

1. Einleitung

1.1 Oxygene Photosynthese

Die Photosynthese ist der wichtigste Energieumwandlungsprozess auf der Erde, auf der das gesamte Leben höherentwickelter Organismen beruht. In diesem Prozess wird die Strahlungsenergie der Sonne umgewandelt und in Form chemischer Energie gespeichert. Dabei spielt die oxygene Photosynthese, die in höheren Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien stattfindet, eine herausragende Rolle, da sie Wasser und Kohlendioxid unter Nutzung der Strahlungsenergie in Glukose als Energiespeicher und molekularen Sauerstoff als Nebenprodukt umwandelt. Sie ist somit verantwortlich für den in der Atmosphäre enthaltenen Sauerstoff, den Verbrauch von Kohlendioxid und dessen Bindung in Form von Kohlehydraten, also letztlich in Biomasse. Der Gesamtprozess der Photosynthese lässt sich in Licht- und Dunkelreaktionen unterteilen, die in räumlich getrennten Bereichen innerhalb der Chloroplasten stattfinden. Die Lichtreaktionen finden in in sich geschlossenen Lipiddoppelschichten, den Thylakoidmembranen, statt (siehe Abbildung 1.1).

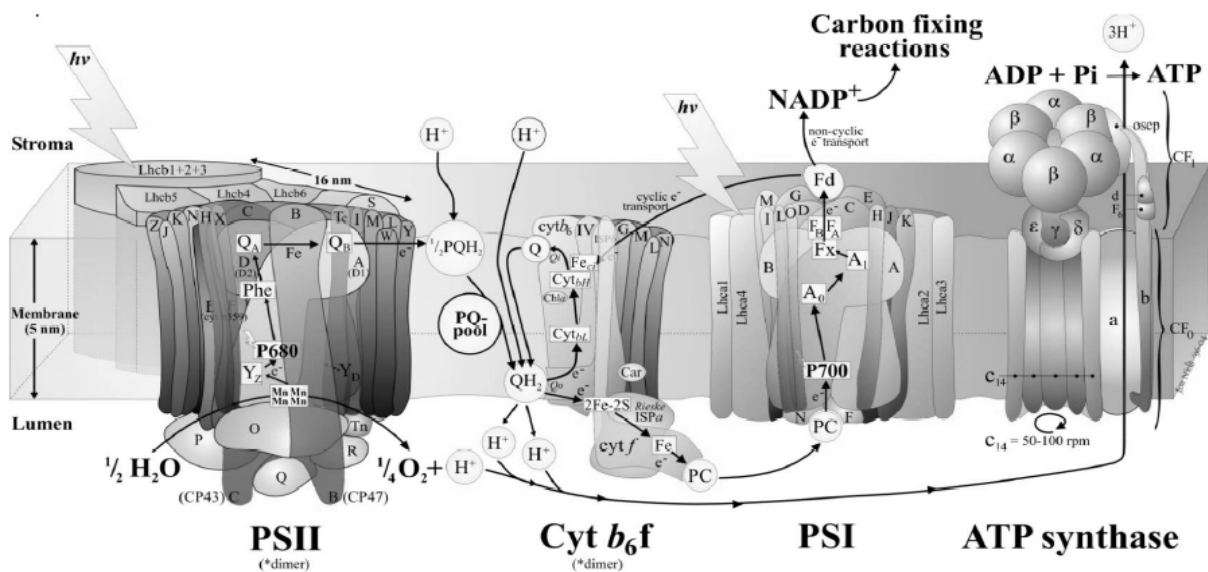


Abbildung 1.1: Ausschnitt aus der Thylakoidmembran mit den Kofaktor-Proteinkomplexen der oxygenen Photosynthese (Quelle: <http://www.bio.ic.ac.uk/research/nield/downloads>).

Die Thylakoidmembranen grenzen eine innere Phase, das Lumen von einer äußeren, dem Stroma, ab. Die an der Lichtreaktion beteiligten Komponenten sind Membranproteinkomplexe, die in die Thylakoidmembran eingebettet sind. In zwei dieser Proteinkomplexe, dem Photosystem I (PSI) und dem Photosystem II (PSII) wird die Lichtenergie zum Aufbau eines elektrochemischen Potentials über die Thylakoidmembran und zur Bildung von NADPH genutzt. Die Gesamtgleichung der als Lichtreaktion zusammengefassten Einzelprozesse beinhaltet die Spaltung von Wasser, welches als Elektronenquelle dient, die Reduktion von NADP^+ zu NADPH und die über den Protonengradienten angetriebene Bildung von ATP aus ADP. Mit der energiereichen

1. Einleitung

Verbindung ATP und dem starken Reduktionsmittel NADPH als Produkte der Lichtreaktion wird in der Dunkelreaktion CO_2 im sogenannten Calvin-Zyklus zu Kohlehydraten reduziert.

Die beiden an der Lichtreaktion beteiligten Photosysteme (PSI und PSII) arbeiten in Reihe, um den Elektronentransport vom Wasser zum NADP^+ zu ermöglichen. Der prinzipielle Aufbau beider Photosysteme ähnelt sich: Im peripheren Bereich befinden sich pigmenthaltige Antennenkomplexe, in höheren Pflanzen Chlorophyll-Proteinkomplexe mit Chlorophyll-a (Chl-a), Chlorophyll-b (Chl-b) und Karotinoiden als Pigmente (in Cyanobakterien auch Phycobilliproteine mit offenkettigen Tetrapyrrolringen), die das Licht absorbieren und die Anregungsenergie zum Reaktionszentrum weiterleiten, wo es zur Ladungstrennung und einem gerichteten Elektronentransport vom Lumen zum Stroma kommt. Abbildung 1.2 zeigt den prinzipiellen Verlauf des Elektronentransports durch die beiden Photosysteme im sogenannten Z-Schema.

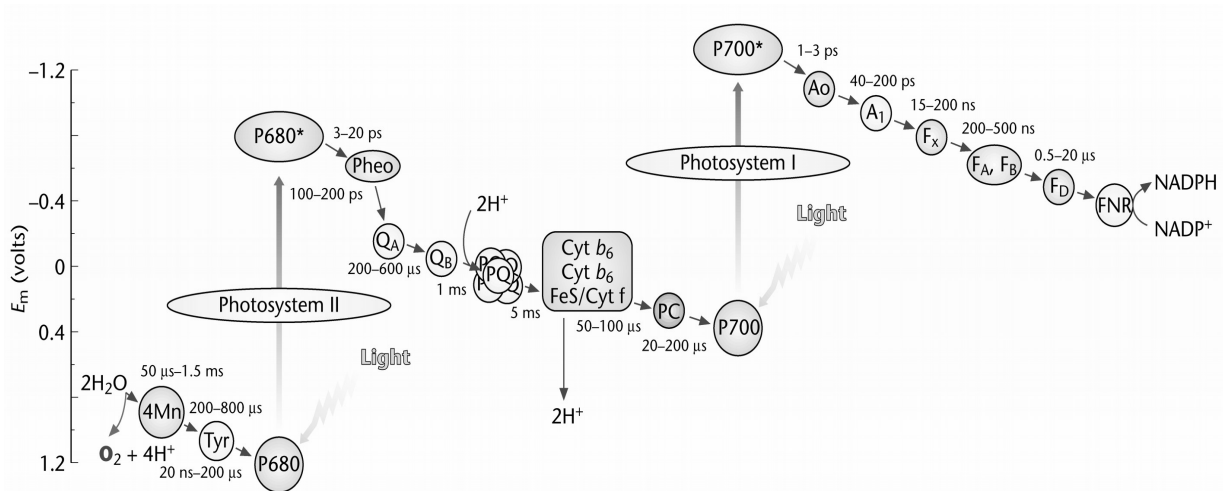


Abbildung 1.2: Z-Schema des lichtgetriebenen Elektronentransports der Photosynthese (Details siehe Text, übernommen aus [Whitmarsh und Govindjee 2001]).

Die durch Wasserspaltung gewonnenen Elektronen gelangen über die Elektronentransportkette des PSII, auf die weiter unten genauer eingegangen wird, zum Cytochrom- b_6/f -Komplex, von wo aus sie mittels Plastocyanin, einem wasserlöslichen Protein, zum P700, dem primären Donor des PSI, weitertransportiert werden. Dieser wurde vorher im Primärschritt durch Absorption eines Photons durch die Antenne, die Weiterleitung der Anregung zu P700 und durch den Elektronentransfer zum primären Akzeptor A_0 , einem Chlorophyll-a, oxidiert. Über eine Elektronentransportkette von A_1 über drei Eisen-Schwefel-Zentren wird Ferredoxin reduziert, das so NADP^+ reduzieren kann. Der Elektronentransport ist mit einer Protonenaufnahme aus dem Stroma und einer Protonenabgabe in das Lumen gekoppelt, was zur Generierung eines Protonengradienten über der Membran führt. Der Protonengradienten und die parallel entstandene Potentialdifferenz werden zur ATP-Synthese genutzt.

Im folgenden soll genauer auf die Funktionsweise des PSII eingegangen werden, wobei der Schwerpunkt auf den für diese Arbeit relevanten Prozessen der PSII-Donorseite liegt.

1.2 Photosystem II

Abbildung 1.3 zeigt schematisch das PSII mit seinen wesentlichen funktionellen Komponenten. Nach der Absorption eines Photons im Antennensystem des PSII kommt es durch schnelle Energietransferprozesse zu einer Äquilibration der Anregungsenergie über die Chlorophylle des Antennensystems und des Reaktionszentrums einschließlich des primären Donors P680 [Dau und Sauer 1996]. Vom angeregten P680 aus (im folgenden mit P680* bezeichnet) erfolgt innerhalb etwa 3 ns die primäre Ladungstrennung durch Elektronentransfer zu einem speziellen Pheophytin (Pheo). Der so erzeugte ladungsseparierte Zustand $P680^+Pheo^-$ steht im Gleichgewicht mit dem angeregten Antennenzustand (Reversibles-Radikalpaar-Modell, [Schatz *et al.* 1988]) und würde innerhalb einiger ns durch Rekombination verloren gehen. Die Stabilisierung der Ladungstrennung wird erreicht durch den Elektronentransfer vom Pheo⁻ zu einem gebundenen Plastochinon, Q_A, der mit einer Zeitkonstanten von etwa 300 ps erfolgt. Das so reduzierte Q_A gibt das Elektron innerhalb einiger 100 μs an ein weiteres Plastochinon, Q_B, ab. Q_B ist ein reversibel gebundener Zweielektronenakzeptor, der nach Übernahme von zwei Elektronen unter Aufnahme von zwei Protonen aus dem Stroma als Hydrochinon (H₂Q_B) seine Bindungsstelle verlässt und gegen oxidiertes Q_B aus dem Plastochinonpool ausgetauscht wird. Das gebildete Hydrochinon diffundiert in der Lipidphase zum Cytochrom-b₆f -Komplex wo es wieder oxidiert wird. Hierbei werden die zuvor aus dem Stroma aufgenommenen Protonen in das Lumen abgegeben.

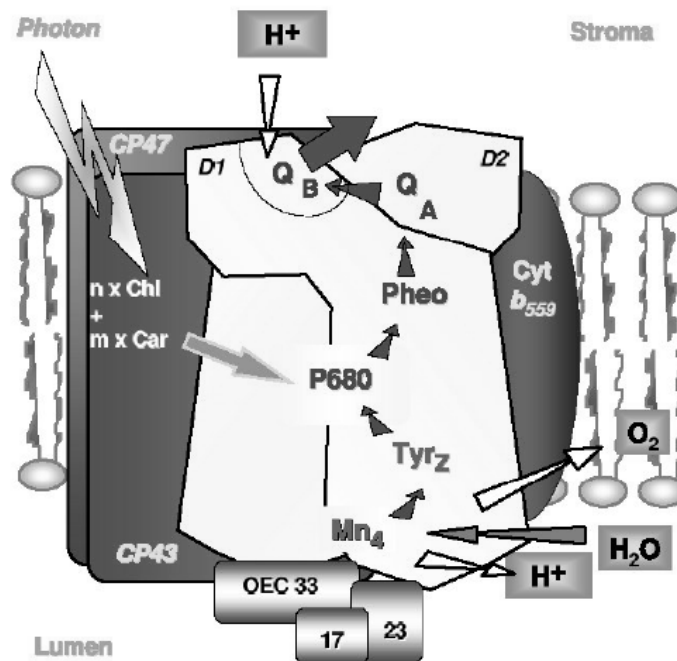


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Photosystems II und der Komponenten der Elektronentransportkette. Die Lichtsammelkomplexe (LHC) der Pflanze sind nicht eingezeichnet. (Erklärungen siehe Text, übernommen aus [Dau *et al.* 2003]).

Das oxidierte P680 wird durch Elektronentransfer von einem redoxaktiven Tyrosin (Tyr_Z oder Y_Z) reduziert, wodurch es zu einer weiteren Stabilisierung der Ladungstrennung kommt, da somit die Rekombination zwischen $P680^+$ und Q_A^- verhindert wird. Das jetzt oxidierte Y_Z entzieht seinerseits dem Mangankomplex ein Elektron. Der Mangankomplex ist ein Cluster

aus vier Mn-Ionen und einem Kalzium-Ion, an dem die katalytische Wasserspaltung stattfindet. Nach der sukzessiven Absorption von vier Photonen und der entsprechenden Akkumulation von vier positiven Ladungen im Mangankomplex erfolgt die Oxidation von zwei Wassermolekülen unter Bildung von molekularem Sauerstoff. Nach diesem Schritt müssen wieder vier Photonen absorbiert und dem Mangankomplex vier Elektronen entzogen werden, bevor es zu einer erneuten Wasserspaltung und Sauerstoffbildung kommt (zyklischer Prozess).

Mangankomplex

Kok-Zyklus

Der oben erwähnte 4er-Zyklus der Sauerstoffentwicklung wurde 1969 von Joliot entdeckt [Joliot *et al.* 1969] und 1970 von Kok erklärt [Kok *et al.* 1970]. Bei Belichtung von dunkeladaptierten Photosystemen mit einer Serie sättigender kurzer Lichtblitze beobachtet man eine Oszillation der Sauerstoffentwicklung mit Maxima nach jedem vierten Blitz. Diese als Kok- oder S-Zustands-Zyklus bezeichnete Reaktionssequenz ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Die verschiedenen Oxidationszustände des Mangankomplexes werden dabei mit S_0 bis S_4 bezeichnet, wobei die Indizes die durch sukzessive Ladungstrennung akkumulierten Oxidationsäquivalente angeben. Die Ladungstrennung im S_3 -Zustand führt zur Bildung eines intermediären S_4 -Zustandes, der spontan unter Bildung von molekularem Sauerstoff zum S_0 reduziert wird. Mit Ausnahme des S_1 sind alle S-Zustände instabil und relaxieren im Dunkeln zum S_1 -Zustand – S_2 und S_3 unter Elektronenaufnahme, S_0 unter Abgabe eines Elektrons. (Die S_0 -Relaxation ist allerdings extrem langsam (Stunden oder Tage), so dass in dunkeladaptierten PSII-Proben eine S_0 -Restpopulation von bis zu 25 % nicht auszuschließen ist.) Infolgedessen beobachtet man das erste Maximum der Sauerstoffentwicklung schon nach dem dritten Blitz.

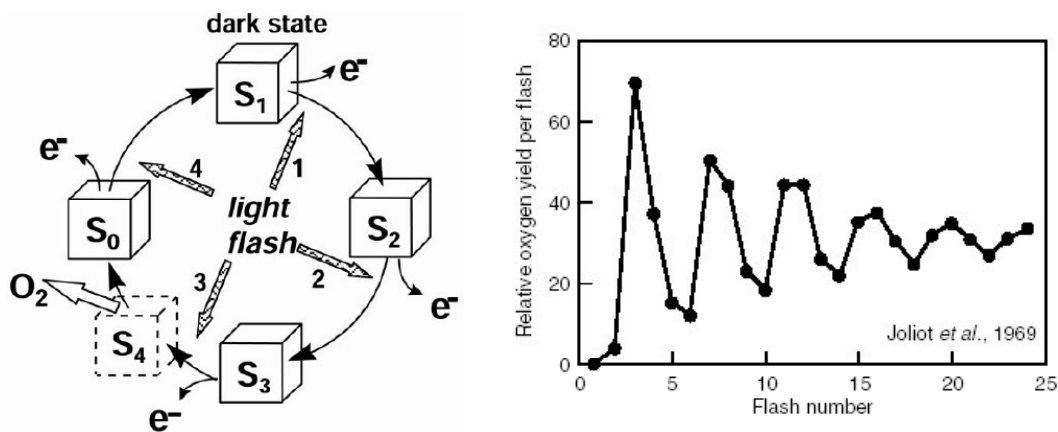


Abbildung 1.4: Kok-Zyklus des PSII und blitzabhängige Sauerstoffentwicklung (übernommen aus [Dau *et al.* 2003] bzw. [Govindjee 2000]).

Da nicht in allen Photosystemen durch die Beblitzung eine stabile Ladungstrennung mit der nachfolgenden Oxidation des Mangankomplexes (S -Übergang) erreicht wird, kommt es mit wachsender Blitzzahl zu einer zunehmenden Durchmischung der S -Zustände, was zu einer Dämpfung der Sauerstoffoszillation führt. Die Stärke dieser Dämpfung wird durch den *miss*-Parameter beschrieben, der den Anteil der Zentren angibt, in denen durch den Blitz kein S -

Übergang ausgelöst wird. Es ist auch möglich, dass Photosysteme während eines Blitzes zwei Übergänge ausführen (*double-hits*), was aber bei der Verwendung von ns-Laserpulsen aufgrund der kurzen Pulsdauer praktisch nicht vorkommt.

Die Zeiten der einzelnen S-Übergänge (die identisch mit den Elektronentransferzeiten vom Mangankomplex zum Y_Z sind) unterscheiden sich für die verschiedenen S-Zustände. In der Literatur werden Zeitkonstanten von 3-250 μs für $S_0 \rightarrow S_1$, 30-140 μs für $S_1 \rightarrow S_2$, 100-600 μs für $S_2 \rightarrow S_3$ und 1-4,5 ms für $S_3 \rightarrow S_0$ angegeben [Nugent 1996, Rappaport *et al.* 1994, Razeghifard und Pace 1997]. Die ermittelten Raten hängen dabei stark von der Art der Probenpräparation ab (PSII-Membranfragmente, PSII-Kernkomplexe, intakte Chloroplasten). Die Kinetik der Elektronentransfers aller S-Übergänge lässt sich sehr gut mit einem einfach-exponentiellen Verhalten beschreiben. Für den $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang wird allerdings in einigen Untersuchungen eine kurze Verzögerungsphase gefunden [Rappaport *et al.* 1994, Razeghifard und Pace 1999, Clausen *et al.* 2004], die mit möglichen Intermediatzuständen in Verbindung gebracht wird. Tendenziell nimmt die Zeitkonstante des S-Überganges mit der Zahl der akkumulierten Oxidationsäquivalente zu, wobei der langsamste Schritt der sauerstoffentwickelnde $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang ist. Die Ratenkonstante der Sauerstoffentwicklung beim $S_3 \rightarrow S_0$ -Schritt stimmt dabei, abgesehen von der erwähnten Verzögerungsphase, mit der des Elektronentransfers vom Mangankomplex zum Y_Z überein [Babcock *et al.* 1976, van Leeuwen *et al.* 1993, Razeghifard und Pace 1999].

Strukturuntersuchungen am Mangankomplex

Trotz intensiver Forschungen ist es bisher noch nicht gelungen, den Mechanismus der katalytischen Wasserspaltung am Mangankomplex vollständig zu verstehen. Ein wichtiger erster Schritt in diese Richtung besteht in der Aufklärung der geometrischen und elektronischen (Oxidationszustände) Struktur in den verschiedenen S-Zuständen. Die Tatsache, dass sich der Mangankomplex aus vier Mangan-Ionen zusammensetzt, wurde durch Quantifizierung von freigesetztem Mn^{2+} mittels Atomabsorptionsspektrometrie und EPR gezeigt. (Ein historischer Abriss findet sich in [Debus 1992].) Messungen der Sauerstoffentwicklung von Ca-verarmten PSII zeigen, dass Kalzium zur Sauerstoffbildung nötig ist, und wahrscheinlich einen integralen Bestandteil des Mn-Komplexes darstellt, was durch Röntgenuntersuchungen bestätigt wurde [Cinco *et al.* 2002, Ferreira *et al.* 2004, Müller *et al.* 2005].

Die wesentlichen Informationen zur Geometrie des Komplexes und zu den Oxidationszuständen der Mangan-Ionen, die vor Veröffentlichung der ersten Kristallstrukturen des PSII gewonnen worden, beruhen auf den Ergebnissen von Röntgenabsorptions- und EPR-Messungen (für eine Übersicht siehe [Dau *et al.* 2001, Robblee *et al.* 2001]). EXAFS-Messungen zeigen Mn-Mn-Distanzen von etwa 2,7 Å, die typisch sind für zwei di- μ -oxo-verbrückte Mangan-Ionen. Im S_1 und S_2 -Zustand liegen höchstwahrscheinlich zwei solcher di- μ -oxo-verbrückten Mn-Paare vor. Des weiteren werden Abstände zwischen 3,3 und 3,4 Å gefunden, die einem Mn-Mn-Vektor und einem Mn-Ca-Vektor zugeordnet werden. Aufgrund dieser Befunde sind eine Vielzahl von Strukturmodellen vorgeschlagen worden. Ein lange Zeit favorisiertes Modell ging von zwei jeweils di- μ -oxo-verbrückten Mangan-Paaren aus, die untereinander über eine Mn-(mono- μ -oxo)-Mn-Brücke mit einem Mn-Mn-Abstand von 3,3 Å verbunden sind („dimer of dimers“- oder Berkeley-Modell [Yachandra *et al.* 1993]). Die proteinkristallografischen Ergebnisse, die in letzter Zeit gewonnen wurden [Zouni *et al.* 2001, Kamiya und Shen 2003, Ferreira *et al.* 2004], stellen dieses „dimer of dimers“-Modell allerdings in Frage. Besonders die Ergebnisse der neuesten Kristallstruktur mit einer Auflösung von 3,5 Å legen vielmehr eine kubische Geometrie nahe [Ferreira *et al.* 2004]. Allerdings ist bei einer Bewertung der proteinkristallografischen

Ergebnisse zu berücksichtigen, dass die untersuchten PSII-Kristalle in diesen Experimenten einer sehr hohen Röntgenstrahlen-Dosis ausgesetzt sind ([Dau *et al.* 2004], siehe Kapitel 3 dieser Arbeit), infolge derer strukturelle Modifikationen der Proteinmatrix und vor allem des Mangankomplexes wahrscheinlich erscheinen.

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen dem Oxidationszustand des Mangans und der energetischen Lage der Mangan-K-Kante des Röntgenabsorptionsspektrums kann auf den Oxidationszustand der Mangan-Ionen im Komplex geschlossen werden [Sauer *et al.* 1992, Penner-Hahn 1998, Dau *et al.* 2003]. Der Vergleich mit Manganverbindungen, deren Mn-Oxidationszustand bekannt ist ergibt als wahrscheinlichste Konfiguration $\text{Mn(III)}_2\text{Mn(IV)}_2$ für den S_1 - und Mn(III)Mn(IV)_3 für den S_2 -Zustand [Yachandra *et al.* 1993, Dau *et al.* 2003]. Diese Annahme wird gestützt durch EPR-Messungen im S_2 -Zustand (S_2 -Multiline-Signal, für eine Übersicht siehe [Peloquin und Britt 2001]). Für den S_0 -Zustand wird eine Konfiguration von $\text{Mn(II)Mn(III)Mn(IV)}_2$ oder $\text{Mn(III)}_3\text{Mn(IV)}$ angenommen. Ob der $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang mit einer Änderung des Mn-Oxidationszustandes verbunden ist [Iuzzolino *et al.* 1998, Haumann *et al.* 2005] oder die Oxidation eines Mn-Liganden erfolgt [Roelofs *et al.* 1996, Messinger *et al.* 2001], ist kontrovers diskutiert. (Für eine detaillierte Diskussion sei auf [Dau *et al.* 2003] verwiesen.) Ab-initio-Simulationen der Mangan-K-Kante legen jedoch nahe, dass im $S_2 \rightarrow S_3$ -Schritt eine Mangan-Oxidation erfolgt, die mit einer Koordinationszahländerung einhergeht ($\text{Mn(III)O}_5 \rightarrow \text{Mn(IV)O}_6$). Dies kann, unter Berücksichtigung von EXAFS-Ergebnissen, als Bildung einer dritten di- μ -oxo-Brücke interpretiert werden [Liebisch 2005, Dau *et al.* 2005]. Im sauerstoffentwickelnden $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang könnte diese neugebildete μ -oxo-Brücke dann als Protonenakzeptor dienen (siehe unten).

Die kristallografischen Ergebnisse stellen zwar einen lange erwarteten Durchbruch dar. Hinsichtlich des Mangankomplexes stellt sich allerdings die Frage, in welchem Ausmaß die erhaltenen strukturellen Informationen durch Modifikationen beeinflusst sind, wie sie die hochintensive Röntgenstrahlung erwarten lässt, der die Probe in diesen Experimenten ausgesetzt ist. Die Modifikationen des Mangankomplexes durch Röntgenstrahlung wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht.

Tyrosin-Z

Der Elektronentransfer vom Y_Z zum P680^+ zeichnet sich durch ein komplexes Zeitverhalten mit schnellen Phasen im Nanosekundenbereich und langsamen Komponenten im Mikrosekundenbereich aus [Gerken *et al.* 1987, Christen *et al.* 1998, Christen und Renger 1999]. Die Zeitkonstanten und relativen Amplituden sowohl der Nanosekunden- wie auch der Mikrosekunden-Komponenten hängen dabei vom S-Zustand des Mangankomplexes ab [Brettel *et al.* 1984, van Leeuwen *et al.* 1993]. Im S_0 - und S_1 -Zustand findet der überwiegende Teil der Nanosekunden-Reduktion von P680^+ im Zeitbereich von 20 bis 50 ns statt, während im S_2 und S_3 ein signifikanter Anteil der P680^+ -Reduktion mit Zeitkonstanten von 200 bis 700 ns erfolgt. Kinetische Phasen im Mikrosekundenbereich werden in allen S-Zuständen beobachtet, wobei der Anteil dieser Phasen an der gesamten P680^+ -Reduktion mit dem S-Zustand variiert [Schilstra *et al.* 1998, Jeans *et al.* 2002]. Die Oxidation von Y_Z ist mit der Abgabe oder Verschiebung des phenolischen Protons verknüpft und Y_Z liegt in oxidiertem Form als neutrales Radikal vor, wie FTIR- [Ayala *et al.* 1999, Berthomieu *et al.* 1998] und EPR-Messungen zeigen [Babcock *et al.* 1989, Barry *et al.* 1990, Rodriguez *et al.* 1987]. Hierbei handelt es sich vermutlich um keine echte Deprotonierung, sondern das Proton wird nur innerhalb einer Wasserstoffbrücke zu einem benachbarten Histidin (D1-His190) verschoben [Hays *et al.* 1998, Hays *et al.* 1999, Chu *et al.* 1995, Mamedov *et al.* 1998]. Während der anschließenden Reduktion des Y_Z^+ durch den Elektronentransfer vom

Mangankomplex erfolgt dann die Wiederaufnahme des Protons, bzw. die Zurückverschiebung vom His190 zum Y_Z innerhalb der Wasserstoffbrücke.

H_2O/D_2O -Isotopenaustauschversuche zeigen eine Verlangsamung der μs -Phasen in D_2O [Schilstra *et al.* 1998, Christen und Renger 1999], während die ns-Phasen durch H_2O/D_2O -Austausch nicht oder nur geringfügig beeinflusst werden [Karge *et al.* 1996]. Die schnellen, 20-50 ns-Komponenten werden einem reinem Elektronentransfer zugeschrieben, während die Phasen im Bereich von 200 bis 700 ns vermutlich mit einer Konformationsrelaxation der lokalen Proteinmatrix verbunden sind [Renger 2001]. Die protonische Beeinflussung der μs -Phasen wird mit Relaxationen in der Umgebung des Y_Z erklärt, die an Protonenbewegungen gekoppelt sind: Nach dem ns-Elektronentransfer stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den Zuständen Y_Z^+P680 und Y_ZP680^+ ein, welches durch Protonierungs- oder Deprotonierungsprozesse in Richtung Y_Z^+P680 verschoben wird. Hierbei könnte es sich z.B. um Protonenverschiebungen innerhalb eines Wasserstoffbrückennetzwerkes [Nugent *et al.* 2001, Renger 2001] oder um eine elektrostatisch induzierte Deprotonierung peripherer Gruppen an der Proteinoberfläche handeln [Tommos und Babcock 2000]. Über den genauen Mechanismus und die Bedeutung dieser μs -Relaxation ist allerdings noch wenig bekannt.

Insgesamt werden durch die ns-Komponenten nur etwa 80 % des durch die Ladungstrennung gebildeten $P680^+$ reduziert, die Reduktion der verbleibenden 20 % erfolgt im Zeitbereich von 1 bis 100 μs [Eckert und Renger 1988, Brettel *et al.* 1984, Rappaport *et al.* 1995, Schilstra *et al.* 1998, Cherepanov *et al.* 1998]. Das ist insofern erstaunlich, da hierdurch die Wahrscheinlichkeit für eine Rekombination des ladungsseparierten Zustandes $P680^+Q_A^-$ erhöht wird, was die Effizienz des photochemischen Prozesses verringert. Es ist daher zu vermuten, dass Y_Z nicht nur als reiner Elektronenüberträger zwischen dem Mangankomplex und dem $P680$ agiert – hierzu wäre eine möglichst schnelle Reduktion von $P680^+$ wünschenswert –, sondern auf eine direktere Art an den katalytischen Prozessen, die zur Wasserspaltung führen, beteiligt ist [Ahlbrink *et al.* 1998, Ioannidis *et al.* 2002, Nugent *et al.* 2004].

Energetik der Donorseitenprozesse

Die Spaltung von Wasser erfordert ungewöhnlich hohe Redoxpotentiale von etwa +1 V an der Donorseite des PSII. Für die elektrochemische Oxidation von Wasser müssen im Mittel +0,83 V (bei pH 7) pro Elektron aufgebracht werden. Durch den mit dem Elektronentransfer verbundenen Protonentransport über die Membran kann der pH im Lumen Werte von bis zu 5 annehmen, wodurch sich das notwendige Potential zur Wasseroxidation auf +0,95 V erhöhen kann. Eine direkte Messung der Potentiale der Donorseitenkomponenten durch Redoxtitration ist nicht möglich, da es bei diesen hohen Potentialen zu einer Schädigung des Proteins kommen würde. Indirekte Abschätzungen, die auf Redoxtitrationen der Akzeptorseite (Pheophytin, Q_A) und der Bestimmung der Energiedifferenzen zwischen den ladungsseparierten Zuständen beruhen, liefern Werte von etwa +1,1 V für das Redoxpotential von $P680^+$ [Jursinic und Govindjee 1977, Klimov *et al.* 1979, Rutherford *et al.* 1981]. Eine jüngere Untersuchung ergibt einen etwas größeren Wert von 1,26 V [Rappaport *et al.* 2002]. Im Vergleich dazu liegen die Redoxpotentiale aller anderen primären Donoren von photosynthetischen Reaktionszentren (PSI, bakterielle Photosysteme) zwischen +0,4 und +0,6 V [Barber 1995]. Für Y_Z/Y_Z^+ wird ein Wert von +950 bis +990 mV angegeben, für die S-Übergänge +900 bis +950 mV für $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$ und $S_3 \rightarrow S_0$ sowie $\leq +740$ mV für $S_0 \rightarrow S_1$ [Vass und Styring 1991]. Diese Zahlen zeigen, dass der energetische Spielraum zur Wasserspaltung relativ gering ist. Zudem muss dafür gesorgt werden, dass sich das Redoxpotential des Mangankomplexes für die einzelnen S-Übergänge trotz der Extraktion von Elektronen nicht wesentlich erhöht, da sonst die Oxidation durch Y_Z im nächsten S-

Übergang nicht möglich wäre. Ein trotz Elektronenentzug nahezu konstant bleibendes Redoxpotential kann durch Konfigurationsänderungen, wie sie für den $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang postuliert werden, und/oder durch Deprotonierung von Mangankomplex-Liganden erreicht werden [Magnuson *et al.* 2005].

Energetische Betrachtungen ergeben, dass mindestens im sauerstoffbildenden $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang ein starker Protonenakzeptor in den Oxidationsprozess involviert sein muss [Krishtalik 1986, Krishtalik 1990]. Als Kandidat hierfür wurde Y_Z vorgeschlagen, das im oxidierten Zustand als neutrales, deprotoniertes Radikal vorliegt. Im sogenannten „Hydrogen-Abstractor“-Modell wird vorgeschlagen, dass Y_Z dann in jedem S-Übergang zusätzlich zum Elektronen aus dem Mangankomplex ein Proton von mangankoordiniertem Wasser oder einem Hydroxoliganden aufnimmt [Tommos *et al.* 1998, Gilchrist *et al.* 1995, Tommos und Babcock 2000, Hoganson und Babcock 1997]. Ein Vorteil dieses Modells besteht darin, dass durch die konzertierte Extraktion von Elektronen und Protonen eine Ladungsakkumulation am Mangankomplex verhindert wird, wodurch das Redoxpotential durch die S-Übergänge nicht wesentlich zunimmt. Das phenolische Proton muss nach jeder Oxidation von Y_Z aus dem Reaktionszentrum entfernt werden. Als Akzeptor hierfür ist das benachbarte Histidin (D1-H190) vorgeschlagen worden, von dem aus dann der weitere Protonentransfer in Richtung Lumen erfolgt [Babcock *et al.* 1997, Hays *et al.* 1998, Hoganson *et al.* 1995].

Gegen dieses Modell sprechen aber verschiedene Tatsachen: In der Mehrzahl der Untersuchungen hängt die Zahl der freigesetzten Protonen vom S-Zustand ab [Schlodder und Witt 1999, Haumann und Junge 1994, Rappaport und Lavergne 1991] (aber siehe z.B. [Lübbers und Junge 1990]). Nach dem „Hydrogen-Abstractor“-Modell müsste jedoch bei jedem Schritt im S-Zyklus ein Proton freigesetzt werden. Die Interpretation der S-zustandsabhängigen Protonenfreisetzung ist allerdings schwierig, da es während der S-Übergänge neben den echten „chemischen“ Protonen, die direkt oder indirekt aus der Wasserspaltung stammen, zu elektrostatisch induzierten Protolysereaktionen peripherer Aminosäuregruppen kommt. Die Mehrzahl der Untersuchungen deutet aber auf eine Freisetzungsmuster für „chemischen“ Protonen von 1:0:1:2 in den Übergängen $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$ und $S_3 \rightarrow S_0$ hin (für eine Übersicht siehe [Rappaport und Lavergne 2001] und [Junge *et al.* 2002]). Durch $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Isotopenaustauschversuche ist gezeigt worden, dass noch im S_3 -Zustand beide Substratwassermoleküle austauschbar sind [Hillier *et al.* 1998, Messinger *et al.* 1995]. Beim „Hydrogen-Abstractor“-Modell wären im S_3 aber schon drei Protonen entfernt worden und ein schneller Austausch nicht mehr möglich. Elektrochrome Bandenverschiebungen von Chlorophyll-a belegen, dass nach der Oxidation von Y_Z die generierte positive Ladung in der Nähe des Y_Z bestehen bleibt, was ebenfalls nicht mit dem „Hydrogen-Abstractor“-Modell vereinbar ist [Rappaport und Lavergne 1997, Dekker *et al.* 1984a, Lavergne 1984, Saygin und Witt 1985, Mulkidjanian *et al.* 1996]. Die ladungsinduzierte Bandenverschiebung verschwindet erst durch die Y_Z -Reduktion infolge des Elektronentransfers vom Mangankomplex zum Y_Z . Es werden aber auch schnelle Phasen im 30 μs -Bereich gefunden die auf Protonenverschiebungen innerhalb des Proteins in der Nähe von Y_Z zurückgeführt werden [Rappaport *et al.* 1994] (siehe obige Ausführungen bezüglich der μs -Phasen des Y_Z -P680-Elektronentransfers). Es ist daher wahrscheinlicher, dass das phenolische Proton in der Nähe des Y_Z verbleibt und nur innerhalb einer bereits bestehenden Wasserstoffbrückenbindung mit dem benachbarten His190 verschoben wird.

Als alternative Protonenakzeptoren im $S_3 \rightarrow S_0$ -Schritt kommen beispielsweise die schon erwähnte zusätzliche μ -oxo-Brücke, die im $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang gebildet wird, wie auch protonierbare Aminosäure-Seitenketten in der unmittelbaren Umgebung des Mangankomplexes in Betracht, die sich dann vor dem sauerstoffbildenden Schritt im deprotonierten Zustand befinden müssen.

Diese Betrachtungen zur Kinetik und Energetik der Donorseitenprozesse zeigen, dass protolytische Reaktionen vermutlich eine entscheidende Rolle in der Feinabstimmung der Redoxpotentiale spielen und schon auf der Ebene von Y_Z^+ in die katalytische Wasserspaltung involviert sind.

2. Probenpräparation

Herstellung der PSII-Membranfragmente

Die Herstellung von PSII-Membranpartikeln erfolgte nach der in [Iuzzolino *et al.* 1998, Schiller und Dau 2000] beschriebenen Präparationsvorschrift, die auf dem Verfahren von Berthold, Babcock und Yokum [Berthold *et al.* 1981] basiert, weswegen dieser Typ PSII-Proben auch BBY genannt wird. Der wesentliche Unterschied zum Verfahren nach [Berthold *et al.* 1981] besteht in der Verwendung des Proteinstabilisators Glycin-Betain. Als Ausgangsmaterial wurde marktüblicher, frischer Spinat verwendet.

Das Verfahren besteht im wesentlichen aus drei Schritten: Erstens dem Zellaufbruch, zweitens dem Aufbruch der Chloroplasten und der Abtrennung der PSI-haltigen Stromabereiche der Tylakoidmembran und drittens dem Waschen zum Entfernen der Stärke. Die Membranpartikel wurden bei -80 °C und einer Chlorophyll-Konzentration von 2-3 mg/ml gelagert. Die Rate der Sauerstoffentwicklung unter sättigendem weißem Licht bei 28 °C betrug 1000-1400 $\mu\text{mol} / (\text{mg Chl} \times \text{h})$, das Chlorophyll-a/b-Verhältnis ca. 2,5.

Alle Präparationsschritte, einschließlich der im folgenden beschriebenen Schritte zur Herstellung der Proben für die Röntgenspektroskopie und Fluoreszenzmessungen, erfolgten auf Eis bei schwachem Grünlicht.

Probenpräparation für Röntgenspektroskopie

Die bei -80 °C gelagerten PSII-Membranpartikel wurden vorsichtig ca. eine Stunde auf Eis aufgetaut und anschließend mit einem weichen Pinsel in Glycin-Betain-haltigem Puffer (Puffer A) resuspendiert. Die verwendeten Puffer sind im Anhang beschrieben. Um eventuell noch vorhandene Stärke und freigesetztes Chlorophyll zu entfernen, wurde die Suspension 12 min bei 48000 g zentrifugiert und das erhaltene Pellet in einigen Millilitern Puffer A resuspendiert. Anschließend erfolgte die Chlorophyllgehalts-Bestimmung. Dazu wurde ein definiertes Probenvolumen in einem Aceton-Wasser-Gemisch (80 % Aceton, 20 % Wasser) inkubiert, die nichtlöslichen Bestandteile abzentrifugiert und die Chlorophyllkonzentration über Messung der optischen Dichte nach [Lichtenthaler 1987] bestimmt (Absorptions-Spektrometer: Cary 50 Conc UV-Vis Spectrophotometer, Varian). Die Probe wurde mit Puffer A auf eine Chlorophyll-Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und auf dünne Kaptonfolie zentrifugiert (Zentrifugationszeit 2 h bei 112000 g). Die so erhaltenen Schichten wurden bei leichtem Unterdruck (~400 mbar) zwei Stunden getrocknet und anschließend unter flüssigem Stickstoff gelagert.

Probenpräparation für Fluoreszenzmessungen

Das Auftauen, die Zentrifugation und die Chlorophyllgehalts-Bestimmung erfolgten analog zur Präparation der Röntgenproben. Die Konzentration wurde mit dem jeweils verwendeten Messpuffer (Puffer A, Puffer B) auf eine Chlorophyll-Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt. Direkt vor der Messung erfolgte die Verdünnung auf die standardmäßig verwendete Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sowie die Zugabe des Elektronenakzeptors DCBQ (bzw. der speziellen verwendeten Reagenzien). Die Zugabe des DCBQ erfolgte in Form einer

Stammlösung (ein DMSO-Wasser-Gemisch mit 1 % DMSO, die Endkonzentration des DMSO betrug 0,05 %). Für pH-abhängige Messungen wurde ein spezielles ternäres Puffergemisch verwendet (Puffer B, siehe Anhang), da der sonst standardmäßig verwendete Puffer (Puffer A) in den stark saurem bzw. basischem pH-Bereichen keine ausreichende Pufferwirkung besitzt. Im Falle der Messungen in D₂O enthielten alle verwendeten Puffer und Reagenzien ab dem Zentrifugationsschritt D₂O anstelle von H₂O. Zur Einstellung des pD-Wertes bei Messungen in D₂O wurde die unterschiedliche Sensitivität der pH-Elektrode gegenüber Protonen und Deuteronen gemäß $pD = pH' + 0,4$ korrigiert, wobei pH' der Ablesewert des pH-Meters ist [Glasoe und Long 1960].