexponentielle Kinetiken wohldefinierten Reaktionsmechanismen zugeordnet werden. Fehlen diese, können in sich komplexe Vorgänge vorliegen, wie z.B. ein Elektronentransfer, welcher durch Proteinrelaxation gesteuert wird und eher nichtexponentiell zu beschreiben ist (Cherepanov et al., 1998, 2001).

Im Folgenden schließt ein Vergleich zum Elektronentransfer in Sauerstoff-entwickelnden Reaktionszentren an, der die Gemeinsamkeiten zum System A verdeutlicht. Danach wird auf den Reaktionsmechanismus im Protonierungszustand S des PS II bei inaktiviertem Mn-

Komplex eingegangen. Abschließend wird über daraus folgende Konsequenzen für die Rolle von Tyrosin Z in der enzymatischen Wasserspaltung diskutiert.

2.5.1 Y_Z -Oxidation im System \mathcal{A} erfolgt analog zu nativen Zentren

Die Y_Z -Oxidation im Alkalischen bei Mn-verarmten PS II, die deswegen keinen Sauerstoff produzieren, erfolgt überwiegend in 1 μ s. Genauer betrachtet findet man in Kernkomplexen aus Pflanzen (Erbse, Spinat) geringe Anteile, die mit weiteren Exponentialkomponenten mit Halbwertszeiten von 200 ns und 5 μ s beschrieben werden können. Präparate aus Cyanobakterien zeigen eine global schnellere Kinetik, dort scheint die Komponente mit 200 ns zu überwiegen (Schloder & Meyer, 1987; Hundelt, 1999).

Ein Vergleich mit den – ebenfalls mehrphasig zu beschreibenden – Nanosekundenkinetiken in O_2 -entwickelnden Systemen ergibt ähnliche Eigenschaften: Die Aktivierungsenergie ist mit 0.1 V bzw. 0.15 V niedrig. Die Erhöhung um 0.05 V im inaktiven System und die Verlangsamung der Raten um einen Faktor 10–100 lassen sich durch Veränderungen der Umgebung, der geometrischen Lage oder der Redoxpotentiale der beiden Redoxkomponenten erklären. Ersteres ließe sich mit einer erhöhten Reorganisationsenergie λ quantifizieren: Eine verstärkte Polarisierbarkeit der Umgebung und damit der effektiven (statischen) Dielektrizitätskonstanten (Warshel & Aqvist, 1991) erhöht den *outer sphere* Anteil von λ (Marcus, 1956)⁽⁴⁾. Dies ist möglich, da die Umgebung durch die Entfernung von Mangan wahrscheinlich hydrophiler wird. Weitere Ursachen können eine Erhöhung der Distanz der beiden Redoxkomponenten um $\sim 2 \text{ \AA}$, oder eine Verringerung der Redoxspanne sein, die durch die Inaktivierung hervorgerufen werden. Ersteres wird bei Erscheinen einer Strukturbestimmung des inaktivierten Kernkomplexes überprüfbar sein. Letzteres erscheint plausibel, weil durch die Mn-Verarmung selbst Veränderungen auf der Akzeptorseite induziert werden, die zur Verschiebung des Redoxpotentials von Q_A von ca. -80 mV auf 60 mV führt (Johnson et al., 1995; Krieger et al., 1995). Der Ratenunterschied zwischen höheren Pflanzen und Cyanobakterien lässt sich unter diesem Gesichtspunkt mit einer geringeren Modifikation durch Inaktivierung in letztgenannten Organismen erklären.

Die Reduktionsraten verändern sich kaum bei einer Veränderung des pHs. In aktiven Zentren werden im pH-Bereich von 5–7.5 nahezu konstante Elektronentransferraten und die maximale Sauerstoffentwicklung gefunden (Schloder & Meyer, 1987; Meyer et al., 1989).

Es wird kein oder ein geringer H/D-Isotopeneffekt auf die Rate gefunden (1.0–1.1, (Diner et al., 1998): 1.1–1.2, aber bei (Hays et al., 1999): 1.7), und in aktiven Zentren wird kein Effekt gefunden (Karge et al., 1996; Haumann et al., 1997a). Eine Limitierung der Raten durch das *Aufbrechen* einer Wasserstoffbrückenbindung ist daher unwahrscheinlich. Für die Betrachtung von Protonentransfers innerhalb einer Wasserstoffbrückenbindung sind zwei Fälle zu unterscheiden:

a) Y_Z liegt als Tyrosin vor: Wenn Y_Z wie Tyrosin in Wasser einen $pK = 10.3$ aufweist, dann erfolgt für den neutralen und schwach alkalischen pH-Bereich eine Verschiebung des Hydroxylprotons vom Phenolring zur benachbarten Base B als Reaktion auf den Elektronentransfer:

4 Zur Elektronentransfertheorie in Proteinen siehe z.B.: DeVault (1984); Marcus & Sutin (1985); Krishtalik & Cramer (1996).



Der Protonentransfer kann als nicht Raten-limitierend für den Elektronentransfer angesehen werden, denn für oxidiertes Tyrosin gilt $pK \approx -2$. Man erwartet zwar für Protonentransfers zwischen Säure-Base-Gruppen mit wenig differierenden pK s im Allgemeinen einen signifikanten Isotopeneffekt, sowohl in der klassischen Betrachtung und bei Tunnelprozessen mit signifikanter Barriere, d.h. für Protonentransfers vom Bell-Typ (Bell, 1973). Allerdings wird insbesondere zwischen Sauerstoff- und Stickstoffbasen auch der Transfertyp nach Kreevoy beobachtet, bei dem die Umgebungsreorganisation ratenlimitierend ist, die zu durchtunnelnde Barriere ist dann klein und der Isotopeneffekt nimmt Werte im Bereich von 1–3 an (siehe Albery, 1980, und darin genannte Referenzen). Eine Ratenlimitierung ist aber unerwartet, weil mit der großen pK -Differenz zwischen $Y_Z^\bullet H$ und B ein exothermer Prozess vorliegt.

Gegen diese Möglichkeit spricht die weiter unten ausgeführte Folgerung für das System S ($Y_Z H \cdots H B$), dass das Phenolproton vor oder gleichzeitig mit dem Elektronentransfer dissoziiert wird. Daher ist im Alkalischen eine im Vergleich zum Elektronentransfer schnelle Protonenverschiebung anzunehmen, wie sie für ein delokalisiertes Proton zwischen Y_Z und B gegeben wäre.

b) Y_Z liegt als „Tyrosinat“ vor: Entweder liegt ein delokalisiertes Proton vor, Y_Z liegt dann als H-gebundenes Tyrosinat vor (siehe auch Abschnitt 2.5.3). Oder im Extremfall ist Y_Z im Alkalischen vollständig deprotoniert, weist also als individuelle Gruppe den $pK_{Y_Z}^{app} = 7$ auf.

Die Raten der Protonenabgabe sind im Alkalischen langsam, so dass diese keinen funktionellen Hinweis geben können. Es erfolgt aber für diesen pH-Bereich eine sub-stöchiometrische Abgabe, so dass hier von einer rein elektrostatisch induzierten Abgabe ausgegangen werden kann.

Messungen der Elektrochromie bei 443 nm (von M. Haumann, siehe (Ahlbrink et al., 1998), zum Methodenverständnis siehe auch Abschnitt 3.2.2.4), die das Entstehen von unkompenzierten Ladungen durch Y_Z -Oxidation anzeigen, weisen ein Amplitudenverhalten wie das der Kinetik mit der schnellen Rate k^A auf (Rappaport & Lavergne (1997) finden allerdings auch für $pH = 5.5$ noch ein „elektrochromes“ Signal). In O_2 -entwickelnden Präparationen wird eine entsprechende elektrochrome Verschiebung im gesamten physiologischen Bereich gemessen, das Abklingen dieses Signals erfolgt dabei mit der Reduktion von Y_Z^{ox} durch den OEC. Im neutralen Bereich ist die Amplitude des elektrochromen Signals im Vergleich zu den inaktivierten Proben etwa verdoppelt, was auf eine Erhöhung des elektrischen Feldes durch eine geringere Polarisierbarkeit der Proteinumgebung im intakten System zurückgeführt werden kann.

Die Beobachtung einer unkompenzierten Ladung nach Oxidation von Y_Z widerspricht dann nicht der Beobachtung eines neutralen Radikals bei ESR-Messungen, wenn man wie im obigem Modell annimmt, dass die Abgabe des Hydroxylprotons der Phenolgruppe über eine Wasserstoffbrückenbindung auf eine benachbarte Base erfolgt.

Die elektrochrome Natur der während der Y_Z -Oxidation beobachteten Bandenverschiebungen (im roten und blauen Spektralbereich) ist umstritten. Nach Diner et al. (2001) wird anhand Mutagenese der Aminosäure D1-His198, ein Ligand zu P_A , die Änderung des Dipolmomentes ($\Delta\mu$) dieses koordinierten Chlorophylls durch Y_Z -Oxidation als bestimmende

Signalquelle identifiziert (siehe dazu auch Abschnitt 3.5.1). Bei zum BRC analogen Lage des P_A würde man nach bisheriger Berechnung von $\Delta\mu$ (Fajer et al., 1992) eine Blauverschiebung der Bande erwarten. Dies trifft für die elektrochrome Änderung durch die Reaktion $S_1 \rightarrow S_2$ zu, es wurde aber eine entgegengesetzte Verschiebung durch $Y_Z \rightarrow Y_Z^{\text{ox}}$ beobachtet ((Dekker, 1985; Mulkidjanian et al., 1996) im Bereich der Q_y -Bande, im Soret-Bereich wird ebenfalls die „falsche“ Richtung beobachtet (Diner et al., 1995)). Daher wurde für die Topologie der Kofaktoren von A. Mulkidjanian eine vom BRC-Modell abweichende Lage des P_A sowie ein der Symmetrieachse stark angenähertem und damit vom Y_Z entferntem Mn-Komplex angenommen. Zouni et al. (2001) geben die Lage der beiden redoxaktiven Tyrosine an, können aber bei der bisherigen Strukturauflösung nicht die Aminosäurereste in der Umgebung bestimmen. Nach dieser Zuordnung bilden das Zentrum des Mn-Komplexes und der Sauerstoff der Y_Z -Phenolgruppe eine Gerade, die auf das Zentrum von P_A zuläuft (mit einem geringen Versatz in Richtung des Normalenvektors der Chlorinebene), so dass eine gegenläufige *elektrochrome* Verschiebung unverständlich erscheint. Mögliche Gründe für den augenscheinlichen Widerspruch sind z.B. eine falsche Bestimmung der Position von Y_Z , eine nicht direkt bei Y_Z lokalisierte Ladung, überlagerte elektrochrome Verschiebungen weiterer Pigmente oder eine Misinterpretation der Spektren. Innerhalb des „hydrogen abstractor“ Modells (siehe Einleitung, 1.2.3, und weiter unten) sollen die Redoxreaktionen des OECs und Y_Z elektroneutral erfolgen. In (Tommos & Babcock, 1998) wurde daher eine alternative Interpretation der Bandenverschiebung genannt: Es soll sich um eine vermittelt durch kovalente Bindungen weitergeleitete Wechselwirkung zwischen Y_Z und dem Chlorophyll handeln. Die Ergebnisse für den im nächsten Abschnitt detailliert besprochenen Protonierungszustand S sprechen für einen elektrostatischen Ursprung des Signals, wenn die oben erwähnte pH-Abhängigkeit gegeben ist. Inwiefern der von Tommos & Babcock vorgeschlagene Mechanismus, der nicht mehr indikativ für Ladungsakkumulation sein muss, ein elektrochromes Signal überdecken könnte, ist nicht bekannt.

Die Eigenschaften des Elektronentransfers im alkalischen Bereich bei unprotonierter Base ähneln denen, die in nativen Kernkomplexen im pH-Bereich 5–7.5 beobachtet werden. Schlodder & Meyer (1987) geben für die reversible Inhibierung der O_2 -Entwicklung einen apparenten pK von 4.8 an, der Anteil der Nanosekunden-Kinetiken verringert sich gleichermaßen. Dies könnte damit erklärt werden, dass die protonenaufnehmende Gruppe B im nativen System (im Gegensatz zu dem System, bei dem das Manganzentrum irreversibel deaktiviert wurde), einen um 2.5 Einheiten zum Säuren hin verschobenen pK aufweist. Eine derartige durch ionische Kofaktoren verursachte Verschiebung des pK, wie hier für Mn und Ca unterstellt, wurde für Ca^{2+}/Mg^{2+} gefunden, wenngleich auch mit kleinerem Betrag (circa 0.7 pH-Einheiten). So können auch 825 nm-Daten (Messungen hier nicht präsentiert, siehe (Haumann et al., 1998; Haumann & Junge, 1999a)) in Verbindung mit UV-Differenzspektren von Y_Z und Protonenmessungen an Ca^{2+} -verarmten und reaktivierten bzw. nativen Kernkomplexen für pH-Werte 6 und 7.5 interpretiert werden, die Parallelen zwischen diesem inhibiertem und dem durch Mn-Verarmung inaktiviertem PS II zeigen.

Unterhalb von pH = 4.8 sollten dann die in nativen Zentren beobachteten Mikrosekundenkinetiken zum System S vergleichbare Eigenschaften aufweisen, eine Untersuchung ist aber schwierig durch irreversible Veränderungen dieser Systeme bei stark saurem pH (Ca^{2+} -Verarmung, Proteindenaturierung).

2.5.2 Y_Z -Oxidation im Zustand S ist Proton-limitiert

Die Ergebnisse für den sauren pH-Bereich im Vergleich zum alkalischen sprechen für einen Proton-limitierten Elektronentransfer: Die Raten der P_{680}^+ -Reduktion (k^S) sind verlangsamt und pH-abhängig, die Aktivierungsenergie ist etwa verdoppelt und es liegt ein signifikanter H/D-Isotopeneffekt vor.

Die Ausgangssituation im Sauren (S) nach Oxidation von P_{680} setzt voraus, dass der zwischen diesem Kofaktor und Y_Z stattfindende Elektronen- mit Protonentransfer gekoppelt ist. Man kann die Deprotonierung in zwei Schritte aufteilen, wenn B ein Aminosäurerest ist: Deprotonierung der Base und Transfer des Hydroxylprotons vom Tyr-Phenolring nach B. Ersteres entfällt, wenn B Wasser ist; für diesen Fall muss der Säure-pK von Tyrosin von 10 in wässriger Lösung für Y_Z um drei Einheiten verschoben sein.

Die Kinetik des Elektronentransfers kann auf zwei Weisen von der Verschiebung eines Protons gesteuert werden, konzertiert oder konsekutiv. Für Letzteres sind zwei Fälle, je nach Reihenfolge, zu unterscheiden: ET/PT oder PT/ET. Bei einem konzertierten Transfer ist nur ein Übergangszustand zu betrachten, wobei die Deprotonierung dann zur bestimmenden Kern-Reaktionskoordinate wird.

ET/PT: Erfolgt der Elektronentransfer zuerst, kann eine pH-Abhängigkeit der Rate nur mit einer elektrostatischen Beeinflussung auf das Redoxgleichgewicht erklärt werden. Conjeaud & Mathis (1986) beschreiben eine Abhängigkeit vom lokalen pH der Thylakoidmembran, welcher durch Oberflächenladungen und nach der Gouy-Chapman-Theorie (analog zum Debye-Hückel-Modell der Ionenwolken) durch Variation der Ionenstärke des Mediums beeinflussbar ist. Allerdings erklärt eine Beeinflussung der Tyrosin-Oxidation nur durch Coulomb-Wechselwirkung nicht den signifikanten Isotopeneffekt, auch die Zunahme der Aktivierungsenergie bei einem pH-Übergang von 8 nach 6 ist dafür zu abrupt. Bei den hier verwendeten Kernkomplex-Präparaten führte die Zugabe zweiwertiger Ionen zu zwei unterschiedlichen Effekten: Fe- und Mn-Kationen verlangsamten bei Konzentration um $10 \mu\text{M}$ die Rate k^S . Ca- und Mg-Kationen zeigten hingegen erst bei 1000-facher Konzentration einen eher geringen und gegenteiligen Effekt auf die langsame Rate, verschoben aber $\text{p}K_{Y_Z}^{\text{app}}$ zum Sauren. In beiden Fällen wurde keine Veränderung der schnellen Rate festgestellt. Der Einfluss der Ionenstärke auf das Redoxgleichgewicht war somit gering.

PT/ET: In einem PT/ET-Modell ist der Protonentransfer Raten-limitierend. Sjödin et al. (2000) argumentieren gegen eine Oxidation von Y_Z (bzw. einem Tyr in einem Modellsystem, siehe weiter unten) nach diesem Typ, da (nach Gleichung (2.10)) die Deprotonierung einer Base mit $\text{p}K = 7.3$ direkt in die Wasserphase eine konstante Rate von circa 1000 s^{-1} ergeben würde. Solch eine pH-unabhängige und kleine Rate entspricht nicht der experimentell bestimmten Rate der Y_Z -Oxidation. Dieser Ausschlussgrund trifft für das Modellsystem zu, für PS II könnten aber Protonentransfers zwischen $Y_Z\text{H}\cdots\text{HB}$ und anderen Aminosäuregruppen schnell erfolgen. Diese oder nachfolgende Gruppen müssen aber mit der Wasserphase protolytisch im Gleichgewicht stehen, denn erst ein Protonentransfer in das Medium ermöglicht eine Protonenabgabe von B. Letztlich scheint dann aber wieder die Elektronentransferrate kinetisch auf der Protonenabgabe in die Wasserphase aufzusitzen.

In (Sjödin et al., 2000) ist der Elektronentransfer in einem synthetischen Tyrosin-Ruthenium-tris-Bipyridin-Konstrukt in Abhängigkeit von pH und Temperatur untersucht

worden. Nach Anregung durch einen Lichtpuls wird $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ sehr schnell durch externe Akzeptoren oxidiert und dann analog zum PS II von der Aminosäure wieder reduziert, bei $\text{pH} > 10$ mit einer Rate von circa $5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Unterhalb des Säure-pKs von Tyr wird bei Oxidation das Hydroxylproton vom Phenolring in die Wasserphase abgegeben, die ET-Rate in diesem Bereich ist pH-abhängig und im Vergleich zum stark alkalischen Bereich um mindestens zwei Größenordnungen verlangsamt. Die Randbedingungen insbesondere für den Protonentransfer sind im Gegensatz zum PS II eindeutig: Es bestehen keine weiteren Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren. Die an diesem gut definierten System erhaltenen Ergebnisse können als Modell für das Verständnis ähnlicher Daten an PS II angesehen werden.

Die Berechnung des Gleichgewichts zwischen P_{680} und Y_Z und die entsprechenden intrinsischen Raten f und b erfolgte unter Annahme des in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen kinetischen Modells (siehe 2.4.1.6). Für den sauren pH-Bereich, in der der Elektronentransfer Protonenkoppelt ist, wird bei Anstieg des pHs um zwei Einheiten eine Beschleunigung von f^{S} um eine Größenordnung gefunden. Genau dieses Verhalten wurde auch in dem Tyr-Ru(bpy)₃-Modellsystem in dem entsprechenden pH-Bereich gefunden (Sjödín et al., 2000). Wobei die internen Raten im Modellsystem mit den observierten gleichgesetzt werden können, sie sind bei gleichem pH etwa um einen Faktor 5 kleiner als f^{S} in PS II. In beiden Fällen bewirkt die Änderung des Redoxpotentials von Tyr, das durch die Protonenkonzentration im Medium bestimmt ist, von 120 mV (bei Raumtemperatur) eine Änderung der Aktivierungsenergie um die Hälfte dieses Betrages, so dass man von einer einfachen LFER⁽⁵⁾ sprechen kann (siehe z.B. Albery, 1980). Die beiden Systeme zeigen für den sauren pH-Bereich Gemeinsamkeiten:

- Die pH-Abhängigkeiten der intrinsischen Raten der Tyr-Oxidation sind gleich im Rahmen der Messgenauigkeit und der Unsicherheit bei der Bestimmung von f^{S} aus der observierten Rate.
- Die Aktivierungsenergien sind nahezu identisch: Im Modellsystem wurden für $\text{pH} = 6.5$ 0.32 eV (Sjödín et al., 2000), in PS II 0.29 eV ($\text{pH} = 6.3$) bzw. circa 0.32 eV ($\text{pH} = 5$) bestimmt.
- Die H/D-Isotopeneffekte der Raten sind ähnlich: Im Modellsystem 2.0–2.5 (Sjödín et al., 2002b,a), in PS II etwa 3.

In (Sjödín et al., 2000) wird die Tyr-Oxidation gemäß der Theorie von Marcus (Marcus & Sutin, 1985) analysiert unter der Annahme, dass ein gleichzeitiger Transfer von Proton und Elektron stattfindet. Für pH-Werte oberhalb des Tyr-Säure-pKs wird ein für polare Medien normaler Betrag der Reorganisationsenergie λ von ca. 0.9 eV gefunden. Ist das Tyrosin in der Modells substanz protoniert, erhöht sich die Reorganisation in erster Näherung um den Anteil, der die Streckung der O–H-Bindung beschreibt. Die dann errechnete Reorganisationsenergie, unter Berücksichtigung der bei Abgabe des Protons anfallenden Mischentropie, wird zu 1.4 eV angegeben (Sjödín et al., 2002b,a).

⁵ Eine *linear free energy relationship* ist gültig für einen annähernd symmetrischen Übergangszustand. Betrachtet man die Änderung der Aktivierungsenergie, folgt $d\Delta G^\ddagger \simeq 1/4 d\lambda + \alpha d\Delta G^\circ$, wobei $\alpha = 1/2 (1 + \Delta G^\circ/\lambda)$. Somit ist $\alpha \approx 1/2$, wenn die Triebkraft wesentlich kleiner als die Reorganisationsenergie λ ist.

Die Verwendung der Marcus-Theorie könnte allerdings kritisch sein, da diese eine Näherung für ET zwischen Reaktand- und Produktzuständen darstellt, die mit *gleichartigen* charakteristischen Kernschwingungen, im einfachsten Fall als harmonische Oszillatoren (mit parabelförmigen Potentialverlauf), beschrieben werden können. Hier ist aber der Produktzustand dissoziativ, so dass nur in dem klassischen Bereich des Übergangszustandes aufgrund einer Abstossung in der OH-Koordinate ein Potentialverlauf ähnlich eines Parabelastes angenommen werden kann. Quantenmechanisch betrachtet liegt aber im Gegensatz zu den Oszillatorzuständen der Reaktanden auf der Produktseite ein Kontinuum von möglichen Energiezuständen vor, so dass die Hochtemperatur-Näherung, bei der der Franck-Condon-Anteil der ET-Rate zum klassischen Ausdruck $\exp(-\Delta G^\ddagger/kT) / \sqrt{4\pi\lambda kT}$ wird, möglicherweise nicht mehr anwendbar ist. Cukier (1999) gibt einen (nicht-analytischen) Ausdruck für Ratenkonstanten bei *dissoziativen Elektronen-* sowie *Protonentransfer* an, bei dem er von einem konzertierten Übergang ausgeht (DETPT). In dieser Arbeit wird der repulsive Potentialverlauf quantifiziert durch Annahme einer schwachen Wasserstoffbrückenbindung und eines im Vergleich zum Protonentransfer schnellen Rearrangements der elektronischen Umgebungspolarisation (für das reelle System muss aber der verwendete Potentialverlauf als qualitativ angesehen werden). Die Darstellung der Raten in Abhängigkeit von der Gibbsenergie zeigt eine ähnliche Form, wie sie auch in der Marcus-Theorie gefunden wird, insbesondere ist die Steigung für $-\Delta G^\circ \ll \lambda$ entsprechend⁽⁶⁾, so dass auch hier die vereinfachte lineare Beziehung gilt: $\log(k) \propto \Delta G^\ddagger \sim 1/2 \Delta G^\circ$.

Aufgrund der erstaunlich guten Übereinstimmung von Modellsystem und PS II kann davon ausgegangen werden, dass die Rate der Y_Z-Oxidation für pH < pK_{Y_Z}^{app} in Mn-verarmten Präparationen bestimmt wird durch die Abgabe eines Protons in die Wasserphase. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen konsekutiven (PT/ET) und gleichzeitigen (DETPT) Transfer erscheint aber bei derzeitigem Kenntnisstand über Y_Z und dessen Umgebung nicht möglich.}

Die Abgabe etwa eines Protons im Bereich um pH = 6, in der dieser Protonen-gekoppelte Elektronentransfer vorherrscht, wurde bestimmt. Die Rate der Protonenabgabe nähert sich zum Säuren (für pH ≤ 6) der Elektronentransferrate an. Man kann daher vermuten, dass hier die Abgabe des Phenolprotons in die Wasserphase beobachtet werden kann, es sich also um ein „chemisches Proton“ handelt. Im Gegensatz zu O₂-entwickelnden Präparaten (siehe Abbildung 2.9) könnte die Protonenabgabe für pH < 6 schneller erfolgen als die Entstehung von Y_Z^{ox}. Da dies nicht der Fall ist, kann der Schluss gezogen werden, dass keine Protonenabgabe (oder ein nur sehr geringer Bruchteil, etwa 0.1–0.3 H⁺/PS) erfolgt, die durch die positive Ladung auf P₆₈₀⁺ induziert ist. McPherson et al. (1988) bestimmten für BRC (*Rhodobacter sphaeroides*) eine durch den primären Donator induzierte Protonenabgabe von 0.0–0.3 für pH-Werte 5–10. Dieses Ergebnis ist nicht zu erwarten, wenn man von einem isotropen Kontinuummodell des Proteins ausgeht. Wie z.B. von Krishtalik & Cramer (1996) ausgeführt, sind Proteine zwar ein Medium mit einer hohen Konzentration an polaren Gruppen, die aber im Vergleich zu Flüssigkeiten recht starr angeordnet sind. Dies bedingt eine niedrige (relative) Dielektrizitätskonstante von etwa 4, dementsprechend ist die „Reichweite“

⁶ Aufgrund der ungünstigen graphischen Darstellung in dem zitierten Artikel erfolgten eigene Berechnungen analog zu (Cukier, 1999) – vereinfacht durch Annahme eines harmonischen Oszillators für den Anfangszustand (hier im Einzelnen nicht dargestellt).

des Coulomb-Potentials einer Ladung groß. Da es sich bei der Proteinmatrix um ein inhomogenes System handelt, ist aber die universelle Definition einer Dielektrizitätskonstanten nicht möglich. Vielmehr ergeben sich effektive Werte (ϵ_{eff}), die abhängig sind von der betrachteten Eigenschaft (mikroskopischer Wert, Punktladungs- bzw. Punktladung-Dipol-Interaktionen, Solvatisierung), die sie definieren (Warshel & Russell, 1984; Warshel & Aqvist, 1991). Man kann von einem einfachen Modell der Donatorseite ausgehen, bei dem das dielektrische Protein und das „metallische“ Lumen zwei angrenzende Phasen mit unendlicher Ausdehnung sind (Drevenstedt, 1997; Junge et al., 2002). Periphere Gruppen, bei denen eine schnelle Deprotonierung durch P_{680}^+ detektiert werden könnte, liegen laut Struktur grob geschätzt 3–4 nm von der Ladung entfernt. Geht man von einer 3 nm Distanz des primären Donators von der Grenzfläche aus, so erfahren Gruppen, die nicht mehr als 5 Å vom Grenzbereich entfernt sind, eine Potentialänderung ≤ 40 mV. Ebenso ergibt eine möglicherweise gerade für Mn-verarmte Präparationen realistischere Distanz von 2 nm (etwa der Abstand P_{680} zum Mn-Cluster) Werte von ≤ 100 mV, so dass eine Protonenabgabe, zumindest für $\epsilon_r = 4$ wahrscheinlich erscheint. Nimmt man aber an, dass die effektive Dielektrizitätszahl für die Interaktion zwischen der positiven Ladung P_{680}^+ und basischer Gruppen vom Reaktionskern aus ansteigend verläuft (in Anlehnung an das Drei-Zonen-Modell von Membranproteinen (Cherepanov & Krishtalik, 1990)), um der nach außen hin zunehmend hydrophileren Umgebung Rechnung zu tragen, ergeben sich deutlich kleinere Potentialänderungen. Weiterhin führt Mulikdjanian (1999) die geringe, möglicherweise auch nur stark verlangsamte, Protonenabgabe durch P_{680}^+ auf eine zu hohe Lösungsenergie für Protonen zurück, die zu Gruppen im hydrophoben Reaktionskern gehören.

2.5.3 Tyrosin Z im nativen PS II

Messtechniken wie Magnetoresonanz und FTIR-Spektroskopie, die strukturell besonders hohe Aussagekraft haben können, kommen naturgemäß an ihre Grenzen bei der kurzen Lebensdauer des Y_Z in O_2 -entwickelnden Zentren. Es gibt zwar ein zeitaufgelöstes cw-EPR-Spektrum (Hoganson & Babcock, 1988), aber die Qualität des Spektrums lässt keine sicheren Rückschlüsse durch Quantifizierung der chemischen Verschiebungen und Hyperfeinwechselwirkungen zu (Mino et al., 2000). Bisher erzielte Ergebnisse mit für die Struktur relevanten Erkenntnissen basieren daher auf inaktiven Präparaten, die langsamere Kinetiken aufweisen.

Messungen von Y_Z^\bullet , die eine quantitative Beurteilung der Hyperfeinstruktur ermöglichen, wurden an Proben durchgeführt, die unter Dauerlicht auf niedrige Temperaturen (150–250 K) gebracht werden, um das Radikal zu konservieren (Mino & Kawamori, 1994). Dies gelang bisher nur in ausreichendem Maße, wenn die Reduktion von Y_Z durch die Mn-, Ca^{2+} - oder Cl^- -Verarmung des OEC verlangsamt war. Da der Mn-Cluster bei der reversiblen Ca^{2+} -Verarmung intakt im Protein verbleibt, wurden diese Präparate als Modell für das O_2 -entwickelnde Systeme angesehen (z.B. Hoganson & Babcock, 1997), was nicht gesichert ist.

Die protonischen Wechselwirkungen der redoxaktiven Tyrosine weisen demnach Unterschiede auf: Bei Y_D^\bullet liegt die Bindung zwischen C_β und dem Phenolring in einer homogenen Konformation vor. Der Phenolsauerstoff zeigt eine wohldefinierte Wechselwirkung mit einem

Proton (siehe aber Diner et al., 1998), bei dem ein H/D-Isotopenaustausch nur sehr langsam erfolgt. Dies wurde interpretiert mit einer festen Lage des Ringes und einer einzigen Wasserstoffbrückenbindung der Phenolgruppe zu D2-His189 (Tang et al., 1993; Un et al., 1996; Campbell et al., 1997), in der das Proton verbleibt und je nach Redoxzustand des Tyrosins Akzeptor- oder Donator-seitig verschoben ist (Babcock et al., 1989). Y_Z^\bullet hingegen zeigt unterschiedliche Hyperfeinkopplungen der beiden Methylenprotonen, gepaart mit einem größeren Bereich von möglichen Winkeln zwischen diesen beiden Protonen und des Phenolringes, was auf eine Heterogenität in der Bindungstasche oder auf eine erhöhte Rotationsfreiheit um die C_1 - C_β -Bindung schließen lässt (Tommos et al., 1995). Für den Phenolsauerstoff wird mittels Hochfeld-ESR wie bei Y_D^\bullet eine Kopplung entsprechend einer starken Wasserstoffbrückenbindung gefunden, die Bindungsumgebung ist aber durch Überlagerung mit mehreren schwachen Bindungen „ungeordneter“ (Un et al., 1996).

Dieser augenscheinlich generelle Unterschied und eine aufgrund einer Misinterpretation von ESR-Daten (die Autoren, Gilchrist et al. (1995), ignorierten Austauschwechselwirkung) als sehr nah ($\lesssim 5 \text{ \AA}$) angenommene Lage des Y_Z zum Mn-Komplex führte u.a. zur Modellbildung der „hydrogen abstractor“-Funktion (Hoganson et al., 1995): Y_Z verbindet den Elektronentransfer, der die Ladungstrennung von $P_{680}^+Q_A^-$ stabilisiert, mit der Protonengekoppelten Redoxchemie des OEC in der Weise, dass das Tyrosin-Radikal gleichzeitig eine Elektron- und Proton-Senke darstellt. Ein Extremfall dieser Auffassung ist der *gleichzeitige* Tunnelprozess: Statt eines Elektrons tunnelt ein Wasserstoff zum Tyrosin. Die Röntgenstrukturdaten ergeben 7 \AA Distanz zwischen dem Phenolsauerstoff und den Zentren der zwei nächsten Mn-Atomen, die Zentren der Spindichten sind $7\text{--}9 \text{ \AA}$ voneinander entfernt (Dorlet et al., 1998; Lakshmi et al., 1998; Peloquin et al., 1998). Ein Wasserstofftransfer setzt aber eine sehr kurze Tunneldistanz voraus, so dass dann das Wassersubstrat zwischen Mangan und Y_Z lokalisiert sein müsste (Rutherford & Faller, 2001).

Energetisch ist es sinnvoll, die enzymatische Wasseroxidation mit der Protonierung einer Base zu koppeln (Krishtalik, 1990), deren Säure-pK sich durch eine Redoxreaktion stark verändert. Das eben beschriebene Modell sieht Y_Z als diese Base an, fordert aber darüber hinaus die Abgabe des Phenolprotons, um einen Wasserstofftransfer zu ermöglichen. Im Übergang $S_1 \rightarrow S_2$ wird aber innerhalb der Lebensdauer von Y_Z^{ox} keine „chemische“ Protonenabgabe detektiert, denn für alle untersuchten O_2 -entwickelnden Präparationen liess sich eine Bedingung einstellen, bei der eine substöchiometrische, also *nur* elektrostatisch induzierte Abgabe erfolgte (Haumann & Junge, 1994; Haumann et al., 1997b; Schlodder & Witt, 1999; Junge et al., 2002). Zumindest in Mn-verarmten Präparationen (im Protonierungszustand S) ist aber eine Detektion solch eines „chemischen“ Protons direkt möglich. So ist die „hydrogen abstractor“-Funktion wahrscheinlich keine generelle Funktion des Tyrosins Z, erscheint aber trotzdem attraktiv für den Übergang $S_2 \rightarrow S_3$, welcher sich gegenüber den anderen Übergängen durch einen signifikanten Isotopeneffekt auszeichnet (Haumann & Junge, 1999b). Dabei ist allerdings unklar, wodurch die Funktionsänderung des Y_Z induziert wird.

In Hinblick auf die hier vorgestellten Ergebnisse und den Gemeinsamkeiten zwischen durch Mn- oder Ca^{2+} -Verarmung inaktivierten Präparationen (Haumann & Junge, 1999a) ist die Durchführung der eben genannten Magnetoresonanz-Experimente bei pH-Werten von etwa 6–7 bedenklich hinsichtlich einer klaren Aussage über Y_Z . ENDOR- (Mino et al., 1995, 1997) und zeitaufgelöste ESR-Daten (Shigemori et al., 1997) zeigen eine Änderung der Protonie-

zung mit $pK \sim 6.5$ an. Die $Y_Z^{\bullet}S_1^-$, $Y_Z^{\bullet}S_2^-$ bzw. Y_Z^{\bullet} -Spektren in (Mino et al., 1997, 2000) (cw-ESR und ENDOR (gepulst)) zeigen Übereinstimmungen zwischen Ca^{2+} -verarmten und Mn-verarmten Zentren bei saurem pH (5.5), sie werden interpretiert mit Vorliegen eines kationischen Radikals. Sie unterscheiden sich aber im Alkalischen (7.0), $Y_Z^{(A)}$ erscheint wie Y_D als neutrales Radikal, $Y_Z^{\bullet}S_2$ wird als eine Mischform interpretiert (Mino et al., 2000). Die in (Haumann et al., 1998) gezeigten P_{680}^+ -Rekombinationskinetiken im Ca^{2+} -verarmten System belegen überdies durch einen signifikanten H/D-Isotopeneffekt auch für pH = 7.5 (Verlangsamung der Y_Z -Oxidation von 7 μs auf 15 μs) und ein generell sogar gegenüber Mn-verarmten Zentren langsamere Kinetiken (s.a. Andreasson et al., 1995) ein vom nativen System stark abweichendes Verhalten.

Ein Hin- und Herverschieben des Protons innerhalb des Systems $Y_Z \cdots H \cdots B$ durch die Redoxreaktionen des Tyrosins, wie es für Y_D von Babcock et al. (1989) vorgeschlagen wurde, erscheint naheliegend aufgrund der übereinstimmenden Magnetoresonanz-Daten von $Y_Z^{(A)}$ und Y_D^{\bullet} .

FTIR-Spektren von Y_Z^{ox}/Y_Z (Berthomieu et al., 1998) zeigen Gemeinsamkeiten zwischen Mn- und Ca^{2+} -verarmten Systemen und Y_D -Differenzspektren sowie Tyrosin (mit Methylimidazol als Partner für Wasserstoffbrücken) in Wasser (Hienerwadel et al., 1997). Die Tyrosine $Y_Z^{(S)}$ und Y_Z^{-Ca} in oxidierte Form könnten aufgrund der jeweiligen spektralen Lage der vermuteten C–O-Schwingungsmoden des Phenolrings mehrfach über Wasserstoffbrücken gebunden sein, während für Y_D nur eine Bindung vorliegen soll. Die pH-Abhängigkeit der FTIR-Daten vom Mn-verarmten PS II wurde interpretiert mit dem Verschwinden der Wechselwirkung zwischen Y_Z und Histidin bei Bildung von Tyrosinat mit einem $pK \sim 8-8.3$.

Der Unterschied von UV-Differenzspektren des Y_Z^{ox} in Mn-verarmten Kernkomplexen bei pH = 6 und 9 wurde durch Vergleich mit *in vitro* Spektren von Diner et al. (1998) mit dem Vorliegen von 60% Tyrosinat beim letztgenannten pH-Wert abgeschätzt. In (Haumann et al., 1999) wurde ebenfalls ein Unterschied für Spektren bei sauren und alkalischen pH gefunden, ausserdem ähnelt letztgenanntes (*A*) dem von O_2 -entwickelnden Präparaten, welches bei pH = 5.5 gemessen wurde. Ein Vergleich mit *in vivo* und *in vitro* Spektren von phenolischen Substanzen ergab folgende Interpretation: Tyrosin Z liegt im nativen PS II und für den Protonierungszustand *A* (in Mn-verarmten Präparaten) als mit Wasserstoffbrücken gebundenes Tyrosinat vor ($Y_Z^{\delta-} \cdots H^{\delta+} \cdots B$), so dass nach Oxidation die positiv geladene Einheit $Y_Z^{ox} = Y_Z^{\bullet} \cdots H^+ \cdots B$ vorliegt. Das System *S* ergibt sich in diesem Bild mit einer zusätzlichen Protonierung von $Y_Z^{\delta-} \cdots H^{\delta+} \cdots B$, welche das Netzwerk der Wasserstoffbrücken zerstört. Rappaport & Lavergne (2001) kritisierten die Verwendung einiger der zum Vergleich hinzugezogenen Spektren, ebenso verweist Diner (2001) auf das Fehlen geeigneter Modellspektren. Unbestritten jedoch ist der Unterschied der Y_Z^{ox}/Y_Z -Differenzspektren beim Übergang vom protonengesteuerten (System *S*) zum nativen Elektronentransport (oder System *A*). Das Tyrosinat-Modell erklärt die Eigenschaften des nativen bzw. intakteren (*A*) Systems, insbesondere den geringen H/D-Isotopeneffekt, in naheliegender Weise.

Die homologe Aminosäure auf D1 in der Umgebung von Y_Z zu derjenigen, welche in D2 mit Y_D durch eine Wasserstoffbrücke verbunden ist, ist D1-His190. Durch ortsspezifische Mutagenese dieses Histidins wird die Y_Z -Oxidation durch P_{680} generell verlangsamt. Es resultiert normalerweise eine Inaktivierung der OEC-Funktion (Diner et al., 1991; Kramer et al., 1994; Nixon & Diner, 1994; Roffey et al., 1994), nur bei Ersetzung durch Arg oder Lys

liegt ein intakter Mn-Komplex vor und es konnte eine (geringe) O_2 -Entwicklung detektiert werden (Chu et al., 1995). Die Rate der Y_Z -Oxidation in His190-Mutanten konnte ferner durch Hinzufügung von schwachen Säuren, insbesondere Imidazol, restauriert werden (Hays et al., 1998, 1999). Daher wurde D1-His190 als direkter Partner für eine Wasserstoffbrückenbindung zum Tyr161 angesehen. Hays et al. (1999) finden zudem für His190Ala-Mutanten eine Beschleunigung der P_{680}^+ -Reduktionsrate mit einem Amplitudenverlauf der Kinetik, der einen $pK \sim 10.3$ aufweist, also wie der Säure- pK von Tyrosin in Wasser. Dieses Ergebnis macht eine Zuordnung des $pK_{Y_Z}^{app}$ allein zur Hydroxylgruppe des Tyrosins Z unwahrscheinlich.

Mehrere Gründe sprechen nun aber gegen eine *direkte* Verbindung von His190 und Tyr161: Mit Hilfe der in der Röntgenstruktur erkennbaren Verlauf des Protein-Rückgrats lässt sich die Lage des His auch ohne volle Auflösung der Aminosäure-Seitenketten eingrenzen, es ergibt sich eine Distanz von etwa 1 nm zum Tyr (P. Fromme, persönliche Mitteilung). Bei ^{15}N ESE-ENDOR Experimenten wurden im Gegensatz zu Ergebnissen für die Y_D -Umgebung keine isotrop gekoppelten Stickstoffatome detektiert (Diner, 2001). Ebenso wurde der direkte Nachbar des Histidins, D1-Glu189, als H-Brücken-Bindungspartner in einem Verbund um Y_Z gesehen (Debus et al., 2000). Aber sowohl die Oxidation als auch Rereduktion des Y_Z wird nicht beeinflusst durch eine Ersetzung des Glutamats durch Gln, Arg oder Lys, also Aminosäuren mit von Glu abweichenden elektrostatischen Eigenschaften (Clausen et al., 2001). Zwei eher unwahrscheinliche Extremfälle könnten den Befund erklären: Eine sehr hydrophobe Umgebung erzwingt die neutralen Formen der Seitenketten, oder im Gegensatz dazu schirmt ein sehr hydrophiles Medium alle Ladungen voneinander ab. Die wahrscheinlichere Alternative ist eine der bisherigen Strukturvorhersage entsprechende Distanz von Glu und His zu Y_Z .

Da der bisher vermutete Partner einer Wasserstoffbrücke zu Y_Z , D1-His190, wahrscheinlich nicht direkt mit Y_Z verbunden ist, muss man zur Zeit formal von einem *Säure-Base-Aggregat aus Tyrosin Z und seiner Umgebung* sprechen, welches die Geschwindigkeit des Elektronentransfers $Y_Z \rightarrow P_{680}$ bestimmt.

Es ist denkbar, dass die effektive Ladungserhöhung bei Bildung des Y_Z^{ox} im finalen S-Übergang der Wasserspaltung eine entscheidende funktionelle Bedeutung hat. Denn dadurch wird das Mittenpotential des Mn-Komplexes erhöht, so dass Tyrosin Z elektrostatischer Auslöser für die Oxidation des Substrats ist, welche zur Abgabe des Sauerstoffmoleküls führt (Saygin & Witt, 1987; Ahlbrink et al., 1998; Schlodder & Witt, 1999; Haumann & Junge, 1999b).

3 Linear-dichroitische Charakterisierung von „P₆₈₀“

3.1 Einführung

Bei der Anregung von PSII mit Licht findet ein Elektronentransfer statt, der zur Oxidation und damit Ausbleichung einer Entität P₆₈₀ führt, und zum Erscheinen der Absorption (im nahen IR) eines Chl α -Kations. Es gibt keine Einigkeit darüber, welche Chl α -Komponenten des Reaktionskerns an den Primärreaktionen teilhaben, ob sie als Einzelmoleküle – *Monomer* – beschreibbar sind oder als eine (oder mehrere) über Wechselwirkungen angeregter Zustände (Exzitonen) gekoppelte Einheit – *Multimer* – aufzufassen ist (Dekker & van Gronnelle, 2000; Diner & Rappaport, 2002).

Die Bezeichnung P₆₈₀ meint im Folgenden nicht ein bestimmtes (oder mehrere) Chlorophyll(e), sondern beschreibt Spektren, an denen alle zentralen Chromophore des PSII teilhaben können.

P₆₈₀⁺Q_A⁻/P₆₈₀Q_A ist also der spektroskopische Befund bei zeitaufgelöster Laserspektroskopie nach stabiler Ladungstrennung. Wird diese blockiert, weil Q_A einfach (Q_A⁻) oder doppelt (Q_AH₂) reduziert ist, oder ist sie nicht möglich, weil Q_A nicht vorhanden ist, wie bei Reaktionszentren-Präparationen, kann sich ein ³P₆₈₀ genannter Tripletzustand bilden (s. van Kan et al., 1992; van Mieghem et al., 1995; Noguchi et al., 2001, und darin genannte Referenzen). Fehlt Q_A oder liegt Q_AH₂ vor, ist das Radikalpaar P₆₈₀⁺Pheo⁻ bei Raumtemperatur etwa 20 ns und länger stabil. Bei Tieftemperatur betragen die Relaxationszeiten mindestens 50–80 ns, so dass die Generierung des Tripletzustandes mit hoher Ausbeute erfolgt. Der auf dem direkten Wege „verbotene“ Übergang resultiert aus der Dekorrelation der Spins auf den beiden Spezies des Radikalpaares.

Für das BRC besteht Einigkeit darüber, dass das Elektronenloch auf einem *special pair* von BChl α -Molekülen (asymmetrisch) delocalisiert vorliegt. Die aktuellen Strukturdaten von PSII (Zouni et al., 2001, s.a. Abbildung 1.5) zeigen ebenfalls eine zueinander parallele, gegeneinander versetzte Anordnung der zentralen zwei Chl α (P_A/P_B) und eine senkrechte Lage der Ring- zur Membranebene. Aufgrund des größeren (Mg-Mg-)Abstands dieser Chromophore, statt 7.6 Å in *Rhodobacter sphaeroides* (Stowell et al., 1997) circa 10.0 Å (Zouni et al., 2001) oder 8.3 Å (Vasil'ev et al., 2001), ist eine geringere exzitonische Kopplung zu erwarten. Sie sind deshalb nicht unbedingt als *special pair* im Sinne exzitonischer Wechselwirkung anzusehen. Dies folgt auch aus der geringeren Rotverschiebung der Q_y-Exzitonbande von P₆₈₀ verglichen mit derjenigen von P₇₀₀. Die Abwesenheit eines *special pair* im PSII erscheint angesichts der besonderen Anforderungen an die Oxidationskraft überdies erforderlich, wenn man von einem Molekülorbital-Modell des Dimers ausgeht (Lendzian et al., 1993;

Webber & Lubitz, 2001; Spiedel et al., 2002).

Die Lage des Übergangsdipolmoments der NIR-Bande von P₆₈₀⁺ bei 100 K wurde mittels magnetisch orientierter Chloroplasten bestimmt (Mathis et al., 1976). Demnach liegt dieses Übergangsmoment und damit möglicherweise das der Q_y-Anregung mit einer Abweichung ≤ 20° parallel zur Membranebene.

Der Triplettzustand ³P₆₈₀ liegt anscheinend auf einem Chlorophyll lokalisiert vor (Rutherford et al., 1981), welches im Winkel von 30° zur Membranebene geneigt ist (van Mieghem et al., 1991; Kwa et al., 1994a). Diese Ausrichtung lässt vermuten, dass ³P₆₈₀ auf einem der akzessorischen Chlorophylle (B_A/B_B) lokalisiert ist, während im BRC der Triplettzustand dagegen auf dem *special pair* liegt (s. Diner & Rappaport, 2002, und darin genannte Referenzen).

Diner et al. (2001) finden eine starke Verschiebung der stärksten ausbleichenden Bande im P₆₈₀⁺Q_A⁻/P₆₈₀Q_A-Differenzspektrum (77 K) bei Vergleich von Wildtyp und Mutagenese des P_A-Liganden D1-His198Gln. Der Effekt auf das ³P₆₈₀/P₆₈₀-Differenzspektrum (5 und 77 K) ist dagegen sehr gering. Daher liegt die Interpretation nahe, dass eines als Monomer anzusehendes „Voyeur“-Chl B_A Träger des Triplettzustandes ist. Die primäre Ladungsübertragung auf Pheo würde dann aufgrund des erwarteten Mechanismus der Triplettentstehung von B_A ausgelöst werden.

Wegen der geringen Anzahl an Pigmenten liegt eine spektroskopische Untersuchung an Reaktionszentren vom Typ D1-D2-Cyt b₅₅₉ nahe. Wegen der starken spektralen Überlagerung der Chromophore sind aber auch bei dieser Präparation statische Spektren nur mit Kombinationen von Markierungen (linearer/zirkularer Dichroismus, Mutanten, Pigmentersetzung) notwendig (s. z.B. Germano et al., 2001). Durch die Beseitigung der stabilisierenden Kernantennen ist Q_A nicht vorhanden, eine stabile Ladungstrennung findet nicht statt. Somit enthält das mittels Laserspektroskopie erhaltene Differenzspektrum der Ladungstrennung P₆₈₀⁺Pheo⁻/P₆₈₀Pheo signifikante Anteile an Pheophytinabsorption, während das an intakteren Präparaten erzielbare P₆₈₀⁺Q_A⁻/P₆₈₀Q_A-Differenzspektrum im Bereich der Q_y-Bande von Chl a praktisch P₆₈₀⁺/P₆₈₀ entspricht (s.a. Abschnitt 3.2.2). Zudem zeigen Differenzspektren (³P₆₈₀/P₆₈₀, P₆₈₀⁺Pheo⁻/P₆₈₀Pheo) signifikante Abweichungen und Inhomogenitäten im Vergleich zu intakteren Präparaten (Hillmann et al., 1995; Carbonera et al., 1994b). Kwa et al. (1994a) berücksichtigten bei der Simulation von ³P₆₈₀/P₆₈₀-Differenzspektren (aus selektiver Anregung) explizit zwei unterscheidbare Verteilungen des Triplettzustandes.

Es wurden Photosелеktionsexperimente an PS II-Kernkomplex-Präparaten durchgeführt. Mittels Anregung am langwelligen Rand der Chl a-Q_y-Banden wurden die Differenzspektren P₆₈₀⁺Q_A⁻/P₆₈₀Q_A und ³P₆₈₀/P₆₈₀ mit linear-dichroitischen Markierungen versehen, welche neue Unterscheidungsmöglichkeiten bei der Zuordnung von Absorptionsbanden geben.

3.2 Grundlagen

3.2.1 Linearer Dichroismus

In diesem Abschnitt werden die im Weiteren gebrauchten Formalismen bei Photoselektionsexperimenten aufgeführt. Ausführliche Darstellungen sind in der Literatur zu finden (Lakowicz, 1986; Garab, 1997; Michl & Thulstrup, 1986; Thulstrup & Michl, 1989).

Als linearer Dichroismus wird die Differenz der Absorptionen⁽¹⁾ bezeichnet, die mit zwei orthogonal linear polarisierten Messlichtstrahlen in einer anisotropen Probe gemessen werden.

$$LD(t) = \Delta A_{\parallel}(t) - \Delta A_{\perp}(t)$$

Die Polarisationsabhängigkeit einer orientierten Probe – im einfachsten Fall ein einziges Molekül – wird deutlich, wenn man die Absorptionswahrscheinlichkeit \mathcal{P} für die optische Anregung eines elektronischen Überganges betrachtet. Sie verhält sich proportional zum Quadrat des Skalarproduktes aus dem elektrischen Feldvektor \mathbf{E} des Lichtes und dem Übergangsdipolmomentvektor $\boldsymbol{\mu}$ eines Moleküls: $\mathcal{P} \propto (\mathbf{E} \cdot \boldsymbol{\mu})^2 \propto \cos^2(\angle(\mathbf{E}, \boldsymbol{\mu}))$.

Es ist vorteilhaft, den Anisotropieparameter r einzuführen, der LD bezogen auf die totale Absorptionsänderung $\Delta A_T = \Delta A_{\parallel} + 2\Delta A_{\perp}$ (mit Beiträgen für alle drei Polarisationsrichtungen) angibt:

$$r(t) = \frac{\Delta A_{\parallel}(t) - \Delta A_{\perp}(t)}{\Delta A_{\parallel}(t) + 2\Delta A_{\perp}(t)} \quad (3.1)$$

Eine weitere, oft genutzte Größe ist das dichroitische Verhältnis: $DR = \frac{\Delta A_{\parallel}}{\Delta A_{\perp}}$. Sie ist anschaulicher, kann aber im Gegensatz zum Anisotropieparameter nicht in eine einfache Beziehung zu den beitragenden Übergangsmomenten gesetzt werden.

Für den Fall einer uniaxial ausgerichteten Probe, bei der der beobachtete Absorptionsübergang auf einem Kegel mit dem Öffnungs- oder Polarwinkel φ_{obs} und dem Azimutwinkel ϑ_{obs} um eine Achse z liege, findet man mit einer Absorptionsmessung, bei der das Messlicht für A_{\parallel} in z -Richtung und für A_{\perp} orthogonal dazu polarisiert sei, folgende Abhängigkeiten:

$$\begin{aligned} LD_{\text{obs}} &= A_T (\cos^2 \varphi_{\text{obs}} - \sin^2 \varphi_{\text{obs}} \langle \cos^2 \vartheta_{\text{obs}} \rangle) = \frac{1}{2} A_T (3 \cos^2 \varphi_{\text{obs}} - 1) \\ \Rightarrow r_{\text{obs}} &= \frac{1}{2} (3 \cos^2 \varphi_{\text{obs}} - 1) \end{aligned} \quad (3.2)$$

Die Winkelabhängigkeit ergibt sich aus der oben genannten Abhängigkeit zwischen $\mathbf{E}_{(\parallel/\perp)}$ und $\boldsymbol{\mu}$. $\langle \rangle$ deutet hier die Integration über den gesamten Winkelbereich von ϑ_{obs} an, also die Mittelung aller (gleich gewichteten) azimutalen Lagen von $\boldsymbol{\mu}$ auf der Kegelfläche, die $\langle \cos^2 \vartheta_{\text{obs}} \rangle = 1/2$ ergibt.

3.2.1.1 Anisotropie durch Photoselektion

Ein linear-dichroitischer Effekt entsteht nur bei anisotropen Proben. Eine makroskopische Orientierung der Probe kann durch mechanischen, elektrischen oder magnetischen Einfluss

¹ Die hier vorgestellte Theorie beschreibt auch polarisierte Fluoreszenzmessungen, statt der Absorptionsänderungen sind Intensitätsänderungen der Emission zu betrachten.

sowie durch Photoselektion herbeigeführt werden. Die letztgenannte Technik wurde hier angewandt.

Isotrop verteilte Komponenten, wie sie in den nachfolgend beschriebenen Experimenten mit PS II-Proteinen in Lösung gegeben sind, werden mit linear polarisiertem Licht (\mathbf{E}_{exc}) angeregt. Mit schmalbandiger, nichtsättigender Anregung wird dabei versucht, eine kleine – anisotrope – Teilmenge im Protein zu selektieren, im einfachsten Fall nur ein spezifisches Antennenpigment (zum Sättigungsverhalten siehe Junge & DeVault (1975b)).

Die Übergangsdipolmomente der selektierten Antennenpigmente liegen in kegelförmiger Anordnung mit Öffnungswinkel φ_{exc} um die z-Achse, die durch die Polarisationsrichtung des Anregungslichtes definiert sei, mit einer Verteilung $f(\varphi)$ vor. Geht man von einer zu (3.2) analogen Gleichung aus, folgt nach Mittelwertbildung ($\langle \rangle$) die maximal durch Photoselektion erzielbare Anisotropie:

$$r_{exc} = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \varphi_{exc} - 1) \quad \Rightarrow \quad \langle r_{exc} \rangle = \frac{2}{5} \quad (3.3)$$

Die Integration des Orientierungsfaktors $\langle \cos^2 \varphi_{exc} \rangle$ erfolgt dabei gewichtet mit der Verteilungsfunktion $f(\varphi_{exc}) = \cos^2 \varphi_{exc} \sin \varphi_{exc}$, welche die Anregungswahrscheinlichkeit, der erste Term, mit der Antennenanzahl in einem infinitesimalen Winkelelement ($\sin \varphi_{exc}$) kombiniert. Der maximale Orientierungsfaktor (in z-Richtung) ist $\frac{3}{5}$ bei Anregung isotroper Proben durch Photoselektion gegenüber 1 bei makroskopischer Ausrichtung. Daraus resultiert die Verminderung des Anisotropiefaktors um $\langle r_{exc} \rangle$.

Ein angeregter und ein beobachteter Dipol Der linear-dichroitische Effekt durch Photoselektion wird bestimmt durch die Produkte $\mathcal{P}_{exc} \mathcal{P}_{obs}^{\parallel} \sim (\mathbf{E}_{exc} \cdot \boldsymbol{\mu}_{exc})^2 \cdot (\mathbf{E}_{obs} \cdot \boldsymbol{\mu}_{obs})^2$ und $\mathcal{P}_{exc} \mathcal{P}_{obs}^{\perp}$ eines Paares aus angeregtem und beobachtetem Dipol. Unter der Annahme, es gäbe nur jeweils einen Anregungs- und einen Beobachtungs-Dipol, ergibt sich aus der vorhergehenden Darstellung (Gleichungen (3.2) und (3.3)) mit dem Winkel $\alpha = \angle(\boldsymbol{\mu}_{exc}, \boldsymbol{\mu}_{obs})$ der bei Photoselektion gemessene Anisotropieparameter⁽²⁾:

$$r = \frac{1}{5} (3 \cos^2 \alpha - 1) \quad (3.4)$$

Daraus resultieren die Grenzwerte von $r = 0.4$ für eine parallele und $r = -0.2$ für eine orthogonale Ausrichtung von angeregtem zu beobachtetem Dipol (entsprechend dichroitischen Verhältnissen von DR = 3 bzw. 0.5).

Detektion von überlagerten Absorptionskomponenten Der gemessene Anisotropieparameter bei einer Wellenlänge kann als Summe der Anisotropien der beobachteten Einzelkomponenten gewichtet mit ihrem relativen Beitrag zur totalen Absorptionsänderung beschrie-

² Die implizite Herleitung ist: $r = \langle r_{exc} \rangle r_{obs}(\alpha)$ (s. bei Thulstrup & Michl (1989) Eigenschaften von Sauepe Matrizen). Eine explizite Berechnung von $\mathcal{P}_{exc} \mathcal{P}_{obs}^{\parallel}$ und $\mathcal{P}_{exc} \mathcal{P}_{obs}^{\perp}$, im Wesentlichen das Ausführen der Skalarprodukte unter Transformation vom Labor- in das pigmentfeste Koordinatensystem, ist bei Schaffernicht (1980) zu finden.

ben werden (Junge et al., 1977; Schaffernicht, 1980):

$$r_{\text{ges}}(\lambda) = \sum_{i=1}^N f_i(\lambda) r_i, \quad \begin{array}{ll} f_i(\lambda) & : \text{relativer Anteil der Komponente } i \\ r_i & : \text{Anisotropieparameter der Komponente } i \\ N & : \text{Anzahl der spektralen Komponenten} \end{array} \quad (3.5)$$

Mit den totalen Absorptionsänderungen $\Delta A_{\text{T}}^i(\lambda)$ und $\Delta A_{\text{T}}^{\text{ges}}(\lambda) = \sum_i \Delta A_{\text{T}}^i(\lambda)$ kann man die eben eingeführten Größen so ausdrücken:

$$f_i(\lambda) = \frac{\Delta A_{\text{T}}^i(\lambda)}{\Delta A_{\text{T}}^{\text{ges}}(\lambda)}, \quad r_i = \frac{\Delta A_{\parallel}^i(\lambda) - \Delta A_{\perp}^i(\lambda)}{\Delta A_{\text{T}}^{\text{ges}}(\lambda)}$$

Aus numerischen Anpassungen von Anisotropiedaten $r_{\text{ges}}(\lambda)$ mit mehreren spektralen Komponenten, wobei die relativen Anteile f_i im Zusammenhang mit Ergebnissen aus Absorptionsmessungen bei sättigender Anregung festgelegt werden, können die individuellen Anisotropieparameter r_i gewonnen werden.

Im Allgemeinen erwartet man bei einer Wellenlänge λ_p , bei denen die Gesamtabsorption die Nulllinie kreuzt, eine Polstelle der Gesamtanisotropie. Wenn aber in diesem Wellenlängenbereich nur (oder überwiegend) Komponenten $j^{(1)}, j^{(2)}, \dots$ mit *identischen* Werten der individuellen Anisotropieparameter ($r_{j^{(1)}} = r_{j^{(2)}} = \dots = r$) zum Spektrum beitragen, kompensieren sich ΔA_{\parallel} und ΔA_{\perp} unabhängig von der Wellenlänge gleichförmig und es folgt ein konstanter Wert $r_{\text{ges}}(\lambda \rightarrow \lambda_p) \simeq (f_{j^{(1)}}(\lambda) + f_{j^{(2)}}(\lambda) + \dots) r = r$.

Anregung mehrerer Antennenpigmente Die Verallgemeinerung für mehrere Antennenpigmente ergibt eine zusätzliche Summierung mit Summanden, die gegenüber (3.5) auch den jeweiligen relativen Beitrag einzelner Antennen beinhalten (Schaffernicht, 1980).

Eine geometrische Annahme über die Lage der Antennendipole vereinfacht die Betrachtung: die Lage auf einem Kegelmantel (Öffnungswinkel β). Sie schließt die Spezialfälle eines Anregungsdipols ($\beta = 0^\circ$) und einer Dipolebene ($\beta = 90^\circ$) mit ein. Der Ausdruck für den Gesamt-Anisotropieparameter ist in (Schaffernicht, 1980) explizit für den Fall eines observierten Chl-Dimers berechnet worden, er lautet vereinfacht für eine beobachtete Komponente, die im Winkel α zur Symmetrieachse z des Antennenkegels liegt, folgendermaßen⁽³⁾:

$$r(\alpha, \beta) = r_c(\beta) (3 \cos^2 \alpha - 1) \quad \text{mit} \quad r_c(\beta) = \frac{1}{10} (3 \cos^2 \beta - 1) \quad (3.6)$$

Abbildung 3.1 illustriert die geometrische Anordnung und den Wertebereich des Anisotropieparameters in Abhängigkeit zu den beiden Winkeln. Bei Verwendung der Kegelgeometrie enthält r_c ebenfalls einen Faktor der Form $3 \cos^2(\angle) - 1$. Beim sogenannten „magischen Winkel“ von etwa 54.7° wird dieser Term Null. Bei entsprechender Winkelstellung vom observierten Dipol zum angeregten Pseudo-Dipol z oder aber des Antennenkegels erscheint die Probe somit isotrop.

Für eine „Antennenebene“ (bei der z die Richtung der Normalen angibt) und einem beobachteten Dipolübergang resultiert demnach ein maximaler Wertebereich $r = -0.2 \dots 0.1$

³ Dieser Ausdruck folgt implizit auch aus den Gleichungen (3.2) und (3.3): $r(\alpha, \beta) = r_{\text{exc}}(\beta) \langle r_{\text{exc}} \rangle r_{\text{obs}}(\alpha)$.

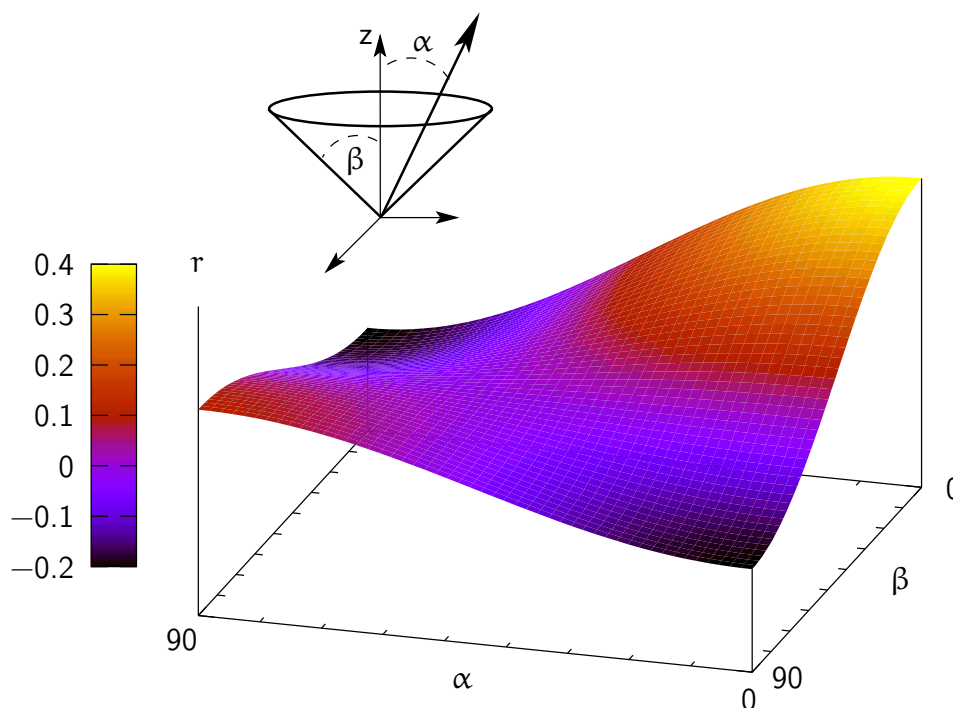


Abbildung 3.1: Anisotropie bei Anregung eines Antennensystems mit kegelförmiger Geometrie (Öffnungswinkel β) der Dipolmomente und Beobachtung eines Übergangsdipolmomentes, das im Winkel α zur Symmetrieachse z liegt.

(DR = 0.5 ... 1.33). Eine einfachere Betrachtung für diesen Spezialfall benutzt Gleichung (3.5): Zwei Antennendipole spannen die Ebene auf, einer liege in Richtung der Projektion des beobachteten Dipols auf die Ebene, der andere senkrecht dazu und damit auch zum beobachteten Übergang. Dies führt auf den gleichen Wertebereich, da $r = \frac{1}{2} r_1 + \frac{1}{2} r_2 = 0.5 r_1 - 0.1$. Dabei enthält r_1 den Winkel, den der beobachtete Dipolvektor zur Ebene einnimmt, in dieser Notation ist der „magische Winkel“ 35.3° .

3.2.1.2 Rotationsdiffusion

Die photoinduzierte Anisotropie wird abgebaut, wenn die Farbstoffmoleküle beweglich sind. Bei isolierten PSII-Kernkomplexen in einem Medium mit der Viskosität η relaxiert der Anisotropieparameter im einfachsten Fall gemäß $r(t) = r_0 \exp(-t/\tau_{\text{rot}})$ mit der Rotationskorrelationszeit einer Kugel (Perrin, 1936):

$$\tau_{\text{rot}} = \frac{\eta V}{k_B T} \quad (3.7)$$

V ist das hydrodynamische Volumen des Proteins: $V = m(\hat{v} + h)$, wobei m die molekulare Masse, $\hat{v} = \rho^{-1}$ das spezifische Volumen (bzw. die reziproke Dichte) und h der Anteil der Hydrathülle des Proteins ist (Lakowicz, 1986). Das Abklingverhalten für Geometrien mit mehreren Symmetrieelementen (z.B. Ellipsoide), deren Rotationsdiffusion mit der entsprechenden Anzahl von Koeffizienten beschrieben wird, ist multiexponentiell (Näheres siehe

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten werden hauptsächlich Absorptionsänderungen detektiert, die auf die stärkste Anregungsbande von Chl *a* im Roten, Q_y, zurückzuführen sind. Der Index gibt die Richtung des Übergangsdipolmoments im Porphyrin-/Chl-Achsensystem (Abbildung 3.2) gemäß des Gouterman-Modells an. Für den Winkel ρ , der im Uhrzeigersinn von der X-Achse, die durch C7 verläuft, ausgehend die Lage von μ angibt, wurden Werte im Bereich von 70–110° experimentell bestimmt, siehe Hoff & Deisenhofer (1997, Kap. 8.2 u. 9.3) und Garab (1997) sowie darin genannte Referenzen.

3.2.2.2 Auswertung von Differenz-Absorptionsspektren

Numerische Anpassungen der gewonnenen Spektren erfolgten mittels Gaußscher Glockenkurven:

$$\Delta A(\lambda) = a \exp\left(-\frac{1}{2} \left(\frac{\lambda - \lambda_c}{\sigma}\right)^2\right), \quad \begin{array}{l} a : \text{Zentralamplitude} \\ \lambda_c : \text{Zentralwellenlänge} \\ \sigma : \text{Standardabweichung von } \lambda_c \end{array} \quad (3.8)$$

Aus den Kenngrößen dieser Normalverteilung lassen sich die in der optischen Spektroskopie gebräuchliche Angabe für die Breite einer Absorptionsbande, FWHM, sowie die Dipolstärke μ^2 (in Debye², 1 D \approx 3.34*10⁻³⁰ C m) des elektronischen Überganges berechnen (Shipman, 1977; Pearlstein, 1991):

$$\begin{aligned} \text{FWHM} &= 2\sqrt{2\ln(2)}\sigma \approx 2.35\sigma \\ \mu^2 &= \frac{3\ln(10)hc\epsilon_0}{2\pi^2N_A} \int \theta(\lambda)\epsilon(\lambda) d(\ln\lambda) \quad (\text{SI-Einheiten}) \\ \mu^2 / \text{D}^2 &\approx 9.19 \times 10^{-3} \sqrt{2\pi}\theta \epsilon(\lambda_c) \frac{\sigma}{\lambda_c} \quad (\epsilon \text{ in } \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}, \theta \text{ Mediumkorrektur}) \\ &\approx 0.008 \epsilon(\lambda_c) \frac{\text{FWHM}}{\lambda_c} \quad (\epsilon \text{ in } \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \end{aligned}$$

Für die hier angegebenen Näherungen für μ^2 ist aus der Zentralamplitude a aus der Anpassung von Absorptionsdaten die molare Extinktion $\epsilon(\lambda_c)$ zu berechnen und in der üblichen Einheit $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ anzugeben. Es wurde für den Korrekturfaktor, der mit den dielektrischen Eigenschaften des Lösungsmittels zusammenhängt, ein konstanter Wert angenommen. Für die unterste Gleichung ist $\theta = 0.83$ gewählt worden, wie er von Shipman (1977) für Diethylether berechnet wurde; denn die Proteinmatrix besitzt eine vergleichbare optische Dielektrizitätszahl ($\epsilon_{\text{opt}} \approx 2.2\text{--}2.4$, Krishtalik & Cramer (1996)). Für die Dipolstärke der Q_y-Bande von Chl *a*, bereinigt um Lösungsmittelleffekte, ist in unterschiedlichsten Medien ein nahezu konstanter Wert gefunden worden ($\mu^2\theta^{-1} \sim 20\text{--}24 \text{ D}^2$). Für monomere Chlorophyll-Banden im PS II wird eine Dipolstärke von 17–19 D^2 , wie für Chl *a* in Diethylether, angenommen.

3.2.2.3 Exzitonische Kopplung

Zwei benachbarte Chromophore, deren angeregte vibronische Zustände wechselwirken, ein Dimer, bilden ein Zwei-Niveau-System (ν_1, ν_2) mit Resonanz-Wechselwirkung J (siehe z.B.

Cohen-Tannoudji et al., 1977); der Kopplungseffekt ist dabei am größten, wenn die beiden Energieniveaus identisch sind. In der einfachsten Form der Theorie (Pearlstein, 1991), in der von stark interagierenden, als Punktdipole⁽⁴⁾ aufgefasste, Übergangsmomente (mit identischer Dipolstärke μ^2) mit einem Abstand d ausgegangen wird, findet man bei einer ursprünglichen Zentralfrequenz (Monomer: ν) der Absorption eine Aufspaltung um $2J$:

$$\nu_{\pm} = \nu \pm J \quad \text{mit} \quad J = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \kappa \frac{\mu^2}{d^3} \quad \left(J / \text{cm}^{-1} \approx 5.04 \kappa \frac{\mu^2}{d^3} \quad (\mu \text{ in D, } d \text{ in nm}) \right)$$

Die Aufspaltung hängt insbesondere vom Abstand der beiden Pigmente ab, sowie vom Orientierungsfaktor κ ⁽⁵⁾, der charakteristisch für Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ist (siehe z.B. Atkins, 1996). Wie bei Pearlstein (1991) werden hier Abschirmungseffekte des Proteins vernachlässigt, d.h. $\epsilon_r = 1$, siehe dazu aber (Louwe et al., 1997) und Abschnitt 3.5.2 in der Diskussion. Bei Betrachtung eines Chl-Dimers gilt für den Fall größtmöglicher Kopplung, also paralleler Stellung der Dipolübergangsmomente, und Winkel θ zwischen den Chl-Ringen und dem Mg-Mg-Verbindungsvektor: $\kappa = 1 - 3 \cos^2 \theta$. Für die exzitonischen Eigenzustände gilt: Die Dipolstärken können sich maximal zur zweifachen Stärke eines Monomers addieren; denn $\mu_{\pm}^2 = \mu^2 \pm \mu_1 \cdot \mu_2$. Für den bezüglich der Dipolstärken symmetrischen Fall, in dem die monomeren Dipolvektoren senkrecht aufeinander stehen, resultiert eine um 45° gedrehte Anordnung der dimerischen Dipolübergangsmomente („ $\uparrow + \rightarrow$ “ und „ $\uparrow - \rightarrow$ “). Da J dann aber klein ist, wird meist nur eine Verbreiterung von Absorptionsbanden detektiert. Bei *paralleler* Stellung der Dipol- und des Verbindungsvektors gibt es nur eine exzitonische Bande mit $\mu_{+}^2 = 2\mu^2$, die bei Betrachtung von 2 Chl a im Abstand von 10 \AA eine maximale Rotverschiebung von etwa 10 nm aufweist ($J \approx 220 \text{ cm}^{-1}$, μ^2 ohne Mediumkorrektur). Geht man von der exzitonischen Kopplung des *special pair* in *Rhodobacter sphaeroides* aus, $\sim 500 \text{ cm}^{-1}$ (Hoff & Deisenhofer, 1997), so wird bei *analoger Ausrichtung* der Übergangsmomente im PSII (bei um Faktor ~ 1.8 geringeren Dipolstärke als BChl a, Shipman (1977)) – aber vergrößerter Distanz der Chlorine ($8.3\text{--}10.0 \text{ \AA}$ statt 7.6 \AA) – eine Kopplung $J \approx 120\text{--}210 \text{ cm}^{-1}$ erwartet.

Für PSII könnte der Grenzfall schwacher Kopplung (im Vergleich zum Abstand der monomerischen Energieniveaus ν_1, ν_2) anwendbar sein. Setzt man $\nu_m = \frac{1}{2}(\nu_1 + \nu_2)$ sowie $\Delta = \frac{1}{2}(\nu_1 - \nu_2)$, so folgt für $\Delta \gg |J|$ für das „gekoppelte“ System nur wenig gestörte Energieniveaus und Zustände (Cohen-Tannoudji et al., 1977):

$$\nu_{\pm} \approx \nu_m \pm \Delta \left(1 + \frac{1}{2} \left(\frac{J}{\Delta} \right)^2 \right), \quad |\psi_{+/-}\rangle \approx |\varphi_{1/2}\rangle \pm \frac{|J|}{2\Delta} |\varphi_{2/1}\rangle$$

Dann folgt eine nur wenig modifizierte Lage der Dipolübergangsmomente. Das Resonanzphänomen führt zwar zur (geringen) Separation der Energieniveaus, die Veränderung wird aber deutlich unterhalb der inhomogenen Verbreiterung der Monomer-Banden liegen.

4 Nach Pearlstein (1991) macht diese Näherung in vielen Fällen auch noch Sinn für Chl mit einem zentralen Abstand in der Größenordnung des Durchmessers eines Tetrapyrrolringes.

5 $\kappa = \hat{\mu}_1 \cdot \hat{\mu}_2 - 3(\hat{\mu}_1 \cdot \hat{d})(\hat{\mu}_2 \cdot \hat{d})$, wobei $\hat{\mu}_1, \hat{\mu}_2$ und \hat{d} Einheitsvektoren in Richtung der zwei Dipole und der Verbindungslinie sind.

3.2.2.4 Elektrochromie

Durch ein elektrisches Feld E werden elektronische Zustände beeinflusst, ihre Energieniveaus verschieben sich aufgrund ihres permanenten und feldinduzierter Dipolmomente. Bei optischer Anregung geht dann der Unterschied dieser Dipolmomente zwischen Grund- und angeregtem Zustand ein. Im Differenzspektrum ist die Verschiebung von Absorptionsbanden zu beobachten. Wenn die feldinduzierte Komponente bei Chl a vernachlässigt wird, gilt für die Bandenverschiebung: $\Delta\lambda \propto \Delta\mu_p \cdot E$.

Man spricht von lokaler Elektrochromie, wenn dieser elektrochrome oder Stark-Effekt durch Ladungsverschiebung innerhalb eines Proteins verursacht wird, und setzt diesen Begriff von einer „transmembranen“ Elektrochromie ab, bei der das elektrische Feld zwischen zwei leitenden Phasen besteht, die durch eine dielektrische Membran getrennt sind.

Bei Annahme einer Punktladung und unter Verwendung des Coulombschen Gesetzes mit einer effektiven Dielektrizitätskonstanten folgt mit der Distanz zwischen der Ladung und einem Chromophor mit einer Zentralwellenlänge $\lambda_c = 680$ nm die erwartete Bandenverschiebung (Mulikdjanian et al., 1996):

$$\Delta\lambda / \text{nm} \approx 1119 \frac{|\Delta\mu_p| \cos(\angle(\Delta\mu_p, E))}{\epsilon_r d^2} \quad (\mu \text{ in D, } d \text{ in \AA}) \quad (3.9)$$

Für monomeres Chl a wurde $|\Delta\mu_p| \sim 1$ D bestimmt (Krawczyk, 1991). Der Unterschied der permanenten Dipolmomente im Grund- und Q_y -Zustand resultiert im Wesentlichen aus einer Nettoverschiebung der Elektronendichte von Ring III nach Ring I (Fajer et al., 1992). Damit hat $\Delta\mu_p$ etwa die Ausrichtung der Y_2 -Achse in Abbildung 3.2, oder etwas weiter zum Ring V verdreht: Das Q_y -Dipolübergangsmoment und $\Delta\mu_p$ schließen einen Winkel von 10–20° ein.

Eine positive Ladung über Ring I oder Ring III stabilisiert sowohl Grund- als auch angeregten Zustand. Die Absenkung des Energieniveaus des Zustandes mit relativ höherer Elektronendichte ist stärker: Wirkt die Ladung vorwiegend auf Ring I ($\Delta\mu_p$ und E liegen etwa parallel), ist dies der angeregte Zustand. Es resultiert eine Rotverschiebung. Für die Lokalisation einer positiven Ladung bei Ring III, $\Delta\mu_p$ und E liegen annähernd antiparallel, folgt dementsprechend eine Blauverschiebung der Q_y -Bande.

3.2.2.5 Zur Interpretation der Differenzspektren – Terminologie

Monomeres Chl: 1 ausbleichende Bande, also mit negativer differentieller Extinktion ($\Delta\epsilon$), im roten Spektralbereich.

Elektrochrome Verschiebung: Zwei sich bezüglich des Betrages der Amplitude, der Breite und des Anisotropieparameters gleichende Banden mit entgegengesetztem Vorzeichen von $\Delta\epsilon$.

Exzitonic gekoppelte Chl: 2 (für 2 Chl, allgemein: N für eben so viele Chl) ausbleichende Banden mit (möglicherweise) unterschiedlichen Anisotropieparametern.

Oxidation eines dieser Chl: Das Kation trägt mit $\lesssim 5$ D² (Chauvet et al., 1981) geringfügig zum Spektrum im Roten bei und es erscheint eine Doppelbande bei

735 und 825 nm (siehe auch Abschnitt 1.4.2.1 und (Mathis & Setif, 1981)). Im Roten erscheint das zweite Chl (bzw. N – 1). Der Beitrag von Q_A^-/Q_A am Differenzspektrum im roten Spektralbereich ist mit 1% für $\lambda < 680$ nm sowie 5% für $\lambda > 680$ nm (Stewart et al., 2000) vernachlässigbar.

Triplettbildung: Analog zur Oxidation erscheint $^1\text{Chl } a$. $^3\text{Chl } a$ absorbiert bei etwa 750 nm (Mathis & Setif, 1981).

3.3 Material und Methoden

3.3.1 Probenmaterial

3.3.1.1 Versuche bei Raumtemperatur

Die PS II-Kernkomplexe wurden wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben hergestellt. Die Probenansätze blieben für die im Folgenden beschriebenen Versuche bei Raumtemperatur im Vergleich zu Abschnitt 2.3.1 bis auf folgende Modifikationen unverändert:

- Das Medium enthielt bis zu ca. 60% Glycerin (v/v) zur Verlangsamung der Rotations-Korrelationszeit (siehe Abschnitt 3.2.1) durch Steigerung der Viskosität von 10^{-3} auf $10^{-2} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$.
- Für Messungen im Roten wurde die Chlorophyllkonzentration auf 1–5 μM reduziert, so dass die Messlichttransmission ca. 10% war (siehe Abschnitt 1.3).

3.3.1.2 Versuche bei Tieftemperatur

Für die Experimente bei 77 K wurden PS II-Kernkomplexe verwendet, bei denen das Manganzentrum bei Raumtemperatur intakt war.

Die PS II-Proben befanden sich in Messpuffer A (Tabelle A.2), wobei dieser zusätzlich soviel Glycerin als Kryoprotektor enthielt, dass die Endkonzentration mindestens 50% (v/v) betrug. Damit war die Probe optisch klar, da solche Glycerin-/Wassergemische bei Tieftemperaturen glasartig erstarren (Franks, 1985). Als Puffer wurde MES, eingestellt auf pH = 6.5, verwendet.

Der Chlorophyllgehalt der Proben lag für Messungen im Roten bei 10–12 μM , für Messlichtwellenlängen im NIR bei 50–200 μM .

Offene Zentren Für Messungen des $\text{P}_{680}^+ \text{Q}_\text{A}^- / \text{P}_{680} \text{Q}_\text{A}$ -Differenzspektrums wurde der frische Probenansatz 15 min bei Raumtemperatur bei 3 mM Ferricyanid inkubiert und dann direkt in die gekühlte Kryostatkammer gebracht. Es gibt drei sekundäre Donatoren für P_{680}^+ , β -Carotin, ein Chl a und Cyt b_{559} (Hillmann, 1997). Wird Cyt b_{559} durch Ferricyanid voroxidiert, wird der Anteil der Konkurrenz zur $\text{P}_{680}^+ \text{Q}_\text{A}^-$ -Rekombination im Einzelschuss von $\leq 10\%$ auf $\leq 5\%$ verringert. Ebenso wird dadurch bei Messungen mit Blitzfolgen von mehreren 100 Schuss (in der eben genannten Referenz mit 4 Hz Repetitionsfrequenz) die dann quasistabile Population, in der P_{680}^+ mit Q_A^- rekombiniert, von 13% auf 23% erhöht.

Geschlossene Zentren Zur Generierung des Zustandes ${}^3\text{P}_{680}$ wurde Q_A mit frisch angesetztem Dithionit (4 mM) sowie 100 oder 200 μM Benzylviologen als Mediator doppelt reduziert. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an (van Mieghem et al., 1992), die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 10 min im Dunkeln unter anaeroben Bedingungen (Argon- oder Helium-Atmosphäre), danach wurde die Probe (bei schwachem Licht) direkt in die gekühlte Kryostatkammer gebracht.

3.3.2 Aufbau der Messapparatur

Die im Folgenden beschriebenen Photosselektions-Experimente erfordern Anregungslicht mit hoher Amplitudenstabilität und – zumindest für die Sondierung eines geeigneten Bereiches – durchstimmbarer Wellenlänge λ_{exc} .

Für alle nachfolgend beschriebenen Experimente ist ein Nd:YAG-Laser „Infinity“ von Coherent zum Einsatz gekommen. Dieser Laser besteht aus einem Laserdioden-gepumpten, Güte-geschalteten Ringlaser, der einen 8 ns TEM₀₀-Puls mit etwa 30 μJ liefert, und einer nachgeschalteten, aufwendigen Verstärkerstufe mit zwei von einer Blitzlampe gepumpten Nd:YAG-Stäben, die vom Lichtpuls jeweils zweimal durchlaufen werden (siehe Abbildung 3.3). In diesem Verstärkeraufbau sorgt eine Lochblende (*spatial filter*) für die Unterdrückung von Hintergrund-Emission und Abbildungen höherer Ordnung. Thermisch induzierte Doppelbrechung und dadurch verursachte Phasenverschiebungen in den Nd:YAG-Stäben wird durch eine zwischengeschaltete 90°-Drehung der Polarisation und einer speziellen optischen Abbildung (*relay imaging*, Umkehr der coaxialen Koordinaten) kompensiert. Durch Reflektion im Phasen-konjugierenden Spiegel, der durch stimulierte Brillouin-Streuung (SBS) in Freon induziert wird, verläuft der auf 3 ns verkürzte Puls den gleichen optischen Weg zurück, aber mit invertierten Wellenfronten, so dass Phasen-Störungen, die beim ersten Durchgang auftraten, korrigiert werden. Aufgrund des zweimaligen Durchgangs durch die Viertelwellen-Verzögerungsplatte ist die Polarisation nun am Dünnfilm-Polarisator um 90° gedreht. Der so ausgekoppelte Laserpuls besitzt ein *top-hat* Intensitätsprofil im Nahfeld, welches ideal zur Generierung von Harmonischen genutzt werden kann. Die typische Langzeitstabilität der Pulsenergie (1–10 Hz Repetition) liegt bei diesem System um 0.3%

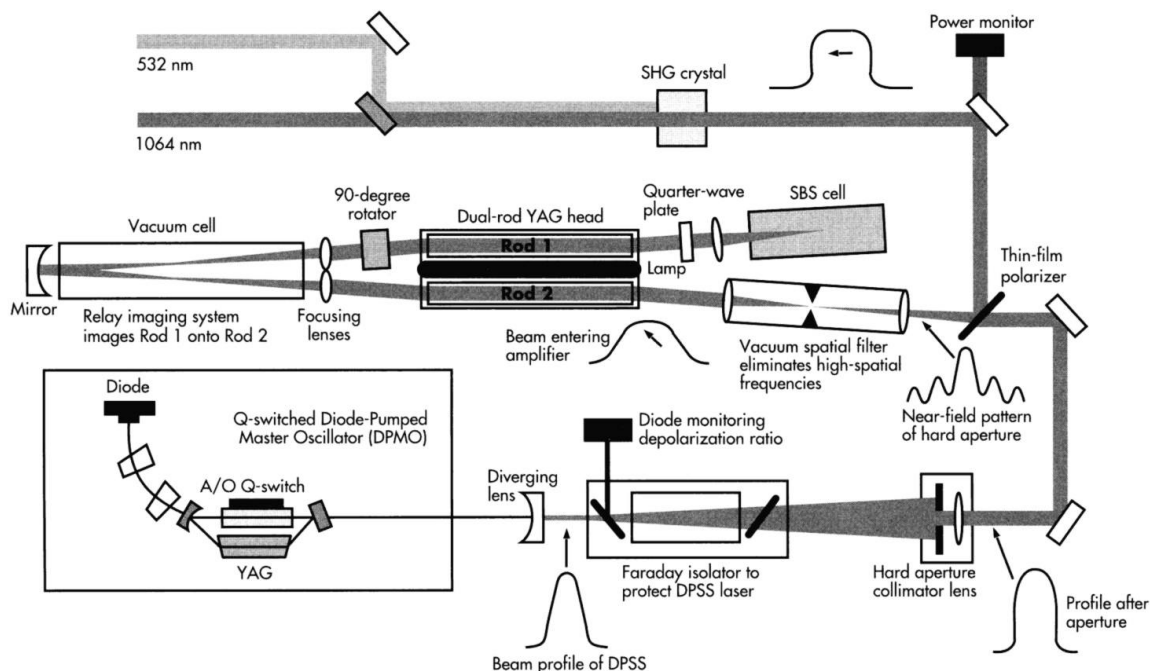


Abbildung 3.3: Optisches Layout des Coherent Infinity Nd:YAG-Pulslasers. Erläuterungen siehe Text.

(Standardabweichung, gemessen mit internem Sensor) bei der Grundwellenlänge (1064 nm) und höchstmöglicher Pulsenergie (500 mJ). Die maximalen Pulsenergien bei 532 nm (SHG, *second harmonic generation*⁽⁶⁾) und 355 nm (THG, Frequenzmischung von Grundwellenlänge und 2. Harmonische⁽⁶⁾) betragen 350 bzw. 230 mJ. Energiereduzierung erfolgte aus Stabilitätsgründen mit einem Strahlteiler.

Dieser Laser wurde als Pumplichtquelle eingesetzt für die Generierung anderer Anregungswellenlängen mittels eines optisch-parametrischen Oszillators (OPO⁽⁶⁾, Fa. LAS). Die Konversionseffizienz⁽⁷⁾ dieses Systems liegt z.B. bei 485 nm und $E_{\text{pump}} = 100$ mJ bei ca. 20%. Bei der in den Experimenten überwiegend zur Anregung genutzten Wellenlänge $\lambda_{\text{exc}} \sim 700$ nm ist es aus prinzipiellen Gründen besser, die Pumpwellenlänge von 532 nm zu wählen. Aus Effizienzgründen wird hier aber dennoch nur eine Ausbeute von 10 mJ bei einer Pumpenergie von 200 mJ – im Bereich der Zerstörschwelle der OPO-Resonatorspiegel – erreicht. Der resultierende Strahl ist divergent (~ 10 mrad) und vom Strahlquerschnitt gesehen räumlich leicht inhomogen bezüglich Intensität und Wellenlänge. Zum Anregen wurde die Probenküvette so ausgeleuchtet, dass die Inhomogenität bezüglich der Intensität vernachlässigbar erschien, die Ungenauigkeit bezüglich der Wellenlänge lag in der Größenordnung von 1–2 nm.

Bei linear-dichroitischen Messungen ist zur Drehung der Polarisationsrichtung eine für den jeweiligen Wellenlängenbereich geeignete Halbwellen-Verzögerungsplatte zwischen Laserdiode und Probe installiert ($\lambda/2$, s. Abbildung 1.8, nullter Ordnung aus Polymer (Fa. Newport) oder Quarz (Fa. Halle Nachfl.)).

Die Anregungsenergie wurde mittels Neutralgraufilter so weit reduziert, dass maximal 15% der PS II-Zentren angeregt wurden.

Da bei diesen Experimenten die Amplitudenbestimmung der Absorptionsänderung im Vordergrund stand, wurden für die Berechnung von ΔA (mittels Gleichung (1.5) und (1.2)) bei Verwendung von Kompensationsschaltungen im Messverstärker Schwankungen um die Nulllinie berücksichtigt. U_0 wurde also nicht einfach gleichgesetzt mit der Kompensationsspannung (U_{set} , unter Berücksichtigung der Verstärkung), sondern die Abweichung ΔU_0 des „Vorlaufs“ von 0 V wurde durch lineare Anpassung der Daten für $t < 0$ ermittelt und mit einbezogen: $U_0 = U_{\text{set}} + \Delta U_0$.

3.3.2.1 Versuche bei Raumtemperatur

Für Messungen im NIR ist bis auf das Laser-OPO-System der in Abschnitt 1.4.2.1 beschriebene Aufbau verwendet worden. Das in Abbildung 1.8 gezeigte Laserdiodensystem LD bestand für Messlichtwellenlängen von 670–690 nm aus selektierten Laserdioden (montiert in einem temperierbaren LD-Kollimatorsystem von Schäfer & Kirchhoff) und einem breitbandigen Faraday-Rotator (Gsänger FR700BB). Als Treibergerät diente zum Teil ein spezieller LD-Pulsgenerator von Avtech Electrosystems (AV-155A-PS), ansonsten wurde das in Abschnitt 1.4.2.1 beschriebene Gerät extern mittels eines Pulsgenerators (SystronDonner) moduliert betrieben; die Pulslängen waren typisch 200 μs . Der durch Temperierung von 0–45°C

6 Eine grundsätzliche Erklärung dieser Verfahren aus der nichtlinearen Optik findet man z.B. in (Shen, 1984).

7 Der Energieanteil des nicht genutzten, langwelligeren Anteils, der *Idle*-Welle⁽⁶⁾, ist in die Betrachtung nicht mit einbezogen worden.

durchstimmbare Wellenlängenbereich pro Laserdiode liegt bei maximal 8 nm.

3.3.2.2 Versuche bei Tieftemperatur

Für Versuche bei Tieftemperatur wurde ein Stickstoff-Badkryostat eingesetzt (Oxford, Optistat DN, mit 3 Spektrosil B Fenstersätzen und Temperaturregler ITC601) mit Helium als Austauschgas. Das Isolationsvakuum erzeugte ein Pumpstand von Leybold (Diffusionspumpe DO251 mit einer Drehschieber-Vorvakuumpumpe) oder ein Turbomolekular-Drage-Pumpstand von Pfeiffer (TSH071E, mit einer Membran-Vorvakuumpumpe). Die Temperatur des Kupferkopfes der Kryostat-Probenkammer war während der Messungen konstant mit Werten von 77.2–77.4 K, nach Auskunft des Herstellers liegt dann die Temperatur der Probe maximal 0.1 K höher. Es wurden Kunststoff-Küvetten mit einer optischen Weglänge von 1 cm eingesetzt.

Das in Abschnitt 3.4.2.1 vorgestellte Absorptionsspektrum bei isotroper, sättigender Anregung (532 nm, 150 mJ im IR, abgeschwächt mit Graufilter OD 0.45) wurde mit einem klassischen Aufbau analog zu Abbildung 1.7 durchgeführt (hier nicht aufgeführte Details sind in Abschnitt 2.3.2.2 beschrieben). Zur Wellenlängenselektion diente ein Monochromator sowohl vor (Amko, $\Delta\lambda = 6$ nm) als auch hinter der Probe (Spex, 2.5 nm). Da in dieser Konfiguration die Messlichtintensität sehr gering ist, wurde als Detektor ein rot-/NIR-sensitiver Photomultiplier mit 12 Dynoden eingesetzt (THORN EMI 9817GB, ~ 1.2 kV Kathodenspannung), so dass über einem Abschlusswiderstand von $R_a = 100$ k Ω eine Spannung U_0 von ca. 0.8–1.2 V erreicht werden konnte. Es erfolgte eine Mittelung über 5 Einzelmessungen im Abstand von 2 s.

Messungen mit linear polarisiertem Licht Messungen mit linear polarisiertem Messlicht erforderten für ein genügend hohes Signal-Rausch-Verhältnis einen Laserdioden-gestützten Aufbau, ähnlich dem im vorhergehenden Abschnitt 3.3.2.1 beschriebenen. Die in Abschnitt 3.4.2 vorgestellten Resultate wurden jedoch mit einem Laserdioden-System erzielt, welches durch ein Beugungsgitter als externer Resonator⁽⁸⁾ stabiler bezüglich Intensität und Wellenlängenselektion ist (Toptica Photonics, vormals TuiOptics, DL100). Der Durchstimmbereich von Laserdioden (mit Antireflexbeschichtung) verdoppelt sich auf ca. 15 nm (bei 680 nm, Temperaturvariation im Bereich 10–40°C), die Selektion erfolgt durch den Beugungswinkel des Gitters. Die Linienbreiten liegen bei $\lesssim 10$ MHz, Langzeitdriften (12 h) sind spezifiziert mit 300 MHz, und die Unterdrückung von Seitenmoden erfolgt mit typisch 40 dB. Durch den robusten mechanischen Aufbau und die gute Temperaturstabilisierung lässt sich – bei korrekter Justage – ein im Vergleich zum Einsatz von „freilaufenden“ Laserdioden ein sehr stabiler Betrieb im gesamten Wellenlängenbereich realisieren.

Die Genauigkeit der Wellenlängenangaben war limitiert durch die Bestimmung mit einem Monochromator (Spex 1681C, 0.25 mm Spalte), $\Delta\lambda \approx 0.4$ nm. Ein Photoverschluss beschränkte das Messlicht auf Pulsdauern von 100 ms, die Repetitionsfrequenz war 1 Hz, gemittelt wurde über 20–200 Einzelmessungen.

⁸ Aufbau im sog. Littrow-Design: Das am Gitter gebeugte (kollimierte) Laserlicht der ersten Ordnung wird in die Laserdiode zurückgekoppelt, das der nullten Ordnung wird ausgekoppelt.

Die Signaldetektion erfolgte mit einem Photomultiplier (EMI 9801QB, 6 Dynoden), für Messungen im NIR-Bereich wurde eine Photodiode eingesetzt (Centronics OSD300). Zur Signalverstärkung wurde ein Stromverstärker (Keithley 427 bzw. 428) mit Kompensationsstrom verwendet.

Eventuell kann signifikante Depolarisierung des Messlichtes durch Streuung in gefrorenen Proben auftreten. Tests mit einem Folienpolarisator zwischen Probe und Detektor ergaben Restintensitäten bei gekreuzter Polarisation von $\lesssim 1\%$ bis etwa 10% (ohne Probe: 0.2%).

3.4 Ergebnisse

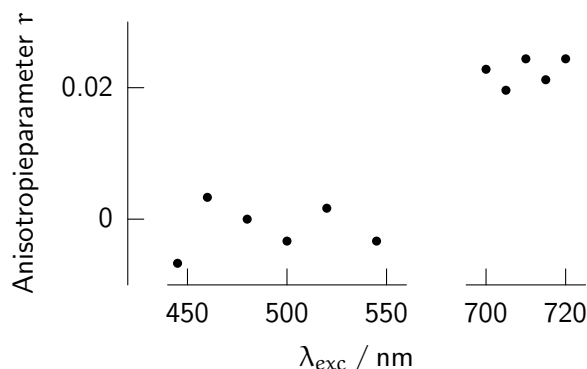
Es wurden Messungen an PS II-Kernkomplexen durchgeführt, die bei Raumtemperatur die spektralen Charakteristika des Zustandes $P_{680}^+Q_A^-/P_{680}Q_A$ im Roten und NIR unter Variation der linearen Polarisation des Messlichtstrahles wiedergaben. Tieftemperatur-Messungen (78 K) wurden analog durchgeführt, sowie ausgedehnt auf geschlossene PS II-Zentren, bei denen der Triplettzustand ${}^3P_{680}$ im roten Spektralbereich beobachtet wurde.

3.4.1 Versuche bei Raumtemperatur

Zu Anfang werden Experimente vorgestellt, die mittels NIR-Messlicht P_{680}^+ detektierten. Zur Evaluierung, für Anregungsspektren und zur Bestimmung von Rotationskorrelationszeiten bietet sich dieser Wellenlängenbereich an wegen der geringen photochemischen Anregung der Probe durch Messlicht und gutem Signal-Rausch-Verhältnis aufgrund geringer Grundabsorption.

Tieftemperatur-Spektren des Zustandes $P_{680}^+Q_A^-/P_{680}Q_A$ zeigen im roten Spektralbereich mehr Einzelheiten als bei Raumtemperatur, wo scheinbar nur eine einzige verbreiterte Bande beobachtet wird (siehe Abbildung 3.9). Eine Gauß-Analyse der Unterbanden ist jedoch auch bei Tieftemperatur-Spektren nicht eindeutig. Deshalb wurde der von der Wellenlänge abhängige Dichroismus als weiterer Marker für spektrale Unterbanden bestimmt.

Abbildung 3.4: Anregungsspektrum der Anisotropie bei der Beobachtungswellenlänge $\lambda_{\text{obs}} = 825 \text{ nm}$.



3.4.1.1 Detektion des Chlorophyll-Kations P_{680}^+

Zur Bestimmung des Anisotropieparameters war der Messablauf folgendermaßen: Eine Messserie bestand aus (mindestens) 4 Einzelmessungen, beginnend mit einer der beiden komplementären Polarisationsrichtungen, \parallel und \perp (Messkurven im Folgenden farblich gekennzeichnet durch — bzw. —), also paralleler bzw. orthogonaler Polarisationsausrichtung vom Messlicht- zum Anregungs-E-Vektor, daran anschließend zwei Einzelmessungen mit gedrehter Polarisation, dann wieder eine Messung bei der ursprünglichen Richtung. Durch einen Vergleich der ersten und letzten Messung konnte festgestellt werden, ob die Signalstabilität ausreichend war.

Auf der Suche nach anisotrop anregbaren Antennenchlorophyllen in PS II-Kernkomplexen wurde das P_{680}^+ -NIR-Signal bei Anregungswellenlängen im Bereich 440–550 nm und 695–

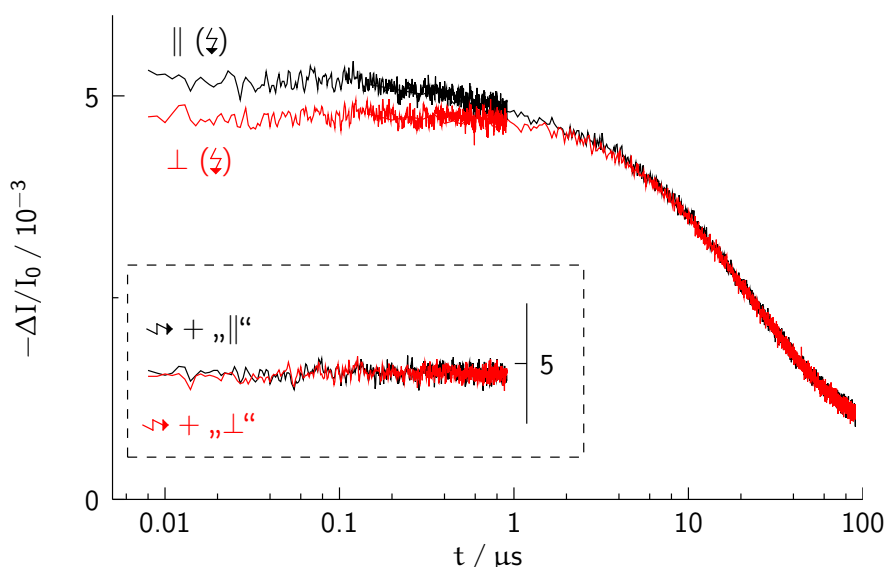


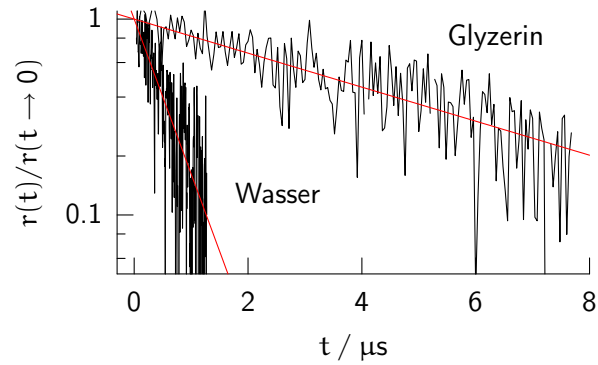
Abbildung 3.5: P₆₈₀⁺-Reduktionskinetiken bei zwei relativen Polarisationen des Anregungs- und Messlichtes: parallel (|| /—) oder orthogonal (⊥ /—), (↺) verdeutlicht hier extra die korrekte Polarisation des Anregungslichtes; λ_{obs} = 825 nm, λ_{exc} = 710 nm. In der Einfügung sind Kontrollmessungen abgebildet, bei denen der elektrische Feldvektor des Laserpulses (\mathbf{E}_{exc}) parallel zum Richtungsvektor des Messlichtes eingestellt war (↗), so dass \mathbf{E}_{obs} und \mathbf{E}_{exc} unabhängig von der Polarisationseinstellung des Messlichtes orthogonal zueinander ausgerichtet sein sollten. Kurzzeitiger Kurvenanteil: 1 ns/P., Bw = 1 GHz. Jede Kurve setzt sich zusammen aus einer Mittelung über 2 Messungen mit jeweils 500 Anregungsblitzen.

720 nm untersucht. Die Ergebnisse (Abbildung 3.4) zeigen, dass die Anregung im langwelligeren Randbereich der Q_y-Bande anisotrop erfolgt. Der Anisotropieparameter beträgt $r \approx 0.023$. Im Gegensatz zum Photosystem I (Junge et al., 1977) ist im PSII eine Polarisations-selektierende Anregung von β-Carotin (bei ~ 450–500 nm) anscheinend nicht möglich – zumindest fehlt ein signifikanter Effekt bei Beobachtung des Chl-Kations. Germano et al. (2001) bestimmten zwei Car in Reaktionszentren, eines parallel, das andere senkrecht zur *in vivo* Membranebene angeordnet. Weitere β-Carotine in den Kernantennen (circa 5, Smith et al., 2002) könnten bei ungünstiger Lage Ursache für erfolglose Photoselektion bei Kernkomplexen sein.

In Abbildung 3.5 sind beispielhaft Reduktionskinetiken gezeigt, aus deren Anfangsamplitude der Anisotropieparameter $r \equiv r(t \rightarrow 0)$, siehe Gleichung (3.1), ermittelt wird. Die hohe Zeitaufösung ermöglichte, Veränderung der Anisotropie bis auf etwa 5 ns nach dem Blitz zuverlässig zu bestimmen, kürzere Zeiten waren aufgrund der Zeitaufösung des Messsystems und Artefakte durch den Laserblitz nicht mess- bzw. auswertbar. Die Extrapolation auf den Anfangswert der Anisotropie erfolgte durch numerische Anpassung der Absorptionskinetiken in einem geeigneten Zeitbereich.

Die mit || bzw. ⊥ gekennzeichneten Kurven setzen sich aus zwei simultanen Messungen mit unterschiedlicher Zeitaufösung zusammen ($t \lesssim 1 \mu\text{s}$ bzw. $t \gtrsim 1 \mu\text{s}$), bei den in der Einfügung dargestellten Messungen wird nur der hochaufgelöste Anteil gezeigt. Mit der in der Einfügung gezeigten Messung, bei der die Polarisation des Anregungslasers um 90°

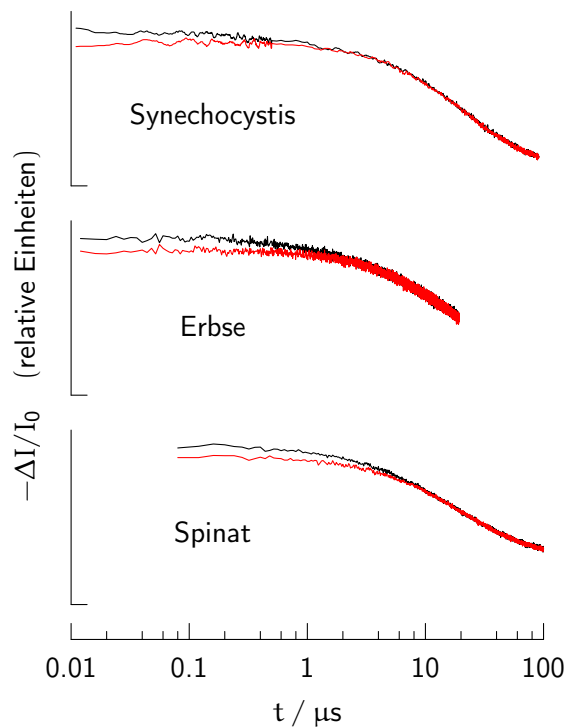
Abbildung 3.6: Zeitliche Entwicklung des Anisotropiefaktors bei PSII-Kernkomplexen (aus Spinat) in Wasser bzw. in 60% (v/v) Glycerin; $\lambda_{\text{obs}} = 825 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 710 \text{ nm}$. (—) Monoexponentielle Anpassung mit Rotationskorrelationszeiten von 500 ns bzw. $5 \mu\text{s}$.



zur sonst verwendeten Richtung gedreht ist (\leftrightarrow), somit parallel zum Richtungsvektor des Messlichtes verläuft, wird überprüft, ob der Aufbau schiefwinklig ist oder ob bei Änderung der Messlicht-Polarisation artifizielle Unterschiede bei den Absorptionsänderungen bestehen (etwa durch nichtlineare Polarisations-Selektivität des Detektors). Dies war im Rahmen der Messgenauigkeit nicht der Fall, da die Kurven, bei denen die Messlicht-Polarisation jeweils der bei den Kurven \parallel bzw. \perp entspricht, übereinander liegen.

In Abbildung 3.6 ist der zeitliche Verlauf des Anisotropieparameters für zwei unterschiedlich viskose Medien dargestellt, wobei der quasi-monoexponentielle Abfall in der halblogarithmischen Auftragung deutlich wird. Die 10-mal größere Viskosität von 60% (v/v) Glycerin (Weast & Astle, 1979) manifestiert sich in der Verlangsamung von τ von $0.5 \mu\text{s}$ in Wasser nach $5 \mu\text{s}$. Die in Abschnitt 3.2.1.2 aufgeführte Abschätzung mit einem typischen Wert für

Abbildung 3.7: Dichroitischer Effekt der P_{680}^+ -Reduktionskinetiken im NIR bei Kernkomplexen aus Spinat, Erbse und *Synechocystis* ($\lambda_{\text{exc}} \approx 710 \text{ nm}$). Die Messungen mit paralleler Polarisation von Mess- und Anregungslicht sind jeweils die Kurven mit größerer Anfangsamplitude. Besondere Messbedingungen: Spinat – 50% (v/v) Glycerin, $B_w = 20 \text{ MHz}$; Erbse, *Synechocystis* – $B_w = 150 \text{ MHz}$. Die Daten aus *Synechocystis* wurden geglättet.



die Proteindichte lässt für dimerisch vorliegende Kernkomplexe eine Rotationskorrelationszeit von 150 ns oder größer erwarten. Die Kernkomplexe liegen somit nicht als Monomere in Lösung vor, weiterhin erscheint der Beitrag der Lösungsmittelhülle signifikant zu sein.

Für ein sphärisches Teilchen berechnet man aus diesen Daten einen Durchmesser von ca. 16 nm (Gleichung (3.7)). Nimmt man als Extremfall ein Ellipsoid (prolate Form) an, bei der das beobachtete Übergangsmoment orthogonal zur langen Symmetrieachse angeordnet ist, muss der kleine Durchmesser immer noch mindestens 13 nm betragen.

STM-Messungen (*scanning tunneling microscopy*) ergaben für dimerische PSII-Kernkomplexe Dimensionen von 23.9×14.4 nm. Bei dieser Technik wird auch die an den Teilchen haftende Detergensschicht detektiert, welche im Fall von β -DM etwa 2.5 nm beträgt (Lukins & Oates, 1998). Die korrigierten Werte sind also 18.9×9.4 nm, was gut mit elektronenmikroskopischen Daten (17.2×9.7 nm, Boekema et al. (1995)) und den längsten Dimensionen im Röntgenstrukturbild (19.0×10.0 nm, Zouni et al. (2001)) übereinstimmt.

Die gefundenen Rotationskorrelationszeiten sind kompatibel mit dimerisch vorliegenden PSII-Kernkomplexen, bei denen das hydrodynamische Volumen eine Detergensschicht, einer Hydrathülle entsprechend (siehe Abschnitt 3.2.1.2), beinhaltet.

In der Abbildung 3.7 sind Messungen analog zu denen in 3.5 gezeigt, die an Präparaten von unterschiedlichen Organismen durchgeführt wurden. Die Präparation von *Synechocystis* sp. PSII-Kernkomplexen wurde von Anna M. Hays zur Verfügung gestellt; es handelte sich hierbei um den in (Hays et al., 1998) beschriebenen Wildtyp (in dieser Präparation ist auch PSI enthalten, welches unter den gewählten Bedingungen aber nicht detektiert wird). *Alle drei Präparationen, aus höheren Pflanzen und Cyanobakterium, zeigen im Rahmen der Messgenauigkeit den gleichen linear-dichroitischen Effekt ($r(t \rightarrow 0)$).*

3.4.1.2 Untersuchung des P₆₈₀-Spektrums im Roten

In Abbildung 3.8 werden exemplarisch Messungen bei 671, 678 und 690 nm unter Verwendung von Kernkomplexen aus Spinat gezeigt, sowie eine weitere Messreihe bei 671 nm mit einer (PSI-freien) Kernkomplex-Präparation aus *Synechocystis*, wie sie bei Clausen et al. (2001) beschrieben ist.

Die Kurven C und D sind verkürzt dargestellt, da bei diesen Messungen durch externe Modulation ein Messlichtpuls erzeugt wurde (siehe Abschnitt 3.3.2.1), was trotz Mittelung zu signifikanten Signaldriften und -störungen im Bereich $> 1 \mu\text{s}$ führen konnte, die nicht reproduzierbar waren – die Anfangsamplituden und damit die Bestimmung von r sind davon jedoch unberührt.

Synechocystis und Spinat sind, analog zu den NIR-Daten, bei 671 nm bezüglich des linear-dichroitischen Effektes etwa gleich ($r \approx 0.03$). Der Amplitudenunterschied bei gleicher Chlorophyllkonzentration liegt zumindest zum Teil an den verschiedenen Chl/PS-Verhältnissen der Kernkomplex-Präparationen aus diesen zwei Organismen. Für *Synechocystis* wurde ein minimaler Wert von 33 Chl/PS bestimmt (persönliche Mitteilung von Jürgen Clausen); für Spinat sind diese Werte im Allgemeinen schlechter (Verunreinigung durch LHCs in Lösung), die besseren Fraktionen (siehe Abschnitt 1.4.1) lassen sich zu 40–50 Chl/PS abschätzen. Der Anisotropieparameter liegt für 678 nm bei $r \approx 0.04$. Bei 690 nm ist die Anfangsamplitude bei beiden Messlichtpolarisationen etwa identisch.

Einen Überblick über die Mittelwerte aller bestimmten Anisotropieparameter in Abhängigkeit von der Messlicht-Wellenlänge gibt Abbildung 3.9. Sie sind zusammen mit aus der Literatur bekannten Absorptionsspektren dargestellt. Denn die in denselben Messserien gewonnenen isotropen Absorptionsänderungen umfassen nicht den vollständigen Wellenlängenbereich und streuen aufgrund der nicht sättigenden Anregung für die Bestimmung von absoluten Extinktionswerten zu stark. Ein unmittelbarer Wechsel zwischen photoselektiver (OPO) und sättigender Anregung (Pumplaser) war aus technischen Gründen ungünstig.

Alle gewonnenen Anisotropieparameter liegen im Bereich von etwa 0.00 bis 0.05. Es lassen sich grob zwei Bereiche im roten Spektralbereich unterscheiden: Von 671–683 nm beträgt $r \approx 0.04 \pm 0.01$, für $\lambda > 685$ nm ist $r \lesssim 0.01$. Die Anisotropieparameter einzelner Spektralkomponenten addieren sich unter Gewichtung mit ihrer Wellenlängen-abhängigen Verteilung zum Gesamtparameter r (siehe Gleichung (3.5)). Mit den eben angesprochenen zwei Anisotropie-Bereichen, der Entwicklung des Spektrums in Abhängigkeit von der Temperatur (Hillmann et al., 1995) und den nachfolgend beschriebenen Ergebnissen der Tieftemperatur-Experimente liegt es nahe, sich den roten Anteil des Absorptionsspektrums aus (mindestens) zwei Komponenten zusammengesetzt zu denken. Die in der Abbildung gezeigte numerische

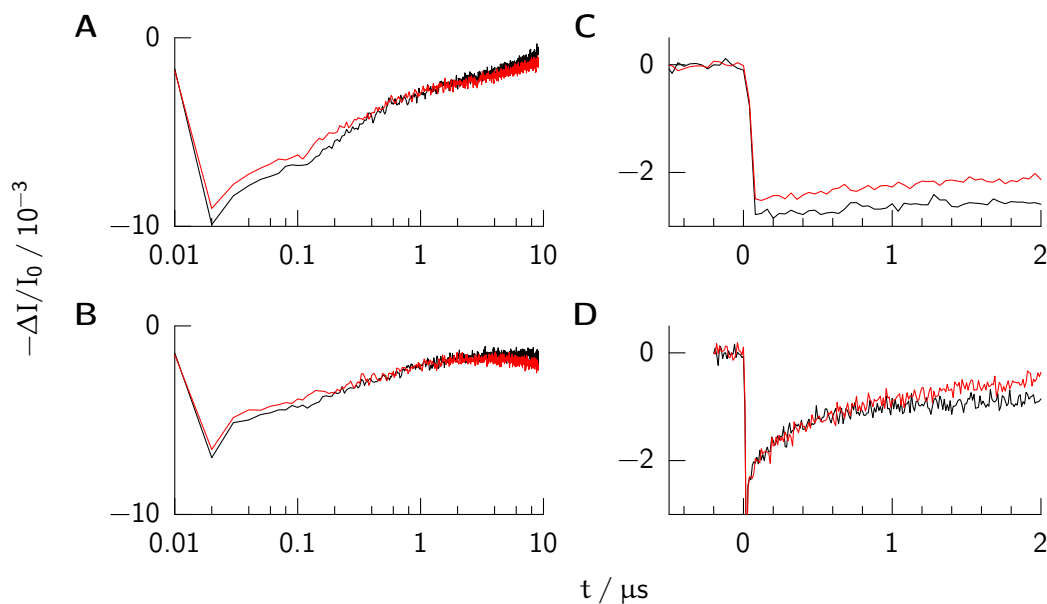


Abbildung 3.8: Linear-dichroitisch aufgelöste P_{680} -Reduktionskinetiken im roten Spektralbereich ($\lambda_{exc} \approx 710$ nm).

(A) Kernkomplex-Präparation aus *Synechocystis*, $\lambda_{obs} = 671$ nm, $[Chl] = 4$ μ M.

(B, C, D) Kernkomplex-Präparation aus Spinat, λ_{obs} ist respektiv 671, 678 und 690 nm, $[Chl]$ ist 4, 1 bzw. 5 μ M.

Die in C gezeigte Kinetik zeigt eine langsamere Zerfallskinetik, da diese Messung bei pH = 5.5 durchgeführt wurde, die anderen aber bei pH = 8.5. In C und D wird ein verkürzter Zeitbereich gezeigt, da Signalstörungen für $t > 1$ μ s vorlagen.

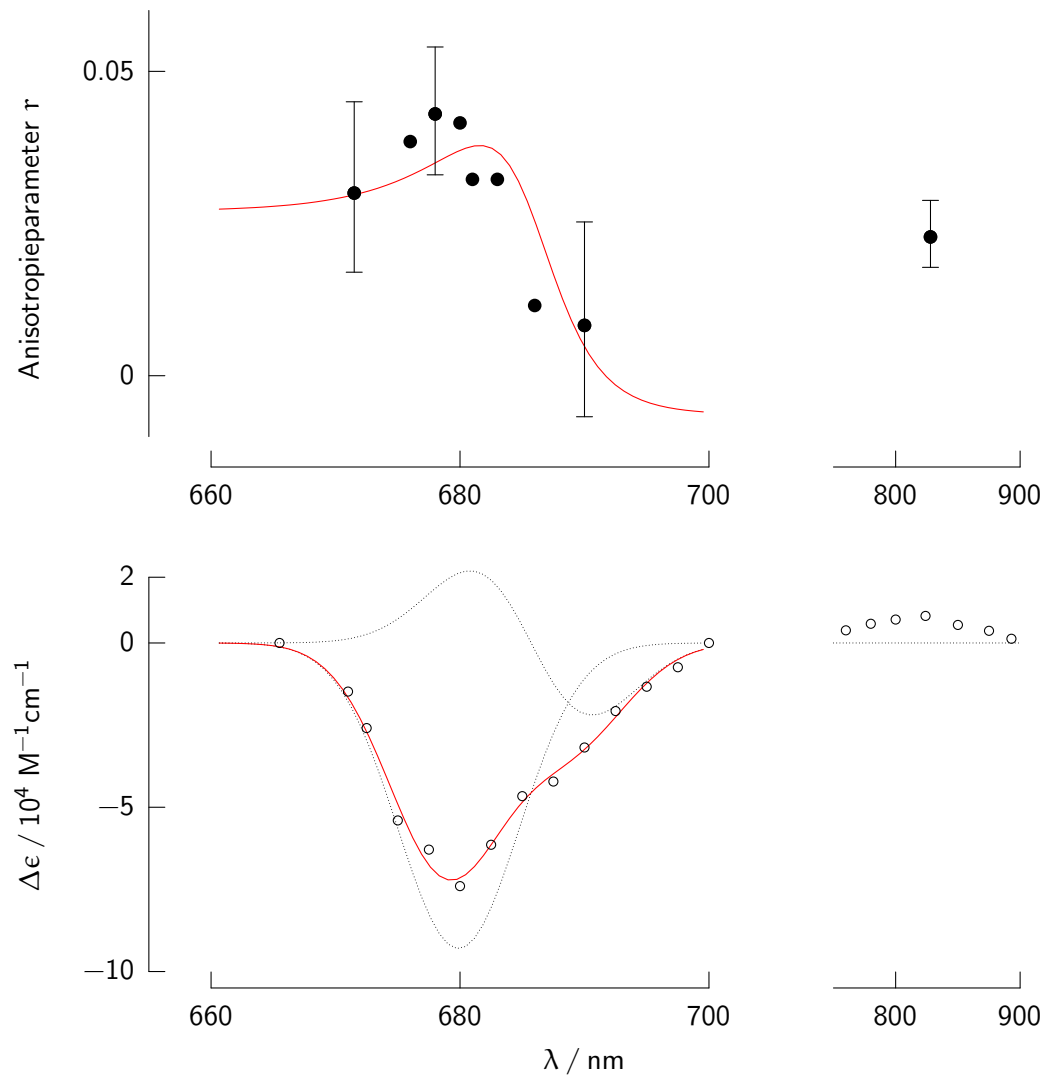


Abbildung 3.9: Bei Raumtemperatur gewonnene (mittlere) Anisotropieparameter (●), exemplarisch ist auch der Fehlerbereich gezeigt, d.h. die maximale Abweichung über alle Messreihen bei einer Wellenlänge. Im unteren Teil sind die entsprechenden Absorptionsspektren (○) dargestellt, wobei der linke Teil aus (Hillmann & Schloöder, 1995), der rechte aus (van Best & Mathis, 1978) entnommen ist. Die Ergebnisse einer numerischen Anpassung (Näheres s. Text) sind dargestellt: (···) Einzelbanden bzw. Nulllinie, (—) Gesamt-Extinktion bzw. -Anisotropie.

Anpassung erfolgte mittels Gaußbanden (Gl. 3.8). Wie in Abschnitt 3.2.2 ausgeführt, ist es sinnvoll, von einer ungeraden Anzahl von Banden auszugehen. In der Abbildung ist der einfachste Fall bei Betrachtung von 3 Einzelbanden dargestellt: 1 ausbleichendes und 1 elektrochrom verschobenes Chlorophyll, für letztgenanntes ist der Übersichtlichkeit halber nur die Differenz der Einzelbanden gezeigt. Da die spektrale Überlagerung aufgrund großer Spektralbreite bei Zimmertemperatur stark ist und somit der Unterschied in den Anisotropiewerten erwartungsgemäß klein ausfällt, ist bei der gegebenen Datenqualität eine Auftrennung in

mögliche exzitonische Komponenten nicht möglich. Aus denselben Gründen wurden in der Auswertung explizit die erwartungsgemäßen Eigenschaften einer elektrochromen Verschiebung berücksichtigt, also die identische Amplitude, Breite und derselbe Anisotropieparameter der negativen und positiven Komponente der elektrochromen Bande. Es ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 3.1: Absorptions- und Anisotropie-Merkmale von $P_{680}^+Q_A^-/P_{680}Q_A$ bei Raumtemperatur. Für den roten Spektralbereich erfolgte eine numerische Anpassung mittels 3 Gaußbanden (nach Gl. (3.5) und (3.8)), von denen 2 durch eine elektrochrome Verschiebung gekoppelt sind.

λ_c / nm	679.9	684.8	686.7	825
r	0.027	~ 0.00		0.023
FWHM / nm	11.5		—	
$ \Delta\epsilon / 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	9.3		(0.8)	

Das Absorptions- und Anisotropie-Differenzspektrum gibt keine ausreichende Evidenz für das Vorliegen einer elektrochromen Verschiebung. Die präsentierte Anpassung sollte als Vergleich mit dem Tieftemperaturspektrum aufgefasst werden.

Mit dem Extinktionswert, der aus dem Absorptionsspektrum von B. Hillmann folgt, errechnet sich eine Dipolstärke der drei roten Chlorophyllbanden von je 12.6 D^2 . Eine geringe Abweichung lässt sich wahrscheinlich mit dem Fehlerbereich bei der Bestimmung des Chl/PS-Verhältnisses begründen. Unter Berücksichtigung eines Beitrags des Kations im Roten mit ca. 5 D^2 – dieser Wert entspricht dem in (Chauvet et al., 1981) gezeigten Gaußbanden-förmige Signal mitsamt dem plateauförmigen Untergrund – resultiert etwa die erwartete Dipolstärke eines ausbleichenden Chl a (siehe Abschnitt 3.2.2). Nach Chauvet et al. (1981) könnte dieser Wert für das kationische Signal im roten Spektralbereich (durch unvollständige Subtraktion von Beiträgen der neutralen Form) aber zu hoch sein.

3.4.2 Versuche bei Tieftemperatur

3.4.2.1 Offene PSII-Zentren

Isotropes P₆₈₀⁺Q_A⁻/P₆₈₀Q_A-Spektrum P₆₈₀⁺ wird bei Tieftemperatur (77 K) nicht mehr durch Y_Z reduziert, sondern im Wesentlichen durch Rekombination mit Q_A⁻. Durch weitere Donatoren für P₆₈₀⁺ kann aber das Chinon (einfach) reduziert verbleiben, so dass es in diesem Anteil der Zentren nicht mehr zu einer stabilen Ladungstrennung kommen kann. Bei der in den nachfolgend beschriebenen Experimenten erzielten Zeitauflösung wird eine Rekombination des primären Radikalpaares P₆₈₀⁺Pheo⁻ dieser geschlossenen Zentren nicht aufgelöst, und in weniger als 10% der Zentren wird der Triplettzustand ausgebildet, der im ms-Bereich zerfällt (van Mieghem et al., 1989; Hillmann, 1997).

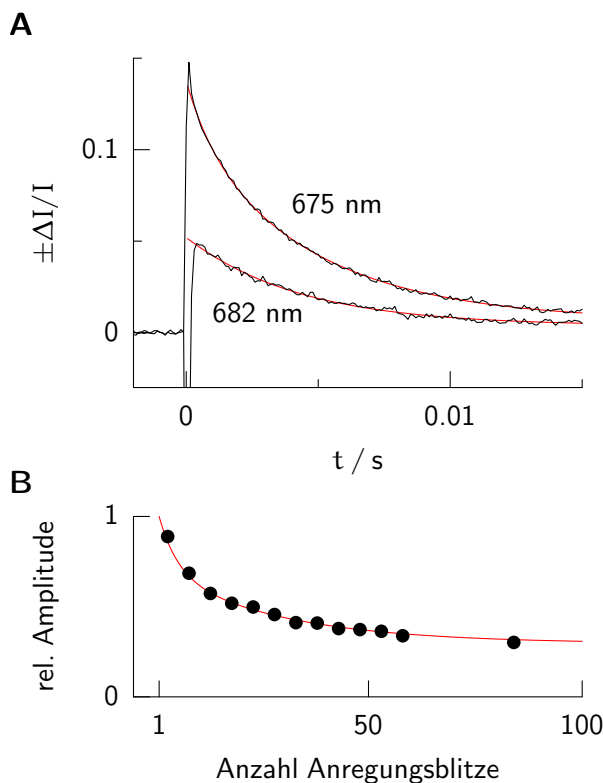


Abbildung 3.10: P₆₈₀-Kinetik bei Tieftemperatur (77 K) und sättigender Anregung – Amplitudenverlust durch Akkumulation von stabilen sekundären Donatoren.

(A) Kinetiken einer jeweils frischen Probe gemessen bei 675 nm (positive Amplitude) bzw. 682 nm (negatives ΔI), Mittelung über 5 Blitze, Detektion mit 100 $\mu s/P$, $BW = 3$ kHz; $[Chl] = 10$ μM . Ergebnisse einer numerischen Anpassung (—), Einzelheiten siehe Text.

(B) Veränderung der Anfangsamplitude bei aufeinander folgenden Experimenten à 5 Schuss mit 0,5 Hz Repetition, dann jeweils ~ 10 s Dunkelperiode, Annahme: Erstes Experiment entspricht Blitzanzahl 3. (—): Anpassung mittels $0,27 + 0,35 \exp(-0,23 x) + 0,38 \exp(-0,035 x)$.

In der Abbildung 3.10 werden Rekombinationskinetiken P₆₈₀⁺Q_A⁻ → P₆₈₀Q_A bei 675 und 682 nm (A, bei sättigender Anregung einer frischen Probe mit 5 Laserpulsen) sowie der Zerfall der Anfangsamplitude (B, bei rascher Durchführung dieser Einzelexperimente nacheinander an einer Probe) dargestellt.

Die Kinetiken können mit einer Summe zweier Exponentialfunktionen plus einem langlebigen (> 10 ms) Untergrund beschrieben werden, sofern man von der Überlagerung des Signals mit dem Blitzdurchschlag und Fluoreszenz – bei dieser Zeitauflösung – für Zeiten $t \lesssim 300$ μs absieht. Die gezeigten sowie weitere Messungen mit höherer Zeitauflösung zur besseren Trennung der kurzzeitigen Artefakte ergaben Ratenkonstanten von etwa 1000 und 250 s^{-1} mit einem Amplitudenanteil von etwa 20% für die schnellere, sowie 75% für die langsamere Kinetik. Aber auch eine Anpassung analog zu (Hillmann & Schlodder, 1995),

bei der die schnellste Rate nur 385 s^{-1} beträgt (mit einem erhöhten Anteil), gibt noch zufriedenstellende Ergebnisse; die dann errechneten Anfangsamplituden differieren um 5–10%.

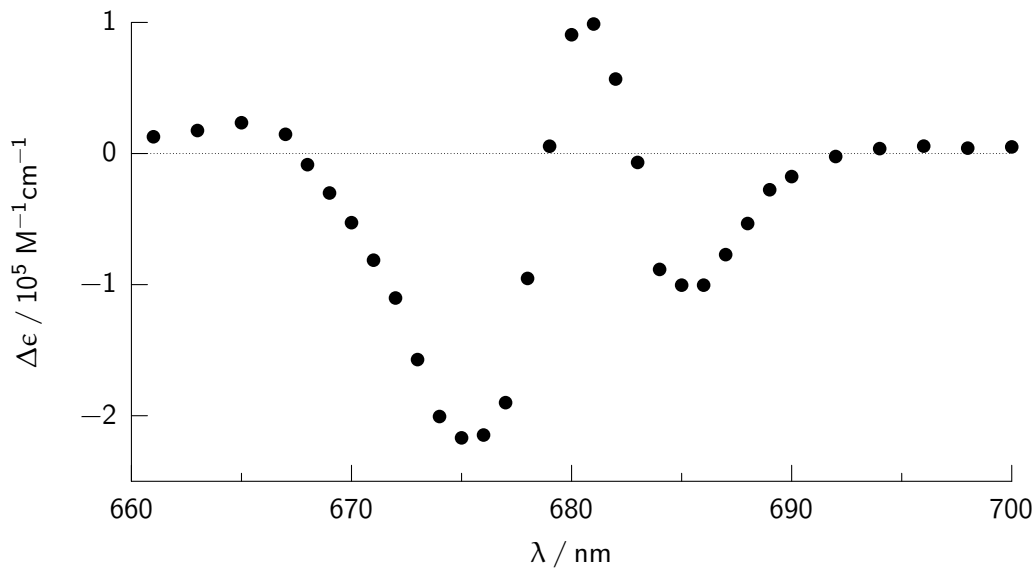


Abbildung 3.11: Differenzspektrum $P_{680}^+ Q_A^- / P_{680} Q_A$ bei 77 K. Bedingungen wie bei Abbildung 3.10 (A) beschrieben.

Der in Teilabbildung 3.10 B gezeigte Amplitudenverlust bei steigender (akkumulierter) Anzahl sättigender Blitze resultiert aus dem Vorhandensein von sekundären Donatoren für P_{680}^+ , die im Bereich von Stunden stabil sind (Hillmann & Schlodder, 1995). Unter den in der Bildlegende genannten Bedingungen wird ein quasi-zweixponentieller Zerfall gefunden, die entsprechenden „Halbwerts-Blitze“ liegen bei 6 und 23 (unter Berücksichtigung des Startwertes 3 - siehe Bildlegende). Somit wird bei Messungen, bei denen eine große Anzahl von Anregungsblitzen zur Mittelung notwendig ist, nur noch ein Bruchteil (25–30%) der Normalamplitude detektiert (s.a. Abschnitt 3.3.1.2.).

Die Anfangsamplituden, die durch die eben beschriebenen numerischen Anpassungen extrapoliert wurden, sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Die Messungen erfolgten unter den in Abbildung 3.10 (A) genannten Bedingungen bei variiertem Messlicht-Wellenlänge im Bereich von 660 bis 700 nm. Messungen durch weitere Blitzfolgen an jeweils derselben Probe zeigten, dass die in Abbildung 3.10 (B) gezeigte Verringerung der Signalamplitude unabhängig von der Mess-Wellenlänge ist. Denn durch Skalierung ließen sich die Spektren, die jeweils aus „gleichaltrigen“ Proben gewonnen wurden, zur Deckung bringen.

Zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten (nach Gleichungen (1.1) und (1.2)) wurde ein Verhältnis von Chlorophyll pro Reaktionszentrum (Chl/PS) von 40 angenommen in Einklang mit an derselben Probenfraktion durchgeführten Messungen bei 825 nm (40–45 Chl/PS) sowie der polarographischen Bestimmung der Elektronentransportrate (siehe Abschnitt 1.4.1.3), die für eine Kernkomplex-Präparation aus Spinat hohe Werte zeigte. Von van Leeuwen (1993) wurde für diese Präparation ein optimales Chl/PS-Verhältnis von 35 bestimmt, für *Synechococcus* wurden mit den bisher vorliegenden Röntgenstrukturdaten 32 (Zouni et al., 2001) bzw. 35 Chl a (Vasil'ev et al., 2001) im Kernkomplex gefunden. Aus-

serdem erfolgte eine Extrapolation auf die Signalamplitude für nur einen Anregungsblitz, analog zu Abbildung 3.10 (B), mit einem Faktor $1/0.9$. Die maximale Unsicherheit in der Bestimmung kann insgesamt mit Extremwerten, die sich wie 1:1.3 zueinander verhalten, abgeschätzt werden, wenn man für Chl/PS von einem Bereich 40–45 sowie für die im Experiment erreichte Signalamplitude (bei Mittelung über 5 Anregungsblitze) von 80–95% des eigentlichen Wertes (Einzelschuss-Experiment) ausgeht.

Das dargestellte Differenzspektrum stimmt mit dem von Hillmann & Schlodder (1995) an *Synechococcus* bei 77 K gewonnenen Daten recht gut überein. Der signifikanteste Unterschied ist, dass dort die positive (differentielle) Absorption bei 681 nm deutlich und die Bleichung bei 685 nm etwas weniger ausgeprägt sind im Vergleich zur stärksten Bleichung bei 675 nm. Insofern entspricht das hier gewonnene Ergebnis eher dem ebenfalls an *Synechococcus* gewonnenen Daten bei 5 K (Hillmann et al., 1995).

Anisotropes $P_{680}^+Q_A^-/P_{680}Q_A$ -Spektrum Um Aussagen über die Polarisations-abhängige Veränderungen der Signalamplituden machen zu können, musste der Messablauf gegenüber dem Vorgehen bei Raumtemperatur-Experimenten modifiziert werden. Denn die Signalamplitude nimmt, wie eben ausgeführt, mit der Anzahl der Anregungsblitze ab. Bei nichtsättigender Anregung und in Abhängigkeit von Mittelungsanzahl und Probenalter kann diese Abnahme quasi einexponentiell (mit konstantem Untergrund) beschrieben werden. Anisotropieparameter wurden aus hintereinander ausgeführten Messreihen mit alternierender Polarisationsrichtung ermittelt.

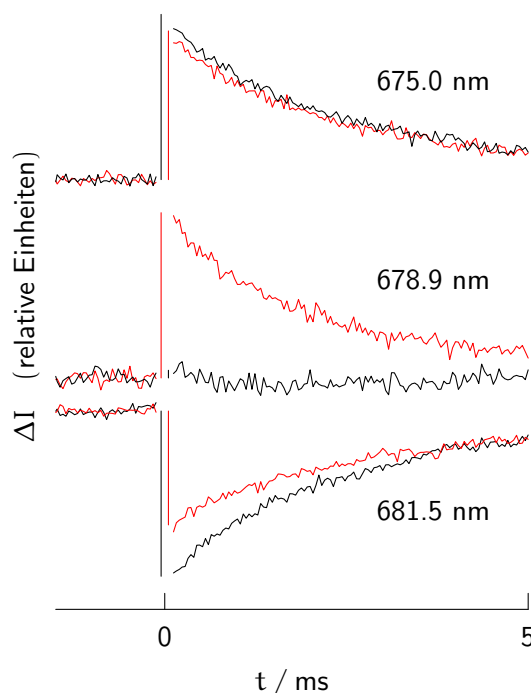


Abbildung 3.12: Beispiele für Polarisationsaufgelöste Kinetiken in offenem PSII bei 77 K bei drei Messlicht-Wellenlängen. Die jeweilige Polarisationsrichtung ist wie in Abbildung 3.5 farblich gekennzeichnet. Die Signalmittelung erfolgte über 20 (675 nm), 50 (681.5 nm) bzw. 200 (678.9 nm) Anregungsblitze, $\lambda_{exc} \gtrsim 695$ nm, Repetitionsfrequenz 1 Hz. Detektion mit $40 \mu\text{s}/P$, $BW = 10$ kHz; $[\text{Chl}] = 12 \mu\text{M}$. Der Zeitbereich $|t| < 100 \mu\text{s}$ ist wegen Signalartefakt ausgespart, dafür sind dort Balken (|/|) eingezeichnet, die jeweils das durch numerische Anpassung gewonnene ΔI anzeigen (Näheres dazu im Text).

Bei 77 K war eine sehr fernrote Anregung ($\lambda > 700$ nm), wie sie bei Raumtemperatur erfolgte, wegen der Verschmälerung der Chl-Banden (bei maximal zur Verfügung stehenden

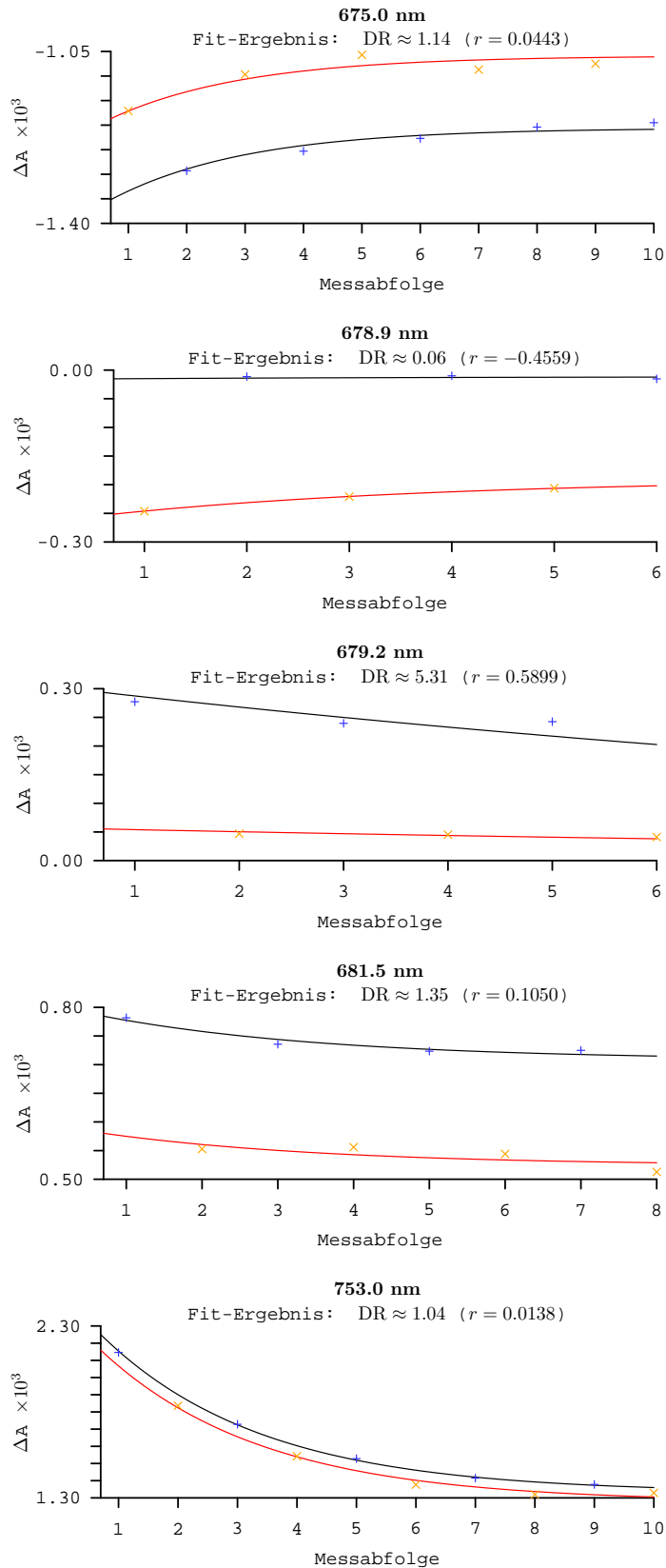


Abbildung 3.13: Beispielgraphen zur numerischen Bestimmung von Anisotropieparametern in offenem PS II mittels Gleichungen der Form $A_i (\exp(-kx) + y_0)$ mit Index i entsprechend den relativen Polarisierungen \parallel ($-/+$) oder \perp ($-/x$). Das dichroitische Verhältnis ist $DR = A_{\parallel}/A_{\perp}$, $r = \frac{DR-1}{DR+2}$. Versuchsbedingungen siehe Abbildung 3.12, für $\lambda_{\text{obs}} = 753 \text{ nm}$ war $[\text{Chl}] = 150 \mu\text{M}$.

Anregungsenergie) nicht mehr möglich. Deshalb wurde im Bereich von circa 693–698 nm angeregt.

Abbildung 3.12 zeigt jeweils die ersten beiden Kurven von Messreihen bei den Detektionswellenlängen 675.0, 678.9 und 681.5 nm und paralleler (—) bzw. orthogonaler (—) Ausrichtung zur Anregungs-Polarisation. Die blitzinduzierte Intensitätsänderung ist relativ angegeben. Die numerische Anpassung der Daten erfolgte zweixponentiell mit festen Raten 1000 und 250 s⁻¹ in einem Zeitbereich von 300 μs bis etwa 5 ms (abhängig von Schwankungen des Untergrundes I₀). Bei zu geringem Signal-Rausch-Verhältnis, bei der Beobachtungswellenlänge 678.9 und 679.2 nm, war nur eine Anpassung an eine einexponentielle Funktion sinnvoll (mit $k = 900 \text{ s}^{-1}$, Zeitbereich 300–1300 μs). Wie die Rohdaten zeigen, ist in diesen beiden Fällen die Bestimmung der Anfangsamplitude vor allem bei der Polarisationsrichtung mit der kleineren Amplitude sehr ungenau, da das Signal-Rausch-Verhältnis kaum größer 1 ist.

Die so gewonnenen Anfangsamplituden einer Messreihe aus einer Abfolge von ≥ 6 Einzelversuchen mit alternierender Polarisationsrichtung bei einer Wellenlänge λ_{obs} ließen sich mit zwei Gleichungen der Form $A_i (\exp(-kx) + y_0)$ beschreiben. Die für die beiden Polarisationsrichtungen erhaltenen Amplituden A_{\parallel} und A_{\perp} ergeben dann den Anisotropieparameter $r(\lambda_{\text{obs}})$. In Abbildung 3.13 sind beispielhaft Auswertergebnisse gezeigt. Wie schon im vorhergehenden Abschnitt gesagt, sind die beiden Extrempunkte bei 678.9 und 679.2 nm sehr fehlerbehaftet, die augenscheinlich gute Anpassung erfolgte hier nur aufgrund von Einschränkungen bei der vorhergehenden numerischen Anpassung der Einzelkinetiken.

Übersicht über die Spektren und Zuordnung zu Spektralbanden Die Ergebnisse, die bei Messungen im roten und nahinfraroten Spektralbereich gewonnen wurden, sind in Abbildung 3.14 wiedergegeben. Der untere Teil zeigt mittels unpolarisiertem Messlicht gewonnene Daten, im oberen Teil sind die in Photoselektions-Experimenten erzielten Anisotropieparameter dargestellt. Um die Skalierung nicht ungünstig wählen zu müssen, sind die zwei extremen Anisotropiewerte bei 678.9 ($r \approx -0.45$) und 679.2 nm ($r \approx +0.6$) bei der erwarteten Polstelle (s.a. Abb. 3.12 und 3.13) in der Abbildung fortgelassen worden. Es wurde je eine globale Anpassung durchgeführt über den beide Datensätze – Absorption und Anisotropie – betreffenden Wellenlängenbereich 670–687 nm bzw. 722–827 nm: Die Gesamt-Extinktion resultiert aus einer Summe von Gaußbanden (nach Gleichung (3.8)), der relative Anteil der einzelnen Banden geht dann über (3.5) in die Gesamt-Anisotropie mit ein als Wellenlängen-abhängige Gewichtung für die einzelnen Anisotropieparameter.

Die Abbildung zeigt eine Anpassung der Daten im roten Spektralbereich mit 3 Einzelkomponenten (Einzelheiten dazu folgen weiter unten), die Absorptionsbanden sind einzeln dargestellt, die Anisotropie der Komponenten, r_i , sind Wellenlängen-unabhängig. Die Parameter sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Die Gesamtfunktionen (—) zeigen, dass beide Datensätze recht gut angepasst werden konnten, aufgrund der großen Fehlerbreite liegt die Gesamt-Anisotropie deutlich im „Rauschband“. Die Anpassung der Absorptionswerte im Roten zeigt allerdings leichte Abweichungen vom augenscheinlich glatten Verlauf der Messpunkte. Dies kann zum Teil messtechnisch aus der Wellenlängen-Ungenauigkeit des isotropen Absorptionsspektrums von nominal 2 nm begründet werden. Zudem ist die Verwendung von symmetrischen Gaußbanden eine Vereinfachung, die auch zu solchen Abweichungen führen könnte

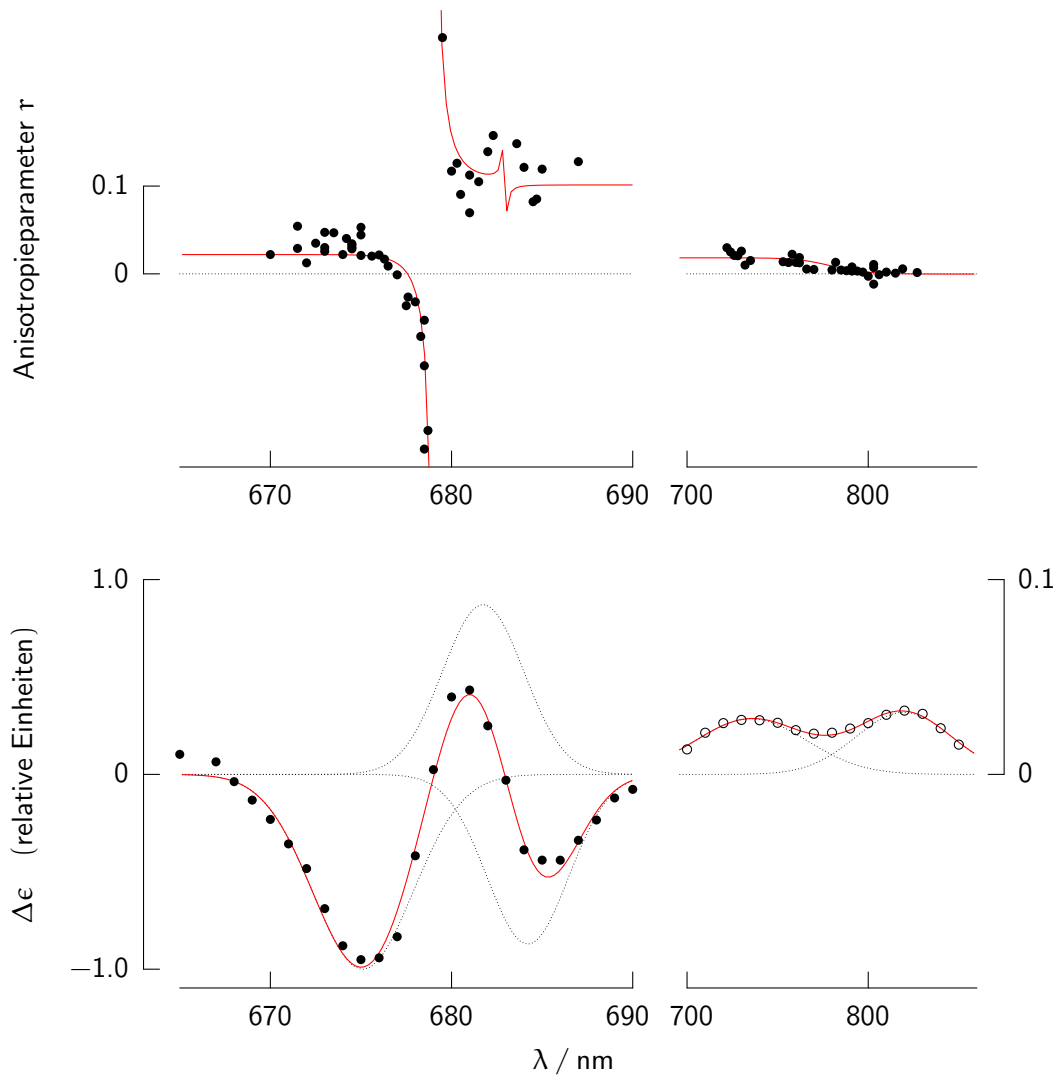


Abbildung 3.14: Absorptions- und Anisotropie-Spektrum von $P_{680}^+ Q_A^- / P_{680} Q_A$ bei 77 K. Anpassung durch 3 und 2 Gaußbanden (Gl. (3.8), Näheres s. Text) im roten bzw. NIR-Bereich. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung von $\Delta\epsilon$ in den zwei Wellenlängenbereichen. Unterer Teil: Daten wie in Abbildung 3.11, das Absorptionsspektrum im NIR ist aus (Hillmann & Schlodder, 1995) entnommen, (\dots) Einzel-Absorptionsbanden. Oberer Teil: (\dots) $r = 0$. (—) Gesamt-Extinktion bzw. -Anisotropie (Gl. (3.5)).

– eine Anpassung mit asymmetrischen Banden (Pearlstein, 1991) würde aber die Einführung (mindestens) einer weiteren Unbekannten erfordern.

Im Wesentlichen sind im Bereich 670–690 nm nur 2 Anisotropiebereiche und eine (erwartete) Polstelle erkennbar: Für $\lambda < 676$ nm ist $r \approx 0.03$, um $\lambda = 679$ nm liegen die gefundenen Werte außerhalb des theoretisch für *eine* beobachtete Komponente (und ein anisotropes Antennenensemble) erwarteten Bereiches, die „blaue“ bzw. „rote“ Seite strebt zu großen und negativen respektive positiven Werten. Und der langwellige Anteil des Spektrums um 681

und 685 nm ist gekennzeichnet durch eine – im Rahmen der Messgenauigkeit – identische Anisotropie $r \approx 0.1$.

Für die Bande bei 675 nm folgt eine Dipolstärke von 17.5–18.2 D², wie es annähernd für monomeres Chl a erwartet wird (17–19 D² in Diethylether, siehe 3.2.2). Die beiden anderen Gaussbanden zeigen allerdings mit 12.5–13 D² einen zu geringen Wert.

Wenn noch eine kleine kationische Bande berücksichtigt wird mit 2.5 D², die bei $\lambda \approx 675$ nm im Differenzspektrum erscheint, wird das Ungleichgewicht der Q_y-Banden noch weiter vergrößert. Die Anpassung mit gleich großen Q_y-Banden gelingt aber für eine Lokalisation weiter zum Roten hin, am besten für $\lambda \approx 681$ nm (Parameter siehe Tabelle 3.2). Für die Absorption des Kations im roten Spektralbereich ist eine Dipolstärke verwendet worden, die etwa dem Gaussbanden-förmigen Bereich im Absorptionsbereich der Q_y-Bande des im Photolyse-Experiment erhaltenem Spektrums (Chauvet et al., 1981) entspricht. Der Restuntergrund im Roten mit ähnlicher Dipolstärke wird vernachlässigt, zumal die Autoren des Artikels eine mögliche Überschätzung wegen Restabsorption des neutralen Chlorophylls einräumen. Die Dipolstärke der 3 Q_y-Banden liegt bei dieser Anpassung bei 21 D², diese Abweichung liegt im Fehlerbereich für die Bestimmung der Extinktionswerte (siehe oben).

Tabelle 3.2: Parameter der numerischen Anpassung mittels Gaußbanden (nach Gl. (3.5) und (3.8)) des Absorptions- und Anisotropie-Spektrums von P₆₈₀⁺Q_A⁻/P₆₈₀Q_A bei Tieftemperatur (77 K). Die maximalen Standardabweichungen waren, falls nicht gesondert angegeben: $\Delta\lambda_c = 0.2$, FWHM: 0.5%, $\Delta\epsilon$: 5%, r : 20%.

λ_c / nm	r	FWHM / nm	$\Delta\epsilon$ / 10 ⁴ M ⁻¹ cm ⁻¹
Roter Spektralbereich			
<i>3 Gaußbanden (freie Parameterwahl)</i>			
675.2	0.024	6.7	-22.9
681.7	0.098	5.4	20.5
684.2	0.102	5.3	-20.1
<i>3 Gaußbanden (elektrochrome Verschiebung explizit berücksichtigt)</i>			
675.1	0.022	6.5	-22.8
681.7	} 0.101	5.3	±19.9
684.2			
<i>3 gleich große Q_y- und eine 2.5 D²-Gaussbande (Chl⁺ bei 681 nm)</i>			
675.5	0.039	} 7.2	±25.2
681.7	0.118		
683.7	0.109		
680.7 (±1)	(±0.07)	4.6	5.8
Ultra-Rot/NIR-Bereich			
735 (±1)	0.018	73	0.65
820 (±1)	0.00	62	0.73

Bei der Interpretation dieser Anpassung (Grundlagen sind in Abschnitt 3.2.2 aufgeführt) kann am wahrscheinlichsten aufgrund sehr ähnlicher Anisotropiewerte von einer Bandenverschiebung von 684.2 nach 681.7 nm ausgegangen werden. Wenn man von nicht mehr als 3 Komponenten in dem betrachteten Wellenlängenbereich ausgeht, muss die Bande bei 675 nm von dem durch Oxidation ausgebleichtenem Chl stammen.

Wenn diese Komponente ein exzitonisch gekoppelter Dimer ist, muss die Komponentenanzahl erhöht werden – falls die Exzitonbanden im Rahmen der spektralen Auflösung überhaupt trennbar sind – oder aber die Zuordnung der elektrochromen Verschiebung aufgegeben werden. Denn man erwartet bei einem Chl-Kation, welches auf einem Chl lokalisiert ist, das Erscheinen des ungekoppelten, ungeladenen Chlorophylls, während die zwei Exzitonbanden verschwinden. Die Interpretation mit „starker“ Wechselwirkung kann ausgeschlossen werden, siehe dazu auch Abschnitt 3.5.2.

In der gezeigten numerischen Anpassung wurde die eben beschriebene Interpretation mit der elektrochromen Verschiebung explizit einbezogen, indem zwei Banden der gleiche Amplitudenbetrag sowie übereinstimmende Breite und Anisotropie zugeordnet wurden. Die in der Tabelle 3.2 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass die Unterschiede zwischen dieser Anpassung und einer mit freier Parameterwahl nur sehr gering ausfallen.

Auch die Einführung einer kleinen Bande, die dem Kation zugeordnet wurde, führt zu keiner nennenswerten Differenzierung der Ausbleichung bei 684 nm und Absorption bei 682 nm über unterscheidbare Anisotropieparameter. Die Forderung nach gleich großen Q_y -Banden, die insbesondere eine stärkere Überlappung der Banden im Bereich der Polstelle bei 679 nm herbeiführte, ergab aber in der numerischen Anpassung eine signifikante Erhöhung des für die 675 nm-Bande bestimmten Anisotropieparameters. Übereinstimmend mit dem Rauschband ergibt sich $r_{675} \approx 0.02-0.04$.

In Abbildung 3.14 sind ausserdem die im ultraroten bzw. nahinfraroten Bereich gewonnenen Anisotropieparameter und eine der Literatur entnommene Absorptionsmessung (von Hillmann & Schlodder (1995), zur absoluten Skalierung wurde Mathis & Setif (1981) herangezogen) gezeigt. Die Anpassung erfolgte mit zwei Gaußkurven. Sie weisen etwa gleiche Oszillatorstärke auf, die Komponente mit der Zentralwellenlänge 735 nm besitzt zwar einen sehr geringen, aber signifikanten Anisotropieparameter, für die andere NIR-Komponente ist $r \approx 0.00$.

Eine Erhöhung der Bandenanzahl im roten Spektralbereich – von der Kationenbande abgesehen – auf die nächst höhere relevante Anzahl von 5 würde aufgrund fehlender weiterer dichroitischer Unterscheidungsmerkmale und hinsichtlich der Datenqualität nicht viel Sinn machen.

Zusammenfassend folgt für den roten Spektralbereich: *Eine hinreichende Anpassung der Absorptions- und Anisotropiedaten kann mit 2 Pigmenten erfolgen, welche folgendes Verhalten zeigen:*

(i) *Bleichung zum Kation*

(ii) *Elektrochrome Verschiebung*

Eine genauere Anpassung unter Berücksichtigung eines geringen Kationbeitrags liefert ähnliche Resultate.

3.4.2.2 Geschlossene PS II-Zentren (Q_A doppelt reduziert)

Durch das in Abschnitt 3.3.1.2 beschriebene Verfahren wird Q_A doppelt reduziert, es liegt dann nach van Mieghem et al. (1989) wahrscheinlich in neutralem, protoniertem Zustand vor. Die stabile Ladungstrennung kann nicht mehr stattfinden, stattdessen wird bei der Ladungsrekombination von P₆₈₀⁺Pheo⁻ mit hoher Ausbeute ³P₆₈₀ gebildet, welches etwa 1 ms stabil ist.

Versuche mit Inkubationszeiten von 3 h oder 10 min unter reduzierenden Bedingungen zeigten keinen signifikanten Unterschied. Bei den hier verwendeten Kernkomplexen (nach van Leeuwen) wurde Q_A also ohne lange Inkubationszeiten zumindest teilweise doppelt reduziert, eine Quantifizierung anhand der optischen Spektren erfolgt weiter unten. Für Kernkomplexe, die ebenfalls aus Spinat mittels einer anderen Detergens-Behandlung nach (Ghanotakis et al., 1987) gewonnen wurden, geben van Mieghem et al. (1992) eine Inkubationszeit von 1.5 h an, es wurden dort 30% des vollen Triplett-ESR-Signals unmittelbar nach Zugabe des Reduktionsmittels gemessen. In Präparationen aus *Synechococcus* erfolgte eine starke Vorbelichtung der Probe bei Raumtemperatur zur Generierung des doppelt reduzierten Q_A. Bei dieser Vorbehandlung wurde aber eine verbreiterte ausbleichende Bande bei 684 nm gefunden, so dass von einer heterogenen Probe ausgegangen wurde (Hillmann, 1997).

Das ³P₆₈₀/¹P₆₈₀-Differenzspektrum wurde linear-dichroitisch charakterisiert. In Abbildung 3.15 sieht man zwei Einzelmessungen bei 682 nm bei den Polarisations-einstellungen \parallel bzw. \perp . Mittelungen über mehrere Einzelmessungen können bei einexponentieller Anpassung mit einer Zerfallsrate von etwa 1400 s⁻¹ (mit einem relativen Amplitudenanteil von ~ 80%) beschrieben werden, für die weitere Auswertung wurde diese Rate festgesetzt. Sie ist geringfügig schneller als der in Reaktionszentren unter anaeroben Bedingungen gemessene Triplettzerfall mit $\tau = 1$ ms (Durrant et al., 1990).

Abbildung 3.16 zeigt exemplarisch das Ergebnis von Amplitudenbestimmungen zur Ermittlung des Anisotropieparameters. Da die Amplituden innerhalb der Messreihe quasi stabil blieben, wurde für jede Polarisationsrichtung ein Mittelwert bestimmt.

Der Spektralbereich 678–687 nm konnte mit hinreichendem Signal-Rausch-Verhältnis Polarisations-aufgelöst untersucht werden. Isotrope Absorptionsänderungen wurden mittels $\frac{1}{2}(A_{\parallel} + A_{\perp})$ aus den Einzelmessungen bestimmt. Dies war möglich, da die Anfangsamplituden – die Triplettgenerierung – innerhalb der Messreihen stabil waren. Das gemittelte Absorptions- und das Anisotropie-Spektrum sind in 3.17 abgebildet. Es erfolgte eine Anpas-

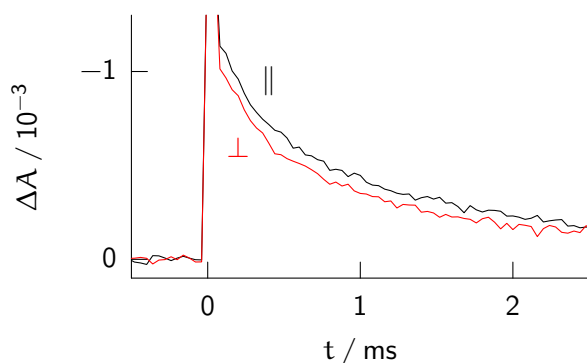


Abbildung 3.15: Beispielkinetiken für ³P₆₈₀-Zerfall bei 77 K, Polarisations-aufgelöst gemessen bei 682 nm. Die Symbolik ist wie in Abbildung 3.5. Die Signalmittelung erfolgte über 50 Anregungsblitze, Repetitionsfrequenz 1 Hz. Detektion mit 40 μs/P., Bw = 10 kHz, [Chl] = 12 μM.

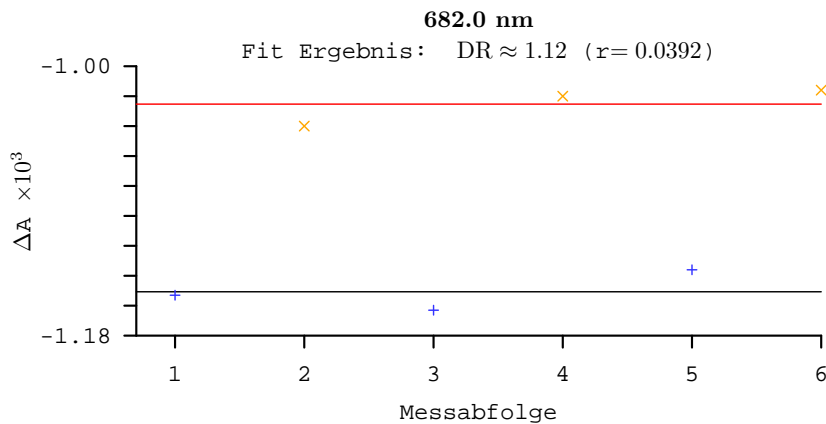


Abbildung 3.16: Beispielgraph zur numerischen Bestimmung der Anisotropieparameter in geschlossenem PSII. Die Symbolik ist wie in Abbildung 3.13, die Messbedingungen sind in der Legende zu Abbildung 3.15 angegeben.

sung mit einer Gaußkurve. Es liegt dann nur ein Anisotropiewert vor, dieser wurde aus einer mit den quadrierten Absorptionswerten gewichteten Mittelung bestimmt. Die Ergebnisse der numerischen Anpassung sind in der Tabelle 3.3 aufgeführt.

Das Ergebnis von Messungen bei 673 nm unter zu Abbildung 3.17 vergleichbaren Bedingungen ist nicht dargestellt, da die Signalamplitude für eine Bestimmung des Anisotropieparameters nicht ausreichend war, die isotrope Absorptionsänderung im ms-Bereich lag bei $+1 \times 10^{-4}$. Kleine Banden mit positiver Absorptionsänderung in diesem Wellenlängenbereich wurden auch von anderen Autoren im Triplettpektrum gefunden (van Mieghem et al., 1995; Hillmann et al., 1995; Carbonera et al., 1994a). Bei dieser Wellenlänge war darüber hinaus eine kinetische Komponente mit entgegengesetzter Amplitude ($\Delta A \lesssim -1 \times 10^{-4}$) zu beobachten, die nur wenig langsamer als die nominelle Zeitaufösung des verwendeten Stromverstärkers (1 μ s) war. Möglicherweise war dies ein Bruchteil der Bleichung bei 674 nm des $P_{680}^+ \text{Pheo}^-$ -Zustandes (van Mieghem et al., 1995). Das Fehlen einer ausbleichenden Komponente, die im ms-Bereich stabil ist, zeigte überdies, dass unter den gewählten reduzierenden Bedingungen kein $P_{680}^+ Q_A^-$ gebildet wurde.

Wird von einem Chl/PS-Verhältnis von 40 ausgegangen (wie in Abschnitt 3.4.2.1) und einer Signalsättigung von $\sim 10\%$, so wurde – im Vergleich mit dem entsprechenden Extinktionswert in Tabelle 3.2 – der Triplettzustand, der in 1 ms zerfällt, in etwa $\frac{1}{3}$ der Reaktionszentren generiert. Diese Ausbeute entspricht dem oben zitierten Wert von van Mieghem et al. nach kurzzeitiger Inkubation bei reduzierenden Bedingungen. Zur vollständigen Generierbarkeit wäre entweder – wie in *Synechococcus* – eine Vorbelichtung oder aber eine längere Inkubationsdauer notwendig gewesen. Letzteres gilt nur, wenn das oben beschriebene Kontrollexperiment fehlerhaft verlaufen war.

Die in Abbildung 3.17 gezeigten Anisotropiewerte zeigen zum langwelligen Bereich ansteigende Werte und deuten damit darauf hin, dass die Beschreibung mit einer Gaussbande möglicherweise nicht ausreichend ist. Eine eher plakativ anzusehende Anpassung mit zwei gleich großen Banden und Zentralwellenlängen bei 683 und 684 nm gibt diese Tendenz gut wieder, wenn Anisotropieparameter der Einzelkomponenten bei 0.0 bzw. 0.1 liegen. Eine

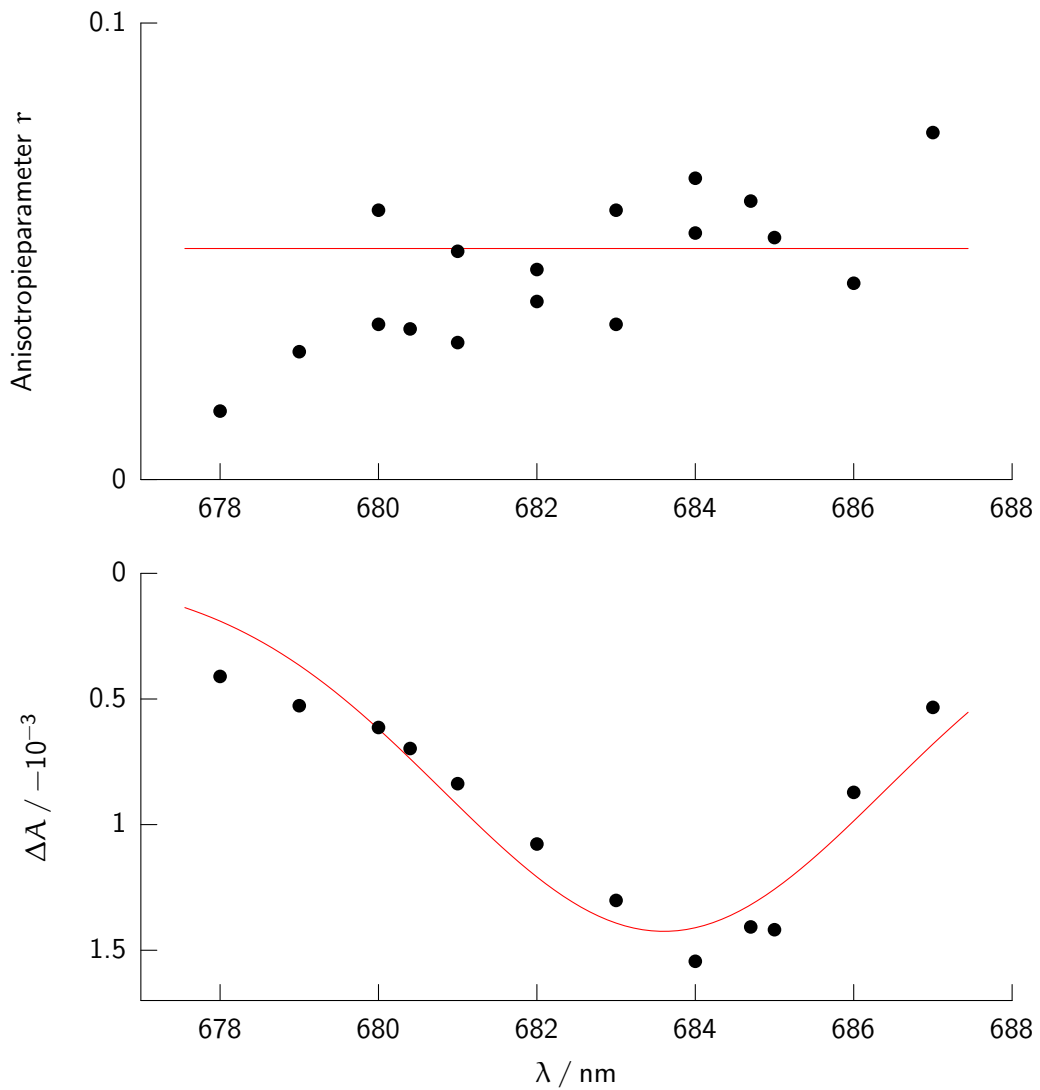


Abbildung 3.17: ${}^3\text{P}_{680}/{}^1\text{P}_{680}$ -Spektrum. Messbedingungen wie bei Abbildung 3.15, außer dass die Mittlung im Einzelexperiment je nach Wellenlängenbereich über 50 bis 200 Anregungsblitze erfolgte.

Tabelle 3.3: Parameter der numerischen Anpassung mittels 1 Gaußbande (Gl. (3.8)) des Absorptions- und Anisotropie-Spektrums von ${}^3\text{P}_{680}/{}^1\text{P}_{680}$ bei 77 K.

λ_c / nm	FWHM / nm	r
683.6	6.6	0.05

Deutung ist möglich, die von einem aktivierten Transfer bzw. Äquilibration des Triplettzustandes (Rutherford, 1986) ausgeht.

Das Ergebnis kann mit einer inhomogenen Verteilung des Triplettzustandes „ $^3P_{680}$ “ auf den Chromophoren des Reaktionszentrums bei 77 K interpretiert werden. Die einfachste Deutung ist aber, dass der Triplettzustand auf einem Chl a gebildet wird, das im „ P_{680}^+/P_{680} “-Differenzspektrum nicht vorkommt oder verborgen ist.

3.5 Diskussion

Die (De-)Lokalisation der vibronischen Anregungsenergie und nachfolgend des Elektronenlochs über die inneren vier Chl α -Moleküle von PS II ist in der Diskussion. In dieser Arbeit wurde dieser Frage durch Photospektroskopieexperimente nachgegangen.

PS II-Kernkomplex-Präparate wurden mit einem linear polarisierten Laserstrahl angeregt. Der Dichroismus von Absorptionsänderungen des Übergangs $P_{680} \rightarrow P_{680}^+$ wurde im nahen IR (825 nm) und im Roten vermessen. Dabei wurden unabhängig vom verwendeten Organismus – Spinat, Erbse und *Synechocystis* sp. – übereinstimmende Anisotropieparameter der Absorptionsänderung von oxidiertem Chl α , P_{680}^+ , beobachtet. Die Lage der positiven Ladung des oxidierten primären Donators des PS II ist in diesen drei Organismen (nahezu) gleich – dies entspricht der Erwartung, denn es gibt zwar Variationen bei anoxygenen Reaktionszentren, diese sind aber bezüglich des Redoxpotentials nicht bis „an die Grenze ausgereizt“. Zugleich ist aber auch das Antennenensemble identisch, welches für $\lambda_{exc} \gtrsim 700$ nm angeregt wird. Demnach werden die Eigenschaften dieser Chlorophylle durch milde Detergentia, die die Sauerstoffaktivität erhalten, nicht beeinflusst, sie sind daher im Reaktionszentrum oder in den Kernantennen-Proteinen lokalisiert.

Die obige Aussage gilt für Raumtemperatur. Bei 77 K führte die „fernrote“ Anregung nur für $\lambda_{exc} < 700$ nm zu für Photospektroskopieexperimente auswertbaren Absorptionssignalen. Dies kann auf eine Verringerung der Linienbreiten mit sinkender Temperatur zurückgeführt werden. Weil die Überlappung bei tiefen Temperaturen geringer ist, sind Absorptionsbanden einzelner Pigmentgruppen deutlich verschieden: Bei van Leeuwen (1993) ist im Absorptionsspektrum dieser Kernkomplex-Präparation bei 6 K die überwiegende Anzahl der Q_y-Banden (bezüglich ihrer Zentralwellenlängen) im Bereich von 669–677 nm lokalisiert. Zusätzlich ist aber bei dieser Temperatur eine klar abgegrenzte, „fernrote“ Bande bei 683 nm sichtbar. Eine auf Gaußbanden basierende Analyse ergibt eine Anzahl von 3–4 Chl α (Hawi Trissl, persönliche Mitteilung, s.a. Trissl & Golovanov (2002)), die zu dieser Bande beitragen. Von Smith et al. (2002) wird eine Kernkomplex-Präparation beschrieben, die aufbauend auf der Vorschrift von van Leeuwen et al. (1991) einen weiteren Aufreinigungsschritt mittels Perfusionsschromatographie (FPLC) umfasst. Die Autoren bestimmten ein Chl/PS-Verhältnis von 32 und passten den langwelligsten Anteil eines VIS-Absorptionsspektrums bei 1.9 K mit 2 Chl α bei 683.5 nm und 1 Chl α bei 685 nm an. 1–2 langwellig absorbierende Chl α -Moleküle wurden für isoliertes CP47 bestimmt (Alfonso et al., 1994).

Bei der photospektroaktiven Anregung am langwelligen Rand der Q_y-Banden sind wahrscheinlich mindestens 3 Chl α -Moleküle beteiligt. Die Übergangsdipolmomente der selektierten Antennenpigmente bilden eine Schar von Vektoren in einem auf das Photosystem bezogenen Koordinatensystem, welche beliebig angeordnet sein können. Im Abschnitt 3.2.1.1 ist beschrieben, wie die Annahme von Symmetrien, z.B. die Lage der „Antennendipole“ auf einem Kegelmantel, zu einfacheren Gleichungen (3.6) führt. Der in den hier vorgestellten Experimenten maximale Anisotropieparameter war 0.1. Dies kann darauf hindeuten, dass die Übergangsdipolmomente der selektierten Antennen eine Ebene aufspannen und dann als „zirkular entartet“ aufgefasst werden können (Junge et al., 1977)⁽⁹⁾. Denkbar wäre die

⁹ Zirkulare Entartung aufgrund hoher Symmetrie eines Pigments allein wurde für die Hämgruppe im Cytochrom c beobachtet (Junge & DeVault, 1975a).

alleinige Anregung zweier exzitonisch gekoppelter Chlorophylle⁽¹⁰⁾, dies ist jedoch mit der abgeschätzten Anzahl der langwellig absorbierenden Chromophore nicht verträglich. Das Vorliegen anderer Geometrien der Antennendipole kann nicht ausgeschlossen werden.

Eine Bestimmung der absoluten Lage der Übergangsmomente aufgrund von Photosелеktionsexperimenten (über Gl. 3.4) ist nur dann möglich, wenn die Lage und Orientierung aller beteiligten Pigmente „fast vollständig“ bekannt ist. Wenn das nicht der Fall ist, sind solche Experimente trotzdem nützlich, um spektroskopisch nicht unterscheidbare – wie z.B. zu stark überlappende – Banden durch die „dichroitische Signatur“ zu identifizieren.

Eine Zuordnung von Banden in den Absorptionsdifferenzspektren bei bekannter Lage der Übergangsdipolmomente ist aussichtsreicher, wenngleich auch nicht eindeutig. Abbildung 3.18 stellt die Anordnung der 6 zentralen (Bakterio-)Chlorine im PS II sowie im BRC dar. Im oberen Teil ist die bisher am weitesten geführte Auswertung (Vasil'ev et al., 2001) der vorhandenen Röntgenstrukturdaten dargestellt, bei der im Gegensatz zu der ersten Veröffentlichung (Zouni et al., 2001) neben der Ringebene auch die Polarisation der Chlorine bestimmt wurde. Die bei der durch die Kristallgüte gegebene Auflösung von 3.8 Å führt aber zu großen Unsicherheiten bei der Zuordnung der Elektronendichten zu Strukturdetails. So wurde nur die Lage exponierter Aminosäurereste, Y_Z und Y_D , bestimmt. Zudem ergibt sich ein Mg-Mg-Abstand zwischen P_A und P_B bei der Auswertung der Strukturdaten in (Zouni et al. (2001), 1FE1) von 10.0 Å, in (Vasil'ev et al. (2001), 1ILX) sind es aber nur 8.3 Å. Die Lagebestimmungen für den Cyclopentanonring (Ring V), die eine Aussage über die Orientierung der Dipolübergangsmomente innerhalb eines Chlorinringes erlaubt, können daher falsch sein. Die Zuordnungen für das BRC ist dagegen wegen der für Membranproteine guten Auflösung von 2.2 Å zuverlässig. Der analoge Aufbau der zentralen Chromophore in Reaktionszentren von PS II einerseits und anoxygener Bakterien andererseits ist ersichtlich. Ist die Strukturanalyse von Vasil'ev et al. (2001) in Bezug auf die Lage der Ringe V korrekt, stimmen die Winkel der 4 zentralen Chl a mit den entsprechenden der Bakteriochlorophylle mit Abweichungen von etwa 5° überein – wenn die Übergangsmomente genau auf der Achse N_1-N_3 liegen. Nur P_B im PS II ist im Vergleich zum BRC um circa 20° weiter zur Membrannormalen gedreht.

Anisotropiewerte helfen bei der Trennung und Charakterisierung von Einzelbanden, Aussagen über die Pigmentgeometrie bleiben aber qualitativ. Wie im Ergebnisteil schon angesprochen, ist die einfachste Deutungsmöglichkeit das Vorliegen von Monomerbanden. Unter dieser Annahme werden zunächst Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen bei Tieftemperatur gezogen. Inwieweit exzitonische Kopplung zwischen den zentralen 4 Chl a eine Rolle spielen kann, wird anschließend diskutiert. Abschließend folgen Implikationen für P_{680} bei Raumtemperatur.

10 Schaffernicht (1980) gibt als mögliche Interpretation der Photosелеktions-Experimente bei PS I die selektive Anregung des Dimers P_{700} an.

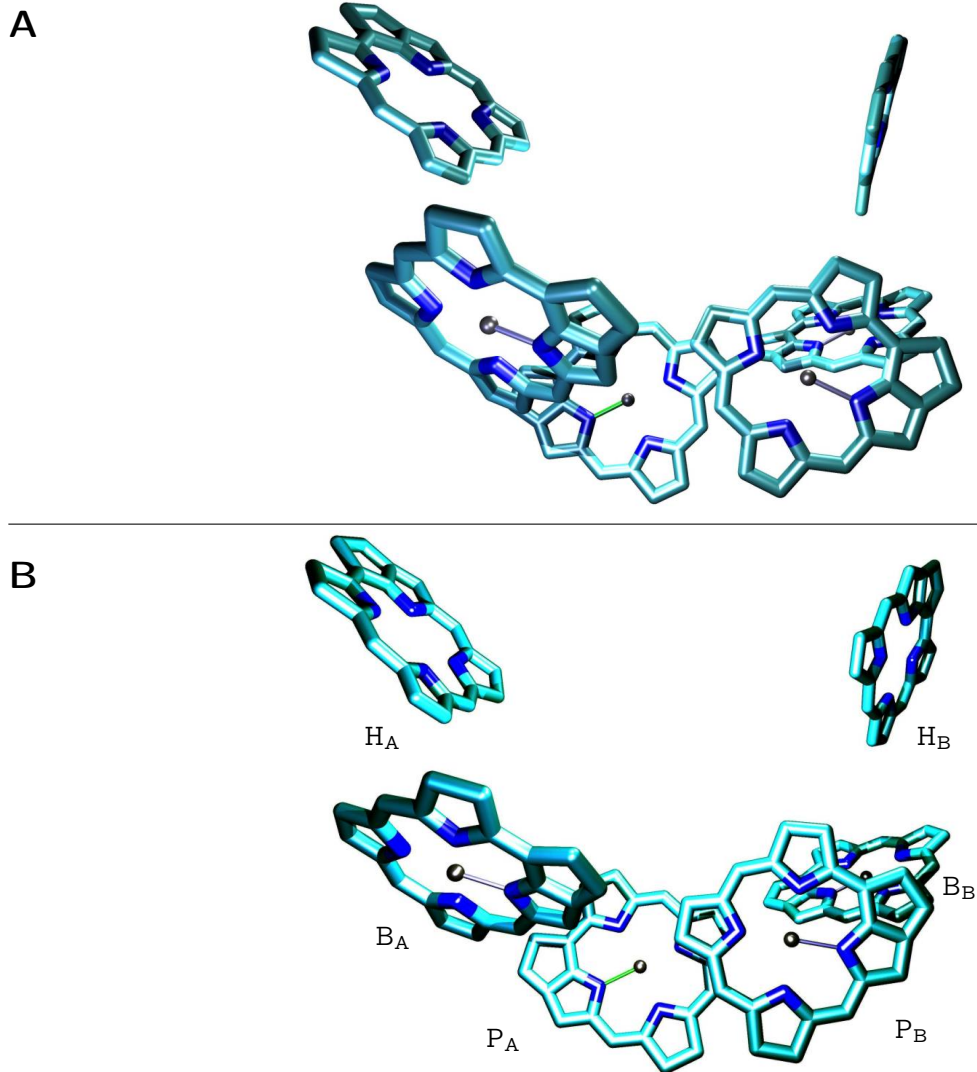


Abbildung 3.18: Über die Ausrichtung der zentralen 6 Chlorin-Ringe im PS II. Auf die Lage des Q_y -Übergangsmomentes und des Differenzvektors des permanenten Dipolmomentes eines als Monomer vorliegenden Chlorinmoleküls kann näherungsweise geschlossen werden, wenn die Lage der Ringebene und die Polarisierung, die Richtung der Achsen X und Y, bekannt sind (s.a. Abschnitt 3.2.2.1 und 3.2.2.4). Die ungefähre Ausrichtung wird durch dünne Linien vom Mg- zum N₃-Atom verdeutlicht für: (—) P_A, (—) B_A, P_B bzw. B_B. Die zentralen (B)Chl a P_A und P_B liegen jeweils annähernd parallel zur Papierebene. H_A und H_B sind (B)Pheo.

- (A) Die zentralen 6 Chlorin-Ringe im PS II nach Vasil'ev et al. (2001), Protein-Datenbank-Eintrag: 1ILX. Die nach dieser Analyse bestimmte jeweilige Lage des Cyclopentanon- („V“) am Tetrapyrrol-Ring gibt die Lage der Q_y -Übergangsmomente (s.a. 3.2.2.1) und des Differenzvektors des permanenten Dipolmomentes (3.2.2.4) vor. Aufgrund der geringen Auflösung der Röntgenstrukturdaten von 3.8 Å kann eine irrtümliche Zuordnung für den Ring V nicht ausgeschlossen werden.
- (B) Die zentralen 6 Bakteriochlorin-Ringe im BRC nach Stowell et al. (1997), Protein-Datenbank-Eintrag: 1AIJ. Bei einer Auflösung von 2.2 Å ist der Ring V, der Phytol- und andere Reste am BChl klar lokalisierbar. Der Übersicht halber sind die beiden letztgenannten Gruppen nicht dargestellt. Das Q_y -Übergangsmoment bei BChl wird auch als entlang der Achse N₁–N₃ liegend angesehen, für eine ausführliche Diskussion dazu siehe Hoff & Deisenhofer (1997, Kap. 8.2).

3.5.1 Deutung der Tieftemperatur-Spektren mit Monomer-Banden

3.5.1.1 „P₆₈₀⁺“-Bildung und elektrochrome Reaktion

Bei Anregung von PS II wird das Radikalpaar P₆₈₀⁺Q_A⁻ gebildet und ist für Millisekunden stabil. Das Differenzspektrum P₆₈₀⁺Q_A⁻/P₆₈₀Q_A zeigt in der naheliegendsten Deutung zwei unterscheidbare Komponenten: Bei Bildung des Kations bleicht ein Chl a bei 675 nm. Die positive Ladung auf diesem Molekül führt zu einer elektrochromen Verschiebung der Bande eines weiteren Chl a-Moleküls um 2.0–2.5 nm zum Blauen hin. Die bleichende Bande bei 675 nm weist bei Photoselektion durch „fernrote“ Anregung einen Anisotropieparameter $r_{675} \approx 0.03$ auf. Die Anisotropieparameter der positiven und der negativen elektrochromen Einzelbande, die Bleichung bei 684 nm und die Absorption bei 682 nm, sind im Rahmen der Messgenauigkeit identisch: $r_{684 \rightarrow 682} \approx 0.1$. Dass eine elektrochrome Verschiebung zum Kurzwelligen um 683 nm vorliegt, zeigen nicht nur die um einen Wert streuenden Messwerte, sondern insbesondere das Fehlen einer ausgeprägten Polstelle – im Gegensatz zum Bereich um 679 nm. Wie in Abschnitt 3.2.1.1 ausgeführt, *liegt dieser Spezialfall nur für identische Anisotropiewerte der Einzelkomponenten vor*. Dieses Chlorophyll ist aufgrund seiner Wellenlänge und seinem Anisotropieparameter als Bestandteil der photoselektierten Antennen erkennbar. Der Verlauf der Polstelle bei 679 nm gibt überdies bei der numerischen Anpassung eine gewisse Einschränkung hinsichtlich der Dipolstärken der überschneidenden Banden, so dass möglicherweise nur ein Pigment elektrochrom reagiert.

Andere Autoren haben sich früher mit derselben Problematik beschäftigt. Sie kamen zum Teil zu anderen Schlüssen, die durch die hier vorgestellten Ergebnisse zu revidieren sind. Dies wird im Folgenden detailliert.

i) Bei Hillmann *et al.* (1995) erfolgte anhand eines Differenzspektrums ähnlich dem in Abbildung 3.11 gezeigten Ergebnis eine entgegengesetzte Zuordnung der beiden bleichenden Komponenten: Ein Chl a-Molekül bleicht aus bei 685 nm und ein weiteres, bei 675 nm absorbierend, erfährt eine Rotverschiebung um 8.4 nm. Anhand der linear-dichroitischen Markierungen kann diese Deutung ausgeschlossen werden.

Hillmann (1997) präsentiert ausserdem P₆₈₀⁺Q_A⁻/P₆₈₀Q_A-Differenzspektren an orientierten Proben bei 77 K. Die Ausrichtung erfolgte im gepressten Polyacrylamidgel bzw. gezogenen Polyvinylalkoholfilm. Bei beiden Methoden zeigten sich im Ergebnis Inkonsistenzen zwischen den beiden Millisekundenphasen (umgekehrtes Vorzeichen der Amplituden bei 681–682 nm), die diese Daten problematisch machen, da anscheinend Überlagerungen mit unerwünschten Zuständen vorlagen. Doch bei Betrachtung ausschließlich der langsameren Kinetik, deren Amplituden die isotropen Differenzspektren qualitativ gut wiedergeben, führte die Bestimmung des linearen Dichroismus zu Ergebnissen, die nicht in Einklang mit dem in der zitierten Arbeit vorgestellten Modell zu bringen waren, wohl aber mit den hier vorgestellten Daten und deren Interpretation. Die kleinen Banden bei 680 nm und 685 nm zeigen im Rahmen des Messfehlers keinen Amplitudenunterschied, die Bande bei 675 nm weist aber signifikante – wenn auch für mechanisch orientierte Proben kleine – dichroitische Unterschiede auf: für Kernkomplexe im Gel wird DR = 1.1–1.2 angegeben, im Film etwa 1.3 bei 675 nm, eine Polstelle ist bei der erreichten spektralen Auflösung andeutungsweise sichtbar mit einem auf fast 2 erhöhten DR-Wert bei 677 nm. Da die Höhe der Partikel vertikal zur Membran kleiner ist als die Dimensionen in der Membranebene, erwartet man maximale Werte des di-

chroitischen Verhältnisses bei Orientierung des detektierten Übergangsmomentes parallel zur Membranebene⁽¹¹⁾. Die beobachteten dichroitischen Effekte bei mechanischer Orientierung deuten darauf hin, dass das Q_y-Übergangsmoment von P₆₈₀⁺ eher parallel zur Membranebene, das des elektrochrom reagierenden Chromophors aber beim „magischen“ Winkel (35.3° zur Membranebene (Breton et al., 1973)) liegt, entsprechend der Lage der „Voyeur“-Chlorophylle B_A/B_B.

ii) Von Mathis et al. (1976) wurde an magnetisch orientierten Chloroplasten bei 100 K eine Bestimmung der Lage des Übergangsmomentes der Chlorophyll-Kationenbande bei 825 nm durchgeführt. Der schnelle Anteil der beobachteten Kinetiken konnte P₆₈₀, der langsamere P₇₀₀ zugeordnet werden. Beide Komponenten zeigten ähnliche dichroitische Verhältnisse, DR = 1.32 für P₆₈₀⁺ sowie 1.40 für P₇₀₀⁺. Für den primären Donator im Photosystem I zeigten übereinstimmende Ergebnisse für den Lineardichroismus, dass die Ausrichtung der Übergangsmomente der bleichenden Bande bei 700 nm⁽¹²⁾ und der NIR-Kationenbande parallel zueinander liegen (Junge & Schaffernicht (1978), sowie Breton & Verméglio (1982) und darin genannte Referenzen). Als Analogieschluss gingen Mathis et al. (1976) von einer ähnlichen Ausrichtung der Q_y-Bande im PS II aus, mit einem Winkel < 20° zur Membranebene. Dabei blieb der unterschiedliche Charakter der Kationenabsorptionen in beiden Systemen unberücksichtigt: Bei P₇₀₀⁺ liegt eine stark verzerrte, als Einzelabsorption erscheinende Bande vor, für P₆₈₀⁺ sind zwei Gaussbanden bei 735 und 820 nm erkennbar (s.a. Abbildung 3.14).

Das Kation von Chl a in apolarer Lösung zeigt demgegenüber eine Bande bei 840 nm ($\Delta\epsilon \approx 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), die zu kleineren Wellenlängen in ein ca. 70 nm breites Plateau mit $\Delta\epsilon \approx 4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ übergeht (Mathis & Setif, 1981). *Ab initio* Berechnungen zur Charakterisierung von elektronischer Struktur und Spektren des Kations von Ethyl-Chl a (Petke et al., 1980) ergaben Banden bei 750 und 805 nm, die überwiegend y-polarisiert sind und Dipolstärken von 1 bzw. 6.3 D² besitzen (mit den Parametern aus Tabelle 3.2 ergeben sich Dipolstärken von P₆₈₀⁺ von 5.2 D² bei 735 nm und 4.4 D² bei 820 nm). 3 weitere Dublettbanden im Bereich von 700–850 nm mit geringen Dipolstärken, $\lesssim 0.3 \text{ D}^2$, werden vorhergesagt, deren Übergangsmomente einen Mischcharakter bezüglich der Polarisationsrichtung haben. Eine nahezu übereinstimmende Polarisierung von Q_y- und Kationenbande wie bei PSI entspricht also der Erwartung.

Wieso die ultrarote Bande bei P₆₈₀⁺ so ausgeprägt ist, ist nicht bekannt. Mittels ¹³C-MAS-NMR wurde allerdings (bei 225 K) eine außergewöhnliche Spindichte-Verteilung für P₆₈₀⁺ gegenüber Chl a⁺ *in vitro* bestimmt (Matysik et al., 2000)⁽¹³⁾. Die durch Photoselenktion

11 Überraschenderweise ist die Ausrichtung in gepressten Gelen sowohl bei Thylakoiden, Membranstapeln, Kernkomplexen und Reaktionszentren ähnlich. Die *in vivo* Membranebenen liegen etwa parallel zur „Fließrichtung“ des Geles (van Dorssen et al., 1987a,b). Gemeinsames Merkmal ist u.a. der positive LD der x-polarisierten Pheo-Banden (bei 543 nm), deren Übergangsmomente analog zum BRC in der Membranebene liegen (s.a. 3.18). Die Ausrichtung in der Art abgeflachter Ellipsoide oder Scheiben senkrecht zur Pressrichtung kann im Falle von Kernkomplexen durch Aggregation vermittelt hydrophober Wechselwirkungen verstärkt werden (Tapie et al., 1986). Bei Reaktionszentren könnte dies der entscheidende Grund für die beobachtete Orientierung sein.

12 Dies ist die langwelligere Dimerbande mit Ausrichtung des Übergangsmomentes etwa parallel zu denen der beiden Monomerkomponenten. Siehe dazu und hinsichtlich einer Diskussion über die Lage der hochenergetischen Dimerkomponente (Webber & Lubitz, 2001).

13 MAS – *magic angle spinning*, siehe (Atkins, 1996).

erhaltenen Anisotropieparameter (bei 77 K) zeigen einen kleinen, aber signifikanten Unterschied zwischen der ultraroten und nahinfraroten Bande. Erstere besitzt mit 0.18 einen ähnlichen Wert wie die Q_y -Bande der bleichenden Bande, während letztere keine Anisotropie zeigt. Möglicherweise ist das Übergangsmoment der NIR-Bande des P_{680}^+ anders polarisiert als bei Chl a in Lösung und bei P_{700} – einhergehend mit dem speziellen Absorptionsverlauf. Wegen der geringen Unterschiede in den Anisotropieparametern des Q_y - und der Kationen-Übergangsmomente im Vergleich zum maximal beobachteten Wert von 0.1 kann aber die Schlussfolgerung von Mathis et al. zutreffen, dass die Lage des Q_y -Übergangsmomentes der ausbleichenden Chl-Komponente nahezu parallel zur Membranebene liegt.

Für das Photoselektionsexperiment bei langwelliger Anregung kann aus dem Vergleich mit Ergebnissen an ausgerichteten Proben gefolgert werden, dass ein Anisotropiewert nahe Null (< 0.04) kompatibel sein *könnte* mit einer Ausrichtung des beobachteten Dipols etwa parallel zur Membranebene. Der maximale Wert von 0.1 *könnte* mit einer „Antennenebene“ interpretiert werden, zu dem entweder B_A oder B_B gehört, und das entsprechende „Voyeur“-Chl dann auch elektrochrom auf das gebildete Chl-Kation reagiert. Ist die Ladung auf ein (als Monomer vorliegendes) P_A lokalisiert, kann bei Gültigkeit des Strukturmodells 3.18 (A) B_B als elektrochromes Pigment ausgeschlossen werden, da die Übergangsmomente dieser beiden Pigmente fast parallel zueinander liegen, die Anisotropieparameter aber deutlich verschieden sind.

iii) Diner et al. (2001) haben einen anderen Weg der Kennzeichnung von $P_{680}^+ Q_A^- / P_{680} Q_A^-$ -Absorptionsbanden gewählt. Sie untersuchten Punktmutanten, bei denen entweder D1-His198 oder D2-His197 ersetzt wurden. Dies sind die homologen Histidine zu L-173 und M-200(202) im BRC, die axiale Liganden für P_A bzw. P_B sind (mit Van-der-Waals-Kontakt zum zentralen Mg).

Es wurden Differenzspektren bei 298 K im Bereich der Soretbanden gewonnen an Mutanten, bei denen His durch Asn, Gln oder Ala ersetzt war. Dies sind zur Koordination fähige Gruppen im Gegensatz zu unpolaren Gruppen, die im BRC zur Bildung eines BPheo anstelle eines BChl führen. Für PS II fanden Diner et al. bei Ersetzung durch kleine unpolare Gruppen, Ala und Val, (verminderte) Aktivität. Die Ligandenbildung könnte in diesen beiden Fällen durch ein Wassermolekül erfolgen. Bei Ersetzung durch eine größere nichtkoordinierende Gruppe wie Leu kann aber augenscheinlich das gesamte Reaktionszentrum nicht erfolgreich assembliert werden, wie aus dem Fehlen variabler Fluoreszenz deutlich wird und aus der Tatsache, dass DCMU nicht gebunden wird. Die Punktmutationen auf der D1-Seite mit Asn, Gln oder Ala ergaben nicht prinzipiell modifizierte Spektren, induzierten aber eine Blauverschiebung der P^+ -Bande, die im Wildtyp eine Zentralwellenlänge von 433 nm hat. Die deutlichste Verschiebung, um 3 nm, wurde in D1-His198Gln-Mutanten gefunden. Der radikale Fall einer Ersetzung des P_A durch ein Pheo ist unwahrscheinlich, da eine im Vergleich zum Wildtyp gleichwertige Sauerstoffproduktion gefunden wurde. Ersetzungen bei P_B ergaben geringere Modifikationen, am deutlichsten eine Rotverschiebung um maximal 1.5 nm durch Ala. Der Befund wurde gedeutet mit einem stärkeren Beitrag von P_B , welches wahrscheinlich bei 436 nm absorbiert, da dort das Zentrum des Elektrochromie-Signals, verursacht von Y_D^{ox} , liegt. Für den Wildtyp wurde daher auf eine Lokalisation der Ladung bei Raumtemperatur überwiegend auf P_A geschlossen (siehe dazu aber Abschnitt 3.5.3).

Im Y_Z^{ox}/Y_Z -Spektrum wird eine Rotverschiebung im Soretbereich bei 433 nm als elektro-

chrome Antwort von P_A, dem nächstgelegenen Chlorin, aufgefasst (siehe dazu auch Abschnitt 2.5.1). In Einklang mit den eben beschriebenen Differenzspektren von P₆₈₀⁺/P₆₈₀ bestimmen Diner et al. (2001) eine Verschiebung dieses spektralen Merkmals zum Kurzwelligen um 2–3 nm durch Ersetzung des D1-His198 durch Gln. Zur Erklärung der Richtung der Verschiebung fordern Diner et al. eine umgekehrte Orientierung des Differenzvektors der permanenten Dipolmomente von Grund- und angeregtem Zustand $\Delta\mu_p$ bei Oxidation von P_A gegenüber der theoretischen Erwartung (Fajer et al., 1992).

Der Effekt der Punktmutation D1-His198Gln wurde auch für das Differenzspektrum P₆₈₀⁺Q_A⁻/P₆₈₀Q_A bei 80 K untersucht⁽¹⁴⁾. Im Vergleich zum Wildtyp ist bei der Mutante die Ausbleichung bei 675 nm deutlich zu kürzeren Wellenlängen verschoben, analog zur Soretbande um 3–4 nm. Die langwelligen Kanten der Ausbleichung bei 685 nm liegen dagegen genau übereinander, und der mittlere Bereich des Spektrums mit der Absorption bei 681–682 nm erscheint um circa 2 nm blauverschoben. Zusammen mit den hier vorgestellten linear-dichroitischen Markierungen der Einzelbanden besteht deutliche Evidenz, dass P_A bei 675 nm absorbiert und nach der Ladungstrennung zum Kation wird. Das im Zustand P₆₈₀Q_A bei 684 nm absorbierende Chl a wird durch die Bildung von P₆₈₀⁺ blauverschoben, wird aber nicht durch Mutation des axialen Liganden D1-His198 modifiziert. Die kleine Verschiebung der Absorptionsbande im Zentrum des betrachteten Differenzspektrums kann durch die teilweise Überlagerung beider Komponenten erklärt werden. Diner et al. (2001) folgern zusammen mit Ergebnissen über den Triplettzustand (siehe unten), dass die stärkste elektrochrome Verschiebung B_A zuzuordnen ist. Diese Folgerung ist aber nicht zwingend, wie weiter unten ausgeführt wird.

Elektrochromie weiterer Komponenten? Die elektrochrome Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen schließt Effekte 2. Ordnung aus. Denn für eine feldinduzierte Komponente erwartet man immer eine Rotverschiebung, da die Polarisierbarkeit höherer vibronischer Zustände größer ist als die des Grundzustandes (Krawczyk, 1991). Somit ist die Wirkung der entstandenen positiven Ladung auf permanente Dipolmomente (genauer: $\Delta\mu_p$) entscheidend. Durch eine auf dem zentralen Mg-Atom eines Chl a lokalisiert gedachte Punktladung (als Näherung für eine Delokalisation über dem Chlorin-Ring) und Betrachtung der Verbindungslinie zum Mg des möglicherweise elektrochrom reagierenden Nachbarpigments lässt sich der Effekt abschätzen, wenn man die Richtung von $\Delta\mu_p$ kennt. Nach Gleichung (3.9) kann die maximale Verschiebung zu etwa 3 nm abgeschätzt werden, wenn man von einer typischen Distanz von 10 Å und einer effektiven Dielektrizitätskonstante von 4 ausgeht⁽¹⁵⁾. Wenn die Ladung auf P_A lokalisiert ist, erwartet man demnach bei einer Struktur wie in Abbildung 3.18 eine Blauverschiebung von B_A und B_B, sowie eine deutliche Rotverschiebung von P_B. Letztgenannter Effekt müsste Bestandteil der Bleichung bei 675 und Absorption bei 681 nm sein. Bezüglich der beobachteten Dipolstärken und Anisotropieparametern ist dies

14 Im Vergleich zu den Ergebnissen bei Tieftemperatur an *Synechococcus* (5, 77 & 170 K: Hillmann & Schlodder, 1995; Hillmann et al., 1995) und Spinat (20 K: van Mieghem et al., 1995, 77 K: diese Arbeit) scheint das bei *Synechocystis* gewonnene Spektrum des Wildtyps im Bereich der Q_y-Banden insgesamt um circa 3 nm zum Blauen verschoben. Zur Vereinfachung der Beschreibung wird dieser Unterschied in der folgenden Beschreibung ignoriert.

15 Steffen et al. (1994) bestimmten mittels Stark-Spektroskopie effektive Werte der Dielektrizitätskonstante des BRC bei Tieftemperatur (1.5 K) von ca. 1.5–2.5 für M und 5–6 für L. Siehe dazu auch Appendix 1 in (Mulikjanian et al., 1996).

auf dem ersten Blick nur dann eine Option, wenn die Verschiebung und damit die resultierende Elektrochromiebande (als Ganzes) sehr klein ist, was aber nicht der Erwartung – bei gegebener Strukturvorhersage – entspricht. Numerische Anpassungen (nicht gezeigt) mit Hinzunahme zwei weiterer Gaussbanden, die eine Rotverschiebung darstellen, ergeben Hinweise für zwei Grenzfälle: a) Zwei Bleichungen bei 676 und 678 nm und eine entstehende Bande bei 679 nm, wobei alle drei Komponenten ähnliche Anisotropiewerte bei 0.03–0.04 aufweisen. b) Die Komponente bei 675 nm („P_A“) bleibt gegenüber der bisherigen Auswertung nahezu unverändert. Das zusätzliche elektrochrome Signal entspricht einer Verschiebung einer Bande von 679 nach 681 nm, die mit einem Anisotropieparameter von etwa 0.08 ausgezeichnet ist. In beiden Fällen verbleibt eine Blauverschiebung von 684 nm um 3 nm, ihr Anisotropieparameter ist gegenüber der alten Auswertung geringfügig reduziert (0.08–0.09). Fall a) ist kompatibel mit einer PS II-Kofaktorordnung analog zu Reaktionszentren anoxygener Bakterien. Für Fall b) sind aber nahezu identische Anisotropiewerte beider elektrochromer Signale notwendig, da sonst eine Polstelle bei 683 nm deutlich werden würde. Dieser Fall ist verträglich mit einer Konfiguration von P_B gegenüber P_A, bei der sowohl das Übergangsdipolmoment, als auch der Differenzvektor der permanenten Dipolmomente von Grund- und angeregtem Zustand ($\Delta\mu_p$) eher senkrecht als parallel zueinander stehen.

Dass die Blauverschiebung nur von einer Komponente herrührt, erscheint nicht zwingend. Geht man von einer zentral auf P_A lokalisierten Ladung aus, wird allein vom Unterschied der Entfernungen der beiden Voyer-Chl zum Elektronenloch ein um den Faktor 1.7 größerer Effekt von B_A erwartet (Gl. (3.9)). Bei Eigenschaften analog zum BRC kann darüber hinaus gefolgert werden, dass der eben genannte Unterschied etwas vermindert wird wegen der günstigeren Ausrichtung von $\Delta\mu_p$ des B_B. Andererseits ist aber auch die entgegengesetzte Tendenz wegen einer bis zu 3-mal höheren Dielektrizitätskonstanten in der D2- gegenüber der D1-Hälfte zu erwarten (s. Fußnote 15 auf der vorherigen Seite). Nach einer Untersuchung, bei dem in Reaktionszentren Pheophytin substituiert wurde, zeigen die spektralen Änderungen der Fraktion, in der das Triplettpektrum (bei 10 K) nicht modifiziert war, die Absorption eines Chl bei ~ 679 nm an, welches mit B_B identifiziert werden kann (Germano et al., 2001). Die Fraktion, bei dem (überwiegend) Pheo_A substituiert wurde, liegt etwa um 2 nm langwelliger. Dann wäre es möglich, dass B_B nicht bei der Photoselektion angeregt wurde und damit eine verschwindende Anisotropie aufweisen könnte, was auch verträglich mit einer möglichen Interpretation des Triplettpektrums wäre (siehe unten). Die Absorptionsdaten sind mit einer *deutlichen* Blauverschiebung einer Bande von ~ 682 nm ausgehend – als mögliche Lage von B_B in Kernkomplexen – nur dann verträglich, wenn diese von einer möglichen Rotverschiebung (P_B) zumindest teilweise kompensiert würde.

Denkbar wäre für PS II, dass eine Verteilung der Ladung auf P_A und P_B (oder ein schneller Transfer, *hopping*) vorliegt. Beispielsweise könnten beide Pigmente bei exzitonischer Wechselwirkung und spezieller Anordnung als eine kaum verbreiterte, ausbleichende Monomerbande erscheinen. Von Noguchi et al. (1998) wurde in Licht-Minus-Dunkel-Spektren eine IR-Bande (~ 1940 cm⁻¹) gefunden (Reaktionszentren bei 150 K), die analog zu ähnlichen (aber stärkeren) Banden (~ 2100 – 2600 cm⁻¹) in anoxygenen Reaktionszentren als Indikator für eine delokalisierte Ladung von P₆₈₀⁺ angesehen werden kann. Die geringere Stärke weist dabei nicht unbedingt auf eine höhere Lokalisation hin, sondern kann qualitativ auf den Unterschied zwischen BChl und Chl allgemein, sowie auf verminderte exzitonische Wechsel-

wirkungen zurückgeführt werden (s. Noguchi et al., 1998, und darin genannte Referenzen). Die bei (Noguchi et al., 1998) gezeigten Kontrollexperimente zeigen allerdings, dass die für die FTIR-Messungen genutzten Bedingungen zu einer Ausbleichung von zwei Chlorophyllen führt, die bei 673 und 682 nm absorbieren. Liegt tatsächlich eine (Quasi-)Delokalisation der positiven Ladung zwischen den beiden zentralen Chl a vor, müsste man zur Beschreibung der wechselseitigen elektrochromen Verschiebungen die oben beschriebenen Anpassungen (in modifizierter Form) gewichtet aufaddieren.

Rigby et al. (1994) verglichen die Hyperfein-Kopplungen einer Methyl-Gruppe (am C₅ gemäß Abbildung 3.2) unterschiedlicher Chl-Kation-Spezies. Die errechneten Spindichten deuten auf eine überwiegende Verteilung, 5:1, der Ladung P₆₈₀⁺ auf einem Chlorophyll bei 15 K. Sie konnten aber ein anderes Spin- bzw. Ladungs-tragendes Chlorophyll nicht vom Untergrund (Matrix-Signal) unterscheiden. Eine weitere ENDOR-Studie (Telfer et al., 1998) bestätigt im Wesentlichen die Ergebnisse von Rigby et al., diesmal bei 80 K. Telfer et al. betonen, dass es unklar ist, ob die geringe Abweichung der Hyperfein-Tensor-Komponenten gegenüber Chl a^{+•} *in vitro* auf veränderte Wechselwirkungen mit der Umgebung oder auf eine verringerte Spindichte zurückzuführen ist. Deswegen erscheint – unter Vernachlässigung von exzitonischen Wechselwirkungen – die Annahme gerechtfertigt, dass *bei Tieftemperatur* genau eine ausbleichende Bande (mit der Dipolstärke eines Chlorophylls) die Lage des „P₆₈₀⁺“, angibt, und diese Bande ist vermutlich P_A zuzuordnen.

3.5.1.2 Triplettbildung

Die Punktmutante D1-His198Gln zeigt bei Tieftemperatur (5 und 80 K) im Bereich der Ausbleichung bei 684 nm⁽¹⁶⁾ nur geringe Veränderungen, inhomogene „Verschiebungen“ $\lesssim 1$ nm (merkwürdigerweise liegen die größeren Unterschiede bei 5 K vor), im Differenzspektrum ³P₆₈₀/P₆₈₀ (Diner et al., 2001). Zusammen mit nahezu invarianten Spin-polarisierten EPR-Spektren bei 5 K für mehrere His198-Mutanten erscheint eine Lokalisation des Triplets auf P_A unwahrscheinlich. Erst bei höheren Temperaturen (150 und 230 K) wird eine Seitenbande bei 675 nm deutlich, die bei der Mutante durch Blauverschiebung stärker hervortritt.

Fluoreszenzemission nach selektiver Anregung (im Bereich 684.0–686.1 nm mit $\Delta\tilde{\nu} = 1$ cm⁻¹) von Reaktionszentren (mit 6 Chl a) bei 5 K wurde mit hoher Auflösung vermessen (Peterman et al., 1998). Mit dieser Technik (*fluorescence line narrowing*) können Pigmente aus einer kleinen Subpopulation konformationeller Proteinzustände beobachtet werden, so dass eine inhomogene Linienverbreiterung (quasi) ausbleibt. Eine Anpassung der homogenen Banden ergab einen Huang-Rhys-Faktor S⁽¹⁷⁾ von 1.6, wie auch ähnlich für ³P₆₈₀/P₆₈₀ bei selektiver Anregung bestimmt wurde (S=1.9, Kwa et al., 1994b). Auch eine Schwingungsmode niedriger Frequenz (80 cm⁻¹) stimmte bei den beiden Experimenten überein. Damit könnten der Emissions- und der Ladungstrennungs-Zustand übereinstimmen. Die Fluoreszenzemissions-Studie zeigt eine deutliche Schwingungsbande bei 1669 cm⁻¹ mit einer Schulter bei 1660 cm⁻¹. Peterman et al. ordnen diese IR-Übergänge der C₉=O Streckschwingung von Chlorophyllen zu (C₉ gemäß Abbildung 3.2). Da zwei Übergänge

16 Siehe die Fußnote 14 auf Seite 102 bezüglich der Angabe von Zentralwellenlängen.

17 Dies ist ein Maß für die Elektron-Phonon-Kopplung. Der oben gegebene Wert ist gegenüber dem bei Antennen-Chl bestimmten (0.8) hoch.

vorliegen, wird das als ein Hinweis auf einen über mehrere Chlorophylle delokalisierten Zustand interpretiert, gemäß (Durrant et al., 1995). Diner & Rappaport (2002) finden, dass die stärkere Bande bei 1669 cm^{-1} dem langwelligsten Chl zuzuordnen ist und auch in FTIR-Differenzspektren des Triplettzustandes (Noguchi et al., 1993, 2001) bestimmt wurde. Zeitaufgelöste Messungen bei 77 K zeigen deutlich die Verschiebung dieser Bande (möglicherweise mit einer Schulter bei 1660 cm^{-1} , siehe oben) zu etwa 1630 cm^{-1} mit charakteristischen Zeiten für Triplettentstehung, im Bereich der erreichten Zeitauflösung von 55 ns, und -relaxation: Dieses Differenzsignal verschwindet mit einer Halbwertszeit von 1.0 ms. Keine der im FTIR-Differenzspektrum von Chl-Kationen in PS II-Reaktionszentren gefundenen Streckschwingungen von Keto-Gruppen stimmt mit der des Triplett-tragenden Chlorophylls überein (Noguchi et al., 1998, s.a. oben). Da B_A auf dem „aktiven Zweig“ liegt, kann man es daher als Träger des Triplettzustandes, zumindest bei Tieftemperatur, ansehen.

Betrachtet man nun die hier gewonnenen Daten über ${}^3P_{680}$ bei 77 K, so findet man in der einfachsten Form der Auswertung, dass zu den zwei unterschiedlichen Anisotropiewerten aus dem Differenzspektrum $P_{680}^+Q_A^-/P_{680}Q_A$ noch ein anderer Wert aus ${}^3P_{680}/P_{680}$, $r_{684} \approx 0.05$ hinzukommt. Dann dürfte B_A aber nicht oder nur sehr gering elektrochrom auf P_{680}^+ reagieren. Wahrscheinlich würde dann B_B auch bei 684 nm absorbieren und die Blauverschiebung verursachen, was aber bedeuten würde, dass die Übertragung der Wellenlänge von Ergebnissen an Reaktionszentren (Germano et al., 2001) nicht unmittelbar möglich war. Eine alternative Interpretation berücksichtigt die Migration des Triplettzustandes für Temperaturen $\gtrsim 80\text{ K}$ (Rutherford, 1986).

Mittels EPR und FTIR (Bosch et al., 1996; Noguchi et al., 1993) wurde eine Energielücke von 8–13 meV für den Transfer des Triplettzustandes bestimmt. Abhängig von den beteiligten Pigmenten bei der Ladungstrennung ergeben sich verschiedene Modelle, siehe z.B. (Noguchi et al., 2001) oder (Diner & Rappaport, 2002). Letztgenannte Autoren merken an, dass nach (Konermann et al., 1997; Peterman et al., 1998) bei 5–10 K keine Fluoreszenzemission durch Pheo* detektiert werden konnte, bei 77 K aber zu 20%. Daher schließen sie gemäß einer Boltzmann-Verteilung auf einen Energieabstand von 10.5 meV, die die Differenz der angeregten Singulett-Zustände von B_A (684 nm) und Pheo (680 nm) wiedergibt. Die Energielücke liegt innerhalb des oben genannten Bereiches für die Triplettmigration.

Eine gewichtete Verteilung des Triplettzustandes für 77 K, bei dem B_A (684 nm), B_B ($\sim 682\text{ nm}$) und die beiden Pheo ($\sim 680\text{ nm}$) nach der obigen Betrachtung noch signifikant beitragen könnten, kann dazu verwendet werden, das Triplett-Differenzspektrum (Abbildung 3.17) anzupassen. Dabei kann der Anstieg des Gesamt-Anisotropieparameters zum Langwelligen hin mit Einzelwerten von $r_{684} \lesssim 0.1$, $r_{682} \sim 0.0$ und $r_{680} \lesssim 0.0$ wiedergegeben werden, allerdings wird die Anpassung der Absorptionskurve im Vergleich zu Abbildung 3.17 geringfügig schlechter (nicht gezeigt). Bei der in (Diner et al., 2001) beschriebenen Punktmutante D1-His198Gln, die nur P_A (675 nm) beeinflusst, war dort bei 77 K kein Unterschied im ${}^3P_{680}/P_{680}$ -Spektrum zum Wildtyp zu sehen. Noguchi et al. (2001) deutet die FTIR-Spektren bei 77 K mit nur einem Pigment (siehe oben). Die weiteren Pigmente sollten aber mit insgesamt 40–50% beitragen. Es ist unklar, inwiefern diese als Seitenbande bei 1669 cm^{-1} oder im Untergrund verborgen sein können.

Bei Reaktionszentren wurde mittels ADMR (*absorbance-detected magnetic resonance*) eine Variation bezüglich magnetischer Eigenschaften von ${}^3P_{680}$ -Zuständen (Variation der

Feinstrukturkonstante D) auch bei tiefsten Temperaturen (1.2 K) gefunden (van der Vos et al., 1992). Bei der Bestimmung des Q_y-Übergangsdipolmomentes zur Membranebene mittels linearem Dichroismus (unter Zugrundelegung der Resultate von van Mieghem et al. (1991)) war diese Inhomogenität nicht mehr sichtbar, der Winkel wurde mit $36^\circ \pm 8^\circ$ angegeben. Nach (Vasil'ev et al., 2001) und mit Annahme der Q_y-Ausrichtung gemäß Abbildung 3.18 kommt P_B mit $\sim 32^\circ$ und dann B_A mit $\sim 26^\circ$ diesem Wert am nächsten. Van der Vos et al. sehen ³P₆₈₀ als gering mit den anderen Pigmenten wechselwirkend an, da die relative Orientierung von Triplett-Achsensystem und Q_y dem von Chl a *in vitro* entspricht. ADMR und FDMR (*fluorescence*-...) an Membranfragmenten zeigen keine Variation der Feinstrukturkonstanten. Die Zentralwellenlänge der Hauptbande liegt hier übereinstimmend mit den eigenen Daten bei 684 nm (Carbonera et al., 1994b,a). Zur Interpretation von kleineren Banden bei Wellenlängen < 680 nm wurden exzitonische Wechselwirkungen hinzugezogen.

Zusammenfassend ergibt die Auswertung des P₆₈₀⁺/P₆₈₀-Differenzspektrums bei 77 K mittels 3 Gaußbanden (mit etwa der Dipolstärke eines Chl a) folgende Interpretation: Im Ergebnis sind deutliche Markierungen gesetzt für P_A (675 nm) und einem durch die entstandene Ladung von 684 nach 682 nm verschobenes Pigment, B_A oder B_B (P_B kommt hierfür nur in Frage, wenn eine im Vergleich zum BRC umgekehrte Orientierung des Vektors $\Delta\mu_p$ vorläge).

Unter der Annahme, dass B_A als Voyeur-Chl des „aktiven Zweiges“ (D1) durch Ladungsrekombination in den Triplettzustand übergeht, kann der Unterschied zwischen den Anisotropiewerten von P₆₈₀⁺/P₆₈₀ und ³P₆₈₀/P₆₈₀ bei 684 nm folgende Gründe haben: a) Der Triplettzustand ist bei 77 K in inhomogener Weise über die sehr langwellig absorbierenden Chromophore des Reaktionszentrums verteilt. b) Der elektrochrom reagierende Chromophor ist nicht B_A. Diese beiden Möglichkeiten schließen sich nicht gegenseitig aus.

Offene Fragen sind (bei Zugrundelegung einer im Wesentlichen zum BRC analogen Lage der Übergangsdipolmomente der Kernpigmente): Warum ist insbesondere P_B aber auch B_B (bzw. B_A) elektrochrom nicht deutlich in Erscheinung getreten? Wieso ist das Kationenspektrum von P₆₈₀⁺ abweichend von P₇₀₀⁺ und Chl a⁺ *in vitro*? Eine Beantwortung dieser Frage könnte auch die Diskrepanz zwischen den Anisotropieparametern bei 675 nm und 825 nm klären. Eine Beantwortung der vorhergehenden Frage sollte möglich sein, wenn Klarheit über die Lage der Übergangsdipolmomente besteht. Es wurden Möglichkeiten für die spektrale Lokalisation dieser „verborgenen“ Banden genannt, die mit dem Absorptions- und Anisotropiespektrum verträglich sein könnten.

Widersprüche, die sich derzeit aus der Zuordnung der Banden mit ihren Anisotropieparametern zu Pigmenten und der Lage von Übergangsmomenten ergeben, könnten auf strukturelle Anordnungen, die von denen des BRC abweichen, zurückgehen.

3.5.2 Exzitonische Wechselwirkungen

Die angeregten Zustände von Chromophoren, die im Protein nah beieinander liegen, können miteinander wechselwirken (Näheres über exzitonische Kopplung siehe Abschnitt 3.2.2.3). Entscheidend für die Kopplungsstärke J ist neben dem Abstand der Pigmente die Ausrichtung der Dipolmomente und die Dipolstärke. Nur bei einem geringen Unterschied in den Anregungsenergien führt die Wechselwirkung zur Bildung eines „Supermoleküls“. Die

elektronischen Energieniveaus werden im Protein durch zwei Faktoren moduliert: In einer „glasartigen“ Matrix ist die Bande eines Pigments aufgrund Fluktuationen in der Umgebung inhomogen verbreitert (in Form einer Gaußbande). Außerdem können sich die Zentralwellenlängen der Banden durch „chemische Verschiebung“ der entsprechenden Kofaktoren unterscheiden.

Mit den zwei vorliegenden Strukturmodellen (Zouni et al., 2001; Vasil'ev et al., 2001) ergeben sich die nachfolgend in der Tabelle 3.4 aufgeführte Kopplungsstärken zwischen den Chl α -Molekülen. In (a) bzw. (b) wurde von einer Ausrichtung der Übergangsmomente analog zum BRC ausgegangen (siehe auch Abbildung 3.18). (c) hingegen entspricht (a) mit einer um 90° gedrehten Ausrichtung des Übergangsmomentes von P_B .

Tabelle 3.4: Exzitonische Wechselwirkungsenergien J (in cm^{-1}) der zentralen Chl α -Moleküle im PS II bei Ausrichtung der Übergangsmomente analog zum BRC (siehe Abbildung 3.18) bei Zugrundelegung der Strukturmodelle (a) nach Zouni et al. (2001), 1FE1, bzw. (b) nach Vasil'ev et al. (2001), 1ILX. (c) entspricht (a) mit einer um 90° gedrehten Ausrichtung des Übergangsmomentes von P_B .

	(a)	P_B	B_A	B_B	(b)	P_B	B_A	B_B	(c)	P_B	B_A	B_B
P_A		124	-47	-80		259	-59	-81		0	-47	-80
P_B			-81	-53			-72	-27			4	17
B_A				8				8				8

Überdies ergeben beide Strukturen für die exzitonische Wechselwirkung zwischen Pheo (H_A bzw. H_B) und dem jeweils benachbarten „Voyeur“-Chl $J \sim 100 \text{ cm}^{-1}$, wenn von einer Ausrichtung der Q_y -Übergangsmomente nahezu parallel zur Membrannormalen ausgegangen wird.

Es fällt im Vergleich von (a) und (b) auf, dass beide Strukturmodelle ähnliche Wechselwirkungsenergien zwischen je einen der Chl-Moleküle des „*special pair*“ und den „Voyeur“-Chl ergeben, aber bei J zwischen P_A und P_B stark abweichen. Dies liegt an der oben erwähnten Diskrepanz der beiden Strukturmodelle im Abstand der beiden zentralen Chl-Moleküle, die in der Weise vorliegt, dass in Struktur (b) eine Lage der Dipol- und des Abstandsvektors resultiert, die der *in-line*-Konfiguration (Pearlstein, 1991) stärker entspricht.

Im BRC sind P_A und P_B „stark“ exzitonisch gekoppelt – sie bilden einen Dimer, bei dem die stärkste Komponente die langwelligste Bande im Spektrum ist. Die hier erzielten Ergebnisse an PS II lassen eine Deutung des $P_{680}^+ Q_A^- / P_{680} Q_A^-$ -Differenzspektrums mit „starker“ Kopplung unwahrscheinlich erscheinen: Man würde die stärkste Bande bei 685 nm positionieren, die andere Dimer-Komponente bei 676 nm, durch die Oxidation entsteht eine Monomer-Bande bei ca. 681 nm. Um dann ein dem Experiment entsprechendes Differenzspektrum zu erhalten, müsste man eine – eher unerwartet starke – elektrochrome Verschiebung einer Bande von etwa 675 nach 684 nm ansetzen. Um den Nulldurchgang der Absorption bei 683 nm würden dann 3 Komponenten mit im Prinzip unterschiedlichen Anisotropieparametern deutlich beitragen. Das Fehlen einer Polstelle in diesem Bereich macht dies sehr unwahrscheinlich. Eine Kopplungsstärke zwischen P_A und P_B wie in Tabelle 3.4 (b) angegeben erscheint daher zu hoch.

Als elektrochrome Verschiebung von P_B interpretierte Banden im Soretbereich des Y_D^{ox}/Y_D-Differenzspektrums liegen im Vergleich zu denen von P_A in Y_Z^{ox}/Y_Z um 2–3 nm blauverschoben, woraus in (Diner & Rappaport, 2002) auf den gleichen Unterschied der Zentralwellenlängen für die Q_y-Anregung geschlossen wird. Ist diese Abschätzung korrekt und weisen P_A und P_B tatsächlich eine Kopplung $\geq 100 \text{ cm}^{-1}$ – also eine BRC-ähnliche Anordnung – auf, ist die oben gegebene Interpretation des P₆₈₀⁺/P₆₈₀-Spektrums wahrscheinlich nicht haltbar. Eine eher rechtwinklige Stellung der Übergangsdipolmomente von P_A und P_B, im Extremfall eine Konfiguration wie in Tabelle 3.4 (c) aufgeführt, wäre aber durchaus verträglich. Der ungekoppelte Fall wurde schon diskutiert. Aber auch eine Kopplung, die zu stark überlagerten Banden im Bereich um 673–678 nm führen würde, kann nicht ausgeschlossen werden. Eine solche Überlagerung könnte auch die Ursache für die abweichenden Anisotropiewerte bei 675 und 825 nm sein.

Barber & Archer (2001) gehen von einer lokalisierten Ladungstrennung und Migration der positiven Ladung aus, aber von einer Delokalisation des angeregten Zustandes „P₆₈₀^{*}“, wie er vom Multimer-Modell nach Durrant et al. (1995) vorhergesagt wird. Danach weisen die zentralen Chlorine des Reaktionszentrums exzitonische Wechselwirkungen von $\sim 100 \text{ cm}^{-1}$ zwischen jeweils direkt benachbarten Chromophoren (H_A–B_A, B_A–P_A, ..., B_B–H_B) auf. Es wurde von einer gemeinsamen Zentralwellenlänge von 673 nm ausgegangen, die wesentliche Folgerung des Modells soll aber auch für „chemische Verschiebungen“ (*site-specific shifts*) von $\pm 130 \text{ cm}^{-1}$ und einer inhomogenen Linienbreite von 120 cm^{-1} gelten: Die exzitonischen Zustände liegen etwa in einem Bereich von 660–685 nm, der weitaus überwiegende Anteil der Dipolstärken liegt dabei aber am roten Rand. Daraus folgt bei Entfernung eines der interagierenden Chlorine durch Kation-, Anion- oder Triplettbildung aus dem Multimer im Wesentlichen eine Bleichung bei 680–684 nm. Diese Vorhersage ist nicht mit der oben gegebenen Deutung des P₆₈₀⁺/P₆₈₀-Differenzspektrums verträglich. Möglicherweise ist das Konzept des Multimers in der beschriebenen Allgemeingültigkeit nicht gegeben, weil gleichzeitig die Kopplungsenergien für P_A–B_A und P_B–B_B zu hoch angesetzt sind und deutliche „chemische Verschiebungen“ von $\sim 200 \text{ cm}^{-1}$ zwischen diesen Chl α -Molekülen vorliegen könnten.

In diesem Zusammenhang ist eine Simulation von optischen Spektren des FMO-Komplexes von grünen Schwefelbakterien (*Prosthecochloris aestuarii*) mit exzitonischen Zuständen interessant (Louwe et al., 1997). Dieses Protein besteht aus drei symmetrisch angeordneten Einheiten mit jeweils 7 BChl α , die Mg-Mg-Abstände von $\geq 12 \text{ \AA}$ aufweisen. Es zeigte sich, dass die Strukturen der betrachteten Spektren hauptsächlich von energetischen Differenzen der Chromophore, vermittelt durch unterschiedliche Bindungsplätze, also von „chemischen Verschiebungen“ herrühren. Die exzitonischen Wechselwirkungsenergien sind geringer als die inhomogene Linienbreite der individuellen Q_y-Übergänge (80 cm^{-1} bei 1.2 K). Bei dieser Abschätzung berücksichtigten die Autoren die Abschirmung der Dipol-Dipol-Wechselwirkung durch die Proteinumgebung – im Gegensatz zu anderen Arbeiten über exzitonische Kopplungen in Pigment-Protein-Komplexen (Pearlstein, 1991; Dekker & van Grondelle, 2000). Der dafür ermittelte Wert der relativen Dielektrizitätskonstanten ϵ_r beträgt 2.4. Für das *special pair* von *Rhodobacter sphaeroides* scheint die Polarisierbarkeit der Umgebung aber einen vernachlässigbaren Einfluss auf die exzitonische Kopplung zu haben, da aus Berechnungen von J für $\epsilon_r = 1$ anhand der Struktur (siehe Abbildung 3.18) nahezu der aus Analysen von Spektren erhaltene Wert von $\sim 500 \text{ cm}^{-1}$ (Hoff & Deisenhofer, 1997) resultiert. Es ist an-

zunehmen, dass der Einfluss der Umgebung für größere Pigment-Abstände zunimmt. Dies könnte die exzitonen Kopplungsenergien der Chromophore im PSII-Reaktionszentrum gegenüber den in Tabelle 3.4 angeführten Schätzwerten sogar noch weiter verringern.

3.5.3 P_{680}^+ bei Raumtemperatur – Delokalisation der Ladung

Mit den in (Hillmann et al., 1995) für 3 verschiedene Temperaturen (5, 170 und 298 K) dargestellten Differenzspektren $P_{680}^+Q_A^-/P_{680}Q_A$ sieht man eine starke Änderung beim Übergang von Tief- zu Raumtemperatur. Geht man von der Interpretation der Tieftemperaturdaten aus, können die Veränderungen beschrieben werden mit dem „Verschwinden“ der elektrochromen Verschiebung am langwelligen Rand der Q_y -Banden sowie mit einer „Verlagerung“ der oxidierten Komponente von 675 nach 680 nm. Gründe für die Modifikationen können sein: a) Vergrößerung der (homogenen) Bandenbreite, b) veränderte Lokalisation bzw. Delokalisation der positiven Ladung, c) elektrostatische Effekte sind aufgrund einer Vergrößerung der Polarisierbarkeit der Proteinmatrix bei Raumtemperatur vermindert (ϵ_r ist gegenüber den Werten bei 1.5 K, siehe Fußnote 15 auf Seite 102, um etwa Faktor 2 vermindert). Eine deutliche spektrale Verschiebung von Komponenten, d.h ihrer Zentralwellenlängen, erscheint schon bei Vergleich der Spektren bei 5 und 170 K nicht gegeben.

Die im Ergebnisteil vorgestellten Anpassungen des Absorptions- und Anisotropiespektrums im Roten von Raum- und Tieftemperaturdaten erfolgten analog (siehe Abbildungen 3.9 und 3.14), obwohl bei Raumtemperatur eine elektrochrome Bandenverschiebung nicht unmittelbar erkennbar ist. Die Auswertungen zeigen eine deutliche Inkompatibilität zwischen diesen beiden Temperaturbereichen, da die postulierte „elektrochrome Verschiebung“ bei Raumtemperatur einen eher verschwindenden Anisotropieparameter aufweist, bei 77 K aber $r \approx 0.1$ bestimmt wurde.

Die Differenzspektren P_{680}^+/P_{680} im Ultra-Roten und NIR unterscheiden sich nur geringfügig bei Temperaturen von 10 bzw. 294 K (Mathis & Setif, 1981). Die Anisotropieparameter bei 825 nm unterscheiden sich jedoch signifikant: Bei 293 K ist ein linearer Dichroismus zu erkennen ($r = 0.023$), bei 77 K hingegen nicht ($r \approx 0.00$). Eine mögliche Erklärung ist, dass es ein charakteristisches Differenzspektrum für Chl α -Kationen, die ein aussergewöhnlich hohes Redoxpotential besitzen, gibt. Dann ist eine Verlagerung der positiven Ladung innerhalb des Reaktionszentrums nur im Anisotropie-, aber nicht im Absorptionsspektrum sichtbar.

Als mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte man den veränderten Wellenlängenbereich der photoselektiven Anregung anführen (siehe oben). Für beide Temperaturbereiche wurde am langwelligen Rand der Q_y -Banden angeregt, die Anregungswellenlänge ist also sozusagen wegen der Veränderung der Linienbreite nachgeführt worden. Die relative spektrale Lage von Antennenpigmenten sollte sich aber nicht geändert haben, sofern man nicht über thermisch induzierte Änderungen der Proteinkonformation spekulieren will. Der nahezu konstante Wert des Anisotropieparameters bei Raumtemperatur und 825 nm im Anregungsspektrum ($\lambda_{exc} = 700\text{--}720$ nm, Abbildung 3.4) deutet überdies an, dass eine selektive Anregung eines speziellen Antennenensembles nicht allzu kritisch war.

Es besteht die Notwendigkeit, dass alle vier zentralen Chl α -Moleküle ein positiveres Mittpotential als Y_Z aufweisen müssen, ansonsten würde der Elektronentransfer, der zur Wasserspaltung führt, nicht stattfinden. Es scheint so, als bliebe die positive Ladung bei tiefen

Temperaturen auf P_A lokalisiert. Die spektralen Veränderungen von P₆₈₀⁺/P₆₈₀ könnten im Wesentlichen durch eine stärkere Delokalisation der positiven Ladung bei Raumtemperatur verursacht sein. Dies wurde schon allein wegen der starken Änderung der (differentiellen) Absorptionskurve angenommen (Mulkidjanian, 1999). Eine Abschätzung soll zeigen, dass schon ein geringer Unterschied in den Mittenpotentialen eine Verteilung der Ladung auf mehrere Chl α -Moleküle bei Raumtemperatur verursachen könnte.

Geht man von aktivierungslosem Elektronentransfer aus, sind die Transferraten mit der Tunnelwahrscheinlichkeit des Elektrons durch die Proteinmatrix bestimmt, woraus eine exponentielle Abstandsabhängigkeit folgt (siehe z.B. DeVault, 1984). Mit der von Moser et al. (1992) und Farid et al. (1993) bestimmten Parametrisierung (mit einer inversen Tunneldistanz β von 1.4 Å⁻¹) und der Strukturbestimmung von Zouni et al. (2001) folgen für den Elektronentransfer zwischen direkt benachbarten zentralen Chl α -Molekülen, die einen Kantenabstand von etwa 5 Å aufweisen, Raten von etwa 10¹² s⁻¹. Für P_A und Y_Z entnimmt man aus der Strukturvorhersage einen Kantenabstand von 8.8 Å, womit eine Rate von 7*10⁹ s⁻¹ folgt. Mit diesem Unterschied in den maximalen Raten kann man versuchsweise von einem Quasi-Gleichgewichtszustand der Ladungsverteilung im Reaktionszentrum ausgehen. Setzt man eine Potentialdifferenz von 15 mV zwischen P_A und B_A (und P_B) an, folgt über $\ln K = e_0 (E_{B_A} - E_{P_A}) / kT$ eine Lokalisation der Ladung auf P_A für T ≤ 77 K (K ≥ 10), aber eine Verteilung der Ladung über mehrere Pigmente bei Raumtemperatur (K ≈ 2).

Diner et al. (2001) finden ähnliche Verschiebungen für P_A im roten Spektralbereich bei 80 K und im Bereich der Soret-Bande bei Raumtemperatur. Zusammen mit geringeren Effekten bei Punktmutanten von D2-His197 im Vergleich zur Ligandenersetzung bei P_A (bei 298 K) wurde auf eine überwiegende Lokalisation der Ladung P₆₈₀⁺ auf P_A auch bei Raumtemperatur geschlossen. Ergebnisse bei Tieftemperatur an D2-His197-Mutanten, die einen besseren Vergleich erlauben würden, wurden allerdings nicht präsentiert. Zur Begründung (s.a. Diner & Rappaport, 2002) wurden Ergebnisse von ENDOR-Experimenten herangezogen (siehe dazu die Ausführungen weiter oben zu Rigby et al. (1994) und Telfer et al. (1998)), diese wurden aber bei Tieftemperatur durchgeführt. Es wurde weiterhin betont, dass die größeren Änderungen in den Spektren bei den Punktmutanten der D1-Seite einhergehen mit deutlicheren Modulationen des „P⁺/P“-Mittenpotentials, die aus S₂- bzw. Y_Z-Rekombinationsreaktionen mit Q_A⁻ und aus Y_Z-Kinetiken bestimmt wurden (also Quasi-Gleichgewichte in verschiedenen Zeitbereichen). Es fällt aber auf, dass die Punktmutanten, bei denen D2-His197 durch Ala oder Gln ersetzt wurde, im Soretbereich des P₆₈₀⁺/P₆₈₀-Spektrums nur geringe und sehr ähnliche Modifikationen gegenüber dem Wildtyp aufweisen, bei der Bestimmung der Redoxmodulation aber eher entgegengesetzte Veränderungen zeigen. Insbesondere aber zeigt die D1-His198Gln-Mutante den größten Effekt in den Spektren, ein kinetischer Unterschied zum Wildtyp ist aber nur im Sekundenbereich auszumachen. Eine direkte Relation zwischen den angeregten Zuständen von P_A oder P_B und dem Redoxverhalten von P₆₈₀ ist nicht gegeben.

Der größere Effekt bei D1-His198-Mutanten im P₆₈₀⁺/P₆₈₀ (Diner et al., 2001) deutet aber auf eine stärkere Lokalisation der Ladung auf P_A im Vergleich zu P_B hin. Interessant wären aber auch Punktmutationen von B_A-Liganden, wobei allerdings die zum BRC homologen Histidine im PSII zu fehlen scheinen (Diner & Rappaport, 2002). Insgesamt ist eine Lokalisation der positiven Ladung nicht zwingend.

Eine aktuelle Bestimmung der Aktivierungsenergien des Elektronentransfers von Y_Z zum oxidierten P_{680} ergibt für die schnellsten Phase (20–50 ns, nur in S_1 und S_2) der multiexponentiellen Kinetik einen Wert von 4–7 kJ mol⁻¹ (Jeans et al., 2002). Es wurden daraus Reorganisations- und Gibbsenergien abgeschätzt, so dass im Prinzip eine Berechnung der Elektronentransferrate wie in der schon eben angeführten Abschätzung erfolgen kann, zusätzlich aber unter Berücksichtigung der thermodynamischen und kinetischen Parameter. Jeans et al. führten diese Berechnung bereits durch und benutzten dabei (unter Berücksichtigung weiterer Literaturwerte) sogar einen etwas größeren Wert von 9.5 Å für den Abstand zwischen den beiden Redoxpartnern. Es resultiert jedoch nur eine Halbwertszeit von etwa 1 ns. Eine Abschätzung mit etwas anderen Werten für die thermodynamischen und kinetischen Parameter führt zu der Aussage, dass Y_Z und P_{680} einen Van-der-Waals-Abstand von etwa 10 Å haben (Renger et al., 1998). Der überschätzte Abstand bei gegebener experimenteller Rate bzw. die zu große Rate bei festgelegtem Abstand kann mehrere Ursachen haben: Die große Unsicherheit in der Bestimmung der Gibbs- und Reorganisationsenergie, eine veränderte Abstandsabhängigkeit ($\beta = 0.9\text{--}1.6 \text{ \AA}^{-1}$, siehe Gray & Winkler (1996)) oder eine falsche Zuordnung für Y_Z im Strukturmodell. Sollten diese Unsicherheiten vernachlässigbar sein, kann die angeführte Diskrepanz in der Ratenbestimmung möglicherweise auf eine Delocalisation der positiven Ladung über die zentralen Chl a hindeuten, da dann im Mittel ein größerer Abstand zwischen Y_Z und dem „Elektronenloch“ vorliegen würde.

4 Zusammenfassung

Grüne Pflanzen und Cyanobakterien besitzen Photosystem II (PS II), welches Wasser zu molekularem Sauerstoff oxidiert und Elektronen zur Fixierung von Kohlendioxid bereitstellt. Diese Fähigkeit setzt voraus: (*i*) Die Vergrößerung des Mittenpotentials der oxidierenden Seite von PS II um mehr als 0.6 V im Vergleich zu Reaktionszentren der anoxygenen Photosynthese, und (*ii*) ein Ausgleich des Energiebedarfs der vier Teilschritte der tetravalenten Wasseroxidation. Die konstruktiven Maßnahmen der Natur, um diese Ziele zu erreichen, sind Gegenstand aktiver Forschung. In der vorliegenden Dissertation werden zwei Teilaspekte untersucht:

1. Die Kopplung des sekundären Elektronentransfers von Tyrosin Z (Y_Z) zum oxidierten primären Donator (P_{680}^+) an Protonentransfers und die mögliche Bedeutung von Y_Z^{ox} für die Einstellung der Mittenpotentiale an der oxidierenden Seite des Reaktionszentrums.
2. Die Lokalisation des primär erzeugten Elektronenlochs, P_{680}^+ , im Verband der vier inneren Chlorophyll a Moleküle und eine Abschätzung der Mittenpotentialunterschiede in dieser exzitonic schwach wechselwirkenden Einheit.

Dafür wurden Elektronen- und Protonentransferreaktionen über Laserpuls-induzierte Absorptionsänderungen der beteiligten Kofaktoren mit Zeitaufösungen bis in den Nanosekundenbereich analysiert.

1. Zur Elektron-Proton-Kopplung bei Tyrosin Z An Kernkomplex-Präparaten aus Erbse oder Spinat, bei denen der Mangankomplex deaktiviert war, ist die Reduktion des primären Elektronendonators P_{680}^+ durch Y_Z bei Variation der Protonenkonzentration des Mediums untersucht worden. Der Befund war, dass dieser Elektronentransfer abhängig vom pH mit der Abgabe eines Protons verknüpft (Zustand \mathcal{S}) oder davon unabhängig (Zustand \mathcal{A}) ist. Der Übergang zwischen diesen beiden Reaktionsformen wurde mit $pK = 7.4$ titriert.

Die Reduktionskinetik, beobachtet bei 825 nm, setzt sich im Wesentlichen zusammen aus der Vorwärts- und Rückreaktion zwischen dem anfangs vorliegendem P_{680}^+ und dem Y_Z sowie aus der Rekombinationsreaktion zwischen P_{680}^+ und Q_A^- . Eine zweie exponentielle Anpassung der Daten bis zu einem Zeitpunkt $t = 30 \mu s$ ergibt klar getrennte Ratenkonstanten: $k^{\mathcal{A}}$ ist groß ($\sim 7 \cdot 10^5 s^{-1}$) und als Funktion des pH nahezu konstant, $k^{\mathcal{S}}$ ist um mindestens eine Größenordnung kleiner und verändert sich mit der Protonenkonzentration des Mediums. Im Alkalischen überwiegt das Subensemble \mathcal{A} mit der schnelleren Kinetik. Der Übergang zum Subensemble \mathcal{S} erfolgt mit einem apparenten $pK_{Y_Z}^{app} = 7.4$ (bei Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+}), wobei die Gesamtamplitude angenähert konstant bleibt. Der dabei charakterisierte

Protonierungszustand kann der eines Säure-Base-Aggregats aus Y_Z und seiner Umgebung oder des Tyrosins allein sein. Eine Verlangsamung der Raten dieses Systems zum Säuren hin geht mit einer Verringerung der Amplituden zugunsten der langsamen Rekombinationsreaktion einher.

Kinetische Eigenschaften deuten auf unterschiedliche Mechanismen der Y_Z -Oxidation in den beiden pH-Bereichen hin: Die Aktivierungsenergie des Elektronentransfers im alkalischen pH-Bereich (\mathcal{A}) ist mit ca. 14 kJ mol^{-1} nur halb so groß wie die im Säuren (\mathcal{S}). Damit einhergehend ist in schwerem Wasser für die Untermenge \mathcal{S} die apparente Rate der Vorwärtsreaktion ($k^{\mathcal{S}}$) um einen Faktor 2–3 verringert, während im Alkalischen der H/D-Isotopenaustausch keinen Effekt auf die Rate bewirkt. Bestimmte divalente Kationen (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} ; bei Konzentrationen $> 10 \text{ }\mu\text{M}$) verlangsamen nur die Rate $k^{\mathcal{S}}$, was mit einem (elektrostatischen) Effekt allein auf die Protonenabgabe bei Y_Z -Oxidation interpretiert werden kann. Ca^{2+} und Mg^{2+} hingegen beeinflussen bei hoher Konzentration ($> 5 \text{ mM}$) $\text{pK}_{Y_Z}^{\text{app}}$, also wahrscheinlich die unmittelbare Säure-Base-Umgebung um Y_Z . Dass unterschiedliche Bindungsorte bei diesen zwei Klassen von divalenten Kationen vorliegen, zeigt die unabhängige Wirkung von Fe^{2+} und Ca^{2+} .

Aus Absorptionsänderungen von wasserlöslichen Protonenindikatoren geht hervor, dass keine Protonenabgabe schneller als die Oxidation von Y_Z erfolgt. Da für $\text{pH} \leq 6$ eine parallel verlaufende Protonen- und Elektronentransferrate und für $\text{pH} \sim 6$ die Abgabe etwa eines Protons pro Reaktionszentrum beobachtet wurde, kann auf eine überwiegend durch Y_Z^{ox} induzierte Protonenabgabe im Säuren geschlossen werden.

Eine kinetische Auswertung der Y_Z -Oxidation im Säuren zeigt, dass das Gleichgewicht zwischen P_{680} und Y_Z sowie die intrinsische Rate der Vorwärtsreaktion ($f^{\mathcal{S}}$) deutlich von der Protonenkonzentration des Mediums abhängt. Die Gleichgewichtskonstante ist etwa 1 bei $\text{pH} = 4.5$, in guter Übereinstimmung mit den Amplituden der Protonenabgabe. $f^{\mathcal{S}}$ nimmt etwa um eine Größenordnung zu bei Vergrößerung des pH's um zwei Einheiten, wobei diese Abhängigkeit mit einem gleichzeitigen Transfer von Elektron und Proton (der Hydroxylgruppe am Y_Z -Phenolring) erklärt werden kann. Dieser konzertierte Transfermechanismus wird auch für ein synthetisches Tyr-Ru(bpy)₃-Konstrukt angenommen (Sjödín et al., 2000), bei dem Tyr-Oxidationskinetiken analog zur vorliegenden Arbeit ausgewertet wurden und die zwei pH-Bereiche, entsprechend dem Protonierungszustand des Tyr (Tyrosinat/Tyrosin), analoge Eigenschaften zu \mathcal{A} und \mathcal{S} in Mn-verarmtem PS II aufweisen. Ein konsekutiver Mechanismus, erst Protonen- und dann Elektronentransfer, für das protonierte System \mathcal{S} von inaktiviertem PS II kann aber bei derzeitigem Kenntnisstand über Y_Z und dessen Umgebung nicht ausgeschlossen werden.

Die obigen Untersuchungen wurden an zur O_2 -Bildung inkompetenten Kernkomplexen ausgeführt. Der Bezug zum nativen System, welches eigentlich interessiert, stellt sich dadurch her, dass die Eigenschaften des nativen Elektronentransfers von Y_Z nach P_{680}^+ denjenigen ähneln, welche bei alkalischem pH an Mn-verarmten Präparaten beobachtet wurden. Im Umkehrschluss wird gefolgert: *Im nativen PS II ist der Elektronentransfer von Y_Z nach P_{680}^+ nicht an einen Protonentransfer gekoppelt.* Es ist vielmehr wahrscheinlich, dass Y_Z von vornherein als Tyrosinat vorliegt, wobei das Hydroxylproton der Phenolgruppe auf ein Säure-Base-Zentrum verschoben ist. Eine Hypothese, die die Abstraktion von Protonen oder Wasserstoff vom Substratwasser durch Y_Z fordert, welches daher bei seiner

Oxidation deprotoniert werden müsste, ist mit diesem Ergebnis nicht vereinbar. Es ist dagegen denkbar, dass die effektive Ladungsänderung bei Bildung des Y_Z^{ox} im finalen S-Übergang der Wasserspaltung eine entscheidende funktionelle Bedeutung hat, indem das Mittenpotential des Mn-Komplexes erhöht wird. Tyrosin Z ist dann elektrostatischer Auslöser für die Wasseroxidation.

2. Über die Lokalisation des Elektronenlochs von P_{680}^+ Die Differenzspektren der Photooxidation der Chlorophyll α Moleküle lassen nicht unmittelbar eine Zuordnung der Banden zu einzelnen Pigmenten zu. Deshalb wurden Differenzspektren $P_{680}^+ Q_A^- / P_{680} Q_A$ und ${}^3P_{680} / P_{680}$ bei photoselektiver Anregung und polarisierter Detektion aufgenommen, um über „dichroitische Marken“ beteiligte Komponenten zu charakterisieren. Dadurch waren Aussagen über die (De-)Lokalisation der Anregungsenergie und nachfolgend des Elektronenlochs bzw. Triplettzustandes über die inneren vier Chl α -Moleküle von PS II möglich. Die positive Ladung P_{680}^+ wird sich mit größerer Wahrscheinlichkeit auf den Pigmenten aufhalten, die das geringste Mittenpotential aufweisen. Die Verteilung des Elektronenlochs über die zentralen Chl α -Moleküle hängt von der Temperatur und den, wie sich zeigte, geringen Differenzen der Mittenpotentiale ab, deren Größenordnung mit circa 15 meV abgeschätzt wurde.

Photoselektive Anregung am langwelligen Rand der Q_y -Banden ($\lambda_{exc} = 700\text{--}720$ nm für Versuche bei Raumtemperatur, $\lambda_{exc} \simeq 695$ nm bei 77 K), bei der wahrscheinlich (mindestens) 3 Chl α -Moleküle als Antennen beteiligt sind, führt – bei linear polarisiertem Messlicht – zu detektierbaren dichroitischen Effekten.

Zunächst wurde der Dichroismus anhand Absorptionsänderungen bei $\lambda_{obs} = 825$ nm, also des Übergangs $P_{680} \rightarrow P_{680}^+$, bei Raumtemperatur an Mn-verarmten Kernkomplexen aus Erbse, Spinat und *Synechocystis* untersucht. Im Rahmen der Messgenauigkeit erscheint ein vom verwendeten Organismus unabhängiger linear-dichroitischer Effekt bzw. Anisotropieparameter $r(t \rightarrow 0) \approx 0.023$ vorzuliegen. Die Rotationskorrelationszeiten der Anisotropie sind kompatibel mit dimerisch vorliegenden PS II-Kernkomplexen, deren hydrodynamisches Volumen eine Detergensschicht einschließt.

Der Zustand $P_{680}^+ Q_A^-$ ist bei 77 K für Millisekunden stabil, da die Y_Z -Oxidation unterbleibt. Absorptionsänderungen im Bereich der Q_y -Bande von Chl α -Kofaktoren (670–690 nm) und des Kations (720–830 nm) wurden in Photoselektion untersucht. Eine gleichzeitige Anpassung der entsprechenden Differenzspektren der Absorption und Anisotropie kann in hinreichender Weise mittels 3 Gaußbanden (mit je etwa der Dipolstärke eines Chl α) erfolgen. Eine Bleichung (ΔA negativ) bei 684 nm und eine absorbierende Bande bei 682 nm (ΔA positiv) mit gleichen Anisotropieparametern ($r \approx 0.1$) zeigen eine elektrochrome Verschiebung eines Chl-Moleküls im Reaktionszentrum bei Entstehung der positiven Ladung an. Die gebleichte Bande bei 675 nm mit $r \approx 0.03$ zeigt dann die Absorption des Chlorophylls an, welches zum Kation wird. Liegen keine weiteren Überlagerungen um 675 nm vor, ist ein Unterschied in der Ausrichtung des Q_y - und Kationen-Übergangsmomentes (bei 825 nm) evident.

Eine schlüssige Interpretation mit deutlich exzitonisch gekoppelten Zuständen, also eine Delokalisation der Anregungsenergie über zwei oder mehrere Chromophore des Reaktionszentrums, konnte mit den experimentellen Ergebnissen nicht erbracht werden. Obwohl die geringen Abstände eine stärkere Kopplung ermöglichen, könnte die Bedeutung exzitonischer

Wechselwirkungen durch energetische Differenzen der Chromophore aufgrund „chemischer Verschiebungen“ durch die Umgebung vermindert sein.

Bei (Doppel-)Reduktion von Q_A durch Zugabe von Dithionit wird nach Anregung der Triplettzustand „ $^3P_{680}$ “ generiert, der unter anaeroben Bedingungen nach knapp 1 ms wieder zerfällt. Die bei 77 K weitaus deutlichste Q_y -Bande im Differenzspektrum ist eine Ausbleichung bei 684 nm. In diesem Bereich wurden Anisotropieparameter bestimmt. Sie haben im gewichteten Mittel einen Wert von $r = 0.05$. Dies deutet darauf hin, dass der Triplettzustand auf einem Chl α gebildet wird, das im „ P_{680}^+/P_{680} “-Differenzspektrum nicht vorkommt oder verborgen ist. Aufgrund des Werteverlaufs der Anisotropieparameter ist auch eine Beschreibung mit mehreren spektralen Komponenten möglich, eine – bei dieser Temperatur inhomogene – Verteilung des Triplettzustandes über mehrere Kernpigmente.

In Zusammenhang mit Daten aus der Literatur kann angenommen werden, dass bei 77 K die positive Ladung auf P_A („*special pair*“-Chl des „aktiven Zweiges“, in D1) und der Triplettzustand möglicherweise überwiegend auf dem „Voyeur“-Chl B_A lokalisiert ist. Aus den Anisotropiedaten ist ersichtlich, dass das Pigment, welches durch die entstandene Ladung auf P_A elektrochrom von 684 nach 682 nm verschoben wird, nicht identisch mit dem Träger des Triplettzustandes ist.

Bei Raumtemperatur ist das Differenzspektrum $P_{680}^+Q_A^-/P_{680}Q_A$ im Vergleich zu Ergebnissen bei Tieftemperatur stark verändert. Die in dieser Arbeit bestimmten linear-dichroitischen Effekte zeigen ebenfalls deutliche Abweichungen zwischen den beiden Temperaturbereichen, so dass Linienverbreiterungen als alleiniger Grund für die Veränderung unwahrscheinlich sind. Die Unterschiede werden zurückgeführt auf eine Delokalisation der positiven Ladung bei Raumtemperatur, die plausibel erscheint, da die zentralen Chl α -Moleküle untereinander geringere Differenzen der Mittenpotentiale als zum Y_Z aufweisen müssen, damit eine Y_Z -Oxidation zustande kommen kann. Eine einfache Abschätzung führt auf ein um ~ 15 meV geringeres Mittenpotential von P_A im Vergleich zu den benachbarten Pigmenten. Dieser Wert ist kompatibel mit (i) einer *Lokalisation der Ladung bei kryogenen Temperaturen*, (ii) einer annähernd *delokalisierten Ladungsverteilung bei Raumtemperatur* sowie (iii) einem effektiven Elektronentransfer zum um ~ 100 meV elektronegativeren Y_Z .

A Verwendete Chemikalien und Abkürzungen

Medien und Puffer

Tabelle A.1: Für die Präparation von PS II-Kernkomplexen verwendete Medien und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blender	400 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 2 g/l BSA, 50 mM Hepes pH 7.4
Waschmedium	150 mM NaCl, 4 mM MgCl ₂ , 50 mM Hepes pH 7.4
Triton-Puffer	15 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM Ascorbat, 50 mM MES pH 6.0
Triton	25% (w/w) Triton X-100 in Triton-Puffer
BTS400-Puffer	20 mM MgCl ₂ , 5 mM CaCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 400 mM Sucrose, 20 mM Bis-Tris pH 6.5 z.T. mit 0.03% (w/v) β-DM
Elutionspuffer	BTS400-Puffer mit 75 mM MgSO ₄

Tabelle A.2: Medien und Protonen-Puffer für Probenansätze

Medium A	5 mM CaCl ₂ , 5 mM MgCl ₂ , 0.03% (w/v) β-DM, 20–50 mM Protonen-Puffer
Medium B	0.4 M Saccharose, 15 mM NaCl, 0.03% (w/v) β-DM, 50 mM Protonen-Puffer

Abkürzung	Name	pK
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan	8.3
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure	7.5
Bis-Tris	bis[2-Hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methan	6.5
Mes	2-[N-morpholino]-ethansulfonsäure	6.1

pH-Indikatoren

Tabelle A.3: pH-Indikatoren für die in Abschnitt 2.4.2 beschriebenen Messungen; aus (Hau-
mann, 1996), modifiziert

Abkürzung	Name	pK	$\varepsilon_{(H)}(\lambda_{\text{obs}}) / 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
CR	Kresolrot	8.2	4.5 (575 nm)
PR	Phenolrot	7.2	6 (560 nm)
BKP	Bromkresolpurpur	6.3	5 (575 nm)
MR	Methylrot	5.2	2.5 (550 nm)

Weitere Abkürzungen

Abkürzung	Name
BBY	PS II-angereicherte Membranfragmente nach Berthold, Babcock & Yocum (1981)
BRC	Reaktionszentren für anoxygene Photosynthese vom Typ II (Purpurbakterien, grüne Bakterien)
Bw	elektrische Bandbreite
Car	β -Carotin
Chl	Chlorophyll
DCBQ	2,5-Dichloro- <i>p</i> -benzochinon
DCMU	3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethyl-Harnstoff
β -DM	Dodecyl- β -d-maltosid
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ENDOR	<i>electron-nuclear double resonance</i>
ESR	<i>electron spin resonance</i> , auch EPR genannt (<i>paramagnetic</i>)
EXAFS	<i>extended x-ray absorption fine structure</i>
FWHM	<i>full width (at) half maximum</i>
LFER	<i>linear free energy relationship</i>
NIR	Nah-Infrarot
OEC	<i>oxygen-evolving complex</i>
P ₆₈₀	primärer Elektronendonator im PS II
P ₇₀₀	primärer Elektronendonator im PS I
Pheo	Pheophytin
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
Q	Chinon
XANES	<i>x-ray absorption near edge structure</i>
Y	Tyrosin

Literaturverzeichnis

- AHLBRINK, R., M. HAUMANN, D. CHEREPANOV, O. BÖGERSHAUSEN, A. MULKIDJANIAN & W. JUNGE, 1998. Function of tyrosine-Z in water oxidation by photosystem II: electrostatical promotor instead of hydrogen abstractor. *Biochemistry*, 37, 1131–1142.
- ALBERY, W. J., 1980. The application of the Marcus relation to reactions in solution. *Annu.Rev.Phys.Chem.*, 30, 227–263.
- ALFONSO, M., G. MONTROYA, R. CASES, R. RODRIGUEZ & R. PICOREL, 1994. Core Antenna Complexes, CP43 and CP47, of Higher Plant Photosystem II . Spectral Properties, Pigment Stoichiometry, and Amino Acid Composition. *Biochemistry*, 33, 10494–10500.
- AMESZ, J. & A. J. HOFF (Hg.), 1997. *Biophysical Techniques in Photosynthesis.*, Bd. 3 von *Advances in photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
- ANDREASSON, L. E., I. VASS & S. STYRING, 1995. Calcium ion depletion modifies the electron transfer on both donor and acceptor sides in photosystem II from spinach. *Biochim.Biophys.Acta*, 1230, 155–164.
- ATKINS, P. W., 1996. *Physikalische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 2. Aufl.
- BABCOCK, G. T., B. A. BARRY, R. J. DEBUS, C. W. HOGANSON, M. ATAMIAN, L. MCINTOSH, U. SITHOLE & C. F. YOCUM, 1989. Water oxidation in photosystem II: from radical chemistry to multielectron chemistry. *Biochemistry*, 28, 9557–9565.
- BABCOCK, G. T., R. E. BLANKENSHIP & K. SAUER, 1976. Reaction kinetics for positive charge accumulation on the water side of chloroplast photosystem II. *FEBS Lett.*, 61, 286–289.
- BABCOCK, G. T., D. F. GHANOTAKIS, B. KE & B. A. DINER, 1983. Electron donation to photosystem II in reaction center preparations. *Biochim.Biophys.Acta*, 723, 276–286.
- BABCOCK, G. T. & K. SAUER, 1973. Electron paramagnetic resonance signal II in spinach chloroplasts. I. Kinetic analysis for untreated chloroplasts. *Biochim.Biophys.Acta*, 325, 483–503.
- BARBER, J. & M. D. ARCHER, 2001. P680, the primary electron donor of photosystem II. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*, 142, 97–106.
- BARRY, B. A. & G. T. BABCOCK, 1987. Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 84, 7099–7103.
- BELL, R. P., 1973. *The proton in chemistry*. Chapman & Hall, London.
- BERTHOLD, D. A., G. T. BABCOCK & C. F. YOCUM, 1981. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett.*, 134, 231–234.
- BERTHOMIEU, C., R. HIENERWADEL, A. BOUSSAC, J. BRETON & B. A. DINER, 1998. Hydrogen bonding of redox-active tyrosine Z of photosystem II probed by FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry*, 37, 10547–10554.
- VAN BEST, J. A. & P. MATHIS, 1978. Kinetics of reduction of the oxidized primary electron of photosystem II in spinach chloroplasts and in chlorella cells in the microsecond and nanosecond time ranges following flash excitation. *Biochim.Biophys.Acta*, 503, 178–188.
- BOEKEMA, E. J., B. HANKAMER, D. BALD, J. KRUIP, J. NIELD, A. F. BOONSTRA, J. BARBER & M. RÖGNER, 1995. Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 92, 175–179.
- BÖGERSHAUSEN, O., 1993. *Protolytische Reaktionen an Photosystem II - Kernkomplexen*. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.
- BÖGERSHAUSEN, O., 1997. *Oxygene Photosynthese: Die Kopplung von Elektronen- und Proto-*

- nenstransferreaktionen in Photosystem II*. Dissertation, Universität Osnabrück.
- BÖGERSHAUSEN, O. & W. JUNGE, 1995. Rapid proton transfer under flashing light at both functional sides of dark adapted photosystem II core particles. *Biochim.Biophys.Acta*, 1230, 177–185.
- BOSCH, M. K., I. I. PROSKURYAKOV, P. GAST & A. J. HOFF, 1996. Time-resolved EPR study of the primary donor triplet in D1-D2- cyt b559 complexes of photosystem II: Temperature dependence of spin-lattice relaxation. *J.Phys.Chem.*, 100, 2384–2390.
- BOSKA, M., K. SAUER, W. BUTTNER & G. T. BABCOCK, 1983. Similarity of EPR signal II_f rise and P-680⁺ decay kinetics in Tris-washed chloroplast photosystem II preparations as a function of pH. *Biochim.Biophys.Acta*, 722, 327–330.
- BRETON, J., M. MICHEL-VILLAZ & G. PAILLOTIN, 1973. Orientation of pigments and structural proteins in the photosynthetic membrane of spinach chloroplasts: A linear dichroism study. *Biochim.Biophys.Acta*, 314, 42–56.
- BRETON, J. & A. VERMÉGLIO, 1982. Orientation of photosynthetic pigments *in vivo*. In Govindjee (Hg.), *Photosynthesis: Energy conversion by plants and bacteria.*, S. 153–194. Academic Press, New York.
- BRETON, J. & A. VERMÉGLIO (Hg.), 1992. *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center II*. Plenum Press, New York.
- BRETTEL, K., E. SCHLODDER & H. T. WITT, 1984. Nanosecond reduction kinetics of photooxidized chlorophyll-aII (P₆₈₀) in single flashes as a probe for the electron pathway, H⁺-release and charge accumulation in the O₂-evolving complex. *Biochim.Biophys.Acta*, 766, 403–415.
- BRITT, R. D., 1996. Oxygen evolution. In (Ort & Yocum, 1996b), S. 137–164.
- BRONSTEIN, I. N. & K. A. SEMENDJAJEW, 1991. *Taschenbuch der Mathematik*. B.G. Teubner, Stuttgart/Leipzig.
- BUSER, C. A., L. K. THOMPSON, B. A. DINER & G. W. BRUDVIG, 1990. Electron-transfer reactions in manganese-depleted photosystem II. *Biochemistry*, 29, 8977–8985.
- CAMPBELL, K. A., J. M. PELOQUIN, B. A. DINER, X. S. TANG, D. A. CHISHOLM & R. D. BRITT, 1997. The τ -nitrogen of D2 histidine 189 is the hydrogen bond donor to the tyrosine radical Y_D of photosystem II. *J.Am.Chem.Soc.*, 119, 4787–4788.
- CARBONERA, D., G. GIACOMETTI & G. AGOSTINI, 1994a. A well resolved ODMR triplet minus singlet spectrum of P680 from PSII particles. *FEBS Lett.*, 343, 200–204.
- CARBONERA, D., M. D. VALENTIN, G. GIACOMETTI & G. AGOSTINI, 1994b. FDMR of chlorophyll triplets in integrated particles and isolated reaction centers of Photosystem II. Identification of P680 triplet. *Biochim.Biophys.Acta*, 1185, 167–176.
- CHAUVET, J. P., R. VIOVY, R. SANTUS & E. J. LAND, 1981. One-electron oxidation of photosynthetic pigments in micelles. Bacteriochlorophyll *a*, Chlorophyll *a*, Chlorophyll *b*, and pheophytin *a*. *J.Phys.Chem.*, 85, 3449–3456.
- CHENIAE, G. M. & I. F. MARTIN, 1978. Studies on the mechanism of tris-induced inactivation of oxygen evolution. *Biochim.Biophys.Acta*, 502, 321–344.
- CHEREPANOV, D. A., W. DREVENSTEDT, L. I. KRISHTALIK, A. MULKIDJANIAN & W. JUNGE, 1998. Protein relaxation and kinetics of P₆₈₀⁺ reduction in photosystem II. In (Garab, 1998), S. 1073–1076.
- CHEREPANOV, D. A. & L. I. KRISHTALIK, 1990. Intramembrane electric fields: a single charge, protein α -helix, photosynthetic reaction centre. *Bioelectrochem.Bioenerg.*, 24, 113–127.
- CHEREPANOV, D. A., L. I. KRISHTALIK & A. Y. MULKIDJANIAN, 2001. Photosynthetic electron transfer controlled by protein relaxation: Analysis by Langevin stochastic approach. *Biophys.J.*, 80, 1033–1049.
- CHRISTEN, G., M. KARGE, H. J. ECKERT & G. RENGER, 1997. The role of protonation steps in electron transfer reactions in Tris-treated photosystem 2 membrane fragments. *Photosynthetica*, 33, 529–539.
- CHU, H. A., A. P. NGUYEN & R. J. DEBUS, 1995. Amino acid residues that influence the binding of

- manganese or calcium to photosystem II. 1. The lumenal interhelical domains of the D1 polypeptide. *Biochemistry*, 34, 5839–5858.
- CLAUSEN, J., S. WINKLER, A. M. A. HAYS, M. HUNDELT, R. J. DEBUS & W. JUNGE, 2001. 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. *Biochim.Biophys.Acta*, 1506, 224–235.
- COHEN-TANNOUJJI, C., B. DIU & F. LALOË, 1977. *Quantum mechanics*. Hermann and John Wiley & Sons, Paris und New York/London/Sydney/Toronto.
- COLE, J., M. BOSKA, N. V. BLOUGH & K. SAUER, 1986. Reversible and irreversible effects of alkaline pH on Photosystem II electron-transfer reactions. *Biochim.Biophys.Acta*, 848, 41–47.
- CONJEAUD, H. & P. MATHIS, 1980. The effects of pH on the reductions kinetics of P-680 in Tris-treated chloroplasts. *Biochim.Biophys.Acta*, 590, 353–359.
- CONJEAUD, H. & P. MATHIS, 1986. Electron transfer in the photosynthesis membrane. Influence of pH and surface potential on the P 680 reduction kinetics. *Biophys.J.*, 49, 1215–1221.
- CUKIER, R. I., 1999. A theory for the rate constant of a dissociative proton-coupled electron-transfer reaction. *J.Phys.Chem.A*, 103, 5989–5995.
- DAU, H., J. C. ANDREWS, T. A. ROELOFS, M. J. LATIMER, W. LIANG, V. K. YACHANDRA, K. SAUER & M. P. KLEIN, 1995. Structural consequences of ammonia binding to the manganese center of the photosynthetic oxygen-evolving complex: an x-ray absorption spectroscopy study of isotropic and oriented photosystem II particles. *Biochemistry*, 34, 5274–5287.
- DEBUS, R. J., 1992. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim.Biophys.Acta*, 1102, 269–352.
- DEBUS, R. J., 2001. Amino acid residues that modulate the properties of tyrosine Y(Z) and the manganese cluster in the water oxidizing complex of photosystem II. *Biochim.Biophys.Acta*, 1503, 164–186.
- DEBUS, R. J., B. A. BARRY, I. SITHOLE, G. T. BABCOCK & L. MCINTOSH, 1988. Directed mutagenesis indicates that the donor to P₆₈₀⁺ in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochemistry*, 27, 9071–9074.
- DEBUS, R. J., K. A. CAMPBELL, D. P. PHAM, A. M. A. HAYS & R. D. BRITT, 2000. Glutamate 189 of the D1 polypeptide modulates the magnetic and redox properties of the manganese cluster and tyrosine Y_Z in photosystem II. *Biochemistry*, 39, 6275–6287.
- DEISENHOFER, J., I. SINNING & H. MICHEL, 1995. Crystallographic refinement at 2.3-Angstrom resolution and refined model of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*. *J.Mol.Biol.*, 246, 429–457.
- DEKKER, J. P., 1985. *Electron transfer in the oxygen-evolving system of photosynthesis*. Dissertation, University of Leiden.
- DEKKER, J. P., H. J. VAN GORKOM, M. BROK & L. OUWEHAND, 1984a. Optical characterization of photosystem II electron donors. *Biochim.Biophys.Acta*, 764, 301–309.
- DEKKER, J. P. & R. VAN GRONDELLE, 2000. Primary charge separation in Photosystem II. *Photosynth.Res.*, 63, 195–208.
- DEKKER, J. P., J. J. PLIJTER, L. OUWEHAND & H. J. VAN GORKOM, 1984b. Kinetics of manganese redox transitions in the oxygen evolving apparatus of photosynthesis. *Biochim.Biophys.Acta*, 767, 176–179.
- DEVVAULT, D., 1984. *Quantum-mechanical tunneling in biological systems*. Cambridge University Press.
- DINER, B. A., 2001. 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. *Biochim.Biophys.Acta*, 1503, 147–163.
- DINER, B. A. & G. T. BABCOCK, 1996. Structure, dynamics and energy conversion efficiency in photosystem II. In (Ort & Yocum, 1996b), S. 213–247.

- DINER, B. A., D. A. FORCE, D. W. RANDALL & R. D. BRITT, 1998. Hydrogen bonding, solvent exchange, and coupled proton and electron transfer in the oxidation and reduction of redox-active tyrosine Y_Z in Mn-depleted core complexes of photosystem II. *Biochemistry*, 37, 17931–17943.
- DINER, B. A., P. J. NIXON & J. W. FARCHAUS, 1991. Site-directed mutagenesis of photosynthetic reaction centers. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1, 546–554.
- DINER, B. A. & F. RAPPAPORT, 2002. Structure, dynamics, and energetics of the primary photochemistry of photosystem II of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 53, 551–580.
- DINER, B. A., E. SCHLODDER, P. J. NIXON, W. J. COLEMAN, F. RAPPAPORT, J. LAVERGNE, W. F. VERMAAS & D. A. CHISHOLM, 2001. Site-directed mutations at D1-His198 and D2-His197 of photosystem II in *Synechocystis* PCC 6803: sites of primary charge separation and cation and triplet stabilization. *Biochemistry*, 40, 9265–9281.
- DINER, B. A., X. S. TANG, M. ZHENG, G. C. DISMUKES, D. A. FORCE, D. W. RANDALL & R. D. BRITT, 1995. Environment and function of the redox active tyrosines of photosystem II. In P. Mathis (Hg.), *Photosynthesis: from light to biosphere*, Bd. 2, S. 229–234. Kluwer Academic Publishers.
- DINER, B. A. & C. DE VITRY, 1984. Optical spectrum and kinetics of the secondary electron donor, Z, of Photosystem II. In C. Sybesma (Hg.), *Advances in Photosynthesis*.
- DORLET, P., M. D. VALENTIN & G. T. BABCOCK, 1998. Interaction of Y_Z with its environment in acetate-treated photosystem II membranes and reaction center cores. *J. Phys. Chem. B*, 102, 8239–8247.
- VAN DORSSSEN, R. J., J. BRETON, J. J. PLIJTER, K. SATOH, H. J. VAN GORKOM & J. AMESZ, 1987a. Spectroscopic properties of the reaction center and of the 47 kDa chlorophyll protein of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 893, 267–274.
- VAN DORSSSEN, R. J., J. J. PLIJTER, J. P. DEKKER, A. DEN OUDEN, J. AMESZ & H. J. VAN GORKOM, 1987b. Spectroscopic properties of chloroplast grana membranes and of the core complex of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 890, 134–143.
- DREVENSTEDT, W., 1997. *Oxygene Photosynthese: Spektroskopische Untersuchungen zur Elektrostatik und Kinetik des Elektronentransportes in Photosystem II*. Dissertation, Universität Osnabrück.
- DURRANT, J. R., L. B. GIORGI, J. BARBER, D. R. KLUG & G. PORTER, 1990. Characterisation of triplet states in isolated photosystem II reaction centers: oxygen quenching as a mechanism for photodamage. *Biochim. Biophys. Acta*, 1017, 167–175.
- DURRANT, J. R., D. R. KLUG, S. L. S. KWA, R. VAN GRONDELLE, G. PORTER & J. P. DEKKER, 1995. A multimer model for P₆₈₀, the primary electron donor of photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4798–4802.
- ECKERT, H. J. & G. RENGER, 1988. Temperature dependence of P₆₈₀⁺ reduction in oxygen-evolving PS II membrane fragments at different redox states S_i of the water oxidizing system. *FEBS Lett.*, 236, 425–431.
- ECKERT, H. J., N. WIESE, J. BERNARDING, H. J. EICHLER & G. RENGER, 1988. 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. *FEBS Lett.*, 240, 153–158.
- EIGEN, M., 1963. Protonenübertragung, Säure-Base-Katalyse und enzymatische Hydrolyse. Teil I: Elementarvorgänge. *Angew. Chem.*, 75, 489–588.
- FAJER, J., L. K. HANSON, M. C. ZERNER & M. A. THOMPSON, 1992. Suggestions for directed engineering of reaction centers: Metal, substituent and charge modifications. In (Breton & Verméglio, 1992), S. 33–42.
- FALLER, P., R. J. DEBUS, K. BRETTEL, M. SUGIURA, A. W. RUTHERFORD & A. BOUSSAC, 2001. Rapid formation of the stable tyrosyl radical in photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 14368–14373.
- FARID, R. S., C. C. MOSER & P. L. DUTTON, 1993. Electron transfer in proteins. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 3, 225–233.

- FÖRSTER, V. & W. JUNGE, 1985. Stoichiometry and kinetics of proton release upon photosynthetic water oxidation. *Photochem. Photobiol.*, 41, 183–190.
- FRAGATA, M., B. NORDÉN & T. KURUCSEV, 1988. Linear dichroism (250–700 nm) of chlorophyll *a* and pheophytin *a* oriented in a lamellar phase of glycerylmonooctanoate/H₂O. Characterization of electronic transitions. *Photochem. Photobiol.*, 47, 133–143.
- FRANKS, F., 1985. *Biophysics and biochemistry at low temperatures*. Cambridge University Press.
- GARAB, G., 1997. Linear and circular dichroism. In (Amesz & Hoff, 1997), S. 11–40.
- GARAB, G. (Hg.), 1998. *Photosynthesis: mechanisms and effects*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- GERKEN, S., K. BRETTEL, E. SCHLODDER & H. T. WITT, 1987. Direct observation of the immediate electron donor to chlorophyll-aII+ (P-680+) in oxygen-evolving photosystem II complexes. Resolution of nanosecond kinetics in the UV. *FEBS Lett.*, 223, 376–380.
- GERKEN, S., J. P. DEKKER, E. SCHLODDER & H. T. WITT, 1989. Studies on the multiphasic charge recombination between chlorophyll A_{II}⁺ (P-680⁺) and plastoquinone Q_A⁻ in Photosystem II complexes. Ultraviolet difference spectrum of Chl-a_{II}⁺/Chl-a_{II}. *Biochim. Biophys. Acta*, 977, 52–61.
- GERMANO, M., A. Y. SHKUROPATOV, H. PERMENTIER, R. DE WIJN, A. J. HOFF, V. A. SHUVALOV & H. J. VAN GORKOM, 2001. Pigment organization and their interactions in reaction centers of photosystem II: Optical spectroscopy at 6 K of reaction centers with modified pheophytin composition. *Biochemistry*, 40, 11472–11482.
- GHANOTAKIS, D. F., D. M. DEMETRIOU & C. F. YOCUM, 1987. Isolation and characterization of an oxygen-evolving photosystem II reaction center core preparation and a 28 kDa chl-a-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 891, 15–21.
- GILCHRIST, M. L., J. A. BALL, D. W. RANDALL & R. D. BRITT, 1995. Proximity of the manganese cluster of photosystem II to the redox-active tyrosine Y_Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9545–9549.
- GLASOE, P. K. & F. A. LONG, 1960. Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J. Phys. Chem.*, 64, 188–190.
- VAN GORKOM, H. J. & P. GAST, 1997. Measurement of photosynthetic oxygen evolution. In (Amesz & Hoff, 1997), S. 391–405.
- GOUTERMAN, M., 1961. Spectra of porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.*
- GRAY, H. B. & J. R. WINKLER, 1996. Electron transfer in proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 537–561.
- VAN GRONDELLE, R., J. P. DEKKER, T. GILLBRO & V. SUNDSTROM, 1994. Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1187, 1–65.
- GROOT, M. L., F. VAN MOURIK, C. EIJCKELHOFF, I. H. M. VAN STOKKUM, J. P. DEKKER & R. VAN GRONDELLE, 1997. Charge separation in the reaction center of photosystem II studied as a function of temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4389–4394.
- GUTMAN, M. & E. NACHLIEL, 1995. The dynamics of proton exchange between bulk and surface groups. *Biochim. Biophys. Acta*, 1231, 123–138.
- HÄDER, D. P. (Hg.), 1999. *Photosynthese*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- HANSON, L. K., 1991. *Molecular orbital theory of monomer pigments.*, Kap. 4.9, S. 993–1014. In (Scheer, 1991).
- HAUMANN, M., 1996. *Oxygenic photosynthesis: electrons, protons, electrostatics*. Dissertation, Universität Osnabrück.
- HAUMANN, M., R. AHLBRINK & W. JUNGE, 1998. Hydrogen-bonding of tyrosine-Z in photosystem II: Probably absent without calcium and without manganese at acid pH but strong in oxygen-evolving centers. In (Garab, 1998), S. 1391–1394.
- HAUMANN, M., O. BÖGERSHAUSEN, D. A. CHEREPANOV, R. AHLBRINK & W. JUNGE, 1997a. 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. *Photosynth. Res.*, 51, 193–208.
- HAUMANN, M., O. BÖGERSHAUSEN & W. JUNGE, 1994. Photosynthetic oxygen evolution: Net charge transients as inferred from electrochromic bandshifts are independent of proton release into the medium. *FEBS Lett.*, 355, 101–105.
- HAUMANN, M., M. HUNDELT, P. JAHNS, S. CHRONI, O. BÖGERSHAUSEN, D. GHANOTAKIS & W. JUNGE, 1997b. Proton release from water oxidation by photosystem II: Similar stoichiometries are stabilized in thylakoids and core particles by glycerol. *FEBS Lett.*, 410, 243–248.
- HAUMANN, M. & W. JUNGE, 1994. Extent and rate of proton release by photosynthetic water oxidation in thylakoids: electrostatic relaxation versus chemical production. *Biochemistry*, 33, 864–872.
- HAUMANN, M. & W. JUNGE, 1996. Protons and charge indicators in oxygen evolution. In (Ort & Yocum, 1996b), S. 165–192.
- HAUMANN, M. & W. JUNGE, 1999a. Evidence for impaired hydrogen-bonding of tyrosine Y_Z in Ca²⁺-depleted photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1411, 121–133.
- HAUMANN, M. & W. JUNGE, 1999b. Photosynthetic water oxidation: A simplex-scheme of its partial reactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1411, 86–91.
- HAUMANN, M., A. MULKIDJANIAN & W. JUNGE, 1999. Tyrosine-Z in oxygen evolving photosystem II: a hydrogen-bonded tyrosinate. *Biochemistry*, 38, 1258–1267.
- HAYS, A. M., I. R. VASSILIEV, J. H. GOLBECK & R. J. DEBUS, 1998. Role of D1-His190 in proton-coupled electron transfer reactions in photosystem II: a chemical complementation study. *Biochemistry*, 37, 11352–11365.
- HAYS, A. M., I. R. VASSILIEV, J. H. GOLBECK & R. J. DEBUS, 1999. Role of D1-His190 in the proton-coupled oxidation of tyrosine YZ in manganese-depleted photosystem II. *Biochemistry*, 38, 11851–11865.
- HIENERWADEL, R., A. BOUSSAC, J. BRETON, B. A. DINER & C. BERTHOMIEU, 1997. Fourier transform infrared difference spectroscopy of photosystem II tyrosine D using site-directed mutagenesis and specific isotope labeling. *Biochemistry*, 36, 14712–14723.
- HILLIER, W., J. MESSINGER & T. WYDRZYNSKI, 1998. Kinetic determination of the fast exchanging substrate water molecule in the S₃ state of photosystem II. *Biochemistry*, 37, 16908–16914.
- HILLIER, W. & T. WYDRZYNSKI, 2000. The affinities for the two substrate water binding sites in the O(2) evolving complex of photosystem II vary independently during S-state turnover. *Biochemistry*, 39, 4399–4405.
- HILLMANN, B., 1997. *Ladungsrekombinationsreaktionen in Photosystem II*. Dissertation, Techn. Universität Berlin.
- HILLMANN, B., K. BRETTEL, F. J. E. VAN MIEGHEM, A. KAMLOWSKI, A. W. RUTHERFORD & E. SCHLODDER, 1995. Charge recombination reactions in photosystem II. 2. Transient absorbance difference spectra and their temperature dependence. *Biochemistry*, 34, 4814–4827.
- HILLMANN, B. & E. SCHLODDER, 1995. Electron transfer reactions in photosystem II core complexes from *Synechococcus* at low temperature - difference spectrum of P₆₈₀⁺ Q_A⁻/P₆₈₀ Q_A at 77 K. *Biochim. Biophys. Acta*, 1231, 76–88.
- HITCHMAN, M. L., 1978. *Measurement of dissolved oxygen*. John Wiley & Sons, New York.
- HOFF, A. J. & J. DEISENHOFER, 1997. Photophysics of photosynthesis. Structure and spectroscopy of reaction centers of purple bacteria. *Physics Report*, 287, 1–247.
- HOGANSON, C. W. & G. T. BABCOCK, 1988. Electron-transfer events near the reaction center in O₂-evolving photosystem II preparations. *Biochemistry*, 27, 5848–5855.
- HOGANSON, C. W. & G. T. BABCOCK, 1997. A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis. *Science*, 277, 1953–1956.
- HOGANSON, C. W., P. A. CASEY & Ö. HANSSON, 1991. Flash photolysis studies of manganese-depleted photosystem-II - evidence for binding of Mn²⁺ and other transition metal ions. *Bio-*

- chim.Biophys.Acta*, 1057, 399–406.
- HOGANSON, C. W., N. LYDAKIS-SIMANTIRIS, X. S. TANG, C. TOMMOS, K. WARNCKE, G. T. BABCOCK, B. A. DINER, J. MCCrackEN & S. STYRING, 1995. A hydrogen-atom abstraction model for the function of Yz in photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth.Res.*, 46, 177–184.
- HUNDELT, M., 1999. *Photosynthetische Wasseroxidation in PSII: Elektronen und Protonentransfer im Wildtyp und in D1-Mutanten von Synechocystis sp. PCC 6803*. Dissertation, Universität Osnabrück.
- HUNDELT, M., M. HAUMANN & W. JUNGE, 1997. Cofactor X of photosynthetic water oxidation: electron transfer, proton release, and electrogenic behaviour in chloride-depleted photosystem II. *Biochim.Biophys.Acta*, 1321, 47–60.
- JEANS, C., M. J. SCHILSTRA & D. R. KLUG, 2002. The temperature dependence of P680⁺ in oxygen-evolving photosystem II. *Biochemistry*, 41, 5015–5023.
- JOHNSON, G. N., A. W. RUTHERFORD & A. KRIEGER, 1995. A change in the midpoint potential of the quinone Q_A in photosystem II associated with photoactivation of oxygen evolution. *Biochim.Biophys.Acta*, 1229, 202–207.
- JUNGE, W., 1976. Flash kinetic spectrophotometry in the study of plant pigments. In T. W. Goodwin (Hg.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.*, S. 233–333. Academic Press, London, New York, San Francisco.
- JUNGE, W., W. AUSLÄNDER, A. J. MCGEER & T. RUNGE, 1979. The buffering capacity of the internal phase of thylakoids and the magnitude of the pH changes inside under flashing light. *Biochim.Biophys.Acta*, 546, 121–141.
- JUNGE, W. & D. DEVAULT, 1975a. Symmetry, orientation, and rotational mobility in the A3 heme of cytochrome-c-oxidase in the inner membrane of mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta*, 408, 200–214.
- JUNGE, W. & D. DEVAULT, 1975b. Symmetry, orientation and rotational mobility of heme A3 of cytochrome-c-oxidase in the inner membrane of mitochondria. In *Lasers Phys.Chem.Biophys., Proc.Int.Meet.Soc.Chim.Phys., 27th*.
- JUNGE, W., M. HAUMANN, R. AHLBRINK, A. MULKIDJANIAN & J. CLAUSEN, 2002. Electrostatics and proton transfer in photosynthetic water oxidation. *Proc.Roy.Soc.London*. In Druck.
- JUNGE, W. & S. MCLAUGHLIN, 1987. The role of fixed and mobile buffers in the kinetics of proton movement. *Biochim.Biophys.Acta*, 890, 1–5.
- JUNGE, W. & A. POLLE, 1986. Theory of proton flow along appressed thylakoid membranes under both non-stationary and stationary conditions. *Biochim.Biophys.Acta*, 848, 265–273.
- JUNGE, W. & H. SCHAFFERNICHT, 1978. On the internal structure of Photosystem I in green plants. In D. O. Hall, J. Coombs & T. W. Goodwin (Hg.), *Proc.Int.Congr.Photosynth., 4th, 1977*, S. 21–32. Biochem.Soc., Colchester.
- JUNGE, W., H. SCHAFFERNICHT & N. NELSON, 1977. On the mutual orientation of pigments in photosystem I particles from green plants. *Biochim.Biophys.Acta*, 462, 73–85.
- KALMAN, L., R. LOBRUTTO, J. P. ALLEN & J. C. WILLIAMS, 1999. Modified reaction centres oxidize tyrosine in reactions that mirror photosystem II. *Nature*, 402, 696–699.
- VAN KAN, P. J. M., M. L. GROOT, S. L. S. KWA, J. P. DEKKER & R. VAN GRONDELLE, 1992. Chlorophyll triplet states in the CP47-D1-D2-Cytochrome b-559 complex of photosystem II. In (Breton & Verméglio, 1992), S. 411–420.
- KARGE, M., K. D. IRRGANG, S. SELLIN, R. FEINAUGLE, B. LIU, H. J. ECKERT, H. J. EICHLER & G. RENGER, 1996. Effects of hydrogen/deuterium exchange on photosynthetic water cleavage in PS II core complexes from spinach. *FEBS Lett.*, 378, 140–144.
- KLIMOV, V. V., S. I. ALLAKHVERDIEV, S. DEMETER & A. A. KRASNOVSKY, 1979. Photoreduction of pheophytin in the photosystem II of chloroplasts with respect to the redox potential of the medium. *Dokl.Akad.Nauk.SSSR*, 249, 227–230.
- KLIMOV, V. V., A. V. KLEVANIK & V. A. SHUVALOV, 1977. Reduction of pheophytin in the primary

- light reaction of photosystem II. *FEBS Lett.*, 82, 183–186.
- KOK, B., B. FORBUSH & M. MCGLOIN, 1970. Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution - I. A linear four-step mechanism. *Photochem. Photobiol.*, 11, 457–475.
- KONERMANN, L., I. YRUELA & A. R. HOLZWARTH, 1997. Pigment assignment in the absorption spectrum of the photosystem II reaction center by site-selection fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, 36, 7498–7502.
- KOULOGLIOTIS, D., X. S. TANG, B. A. DINER & G. W. BRUDVIG, 1995. Spectroscopic evidence for the symmetric location of tyrosines D and Z in Photosystem II. *Biochemistry*, 34, 2850–2856.
- KRAMER, D. M., R. A. ROFFEY, R. A. GOVINDJEE & R. T. SAYRE, 1994. The AT thermoluminescence band from *Chlamydomonas reinhardtii* and the effects of mutagenesis of histidine residues on the donor side of the photosystem II D1 polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1185, 228–237.
- KRAWCZYK, S., 1991. Electrochromism of chlorophyll *a* monomer and special pair dimer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1056, 64–70.
- KRETSCHMANN, H., E. SCHLODDER & H. T. WITT, 1996. Net charge oscillation and proton release during water oxidation in photosynthesis. An electrochromic band shift study at pH 5.5 - 7.0. *Biochim. Biophys. Acta*, 1274, 1–8.
- KRIEGER, A., A. W. RUTHERFORD & G. N. JOHNSON, 1995. On the determination of redox midpoint potential of the primary quinone electron acceptor, Q_A, in Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1229, 193–201.
- KRISHTALIK, L. I., 1986. Energetics of multielectron reactions. Photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta*, 849, 162–171.
- KRISHTALIK, L. I., 1990. Activation energy of photosynthetic oxygen evolution: an attempt at theoretical analysis. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 23, 249–263.
- KRISHTALIK, L. I. & W. A. CRAMER, 1996. Basic aspects of electron and proton transfer reactions with applications to photosynthesis. In (Ort & Yocum, 1996b).
- KUWABARA, T. & N. MURATA, 1983. Quantitative analysis of the inactivation of photosynthetic oxygen evolution and the release of polypeptides and manganese in the photosystem II particles of spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 24(4), 741–747.
- KWA, S. L. S., C. EIJCKELHOFF, R. VAN GRONDELLE & J. P. DEKKER, 1994a. Site-selection spectroscopy of the reaction center complex of photosystem II . 1. Triplet-minus-singlet absorption difference: Search for a second exciton band of P₆₈₀. *J. Phys. Chem.*, 98, 7702–7711.
- KWA, S. L. S., N. T. TILLY, C. EIJCKELHOFF, R. VAN GRONDELLE & J. P. DEKKER, 1994b. Site-selection spectroscopy of the reaction center complex of photosystem II . 2. Identification of the fluorescing species at 4 K. *J. Phys. Chem.*, 98, 7712–7716.
- LAKOWICZ, J. R., 1986. *Principles of Fluorescence spectroscopy*. Plenum Press, New York.
- LAKSHMI, K. V., S. S. EATON, G. R. EATON, H. A. FRANK & G. W. BRUDVIG, 1998. Analysis of dipolar and exchange interactions between manganese and tyrosine Z in the S₂Y_Z state of acetate-inhibited photosystem II via EPR spectral simulations at X- and Q-bands. *J. Phys. Chem. B*, 102, 8327–8335.
- LAND, E. J., G. PORTER & E. STRACHAN, 1961. Primary photochemical processes in aromatic molecules. 6. The absorption spectra and acidity constants of phenoxyl radicals. *Trans. Faraday Soc.*, 57, 1885–1893.
- LAVERGNE, J. & W. JUNGE, 1993. Proton release during the redox cycle of the water oxidase. *Photosynth. Res.*, 38, 279–296.
- VAN LEEUWEN, P. J., 1993. *The redox cycle of the oxygen evolving complex of photosystem II*. Dissertation, Universität Leiden.
- VAN LEEUWEN, P. J., C. HEIMANN & H. J. VAN GORKOM, 1993. Absorbance difference spectra of the S-state transitions in Photosystem II core particles. *Photosynth. Res.*, 38, 323–330.
- VAN LEEUWEN, P. J., C. HEIMANN, F. A. M. KLEINHERENBRINK & H. J. VAN GORKOM, 1992. Kinetics of electron transport on the donor side of spinach photosystem core particles. In N. Murata

- (Hg.), *Research in photosynthesis*, S. 341–344. Kluwer Academic Publ., Dordrecht.
- VAN LEEUWEN, P. J., M. C. NIEVEEN, E. J. VAN DE MEENT, J. P. DEKKER & H. J. VAN GORKOM, 1991. Rapid and simple isolation of pure photosystem II core and reaction center particles from spinach. *Photosynth.Res.*, 28, 149–153.
- LENDZIAN, F., M. HUBER, R. A. ISAACSON, B. ENDEWARD, M. PLATO, B. BÖNINGK, K. MÖBIUS, W. LUBITZ & G. FEHER, 1993. The electronic structure of the primary donor cation radical in *Rhodobacter sphaeroides* R-26: ENDOR and TRIPLE resonance studies in single crystals of reaction centers. *Biochim.Biophys.Acta*, 1183, 139–160.
- LOUWE, R. J. W., J. VRIEZE, A. J. HOFF & T. J. AARTSMA, 1997. Toward an integral interpretation of the optical steady-state spectra of the FMO-complex of *Prosthecochloris aestuarii*. 2. Exciton simulations. *J.Phys.Chem.B*, 101, 11273–11279.
- LÜBBERS, K. & W. JUNGE, 1990. Is the proton release due to water oxidation directly coupled to events at the manganese centre? In M. Baltscheffsky (Hg.), *Current research in photosynthesis, vol. I.*, S. 877–880. Kluwer Academic, Dordrecht.
- LUKINS, P. B. & T. OATES, 1998. Single-molecule high-resolution structure and electron conduction of photosystem II from scanning tunneling microscopy and spectroscopy. *Biochim.Biophys.Acta*, 1409, 1–11.
- MAGNUSON, A. & L. E. ANDREASSON, 1997. Different manganese binding sites in photosystem II probed by selective chemical modification of histidyl and carboxylic acid residues. *Biochemistry*, 36, 3254–3261.
- MAMEDOV, F., R. T. SAYRE & S. STYRING, 1998. Involvement of histidine 190 on the D1 protein in electron/proton transfer reactions on the donor side of photosystem II. *Biochemistry*, 37, 14245–14256.
- MARCUS, R. A., 1956. On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. I. *J.Chem.Phys.*, 24, 966–978.
- MARCUS, R. A. & N. SUTIN, 1985. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim.Biophys.Acta*, 811, 265–322.
- MATHIS, P., J. BRETON, A. VERMÉGLIO & M. YATES, 1976. Orientation of the primary donor chlorophyll of photosystem II in chloroplast membranes. *FEBS Lett.*, 63, 171–173.
- MATHIS, P. & P. SETIF, 1981. Near infrared absorption spectra of the chlorophyll a cations and triplet state in vitro and in vivo. *Isr.J.Chem.*, 21, 316–320.
- MATHIS, P. & A. VERMÉGLIO, 1975. Chlorophyll radical cation in photosystem II of chloroplasts. Millisecond decay at low temperature. *Biochim.Biophys.Acta*, 396, 371–381.
- MATYSIK, J., ALIA, P. GAST, H. J. VAN GORKOM, A. J. HOFF & H. J. DE GROOT, 2000. Photochemically induced nuclear spin polarization in reaction centers of photosystem II observed by ^{13}C -solid-state NMR reveals a strongly asymmetric electronic structure of the $\text{P}_{680}^{\bullet+}$ primary donor chlorophyll. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 97, 9865–9870.
- MCPHERSON, P. H., M. Y. OKAMURA & G. FEHER, 1988. Light-induced proton uptake by photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R-26. I. Protonation of the one-electron states D^+Qa^- , DQa^- , D^+QaQb^- , and DQaQb^- . *Biochim.Biophys.Acta*, 934, 348–368.
- MESSINGER, J., J. H. ROBBLEE, U. BERGMANN, C. FERNANDEZ, P. GLATZEL, H. VISSER, R. M. CINCO, K. L. MCFARLANE, E. BELLACCHIO, S. A. PIZARRO, S. P. CRAMER, K. SAUER, M. P. KLEIN & V. K. YACHANDRA, 2001. Absence of Mn-centered oxidation in the S-2 \rightarrow S-3 Transition: Implications for the mechanism of photosynthetic water oxidation. *J.Am.Chem.Soc.*, 123, 7804–7820.
- METZ, J. G., P. J. NIXON, M. RÖGNER, G. W. BRUDVIG & B. A. DINER, 1989. 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_{680} . *Biochemistry*, 28, 6960–6969.
- MEYER, B., E. SCHLODDER, J. P. DEKKER & H. T. WITT, 1989. O_2 evolution and $\text{Chl } a_{11}^+$ (P_{680}^+) nanosecond reduction kinetics in single flashes as a function of pH. *Biochim.Biophys.Acta*,

- 974, 36–43.
- MICHL, J. & E. W. THULSTRUP, 1986. *Spectroscopy with polarized light. Solute alignment by photoselection, in liquid crystals, polymers, and membranes*. VCH Publishers, Deerfield Beach, FL.
- VAN MIEGHEM, F. J. E., K. BRETTEL, B. HILLMANN, A. KAMLOWSKI, A. W. RUTHERFORD & E. SCHLODDER, 1995. Charge recombination reactions in photosystem II. 1. Yields, recombination pathways, and kinetics of the primary pair. *Biochemistry*, 34, 4798–4813.
- VAN MIEGHEM, F. J. E., W. NITSCHKE, P. MATHIS & A. W. RUTHERFORD, 1989. The influence of the quinone-iron electron acceptor complex on the reaction centre photochemistry of Photosystem II. *Biochim.Biophys.Acta*, 977, 207–214.
- VAN MIEGHEM, F. J. E., K. SATOH & A. W. RUTHERFORD, 1991. A chlorophyll tilted 30° relative to the membrane in the photosystem II reaction center. *Biochim.Biophys.Acta*, 1058, 379–385.
- VAN MIEGHEM, F. J. E., G. F. W. SEARLE, A. W. RUTHERFORD & T. J. SCHAAFSMA, 1992. The influence of the double reduction of QA on the fluorescence decay kinetics of photosystem II. *Biochim.Biophys.Acta*, 1100, 198–206.
- MINO, H., A. V. ASTASHKIN & A. KAWAMORI, 1997. An EPR and pulsed ENDOR study of the structure of tyrosine Z in Tris-treated photosystem II. *Spectrochim.Acta*, 53A, 1465–1483.
- MINO, H., A. V. ASTASHKIN, A. KAWAMORI, T. A. ONO & Y. INOUE, 1995. The low pH form of redox-active components in the donor side of photosystem II studied by pulsed EPR and ENDOR. In P. Mathis (Hg.), *Photosynth.: Light Biosphere, Proc.Int.Photosynth.Congr., 10th*, Bd. 1, S. 559–562. Kluwer.
- MINO, H. & A. KAWAMORI, 1994. Microenvironments of tyrosine D⁺ and tyrosine Z⁺ in Photosystem II studied by proton matrix ENDOR. *Biochim.Biophys.Acta*, 1185, 213–220.
- MINO, H., A. KAWAMORI & T. ONO, 2000. pH-dependent characteristics of Y(Z) radical in Ca(2+)-depleted photosystem II studied by CW-EPR and pulsed ENDOR. *Biochim.Biophys.Acta*, 1457, 157–165.
- MÖBIUS, K., T. F. PRISNER & M. ROHRER, 1996. Gepulste Hochfeld-Elektronenspin-Resonanz. *Physikalische Blätter*, 52, 877–880.
- MOSER, C. C., J. M. KESKE, K. WARNCKE, R. S. FARID & P. L. DUTTON, 1992. Nature of Biological Electron Transfer. *Nature*, 355, 796–802.
- MULKIDJANIAN, A. Y., 1999. Photosystem II of green plants: on the possible role of retarded protonic relaxation in water oxidation. *Biochim.Biophys.Acta*, 1410, 1–6.
- MULKIDJANIAN, A. Y., D. A. CHEREPANOV, M. HAUMANN & W. JUNGE, 1996. Photosystem II of green plants: Topology of core pigments and redox cofactors as inferred from electrochromic difference spectra. *Biochemistry*, 35, 3093–3107.
- NANBA, O. & K. SATOH, 1987. Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 84, 109–112.
- NIXON, P. J. & B. A. DINER, 1994. Analysis of water-oxidation mutants constructed in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem.Soc.Trans.*, 22, 338–343.
- NOGUCHI, T., Y. INOUE & K. SATOH, 1993. FT-IR studies on the triplet state of P₆₈₀ in the photosystem II reaction center : Triplet equilibrium within a chlorophyll dimer. *Biochemistry*, 32, 7186–7195.
- NOGUCHI, T., T. TOMO & Y. INOUE, 1998. Fourier transform infrared study of the cation radical of P₆₈₀ in the photosystem II reaction center: evidence for charge delocalization on the chlorophyll dimer. *Biochemistry*, 37, 13614–13625.
- NOGUCHI, T., T. TOMO & C. KATO, 2001. Triplet formation on a monomeric chlorophyll in the photosystem II reaction center as studied by time-resolved infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 40, 2176–2185.
- ORT, D. R. & C. F. YOCUM, 1996a. Electron transfer and energy transduction in photosynthesis: An overview. In (Ort & Yocum, 1996b), S. 1–9.

- ORT, D. R. & C. F. YOCUM (Hg.), 1996b. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions.*, Bd. 4 von *Advances in photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
- PAKRASI, H. B., 1995. Genetic analysis of the form and function of photosystem I and photosystem II. *Annu.Rev.Genet.*, 29, 755–776.
- PEARLSTEIN, R. M., 1991. *Theoretical interpretation of antenna spectra.*, Kap. 4.11, S. 1047–1078. In (Scheer, 1991).
- PELOQUIN, J. M., K. A. CAMPBELL & R. D. BRITT, 1998. ^{55}Mn pulsed ENDOR demonstrates that the photosystem II 'split' EPR signal arises from a magnetically-coupled manganese-tyrosyl complex. *J.Am.Chem.Soc.*, 120, 6840–6841.
- PENNER-HAHN, J. E., 1998. Structural characterization of the Mn site in the photosynthetic oxygen-evolving complex. In *Structure and bonding.*, S. 1–36. Springer Verlag, Heidelberg.
- PERRIN, F., 1936. Mouvement brownien d' un ellipsoïde (II). Rotation libre et depolarisation des fluorescences. Translation et diffusion de molécules ellipsoïdales. *Le journal de physique et le radium*, 7, 1–11.
- PETERMAN, E. J. G., H. VAN AMERONGEN, R. VAN GRONDELLE & J. P. DEKKER, 1998. The nature of the excited state of the reaction center of photosystem II of green plants: a high-resolution fluorescence spectroscopy study. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 95, 6128–6133.
- PETKE, J. D., G. M. MAGGIORA, L. L. SHIPMAN & R. E. CHRISTOFFERSEN, 1980. Stereoelectronic properties of photosynthetic and related systems - VII. *Ab initio* quantum mechanical characterization of the electronic structure and spectra of chlorophyllide a and bacteriochlorophyllide a cation radicals. *Photochem.Photobiol.*, 31, 243–257.
- PORRA, R. J., W. A. THOMPSON & P. E. KRIEDEMANN, 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim.Biophys.Acta*, 975, 384–394.
- PRINCE, R. C. & P. L. DUTTON, 1978. *Protonation and the reducing potential of the primary electron acceptor.*, Kap. 24, S. 439–453. Plenum Press, New York.
- RAGHAVENDRA, A. S. (Hg.), 1998. *Photosynthesis*. University Press, Cambridge.
- RAPPAPORT, F., M. BLANCHARD-DESCHE & J. LAVERGNE, 1994. Kinetics of electron transfer and electrochromic change during the redox transition of the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Biochim.Biophys.Acta*, 1184, 178–192.
- RAPPAPORT, F. & J. LAVERGNE, 1997. Charge recombination and proton transfer in manganese-depleted photosystem II. *Biochemistry*, 36, 15294–15302.
- RAPPAPORT, F. & J. LAVERGNE, 2001. Coupling of electron and proton transfer in the photosynthetic water oxidase. *Biochim.Biophys.Acta*, 1503, 246–259.
- RAZEGHIFARD, M. R. & R. J. PACE, 1999. EPR kinetic studies of oxygen release in thylakoids and PSII membranes: an intermediate in the S_3 to S_0 transition. *Biochemistry*, 38, 1252–1257.
- REHM, H., 2000. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/Oxford, 3. Aufl.
- REINMAN, S. & P. MATHIS, 1981. Influence of temperature on Photosystem II electron transfer reactions. *Biochim.Biophys.Acta*, 635, 249–258.
- REINMAN, S., P. MATHIS, H. CONJEAUD & A. STEWART, 1981. Kinetics of reduction of the primary donor of photosystem II. Influence of pH in various preparations. *Biochim.Biophys.Acta*, 635, 429–433.
- RENGER, G., 1979. A rapid vectorial back reaction at the reaction centers of photosystem II in Tris-washed chloroplasts induced by repetitive flash excitation. *Biochim.Biophys.Acta*, 547, 103–116.
- RENGER, G., G. CHRISTEN, M. KARGE, H. J. ECKERT & K. D. IRRGANG, 1998. Application of the Marcus theory for analysis of the temperature dependence of the reactions leading to photosynthetic water oxidation: results and implications. *J.Biol.Inorg.Chem.*, 3, 360–366.
- RIGBY, S. E. J., J. H. A. NUGENT & P. J. O'MALLEY, 1994. ENDOR and special triple resonance

- studies of chlorophyll cation radicals in photosystem II. *Biochemistry*, 33, 10043–10050.
- ROBBLEE, J. H., R. M. CINCO & V. K. YACHANDRA, 2001. X-ray spectroscopy-based structure of the Mn cluster and mechanism of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim.Biophys.Acta*, 1503, 7–23.
- ROFFEY, R. A., D. M. KRAMER, R. A. GOVINDJEE & R. T. SAYRE, 1994. Lumenal side histidine mutations in the D1 protein of photosystem II affect donor side electron transfer in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim.Biophys.Acta*, 1185, 257–270.
- RUTHERFORD, A. W., 1986. How close is the analogy between the reaction center of photosystem II and that of purple bacteria? *Biochem.Soc.Trans.*, 14, 15–17.
- RUTHERFORD, A. W., 1989. Photosystem II, the water-splitting enzyme. *Trends Biochem.Sci.*, 14, 227–232.
- RUTHERFORD, A. W. & P. FALLER, 2001. The heart of photosynthesis in glorious 3D. *Trends Biochem.Sci.*, 26, 341–344.
- RUTHERFORD, A. W., D. R. PATERSON & J. E. MULLET, 1981. A light-induced spin-polarized triplet detected by EPR in photosystem II reaction centers. *Biochim.Biophys.Acta*, 635, 205–214.
- SATO, K., 1996. Introduction to the photosystem II reaction center – isolation and biochemical and biophysical characterization. In (Ort & Yocum, 1996b).
- SAYGIN, Ö. & H. T. WITT, 1985. Evidence for the electrochromic identification of the change of charges in the four oxidation steps of the photoinduced water cleavage in photosynthesis. *FEBS Lett.*, 187, 224–229.
- SAYGIN, Ö. & H. T. WITT, 1987. Optical characterization of intermediates in the water-splitting enzyme system of photosynthesis - possible states and configurations of manganese and water. *Biochim.Biophys.Acta*, 893, 452–469.
- SCHAFFERNICHT, H., 1980. *Strukturelle und spektroskopische Analyse von Photosystem I grüner Pflanzen: Eine Photoselektionsstudie*. Dissertation, Techn. Universität Berlin.
- SCHATZ, G. H., H. BROCK & A. R. HOLZWARTH, 1988. Kinetic and energetic model for the primary processes in photosystem II. *Biophys.J.*, 54, 397–405.
- SCHNEER, H., 1991. *Chlorophylls*. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA.
- SCHNEER, H., 1999. *Pigmente und Antennenkomplexe*, Kap. 4, S. 65–89. In (Häder, 1999).
- SCHLIVIS, J. P. M., P. I. VAN NOORT, T. J. AARTSMA & H. J. VAN GORKOM, 1994. Energy transfer, charge separation and pigment arrangement in the reaction center of Photosystem II. *Biochim.Biophys.Acta*, 1184, 242–250.
- SCHILSTRA, M. J., F. RAPPAPORT, J. H. A. NUGENT, C. J. BARNETT & D. R. KLUG, 1998. Proton/hydrogen transfer affects the S-state-dependent microsecond phases of P_{680}^+ reduction during water splitting. *Biochemistry*, 37, 3974–3981.
- SCHLÖDDER, E. & K. BRETTEL, 1988. Primary charge separation in closed Photosystem II with a lifetime of 11 ns. Flash-absorption spectroscopy with O_2 - evolving Photosystem II complexes from *Synechococcus*. *Biochim.Biophys.Acta*, 933, 22–34.
- SCHLÖDDER, E. & B. MEYER, 1987. pH dependence of oxygen evolution and reduction kinetics of photooxidized chlorophyll aII (P_{680}) in photosystem II particles from *Synechococcus* sp. *Biochim.Biophys.Acta*, 890, 23–31.
- SCHLÖDDER, E. & H. T. WITT, 1999. Stoichiometry of proton release from the catalytic center in photosynthetic water oxidation. Reexamination by a glass electrode study at pH 5.5–7.2. *J.Biol.Chem.*, 274, 30387–30392.
- SCHOWEN, K. B. & R. L. SCHOWEN, 1982. Solvent isotope effects on enzyme systems. In *Methods in Enzymology*, Bd. 87, S. 551–606. Academic Press, New York, London.
- SEMIN, B. K., I. I. IVANOV, A. B. RUBIN & F. PARAK, 1995. High-specific binding of Fe(II) at the Mn-binding site in Mn- depleted PSII membranes from spinach. *FEBS Lett.*, 375, 223–226.
- SHEN, Y. R., 1984. *The principles of nonlinear optics*. John Wiley & Sons, New York.
- SHIGEMORI, K., H. MINO & A. KAWAMORI, 1997. pH and temperature dependence of tyrosine Z

- decay kinetics in tris-treated PSII particles studied by time-resolved EPR. *Plant Cell Physiol.*, 38, 1007–1011.
- SHIPMAN, L. L., 1977. Oscillator and dipole strengths for chlorophyll and related molecules. *Photochem. Photobiol.*, 26, 287–292.
- SJÖDIN, M., S. STYRING, B. ÅKERMARK, L. SUN & L. HAMMARSTRÖM, 2000. Proton-coupled electron transfer from Tyrosine in a Tyrosine-Ruthenium-tris-Bipyridine complex: comparison with TyrosineZ oxidation in photosystem II. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 3932–3936.
- SJÖDIN, M., S. STYRING, B. ÅKERMARK, L. SUN & L. HAMMARSTRÖM, 2002a. Electron transfer from tyrosine to ruthenium-tris-bipyridine in a covalently linked complex. Effects of pH, temperature and reaction entropy in the mechanistic analysis, and comparisons with tyrosine Z oxidation in photosystem II. Manuskript in Vorbereitung.
- SJÖDIN, M., S. STYRING, B. ÅKERMARK, L. SUN & L. HAMMARSTRÖM, 2002b. The mechanism for proton coupled electron transfer from tyrosine in a model complex and comparisons with tyrosine_Z oxidation in photosystem II. *Proc. Roy. Soc. London*. In Druck.
- SMITH, P. J., S. PETERSON, V. M. MASTERS, T. WYDRZYNSKI, S. STYRING, E. KRAUSZ & R. J. PACE, 2002. Magneto-optical measurements of the pigments in fully active photosystem II core complexes from plants. *Biochemistry*, 41, 1981–1989.
- SPIEDEL, D., A. W. ROSZAK, K. MCKENDRICK, K. E. MCAULEY, P. K. FYFE, E. NABEDRYK, J. BRETON, B. ROBERT, R. J. COGDELL, N. W. ISAACS & M. R. JONES, 2002. Tuning of the optical and electrochemical properties of the primary donor bacteriochlorophylls in the reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides*: spectroscopy and structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1554, 75–93.
- STAEHELIN, L. A. & G. W. M. VAN DER STAAY, 1996. Structure, composition, functional organization and dynamic properties of thylakoid membranes. In (Ort & Yocum, 1996b), S. 11–30.
- STEFFEN, M. A., K. LAO & S. G. BOXER, 1994. Dielectric asymmetry in the photosynthetic reaction center. *Science*, 264, 810–816.
- STEWART, D. H., P. J. NIXON, B. A. DINER & G. W. BRUDVIG, 2000. Assignment of the Q_y absorbance bands of photosystem II chromophores by low-temperature optical spectroscopy of wild-type and mutant reaction centers. *Biochemistry*, 39, 14583–14594.
- STIEHL, H. H. & H. T. WITT, 1969. Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis. *Z. Naturforsch.*, 24, 1588–1598.
- STOLL, V. S. & J. S. BLANCHARD, 1990. *Guide to protein purification.*, Bd. 182 von *Methods in Enzymology*, Kap. Buffers: Principles and practice., S. 24–38. Academic Press.
- STOWELL, M. H., T. M. MCPHILLIPS, D. C. REES, S. M. SOLTIS, E. ABRESCH & G. FEHER, 1997. Light-induced structural changes in photosynthetic reaction center: implications for mechanism of electron-proton transfer. *Science*, 276, 812–816.
- STRYER, L., 1996. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- STYRING, S. & A. W. RUTHERFORD, 1987. In the oxygen-evolving complex of photosystem II the S₀ state is oxidized to the S₁ state by D⁺ (signal II_{slow}). *Biochemistry*, 26, 2401–2405.
- SUNDHOLM, D., 2000. Comparison of the electronic excitation spectra of chlorophyll *a* and pheophytin *a* calculated at density functional theory level. *Chem. Phys. Lett.*, 317, 545–552.
- TANG, X. S., D. A. CHISHOLM, G. C. DISMUKES, G. W. BRUDVIG & B. A. DINER, 1993. 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. *Biochemistry*, 32, 13742–13748.
- TAO, T., 1969. Time-dependent fluorescence depolarization and brownian rotational diffusion coefficients of macromolecules. *Biopolymers*, 8, 609–632.
- TAPIE, P., Y. CHOQUET, F. A. WOLLMANN, B. DINER & J. BRETON, 1986. Orientation of the pigments in photosystem II: a low-temperature linear dichroism and polarized fluorescence emission study of chlorophyll-protein complexes isolated from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta*, 850, 156–161.

- TELFER, A., F. LENDZIAN, E. SCHLODDER, J. BARBER & W. LUBITZ, 1998. ENDOR and transient absorption studies of P680⁺ and other cation radicals in PSII reaction centers before and after inactivation of secondary electron donors. In (Garab, 1998).
- THOMPSON, L. K. & G. W. BRUDVIG, 1988. Cytochrome b₅₅₉ may function to protect photosystem II from photoinhibition. *Biochemistry*, 27, 6653–6658.
- THULSTRUP, E. W. & J. MICHL, 1989. *Elementary polarization spectroscopy*. VCH Publishers, New York.
- TOMMOS, C. & G. T. BABCOCK, 1998. Oxygen production in nature: a light-driven metalloradical enzyme process. *Account.Chem.Res.*, 31, 18–25.
- TOMMOS, C., X. S. TANG, K. WARNCKE, C. W. HOGANSON, S. STYRING, J. MCCRACKEN, B. A. DINER & G. T. BABCOCK, 1995. Spin-density distribution, conformation and hydrogen bonding of the redox-active Tyrosine Y_Z in Photosystem II from multiple electron magnetic-resonance spectroscopies: Implications for photosynthetic oxygen evolution. *J.Am.Chem.Soc.*, 117, 10325–10335.
- TREBST, A., 1986. The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. *Z.Naturforsch.*, 41c, 240–245.
- TRISSEL, H. W., J. BRETON, J. DEPREZ & W. LEIBL, 1987. Primary electrogenic reactions of Photosystem II as probed by the light gradient method. *Biochim.Biophys.Acta*, 893, 305–319.
- TRISSEL, H. W. & A. V. GOLOVANOV, 2002. Interactive software for photosynthesis. I. Spectral states in kinetic reaction schemes. II. Excitation energy capture in thylakoid membranes. Java Programm: www.biologie.uni-osnabrueck.de/Biophysik/Trissl/modeling.htm.
- UN, S., X. S. TANG & B. A. DINER, 1996. 245 GHz high-field EPR study of tyrosine-D• and tyrosine-Z• in mutants of photosystem II. *Biochemistry*, 35, 679–684.
- VASIL'EV, S., P. ORTH, A. ZOUNI, T. G. OWENS & D. BRUCE, 2001. Excited-state dynamics in photosystem II: Insights from the x-ray crystal structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 98, 8602–8607.
- VAN DER VOS, R., P. J. VAN LEEUWEN, P. BRAUN & A. J. HOFF, 1992. Analysis of the optical absorbance spectra of D1-D2-cytochrome b-559 complexes by absorbance-detected magnetic resonance. Structural properties of P680. *Biochim.Biophys.Acta*, 1140, 184–198.
- WARSHEL, A. & J. AQVIST, 1991. Electrostatic Energy and Macromolecular Function. *Annu.Rev.Biophys.Biophys.Chem.*, 20267–298, 20267–20298.
- WARSHEL, A. & S. T. RUSSELL, 1984. Calculations of electrostatic interactions in biological systems and in solutions. *Quart.Rev.Biophys.*, 17, 283–422.
- WATANABE, T. & M. KOBAYASHI, 1991. *Electrochemistry of chlorophylls.*, Kap. 1.11, S. 287–316. In (Scheer, 1991).
- WEAST, R. C. & M. J. ASTLE (Hg.), 1979. *CRC Handbook of chemistry and physics*. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA.
- WEBBER, A. N. & W. LUBITZ, 2001. P700: the primary electron donor of photosystem I. *Biochim.Biophys.Acta*, 1507, 61–79.
- WESTPHAL, K. L., C. TOMMOS, R. I. CUKIER & G. T. BABCOCK, 2000. Concerted hydrogen-atom abstraction in photosynthetic water oxidation. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 236–242.
- WHITMARSH, J. & H. B. PAKRASI, 1996. Form and function of cytochrome b-559. In (Ort & Yocum, 1996b), S. 249–264.
- WILLIAMS, J. C., A. L. HAFFA, J. L. MCCULLEY, N. W. WOODBURY & J. P. ALLEN, 2001. Electrostatic interactions between charged amino acid residues and the bacteriochlorophyll dimer in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 40, 15403–15407.
- YACHANDRA, V. K., K. SAUER & M. P. KLEIN, 1996. Manganese cluster in photosynthesis: Where plants oxidize water to dioxygen. *Chem.Rev.*, 96, 2927–2950.
- ZOUNI, A., H. T. WITT, J. KERN, P. FROMME, N. KRAUSS, W. SAENGER & P. ORTH, 2001. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, 409, 739–743.

Publikationsliste

- HAUMANN, M., O. BÖGERSHAUSEN, D. A. CHEREPANOV, R. AHLBRINK & W. JUNGE, 1997. 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. *Photosynth. Res.*, 51, 193–208.
- AHLBRINK, R., M. HAUMANN, D. CHEREPANOV, O. BÖGERSHAUSEN, A. MULKIDJANIAN & W. JUNGE, 1998. Function of tyrosine-Z in water oxidation by photosystem II: electrostatical promotor instead of hydrogen abstractor. *Biochemistry*, 37, 1131–1142.
- AHLBRINK, R. & W. JUNGE, 1998. Topology of chromophores and cofactors in photosystem II: fine analysis of difference spectra by polarized spectroscopy. In G. Garab (Hg.), *Photosynthesis: mechanisms and effects*, Bd. 2, S. 997–1000. Kluwer Academic Publishers.
- HAUMANN, M., R. AHLBRINK & W. JUNGE, 1998. Hydrogen-bonding of tyrosine-Z in photosystem II: Probably absent without calcium and without manganese at acid pH but strong in oxygen-evolving centers. In G. Garab (Hg.), *Photosynthesis: mechanisms and effects*, Bd. 2, S. 1391–1394. Kluwer Academic Publishers.
- AHLBRINK, R., B. K. SEMIN, A. Y. MULKIDJANIAN & W. JUNGE, 2001. Photosystem II of peas: Effects of added divalent cations of Mn, Fe, Mg, and Ca on two kinetic components of P₆₈₀⁺-reduction in Mn-depleted core particles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1506, 117–126.
- JUNGE, W., M. HAUMANN, R. AHLBRINK, A. MULKIDJANIAN & J. CLAUSEN, 2002. Electrostatics and proton transfer in photosynthetic water oxidation. *Proc. Roy. Soc. London*.

