

Die Donorseite des Photosystems II der Pflanzen:

Rekombinationsfluoreszenz- und Röntgenabsorptionsstudien

Markus Grabolle

**Im Fachbereich Physik
der Freien Universität Berlin
eingereichte
Dissertation**



**Berlin
Mai 2005**

Tag der Disputation: 4. Juli 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Dau
2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Möbius

Inhalt

| | |
|---|-----------|
| Überblick und Zielsetzung | 1 |
| 1. Einleitung | 3 |
| 1.1 Oxygene Photosynthese | 3 |
| 1.2 Photosystem II | 5 |
| 2. Probenpräparation | 12 |
| 3. Modifikation des PSII-Mangankomplexes durch Röntgenstrahlung | 14 |
| 3.1 Photoreduktion und Röntgenabsorptionsspektroskopie | 14 |
| 3.2 Messung und Datenauswertung | 15 |
| 3.3 Ergebnisse | 16 |
| 3.4 Diskussion | 28 |
| 4. Rekombinationsfluoreszenz des PSII – Theoretische Grundlagen und ein neues Experiment | 35 |
| 4.1 Prompte Fluoreszenz | 35 |
| 4.2 Theoretische Grundlagen der Rekombinationsfluoreszenz | 39 |
| 4.3 Erstellung des Messplatzes zur Detektion der Rekombinationsfluoreszenz | 44 |
| 4.4 Messplatz der prompten Fluoreszenz | 54 |
| 5. S-Zustandsabhängigkeit der Rekombinationsfluoreszenz – eine quantitative phänomenologische Beschreibung | 57 |
| 5.1 Grundlagen | 57 |
| 5.2 S-Zustandsabhängigkeit der Fluoreszenzverläufe | 58 |
| 5.3 Korrektur für die Abhängigkeit von der Q_A^- -Konzentration | 60 |
| 5.4 Oszillationsverhalten der Q_A^- -korrigierten Rekombinationsfluoreszenz | 62 |
| 5.5 Multiexponentielle Simulation der blitzabhängigen Kinetik | 66 |
| 5.6 Schlussfolgerungen | 70 |
| 6. Desynchronisation im S-Zustands-Zyklus | 71 |
| 6.1 Einleitung | 71 |
| 6.2 <i>Miss</i> -Parameter des S-Zyklus | 72 |
| 6.3 Blockierung der Akzeptorseite (<i>non-Q_B</i> -Zentren) | 85 |
| 6.4 Lichtsättigung von Röntgenabsorptions-Proben | 90 |
| 7. Energetische Parameter der primären und sekundären Ladungstrennung | 98 |
| 7.1 Energetik und Fluoreszenzintensität | 98 |
| 7.2 Bestimmung von Anregungsrate und Rekombinationsfluoreszenz | 98 |
| 7.3 Freie Energiedifferenzen und Redoxpotentiale | 102 |
| 7.4 Diskussion | 105 |

| | |
|---|------------|
| 8. Kinetische und energetische Charakterisierung der Relaxationsprozesse vor der O₂-Bildung im S₃ → S₀-Übergang | 107 |
| 8.1 Simulationsansatz und Ableitung von ΔG _{relax} | 107 |
| 8.2 Temperaturabhängigkeit | 112 |
| 8.3 pH-Abhängigkeit | 121 |
| 8.4 Zusammenfassung der Ergebnisse | 131 |
| 8.5 Untersuchung des Akzeptorseiteneinflusses | 131 |
| 8.6 Diskussion – Ursprung und Mechanismus der protonischen Relaxation | 137 |
| 9. Zusammenfassung | 139 |
| Anhang | 141 |
| A.1 Relation zwischen prompter Fluoreszenz und Q _A -Redoxzustand | 141 |
| A.2 Q _A ⁻ -Korrektur der Rekombinationsfluoreszenz | 142 |
| A.3 Simulation der Fluoreszenz-Induktion | 146 |
| A.4 Geräte, Einstellungen und Steuerprotokolle | 147 |
| A.5 Pufferlösungen und Reagenzien | 150 |
| A.6 Simulationsparameter der prompten Fluoreszenz | 151 |
| Publikationen | 152 |
| Literaturverzeichnis | 154 |
| Danksagung | 166 |
| Lebenslauf | 167 |

Abkürzungen

| | |
|------------------------|---|
| Abs | Absorption |
| Ant* | angeregter Antennenzustand des PSII (einschließlich P680) |
| BBY | PSII angereichert Membranfragmente nach [Berthold <i>et al.</i> 1981] |
| Chl | Chlorophyll |
| D ₂ O | Deuteriumoxid, schweres Wasser |
| DCBQ | 2,6-Dichloro-1,4-benzoquinone |
| DCMU | 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethylurea |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ϵ | optischer Extinktionskoeffizient |
| E _a | Aktivierungsenergie |
| EPPS | (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-propanesulfonic acid |
| EPR | Elektronenspinresonanz, auch ESR genannt |
| EXAFS | Extended X-ray Absorption Fine Structure |
| F | Fluoreszenz |
| F ₀ | minimale prompte Fluoreszenz des PSII |
| F _{Del} | Rekombinationsfluoreszenz oder verzögerte Fluoreszenz des PSII |
| FeCy | Kaliumhexacyanoferrat(III), K ₃ [Fe(CN) ₆] |
| F _M | maximale prompte Fluoreszenz des PSII |
| F _P | prompte Fluoreszenz des PSII |
| G | Gibbsche freie Energie, freie Enthalpie |
| H | Enthalpie |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure |
| I | Intensität |
| LHC | Lichtsammelkomplex (Light Harvesting Complex) |
| MES | 2-Morpholino-ethansulfonsäure |
| OD | optische Dichte |
| OEC | Oxygen-Evolving Complex, Mangankomplex |
| P680 | primärer Elektronendonator des PSII |
| P700 | primärer Elektronendonator des PSI |
| Phe | Pheophytin (auch Pheo) |
| PM | Photomultiplier |
| PPBQ | Phenyl-p-benzoquinone |
| PQ | Plastochinon |
| PSI | Photosystem I |
| PSII | Photosystem II |
| Q | Chinon |
| Q _A | Plastochinon, primärer Elektronenakzeptor des PSII |
| Q _B | Plastochinon, sekundärer Elektronenakzeptor des PSII |
| σ_{Abs} | Absorptionsquerschnitt |
| σ_{Wirk} | Wirkungsquerschnitt |
| S | Entropie |
| S _n | Oxidationszustand n des Mangankomplexes |
| XANES | X-ray Absorption Near Edge Structure |
| XAS | X-ray Absorption Spectroscopy |
| Y _D | Tyrosin 160 des D2-Proteins von PSII |
| Y _Z | Tyrosin 161 des D1-Proteins von PSII, sekundärer Elektronendonator |

Überblick und Zielsetzung

Gegenstand dieser Arbeit sind die Prozesse an der Donorseite des Photosystems II (PSII), die zur Wasserspaltung und der Bildung von molekularem Sauerstoff führen. Obwohl viele Elemente der dort stattfindenden Prozesse inzwischen verstanden sind, bleiben zentrale Fragen offen. Hier ist in erster Linie die katalytische Oxidation des Wassers am Mangankomplex zu nennen, deren Mechanismus trotz intensiver jahrzehntelanger Forschung nicht geklärt ist. Ein notwendiger Schritt zum Verständnis der Wasserspaltung besteht in der Aufklärung der geometrischen und elektronischen Struktur des Mangankomplexes in den verschiedenen Zuständen des katalytischen Zyklus. Ein zweiter wichtiger, bisher noch nicht verstandener Punkt betrifft die Kopplung der einzelnen Elektronentransferschritte zwischen dem primären Elektronen-Donor (P680) und dem Mangankomplex an die Bewegung von Protonen sowie den funktionellen Zusammenhang dieser Protonenbewegungen mit der katalytischen Wasserspaltung. In der hier vorliegenden Arbeit werden verschiedene Beiträge zu diesen Problemstellungen geleistet:

1. Untersucht wurde die Modifikation des Mangankomplexes infolge intensiver Röntgenbestrahlung. Durch die hohe Strahlungsintensität in Röntgenabsorptions-Experimenten und in der Röntgen-Proteinkristallografie an Synchrotronstrahlungsquellen kommt es zu einer Reduktion der Mangan-Ionen im katalytischen Zentrum und zu strukturellen Veränderungen des Mangankomplexes. Diese Modifikationen wurden mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie an der Mangan-K-Kante untersucht. Durch die Bestimmung der Kantenenergie in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer konnte der Reduktionsprozess verfolgt werden. Aus der Analyse der EXAFS-Oszillationen wurden Informationen zu den mit der Reduktion einhergehenden Strukturänderungen gewonnen. Hieraus ergeben sich wichtige Schlussfolgerungen für die Konzipierung zukünftiger Messungen an hochintensiven Röntgenstrahlungsquellen. (Kapitel 3)
2. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Erstellung eines Messplatzes zur zeitaufgelösten Detektion der PSII-Rekombinationsfluoreszenz nach Laserpulsanregung. Es konnte gezeigt werden, dass die Rekombinationsfluoreszenz – in Kombination mit Messungen der prompten Fluoreszenz – eine geeignete Methode zur Untersuchung von sowohl Kinetik wie auch Energetik der Elektronentransfer-Reaktionen an der Donorseite des PSII ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Abhängigkeit der Rekombinationsfluoreszenz vom Oxidationszustand des Mangankomplexes im katalytischen Zyklus (Kok-Zyklus) geeignet ist, die Parameter des Zyklus zu bestimmen (*misses*, S-Zustandspopulation). (Kapitel 4)
3. Im Hinblick auf die Optimierung von Beblitzungs-Experimenten, in denen die einzelnen S-Zustände gezielt durch Laserblitze populiert werden, wurde die Abhängigkeit des *miss*-Parameters von den experimentellen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert und Blitzabstand) sowie der Anteil der akzeptorseitig blockierten Photosysteme (*non-Q_B*-Zentren) bestimmt. Es war möglich, die verschiedenen Ursachen, die zum *miss*-Parameter beitragen, zu quantifizieren. Ergänzend wurde das Lichtsättigungsverhalten konzentrierter PSII-Proben untersucht, die in Röntgen-Beblitzungsexperimenten verwendet werden. (Kapitel 6)

4. Durch vergleichende Messungen von Rekombinationsfluoreszenz und prompter Fluoreszenz wurden die energetischen Parameter der Ladungstrennung bestimmt (freie Energiedifferenz zwischen dem angeregten PSII-Antennensystem und dem ladungsseparierten Zustand). Dabei unterscheidet sich der hier verwendete Ansatz von den bisherigen Methoden zur energetischen Charakterisierung der PSII-Ladungstransferprozesse. In Kombination mit Literaturwerten konnten die Redoxpotentiale der Donorseitenkomponenten (P680, Tyrosin-Z) abgeleitet werden, deren direkte Messung durch Redoxtitration nicht möglich ist. (Kapitel 7)

5. Die Kinetik und Energetik des multiphasigen Elektronentransfers vom Tyrosin-Z zum P680, der dem sauerstoffentwickelnden $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang vorausgeht, wurde durch Messung der Rekombinationsfluoreszenz untersucht. Im Gegensatz zu transienten Absorptions-Differenzmessungen (P680⁺-, Tyrosin-Z-, Mn-Absorption), wie sie vorrangig für die Untersuchung der Elektronentransfer-Prozesse der Donorseite verwendet werden, ist diese Methode nicht durch die lichtstreuenden Eigenschaften des PSII-Probenmaterials begrenzt, wodurch die Erfassung eines wesentlich längeren Zeitbereiches möglich wird. Der Elektronentransfer vom Tyrosin-Z zum P680 ist mit Relaxationsprozessen gekoppelt, die vermutlich im direkten Zusammenhang mit der Wasserspaltung stehen. Durch Untersuchung des Temperaturverhaltens, der pH-Abhängigkeit und des H/D-Isotopeneffektes konnten wesentliche Einblicke in den Mechanismus dieser Relaxation gewonnen werden. (Kapitel 8)