

5. S-Zustandsabhängigkeit der Rekombinationsfluoreszenz – eine quantitativ phänomenologische Beschreibung

5.1 Grundlagen

Der Zeitverlauf der Rekombinationsfluoreszenz nach Lichtanregung wurde für eine Serie sättigender ns-Laserpulse gemessen. Zur Einführung wird im folgenden erläutert, wie die Abfälle der Fluoreszenzintensität qualitativ verstanden werden können.

Wie in Kapitel 4 dargestellt, ist die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz proportional zum Produkt der Konzentrationen von $P680^+$ und Q_A^- . Den dominierenden Einfluss auf die Kinetik des Fluoreszenzzerfalls innerhalb des hier untersuchten Zeitbereiches (10 μ s bis 40 ms) hat dabei die Reduktion des $P680^+$, dessen Konzentration um vier Größenordnungen abnimmt, während nur etwa die Hälfte des gebildeten Q_A^- in diesem Zeitbereich reoxidiert wird (siehe Abbildung 5.3). Zu erwarten ist also, dass sich im zeitlichen Verhalten der Rekombinationsfluoreszenz hauptsächlich die Prozesse an der Donorseite widerspiegeln.

In Abbildung 5.1 sind die verschiedenen Zustände der am Elektronentransport beteiligten Redoxkomponenten, die nach der Ladungstrennung durchlaufen werden, zusammen mit den Zeitkonstanten für die Übergänge sowie einer Abschätzung der $P680^+$ -Konzentration für die zu verschiedenen Zeiten erreichten Zwischenzustände dargestellt. (Der Redoxfaktor Pheophytin (Phe) ist aufgrund der sehr schnellen Elektronentransfer-Raten zwischen $P680$ und Phe bzw. zwischen Phe und Q_A^- (siehe Kapitel 4) für die hier gemachten Betrachtungen nicht relevant und wurde der Übersichtlichkeit halber weggelassen.) Der überwiegende Teil des durch die Ladungstrennung gebildeten $P680^+$ wird im Sub- μ s-Zeitbereich durch Elektronentransfer vom Y_Z rereduziert [Gerken *et al.* 1987, Christen *et al.* 1998, Christen und Renger 1999]. Das sich daraufhin einstellende Quasi-Gleichgewicht zwischen den Zuständen $P680Y_Z^+$ und $P680^+Y_Z$ wird durch nachfolgende Relaxationsprozesse im μ s-Bereich zugunsten von $P680Y_Z^+$ verschoben, wodurch die $P680^+$ -Konzentration weiter abnimmt [Schilstra *et al.* 1998, Renger 2001]. Der Anteil dieser μ s-Phasen an der gesamten $P680^+$ -Reduktion hängt vom S-Zustand des Mangankomplexes ab und ist beim $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang am größten [Schilstra *et al.* 1998]. Der Elektronentransfer vom Mangankomplex zum Y_Z^+ führt schließlich zum weitgehenden Verschwinden von $P680^+$, da Y_Z^+ aus dem $P680Y_Z^+ \leftrightarrow P680^+Y_Z$ -Gleichgewicht „entfernt“ wird. Die Ratenkonstante des Elektronentransfers vom Mn-Komplex zum Y_Z , der mit der Akkumulation eines Oxidationsäquivalentes im Mangankomplex, und damit mit einem Voranschreiten im S-Zyklus ($S_n \rightarrow S_{n+1}$) verbunden ist, unterscheidet sich für die verschiedenen S-Übergänge. Für PSII-Membranfragmente werden Zeitkonstanten von 30 μ s für $S_0 \rightarrow S_1$, 100 μ s für $S_1 \rightarrow S_2$, 350 μ s für $S_2 \rightarrow S_3$ und 1,5 ms für $S_3 \rightarrow S_0$ gefunden [Renger und Hanssum 1992, Rappaport *et al.* 1994]. Damit wird die Geschwindigkeit, mit der die $P680^+$ -Konzentration abnimmt, abhängig von der Ratenkonstante des S-Übergangs, der durch den jeweiligen Blitz ausgelöst wird.

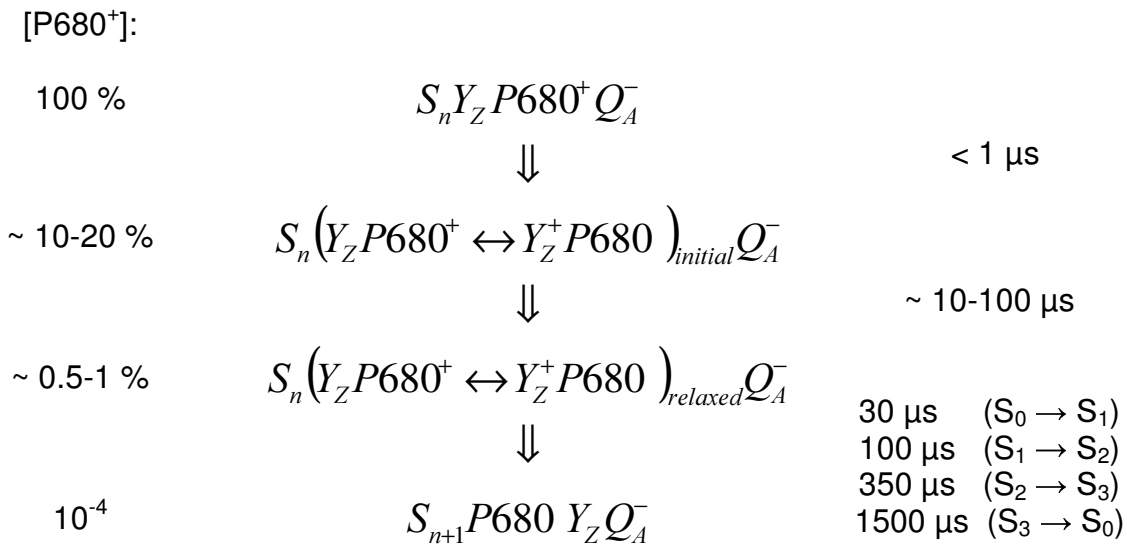


Abbildung 5.1: Schema der Zustände der am Elektronentransport beteiligten Redoxkomponenten, die nach der P680⁺Q_A⁻-Bildung durchlaufen werden. Dargestellt sind zudem eine Abschätzung der relativen P680⁺-Konzentration in den verschiedenen Zuständen und die Zeitkonstanten der entsprechenden Übergänge (Erklärung im Text).

5.2 S-Zustandsabhängigkeit der Fluoreszenzverläufe

Regt man dunkeladaptierte Photosysteme, die sich zum überwiegenden Teil im dunkelstabilen S₁-Zustand befinden, durch eine Serie sättigender Laserblitze an und detektiert die Fluoreszenz nach jedem Blitz, beobachtet man, wie zu erwarten, eine Variation der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Blitzzahl, die einer gedämpften Oszillation mit einer Periodizität von 4 entspricht. Abbildung 5.1 zeigt die Rekombinationsfluoreszenz für eine Serie sättigender Laserblitze für die Zeitbereiche von 10-100 μs (obere Abb.) und 0,4-3 ms (untere Abb.) nach dem jeweiligen Blitz. Die Fluoreszenz ist maximal nach dem dritten (und siebenten Blitz). Da die Zeitkonstante des S₃ → S₀-Übergangs (1,5 ms), der durch den dritten Blitz ausgelöst wird, wesentlich größer ist als die der übrigen S-Übergänge, nimmt die P680⁺-Konzentration nach dem dritten Blitz wesentlich langsamer ab als nach den Blitzen 1, 2 und 4. Entsprechend wäre der schnellste Abfall der Fluoreszenzintensität nach dem vierten Blitz, d. h. für den S₀ → S₁-Übergang zu erwarten, der eine Zeitkonstante von etwa 30 μs hat. Da jedoch nicht in allen Zentren nach dem Laserblitz eine stabile Ladungstrennung erreicht wird (*misses*), kommt es zu einer, mit steigender Blitzzahl zunehmenden, Durchmischung der S-Zustände. Der zu erwartende schnelle Fluoreszenzabfall nach dem vierten Blitz wird aufgrund dieser Zustandsmischung durch Zentren die sich vor dem vierten Blitz erst im S₃ befinden, überdeckt. Die S-Zustandsmischung führt zudem zu einer Dämpfung der Oszillationen (die Fluoreszenz nach dem siebenten Blitz ist geringer als nach dem dritten, siehe Abb. 5.2).

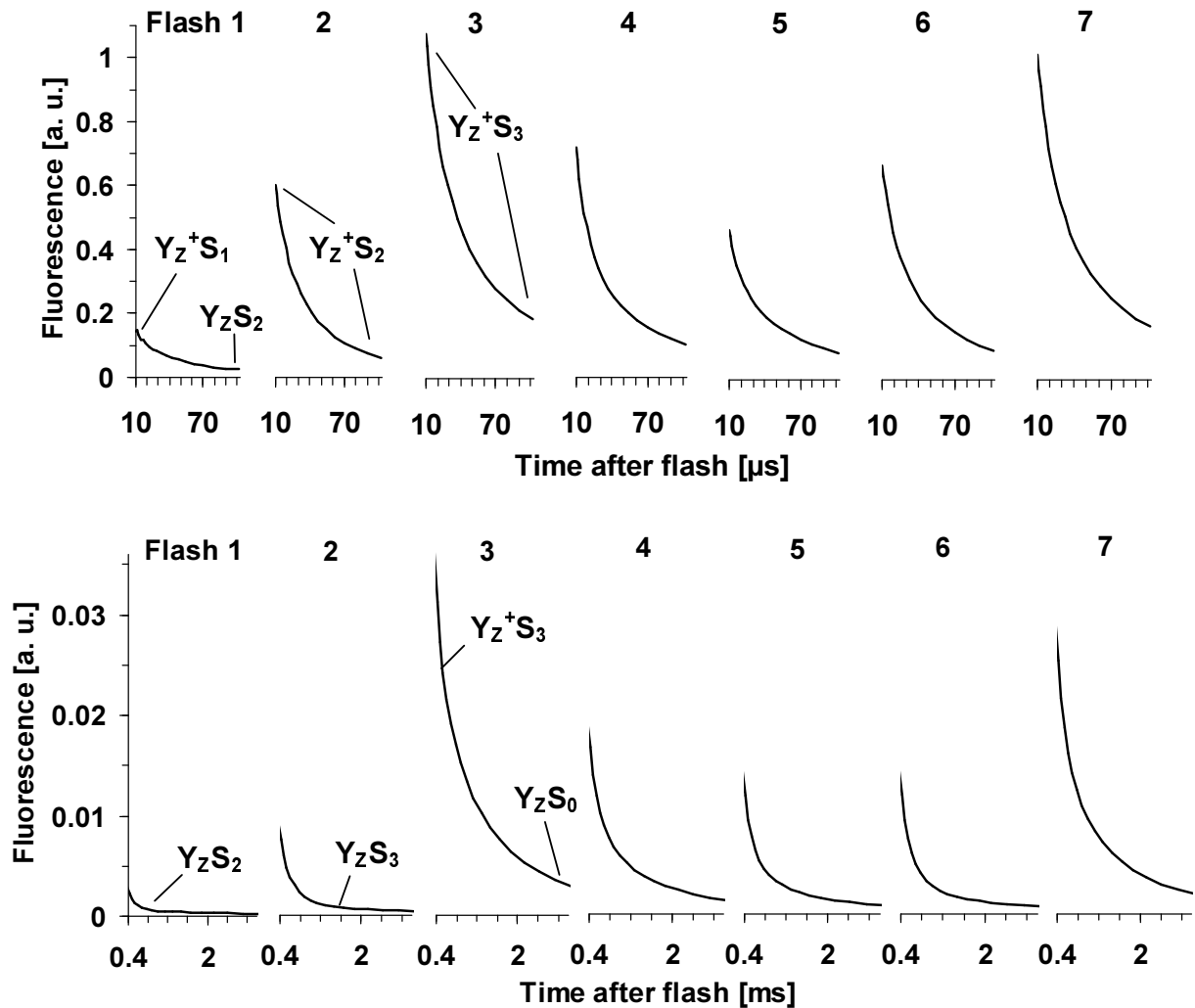


Abbildung 5.2: Zeitverlauf der Rekombinationsfluoreszenz nach den Blitzen 1 bis 7. Dargestellt sind die Zeitverläufe der Fluoreszenz dunkeladaptierter PSII-Membranfragmente im Bereich von 10 bis 100 μs (oben) und von 0,4 bis 3 ms (unten) für eine Serie sättigender ns-Laserblitze.

Zur Veranschaulichung des gesamten Fluoreszenzverlaufes ist eine doppelt-logarithmische Darstellung geeigneter. Abbildung 5.3 zeigt die Rekombinationsfluoreszenz aus Abbildung 5.2 für die ersten fünf Blitze. Visuell lassen sich zwei kinetische Phasen mit Zeitkonstanten kleiner als 200 μs für alle Blitze und mit einer Zeitkonstanten von 1-2 ms für Blitz 3 (und in geringerem Maße für Blitz 4 und 5) unterscheiden. Die Ursache der $\sim 200 \mu\text{s}$ -Phase des dritten Blitzes, die gut von der 1-2 ms-Kinetik zu trennen ist, ist die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den Zuständen P680Y_Z^+ und $\text{P680}^+\text{Y}_Z$ und die damit verbundene Verringerung der P680^+ -Konzentration. Die 1-2 ms-Phase des dritten Blitzes resultiert aus dem $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$ -Übergang, der zum weitgehenden Verschwinden von P680^+ führt. In der Kurve des zweiten Blitzes deutet sich bei etwa 300 μs eine Schulter an, die dem $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ -Übergang zugeordnet werden könnte. Im Falle der Blitze 1 und 4 lassen sich die Relaxationsphase und der S-Übergang visuell nicht trennen. Zur Veranschaulichung des geringen Q_A^- -Einflusses ist in Abbildung 5.3 die prompte Fluoreszenz $F(t)-F_0$, die näherungsweise proportional zur Q_A^- -Konzentration ist (siehe Kapitel 4), für die ersten fünf Blitze dargestellt.

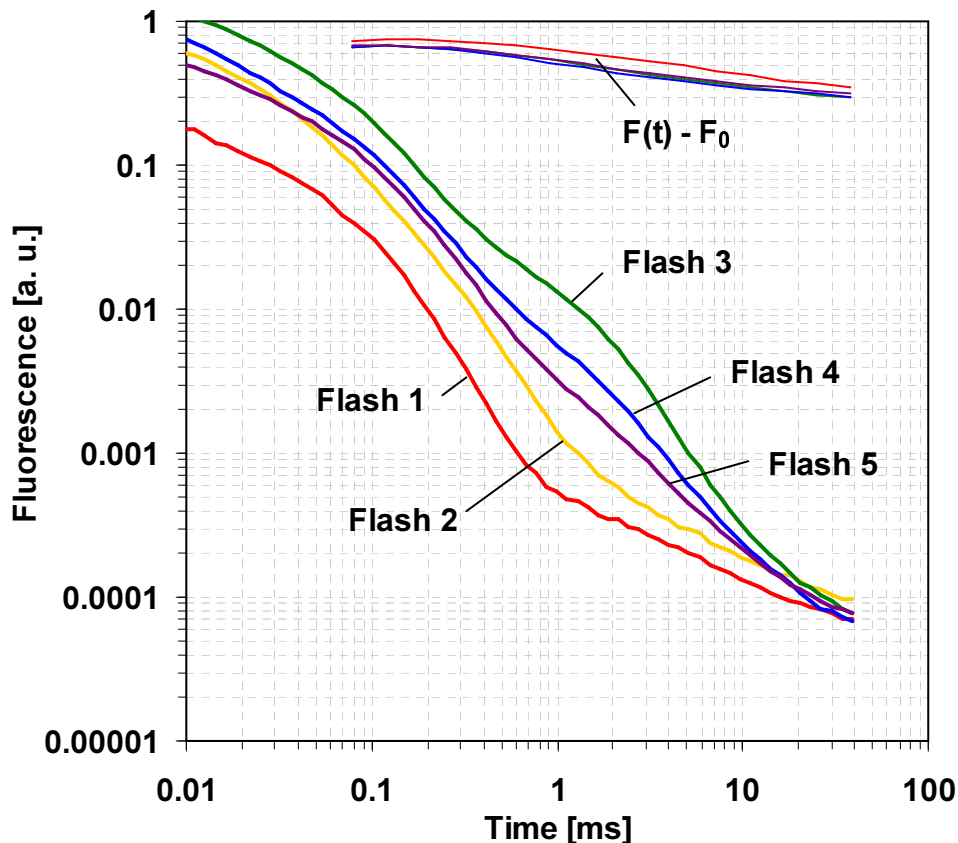


Abbildung 5.3: Doppelt logarithmische Darstellung der Rekombinationsfluoreszenz aus Abb. 5.2 für die Blitze 1-5. Zur Veranschaulichung des Q_A^- -Einflusses ist ebenfalls die prompte Fluoreszenz $F(t)-F_0$ für die ersten fünf Blitze dargestellt.

5.3 Korrektur für die Abhängigkeit von der Q_A^- -Konzentration

Zur Untersuchung der Donorseitenprozesse wurden die Fluoreszenzverläufe für die Abhängigkeit von der Q_A^- -Konzentration korrigiert. Wie in Kapitel 4 (bzw. Anhang A.2) beschrieben, geschieht dies mittels Division durch $(F(t)-F_0)/(F_M-F_0)$. Die Zeitverläufe bzw. Werte von $F(t)$, F_0 und F_M werden dazu in einer separaten Messung der prompten Fluoreszenz unter den gleichen Versuchsbedingungen, wie die unter denen die Rekombinationsfluoreszenz gemessen wurde, bestimmt. Das Korrekturverfahren ist in Abbildung 5.4 (A)-(D) dargestellt. Abbildung 5.4 (A) zeigt Zeitverläufe der prompten Fluoreszenz für die ersten vier Blitze. Zur Berechnung der Korrekturkurve aus $(F(t)-F_0)/(F_M-F_0)$ wurden nicht die gemessenen Fluoreszenzdaten verwendet, sondern eine durch Kurvenanpassung bestimmte Zerfallskurve. Dadurch wird die Korrektur für Zeiten $< 80 \mu\text{s}$ ermöglicht, für die aufgrund der beschränkten Zeitauflösung der Messapparatur der prompten Fluoreszenz sowie der fluoreszenzlöschenden Wirkung von $P680^+$ keine verwertbaren Fluoreszenzdaten vorliegen. Zudem wird eine Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses vermieden, was bei Verwendung der Originaldaten der Fall wäre. Abbildung 5.4 (B) zeigt die Simulation der Fluoreszenzdaten des dritten Blitzes mit der Summe von drei Exponentialfunktionen. (Die Beschreibung durch drei

Exponentialfunktionen erwies sich als ausreichend genau, um alle in dieser Arbeit gemessenen Fluoreszenzverläufe zu beschreiben.) Die aus den Simulationsparametern berechnete Korrekturkurve $(F(t)-F_0)/(F_M-F_0)$ ist in Abbildung 5.4 (C) dargestellt. Abbildung 5.4 (D) zeigt die Rekombinationsfluoreszenz des dritten Blitzes vor und nach der Division durch die in C dargestellte Korrekturkurve. Abbildung 5.5 zeigt die Fluoreszenzverläufe aus Abbildung 5.3 nach der Korrektur für die Q_A^- -Konzentrationsabhängigkeit.

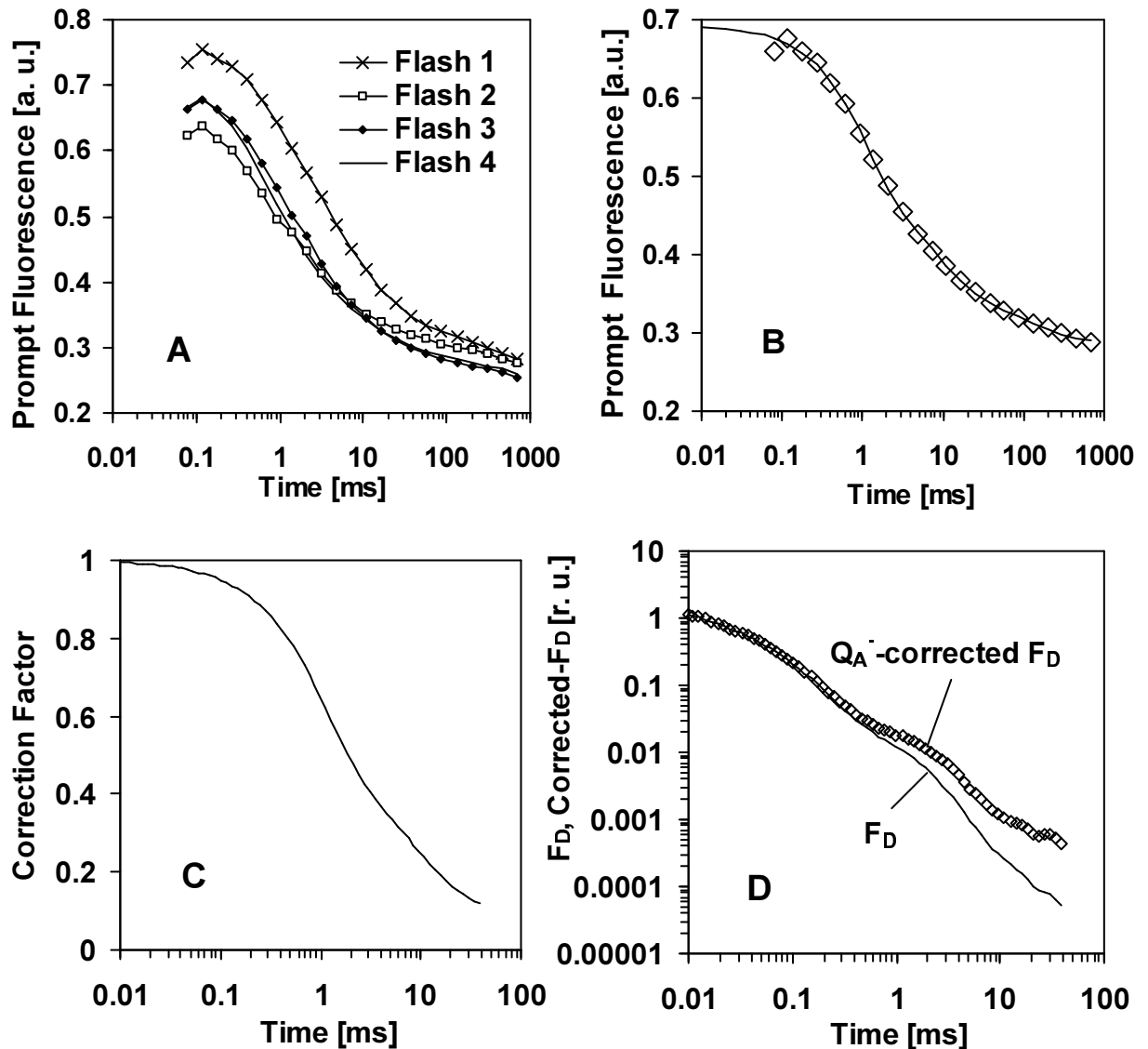


Abbildung 5.4: Beispiel für die Q_A^- -Korrektur. A: Zeitverläufe der prompten Fluoreszenz nach 1, 2, 3 oder 4 *single-turnover* Blitzen, B: Abfall der prompten Fluoreszenz nach dem dritten Blitz (Quadrate) und 3fach-exponentielle Simulation (Linie) mit folgenden Zeitkonstanten 1,1 ms / 9,7 ms / 139 ms (Amplituden: 0,22 / 0,13 / 0,06 / const = 0,29), C: aus der Simulation berechnete Korrekturkurve $(F-F_0)/(F_M-F_0)$, D: gemessene Rekombinationsfluoreszenz des 3. Blitzes (Linie) und nach Division durch $(F-F_0)/(F_M-F_0)$ resultierende Q_A^- -korrigierte Kurve (Quadrate).

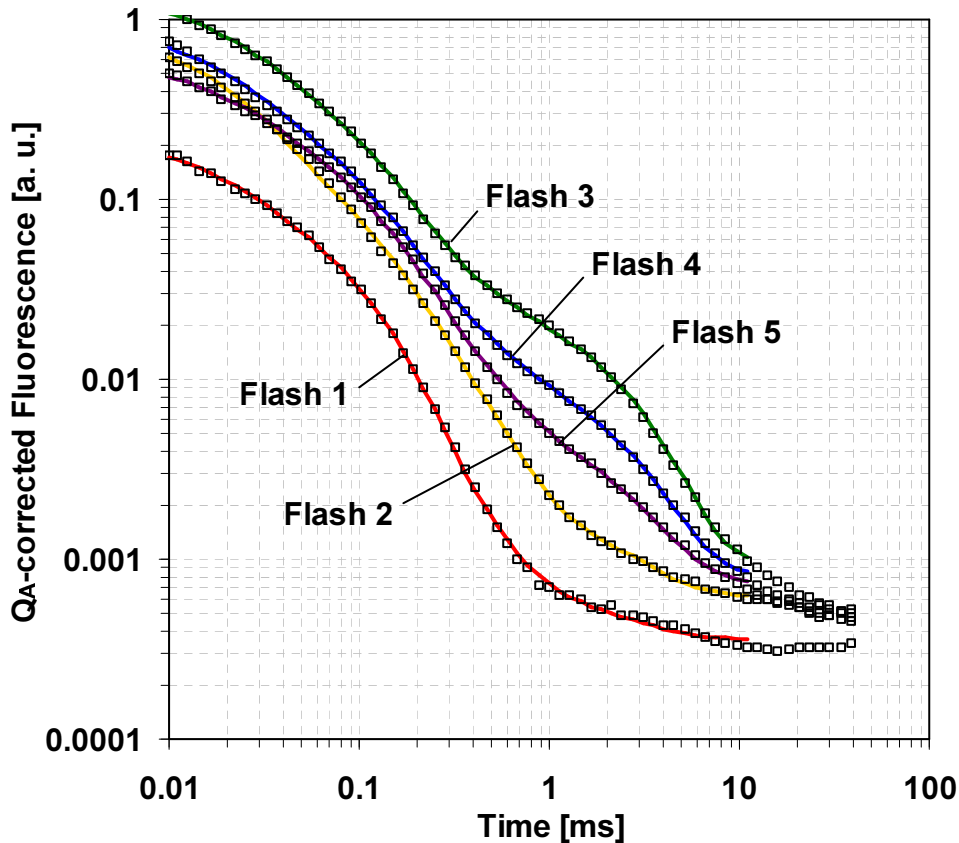


Abbildung 5.5: Q_A^- -korrigierte Rekombinationsfluoreszenz der Zeitverläufe aus Abb. 5.3 (Quadrate). Die farbigen Linien sind Simulationen mit dem im Text beschriebenen Ansatz.

5.4 Oszillationsverhalten der Q_A^- -korrigierten Rekombinationsfluoreszenz

Um einen Überblick über das oszillatorische Verhalten zu geben, sind in Abbildung 5.6 die Q_A^- -korrigierten Fluoreszenzintensitäten der Rekombinationsfluoreszenz für verschiedene Zeiten nach dem Laserblitz in Abhängigkeit von der Blitznummer dargestellt. Für alle Zeiten, mit Ausnahme der 40 ms-Werte, ist eine Oszillation der Periode 4 mit Maxima auf den Blitzen 3, 7 und 11 zu erkennen.

Die Oszillation der 10 μ s-Fluoreszenz lässt sich nicht mit den S-Übergängen erklären, deren Zeitkonstanten alle größer als 10 μ s sind. Eine Simulation mit S-Übergangszeiten von 30 μ s, 100 μ s, 350 μ s, 1,5 ms, einer Dunkelpopulation $S_0:S_1$ von 0,1:0,9 und einem *miss*-Parameter von 10 % ergibt, dass der Einfluss der verschiedenen S-Zustände zu einer Oszillationsamplitude von nur 19 % (Maximum-Minimum / Mittelwert) mit einem Maximum auf dem dritten Blitz und einem Minimum auf dem vierten Blitz führen könnte. Die 10 μ s-Oszillation wird also zu einem großen Teil von Prozessen bestimmt, die vor den S-Übergängen stattfinden. Es ist bekannt, dass die Amplitude der μ s-Komponenten der $P680^+$ -Reduktion durch Y_Z vom S-Zustand abhängt. In [Jeans *et al.* 2002] wurde die $P680^+$ -Reduktion von PSII-Membranfragmenten untersucht. Die von den Autoren angegebenen Reduktionszeiten und -amplituden ergeben nur 17 % Oszillation der $P680^+$ -Konzentration, mit einem Maximum auf dem dritten Blitz und einem Minimum auf dem zweiten Blitz

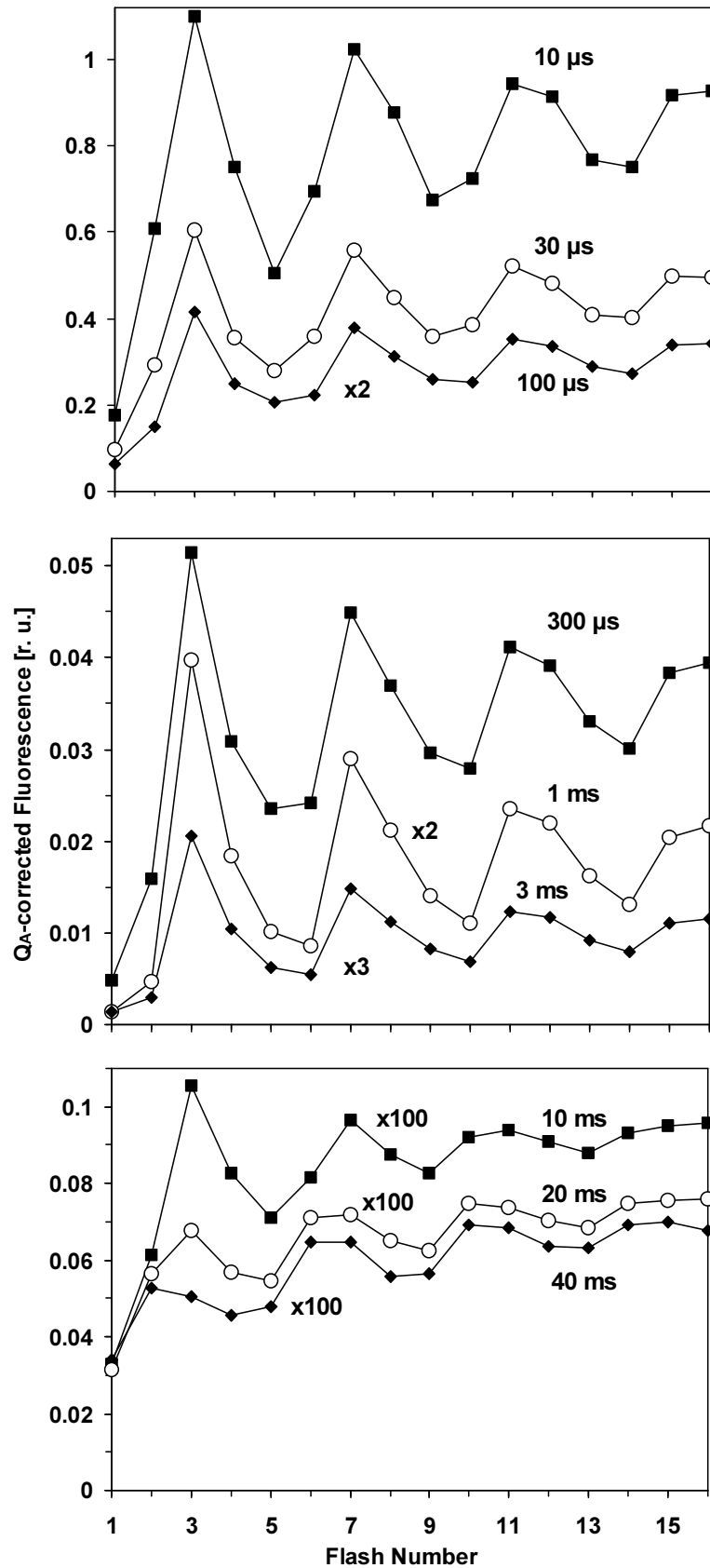


Abbildung 5.6: Q_A^- -korrigierte Rekombinationsfluoreszenz für verschiedene Zeiten nach dem jeweiligen Blitz einer Serie sättigender ns-Laserblitze. (10 μg Chl / ml, 20 μM DCBQ, T = 20 °C, pH 6,4).

(bei 15 °C). Die starke Abhängigkeit der 10 µs-Fluoreszenz von der Blitzzahl ist somit nicht allein mit der blitzabhängigen P680⁺-Konzentration zu erklären.

Am ausgeprägtesten ist die Blitzabhängigkeit im Zeitbereich von 1-3 ms. Hier sind alle S-Übergänge bis auf den sauerstoffentwickelnden S₃→S₀-Übergang weitgehend abgeschlossen, weshalb die Fluoreszenz ein ausgeprägtes Maximum nach dem dritten Blitz zeigt. Die Oszillation der Fluoreszenzintensität stimmt dabei weitgehend mit der Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit von der Blitzzahl überein (siehe Abbildung 5.7).

Für die Zeiten zwischen 10 µs und 1-3 ms erkennt man einen kontinuierlichen Übergang von der 10 µs-Oszillationscharakteristik zur 1-3 ms-Charakteristik. Für Zeiten ab 20 ms zeigt sich eine Verlagerung des Maximums auf den zweiten, sechsten und zehnten Blitz. In [Barbieri *et al.* 1970, Joliot *et al.* 1971] wird eine Verschiebung des Maximums vom dritten auf den zweiten Blitz ab etwa 5 ms beobachtet (gemessen an intakten Zellen von Grünalgen). Man könnte erwarten, dass sich hier die Gleichgewichtskonstanten der S-Zustandsübergänge, d. h. die freien Energiedifferenzen zwischen den Zuständen S_nY_Z und S_{n-1}Y_Z⁺ widerspiegeln, da für Zeiten größer als 20 ms alle S-Übergänge abgeschlossen sind. Allerdings wären dann für freie Energiedifferenzen von -250, -55, -40 und -100 meV für die Übergänge S₀ → S₁, S₁ → S₂, S₂ → S₃ und S₃ → S₀ [Voss *et al.* 1991, Vass und Styring 1991] hohe Intensitäten auf dem ersten und zweiten Blitz zu erwarten.

Interpretationen der Blitzabhängigkeit der Rekombinationsfluoreszenz für die Zeitintervalle, für die keine signifikante Abhängigkeit vom S-Übergang zu erwarten ist (~10 µs, > etwa 10 ms), sind schwierig. Schon eine geringe Änderung des Energieniveaus des P680⁺Q_A⁻-Zustandes würde zu einer starken Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen dem P680⁺Q_A⁻-Zustand und dem angeregten Antennenzustand führen, was eine entsprechende Änderung in der Fluoreszenzintensität zur Folge hätte. Die Verschiebung des Redoxpotentials von P680/P680⁺ oder Q_A⁻/Q_A um nur 17 meV würde zu einer Änderung in der Fluoreszenzintensität um einen Faktor von 2 führen. Solche Variationen der Redoxpotentiale in Abhängigkeit vom S-Zustand, z.B. durch Änderung von Protonierungszuständen, sind leicht denkbar. Beispielsweise wird eine Erhöhung des Redoxpotentials von Q_A⁻/Q_A um +145 meV beobachtet, wenn der Mangankomplex entfernt wird [Johnson *et al.* 1995]. In Anwesenheit von DCMU kommt es zu einer Verschiebung des Redoxpotentials von Q_A⁻/Q_A um +50 mV [Krieger-Liszka und Rutherford 1998].

Ganz allgemein erkennt man einen leichten Anstieg der mittleren Fluoreszenzamplitude mit der Blitzzahl, vor allem für Zeiten < 300 µs und > 3 ms. Ein ähnliches Verhalten wird für die Rekombinationsfluoreszenz in [de Grooth und van Gorkom 1981] und für Messungen der durch ein elektrisches Feld stimulierten Fluoreszenz (Elektrolumineszenz) [Voss *et al.* 1991, de Grooth und van Gorkom 1981] beschrieben. Photosysteme die auf der Donorseite geschädigt sind und keinen, oder nur wenige S-Übergänge ausführen können, würden einen solchen Anstieg erklären. Bei einer Blockierung des S-Überganges kann Y_Z⁺ nicht durch den Mangankomplex rereduziert werden. Das beim nächsten Blitz gebildete P680⁺ wird dann nicht von der Donorseite reduziert, was zu einer intensiven und langlebigen Rekombinationsfluoreszenz Anlass gäbe. Ein mit der Blitzzahl zunehmender Anteil Mangankomplex-inhibierter Zentren würde zu einer ansteigenden, nichtoszillierenden Untergrundfluoreszenz führen. Bei einer Simulation der Oszillation der 2 ms-Fluoreszenz mit dem Kok-Modell (siehe Kapitel 6) ergibt sich eine bessere Übereinstimmung mit den Daten, wenn ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz mit der Blitzzahl n gemäß $F(n) = A(1 - \exp(-kn))$ einbezogen wird (Simulation nicht gezeigt). k gibt dabei den Anteil der Zentren an, die pro Blitz inhibiert werden. Da der Einfluss auf den ermittelten *miss*-Parameter allerdings gering war, wurden die Simulationen ohne diesen zusätzlichen Exponentialterm ausgeführt.

Die Abhängigkeit der Rekombinationsfluoreszenz vom S-Zustand kann genutzt werden, um den Anteil der Photosysteme zu bestimmen, in denen es zu keiner stabilen Ladungstrennung und dem damit verbundenen Voranschreiten im S-Zyklus des Mangankomplexes kommt. Dieser Anteil wird durch den *miss*-Parameter beschrieben. (Zur Bestimmung des *miss*-Parameters siehe Kapitel 6). Im Prinzip ist dazu jede Messgröße geeignet, deren Wert sich für die einzelnen S-Zustände unterscheidet, wie beispielsweise die Sauerstoffentwicklung, die nur beim $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang stattfindet oder das EPR-Multiline-Signal des S_2 -Zustandes. Für die Rekombinationsfluoreszenz bietet sich der 2 ms-Wert an, der die ausgeprägteste Abhängigkeit vom S-Zustand zeigt. Hier sind alle S-Übergänge bis auf den $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang abgeschlossen, so dass nur Zentren, die sich vor dem dritten Blitz im S_3 -Zustand befinden, einen signifikanten Beitrag zur gemessenen Rekombinationsfluoreszenz aufweisen.

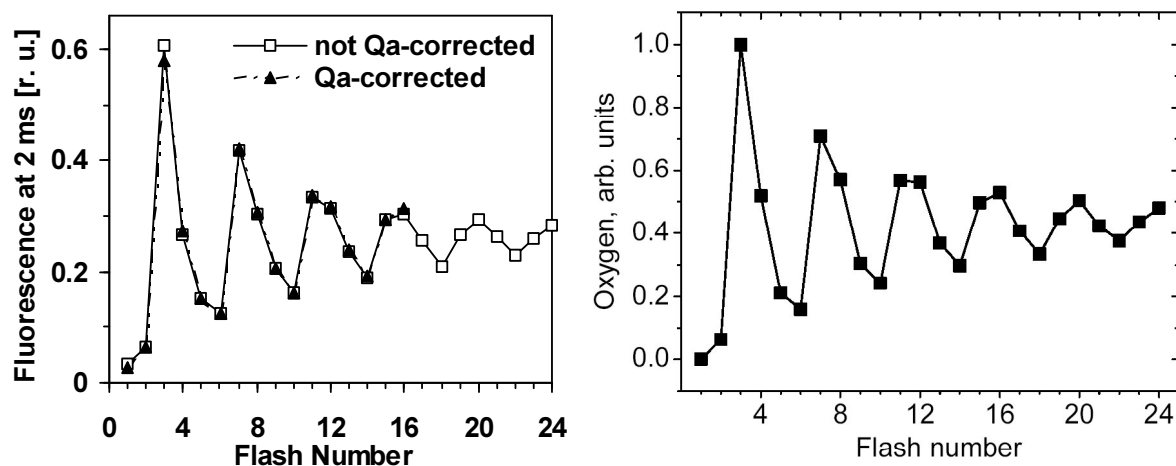


Abbildung 5.7: Links: Rekombinationsfluoreszenz 2 ms nach dem Blitz, mit (schwarze Dreiecke) und ohne (offene Quadrate) Q_A^- -Korrektur. (Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurde für die 2 ms-Werte über die Fluoreszenz von 1-3 ms gemittelt.) Rechts: Blitzabhängige Sauerstoffentwicklung (übernommen aus [Shinkarev 2005]).

In Abbildung 5.7 ist die Blitzabhängigkeit des 2 ms-Wertes der Q_A^- -korrigierten Rekombinationsfluoreszenz zusammen mit den nichtkorrigierten Werten sowie (zum Vergleich) die blitzabhängige Sauerstoffentwicklung dargestellt. Es ergibt sich eine fast perfekte Übereinstimmung zwischen der Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit von der Blitzzahl und der Blitzabhängigkeit der 2 ms-Fluoreszenz. Zudem zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen korrigierten und nichtkorrigierten Fluoreszenzdaten, weswegen bei der Bestimmung des *miss*-Parameters (Kapitel 6) auf eine Q_A^- -Korrektur verzichtet wurde.

5.5 Multiexponentielle Simulation der blitzabhängigen Kinetik

Für eine genauere Analyse des blitzabhängigen Zeitverhaltens der Rekombinationsfluoreszenz wurden die Q_A^- -korrigierten Fluoreszenzverläufe, die bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen wurden, simuliert. Berücksichtigt wurde dabei der Zeitbereich von 10 μs bis 12 ms. Zu erwarten ist, dass zur Beschreibung der Fluoreszenzkinetiken bis 12 ms die Zeitkonstanten der vier S-Zustandsübergänge (30 μs , 100 μs , 350 μs und 1,5 ms) sowie mindestens eine weitere Komponente, durch die die μs -Phasen des $Y_Z \rightarrow P680^+$ -Elektronentransfers erfasst werden. Da jedoch die Übergänge von S_0 nach S_1 (30 μs) und von S_1 nach S_2 (100 μs) im selben Zeitbereich stattfinden, sollte ein Ansatz mit vier Zeitkonstanten ausreichend sein. Im Falle einer Beschreibung durch fünf Zerfallskomponenten zeigte die Amplitude jeweils einer Komponente zwar eine Variation mit der Blitzzahl, jedoch ergab sich keine 4er-Periodizität, wie für eine sinnvolle Beschreibung der blitzabhängigen Rekombinationsfluoreszenz gefordert werden muss. Zur Simulation wurde ein sogenannter *joint-fit*-Ansatz gewählt. Für jede Temperatur wurden die Zeitverläufe $F_D(n,t)$ für die einzelnen Blitze einer Serie simultan (d. h. durch Minimierung einer gemeinsamen Fehlersumme) mit der Summe von vier Exponentialfunktionen und einer Konstanten simuliert:

$$F_D(n,t) = \sum_{i=1}^4 A_i(n) e^{-\frac{t}{\tau_i}} + const \quad (5.1)$$

$A_i(n)$ ist die Amplitude der jeweiligen Fluoreszenzkomponente, τ_i die Zeitkonstante der Komponente i und n die Blitznummer. Dabei waren die Amplituden frei variabel, während die Zeitkonstanten für alle Blitze in gleicher Weise variiert wurden, d.h. die τ_i hatten für alle Blitze innerhalb einer Blitzserie denselben Wert (für eine gewählte Temperatur).

- Berechnung der Fehlersumme zur Anpassung der Simulation an die Daten -

Die Anpassung der Simulation an die Daten erfolgte aus zwei Gründen nicht wie üblich durch Minimieren der Summe über die quadrierten Abweichungen (*least-square*-Kriterium). Erstens nimmt die Rekombinationsfluoreszenz im Simulationsintervall (10 μs - 12 ms) um drei Größenordnungen ab und zweitens ist die Datenpunktdichte für kurze Zeiten, bedingt durch die logarithmische Mittelung (siehe Kapitel 4), größer als für lange Zeiten. Beide Faktoren würden zu einem übermäßigen Einfluss der Abweichungen für kurze Zeiten auf die Fehlersumme führen, während Differenzen zwischen Simulation und Daten für größere Zeiten sich nur wenig auswirken würden. Zur Berechnung der Fehlersumme wurden daher die Differenzen der Logarithmen verwendet, wodurch ein ausgewogenerer Beitrag der Abweichungen über das gesamte Simulationsintervalls erreicht wird. Die Anpassung erfolgte durch Minimierung der „logarithmischen“ Fehlersumme R_{\log}

$$R_{\log} = \sum_N \left(\log \frac{F_{sim}}{F_{exp}} \right)^2 \quad (5.2)$$

mit F_{sim} als theoretischem Wert, F_{exp} als experimentellem Wert und N als Anzahl der Datenpunkte.

In Abbildung 5.8 und 5.9 sind die Amplituden der Zerfallskomponenten in Abhängigkeit von der Blitzzahl für verschiedene Temperaturen dargestellt. Die entsprechenden Zeitkonstanten, den konstanten Term sowie den R-Wert (zur Beurteilung der Simulationsqualität) zeigt Abbildung 5.10.

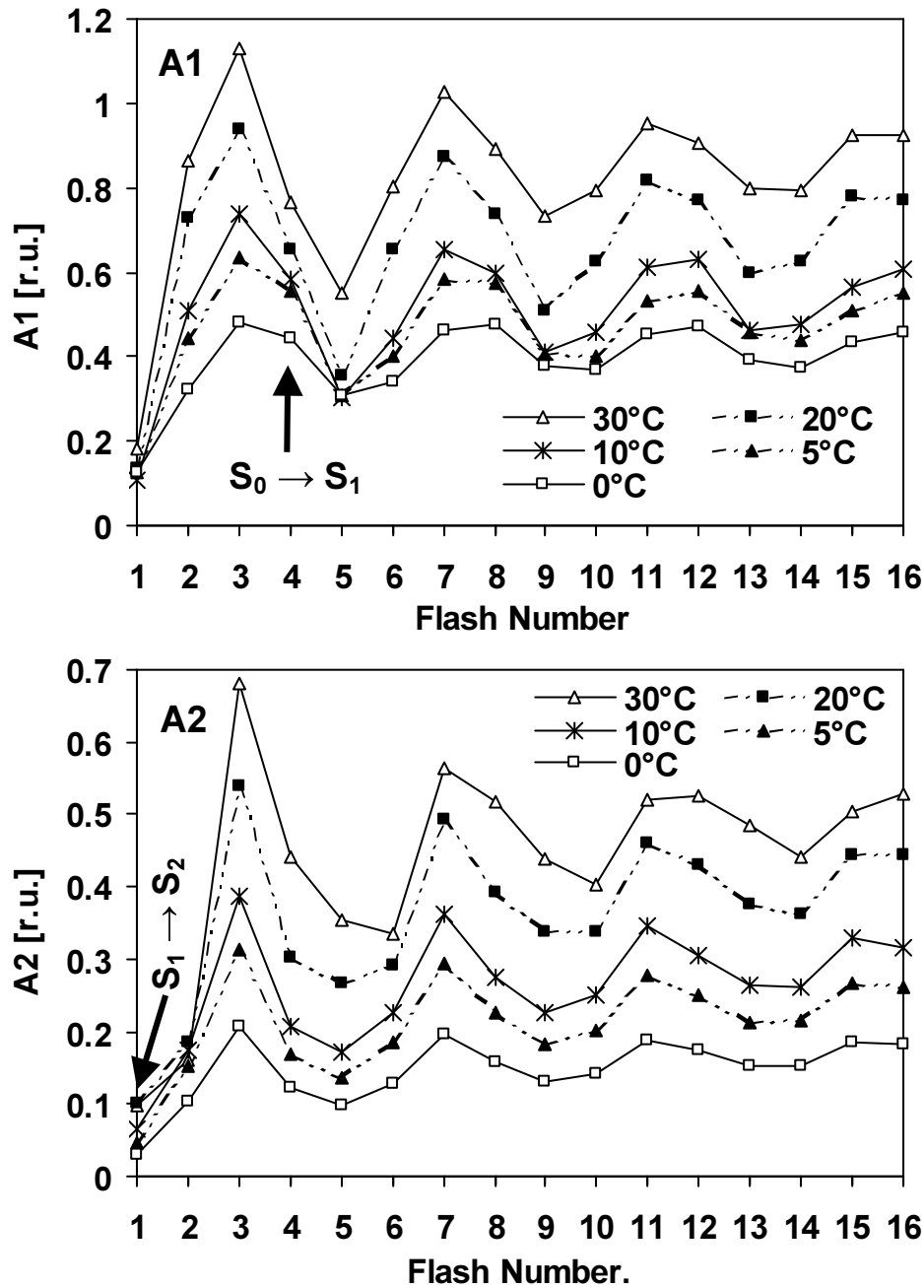


Abbildung 5.8: Simultansimulation der Rekombinationsfluoreszenz für verschiedene Temperaturen. Dargestellt sind die Amplituden der 20 μ s- (A1) und 75 μ s-Komponenten (A2) in Abhängigkeit von der Blitzzahl. Die Pfeile markieren die Blitze, für die die Zeitkonstante der jeweiligen Simulationskomponente in etwa gleich der Zeitkonstanten des bei diesem Blitz stattfindenden S-Übergangs ist.

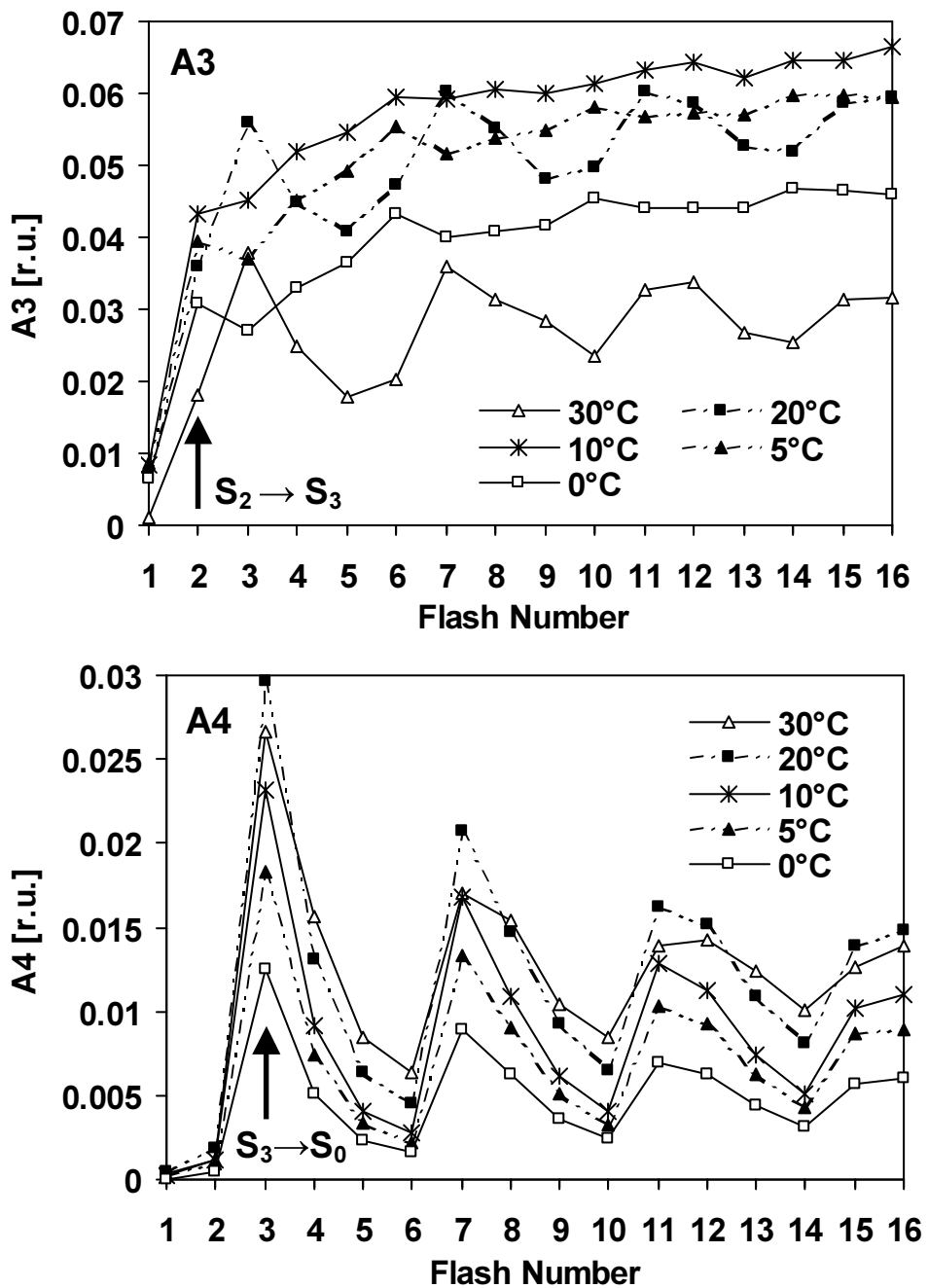


Abbildung 5.9: Simultansimulation der Rekombinationsfluoreszenz für verschiedene Temperaturen. Dargestellt sind die Amplituden der 250 μ s- (A3) und 1,8 ms-Komponenten (A4) in Abhängigkeit von der Blitzzahl. Die Pfeile markieren die Blitze, für die die Zeitkonstante der jeweiligen Simulationskomponente in etwa gleich der Zeitkonstanten des bei diesem Blitz stattfindenden S-Übergangs ist.

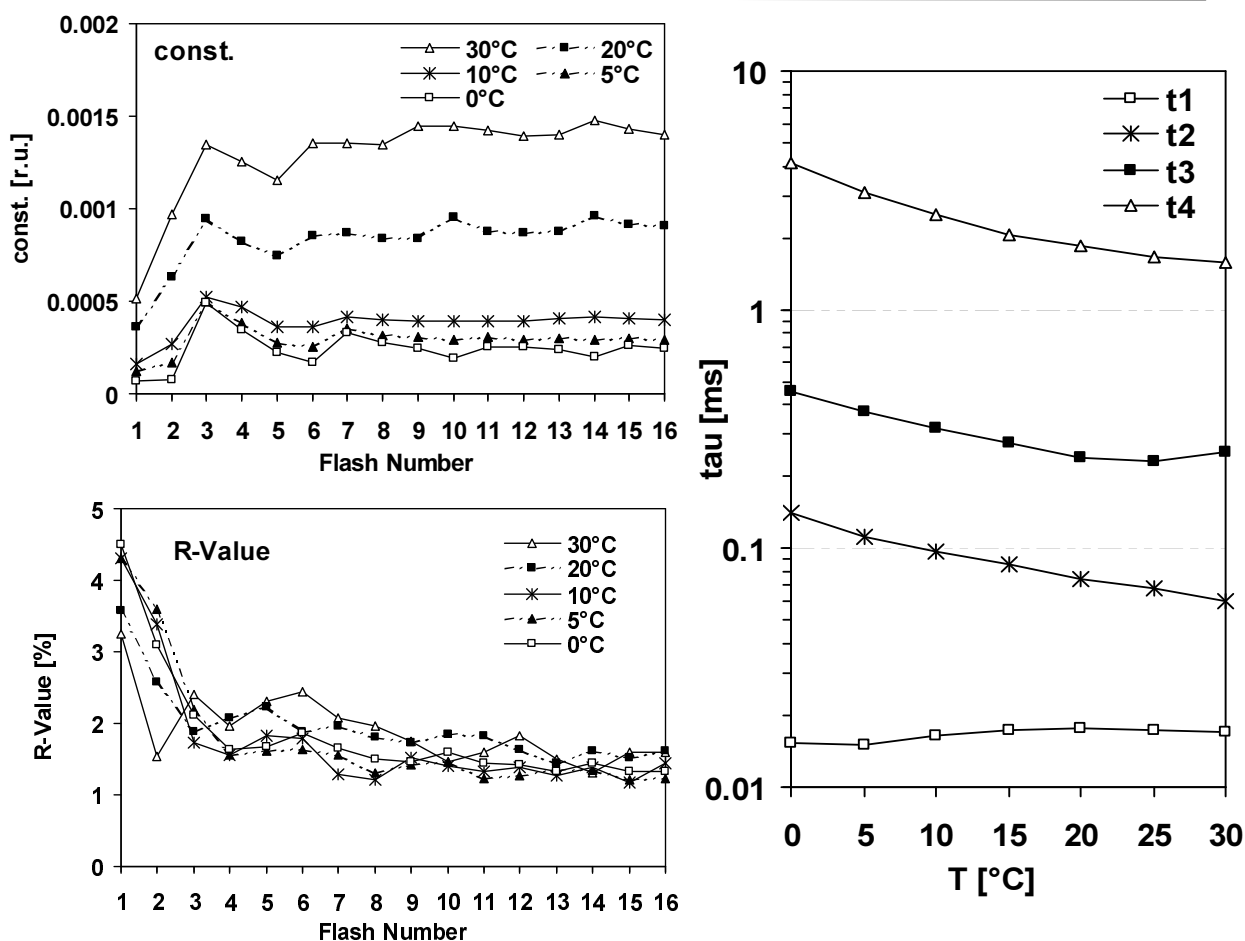


Abbildung 5.10: Simultansimulation der Rekombinationsfluoreszenz für verschiedene Temperaturen. Oben links: Simulationskonstante in Abhängigkeit von der Blitzzahl, unten links: relative Abweichung zwischen Simulation und Daten (R-Wert, $R = N^{-1} \sum |(Sim-Exp)/Exp|$ mit $N =$ Zahl der Datenpunkte) für den Fluoreszenzverlauf nach dem jeweiligen Blitz, rechts: Temperaturabhängigkeit der Zeitkonstanten der einzelnen Fluoreszenzkomponenten.

Ausschließlich auf dem dritten Blitz ist eine Fluoreszenzkomponente auflösbar, die sich dem Elektronentransfer vom Mangankomplex zum Y_Z zuordnen lässt. Die Zeitkonstante (1,8 ms bei 20 °C) und die Temperaturabhängigkeit dieser Komponente stimmt gut mit dem Literaturwert für den Elektronentransfer vom Mangankomplex zum Y_Z beim $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang in PSII-Fragmenten aus Spinat überein [Renger und Hanssum 1992, Rappaport *et al.* 1994, Dekker *et al.* 1984b]. In Abbildung 5.9 (unten) ist zu erkennen, dass die Amplitude dieser 1,8-ms-Komponente maximal nach dem 3. (7., 11. usw.) Blitz ist (also während des $S_3 \rightarrow S_0$ -Überganges). Die blitzabhängige Oszillation der 1,8 ms-Phase ist praktisch identisch mit der blitzabhängigen Oszillation der Sauerstoffentwicklung (siehe Abbildung 5.7). Diese Phase lässt sich also eindeutig dem $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang zuordnen.

Die Übergänge von S_0 nach S_1 und von S_1 nach S_2 die mit Zeitkonstanten von etwa 30 bzw. 100 μs stattfinden, lassen sich nicht von den vorgelagerten Y_Z -Relaxationskomponenten trennen. Die 250 μs -Fluoreszenzkomponente kann für 0 und 5 °C zumindest teilweise dem $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang zugeordnet werden (Literaturwert der Zeitkonstanten: 350 μs). Für höhere Temperaturen ist aber auch hier keine Trennung von S-Übergang und Y_Z -Relaxation möglich, wie anhand der vom zweiten zum dritten Blitz zunehmenden 250 μs -Amplitude (A3) in Abbildung 5.9 zu erkennen ist. Abbildung 5.11 zeigt beispielhaft die durch den Simultan-

Ansatz gewonnene Zerlegung der Fluoreszenzverläufe des zweiten und dritten Blitzes der Messung bei 20 °C. Man erkennt, dass die Amplitude der 250 μ s-Komponente, deren Zeitkonstante in etwa der Zeitkonstanten des $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs entspricht, vom zweiten zum dritten Blitz zunimmt. Wenn die 250 μ s-Komponente durch den Elektronentransfer vom Mn-Komplex zum Y_Z beim $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang verursacht wäre, müsste ihre Amplitude beim dritten Blitz kleiner sein als beim zweiten Blitz, was nicht der Fall ist.

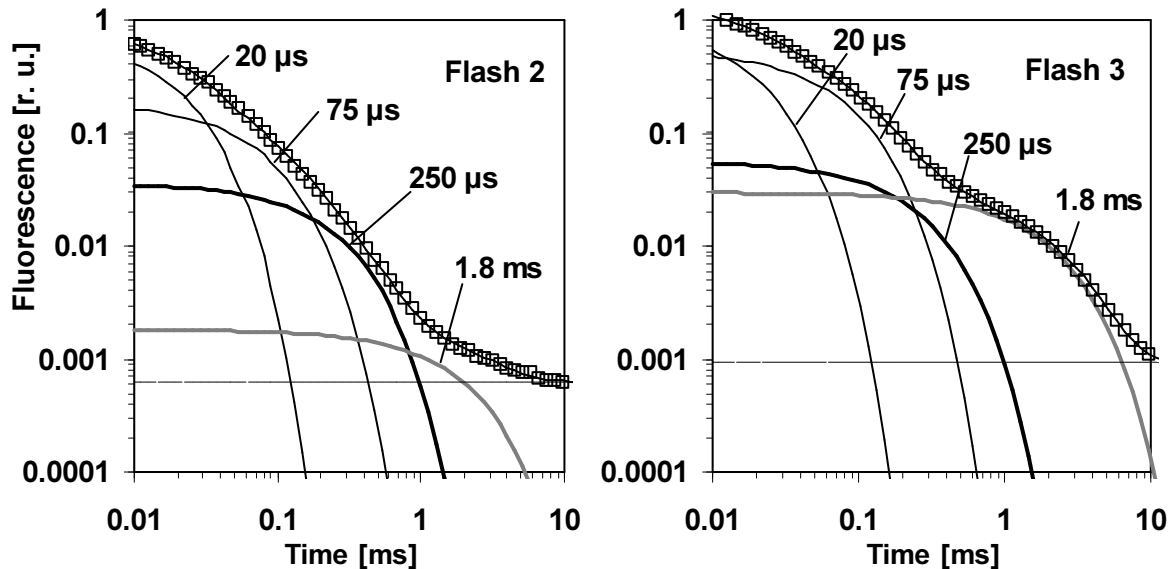


Abbildung 5.11: Simulation der Q_A^- -korrigierten Rekombinationsfluoreszenz (bei 20 °C) für Blitz 2 (links) und Blitz 3 (rechts) durch die Summe von vier Exponentialfunktionen (Ergebnis des im Text beschriebenen Simultan-Ansatzes, Simulationsbereich 10 μ s - 12 ms). Linien: Simulation, Quadrate: Fluoreszenz. Die dem S-Übergang zugeordnete Zerfallskomponente ist jeweils fett hervorgehoben (Blitz 2: 250 μ s, Blitz 3: 1,8 ms).

5.6 Schlussfolgerungen

1. Da nur für den $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang eine eindeutige Trennung von Y_Z -Relaxation und S-Übergang möglich ist, wird die Analyse der Donorseitenprozesse in den folgenden Kapiteln (Kapitel 7 und 8) im wesentlichen auf diesen Übergang beschränkt. Zudem wirken sich unvermeidbare Beimischungen anderer S-Übergänge (S-Zustandsmischung durch *misses*, nicht alle Photosysteme liegen im dunkeladaptierten Zustand im S_1 vor) beim $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang nicht so stark aus, da dieser, verglichen mit den anderen Übergängen, innerhalb des gesamten untersuchten Zeitbereichs eine wesentlich höhere Fluoreszenz zeigt. Aus demselben Grund ist die Korrektur des detektorbedingten Artefaktes (siehe Kapitel 4) hier am unkritischsten. Nicht zuletzt stellt der $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang den interessantesten Schritt im S-Zyklus des PSII dar, da in diesem Schritt die O_2 -Bildung am Mangankomplex stattfindet.
2. Die Oszillation des 2 ms-Wertes der Rekombinationsfluoreszenz kann genutzt werden, um den *miss*-Parameter (und damit die von der Blitzzahl abhängige Population der einzelnen S-Zustände) zu ermitteln. In Kapitel 6 wird mit dieser Methode die Abhängigkeit des *miss*-Parameters von verschiedenen Parametern wie pH-Wert und Temperatur untersucht.