

6. Desynchronisation im S-Zyklus

6.1 Einleitung

Durch eine Serie sättigender Lichtblitze lässt sich das PSII durch den S-Zyklus schalten. Dadurch ist es möglich die verschiedenen Oxidationszustände des Mangankomplexes gezielt einzustellen. Genutzt wird dies u.a. bei Strukturuntersuchungen des Mangankomplexes mittels XAS sowie bei optischen Absorptions- und Fluoreszenzmessungen zur Kinetik und Energetik der Elektronentransferprozesse in Abhängigkeit vom S-Zustand. In beiden Fällen werden die dunkeladaptierten Photosysteme mit einem, zwei oder drei ns-Laserblitzen belichtet und so die Zustände S_2 , S_3 oder S_0 populiert. (Der S_1 -Zustand liegt bereits nach der Dunkeladaptation vor.) Diese S-Zustandseinstellung erfolgt jedoch nur unvollständig, da nicht alle Zentren nach dem Blitz einen Schritt im S-Zyklus voranschreiten, und es kommt zu einer mit der Blitzzahl zunehmenden Durchmischung der S-Zustände. Der *miss*-Parameter gibt den Anteil der Photosysteme an, in denen durch den Blitz kein S-Übergang ausgelöst wird, oder die vor dem nachfolgenden Blitz durch Relaxationsprozesse im S-Zyklus wieder zurückfallen.

Zum Erreichen einer möglichst hohen Population des jeweiligen S-Zustandes ist es notwendig, die Abhängigkeit des *miss*-Parameters von den experimentellen Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Blitzabstand zu kennen, um durch deren geeignete Wahl ein optimales Voranschreiten im S-Zyklus zu erreichen. Die wichtigsten Ursachen, die zu *miss*-Ereignissen führen, sind:

1. *Geschlossene Zentren*: In Photosystemen, in denen Q_A in reduzierter Form vorliegt, ist eine stabile Ladungstrennung nicht möglich, da der $\text{Phe} \rightarrow Q_A$ -Elektronentransfer blockiert ist.
2. *Rekombination*: Der ladungsseparierte Zustand $\text{P680}^+Q_A^-$ geht durch rückgerichteten Elektronentransfer von Q_A^- zu P680^+ verloren. Die Wahrscheinlichkeit dieser Rekombination hängt hauptsächlich von der Menge an P680^+ ab, welches nach den ns-Phasen des $Y_Z \rightarrow \text{P680}^+$ -Elektronentransfers noch in oxidierter Form vorliegt.
3. *S-Zustandsrelaxation*: Zwischen zwei Blitzen kommt es zu einer Relaxation der Zustände S_2 und S_3 und damit zu einem Zurückfallen im S-Zyklus (S_3 relaxiert zu S_2 , S_2 relaxiert zu S_1).
4. *Nichtsättigende Blitzintensität*: Bei zu geringer Intensität des Anregungslichtes erfolgt nicht in allen Photosystemen eine Anregung des Antennensystems.

Abgesehen von diesen Beiträgen, die, in unterschiedlichem Ausmaß, bei jedem Schritt im S-Zyklus auftreten, ist in einem Teil der Photosysteme der Elektronentransfer vom Q_A zum Q_B permanent blockiert oder stark verlangsamt (*non- Q_B -Zentren*). Diese Photosysteme können nur einen Schritt im S-Zyklus voranschreiten, da das durch den ersten Blitz gebildete Q_A^- nicht durch Elektronentransfer zum Q_B reoxidiert werden kann und somit eine erneute Ladungstrennung durch den nächsten Blitz blockiert ist. Die *non- Q_B -Zentren* verbleiben daher nach dem ersten Blitz im S_2 -Zustand.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen XAS-Untersuchungen und optischen Messungen besteht in der Probenkonzentration. XAS-Proben haben üblicherweise eine Chlorophyll-Konzentration von 10-20 mg/ml, während der Chlorophyllgehalt bei optischen Messungen wesentlich geringer ist und im Bereich von etwa 5-50 $\mu\text{g/ml}$ liegt. Die optischen Charakteristika konzentrierter Proben können von denen verdünnter Suspensionen aufgrund

von Abschattungseffekten oder veränderten Streueigenschaften (infolge von Partikelaggregation) abweichen. Für ein möglichst vollständiges Weiterschalten im S-Zyklus ist es aber notwendig, alle Photosysteme durch den Blitz anzuregen, d. h. die Blitz-Sättigungsintensität zu kennen, oberhalb derer in jedem Antennensystem mindestens ein Photon absorbiert wird. Im Hinblick auf die konzentrierten XAS-Proben ist es instruktiv, den Grad der Sättigung in Abhängigkeit von der Eindringtiefe und der Blitzintensität zu untersuchen.

Das Ziel dieses Kapitels ist:

1. Die Untersuchung der Abhängigkeit des *miss*-Parameters von der Temperatur, dem pH-Wert und vom Blitzabstand. Um, abgesehen von einer rein phänomenologischen Beschreibung, zu einem besseren Verständnis der Ursachen beizutragen, die zu *misses* führen, soll zudem versucht werden, die verschiedenen Beiträge zum *miss*-Parameter zu quantifizieren.
2. Die Bestimmung des Anteils der Zentren, in denen der $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer permanent blockiert ist (*non- Q_B* -Zentren). Untersucht wird dabei die Abhängigkeit des Anteils blockierter Photosysteme von der Konzentration künstlicher Elektronenakzeptoren, die bei XAS-Messungen und optischen Experimenten verwendet werden.
3. Die Untersuchung der Absorptionseigenschaften der PSII-Membranfragmente in Hinblick auf das Lichtsättigungsverhalten bei Laser-Beblitzungsexperimenten an hochkonzentrierten XAS-Proben.

6.2 *Miss*-Parameter des S-Zyklus

Einleitung

Simulation der 2 ms-Rekombinationsfluoreszenz mit dem Kok-Modell

Wie im Kapitel 5 erläutert können die Oszillationen des 2 ms-Wertes der Rekombinationsfluoreszenz genutzt werden, um den *miss*-Parameter zu ermitteln. Die dunkeladaptierten Photosysteme werden mit einer Serie von ns-Laserblitzen durch den S-Zyklus geschaltet und die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz 2 ms nach dem jeweiligen Blitz detektiert. Trägt man die 2 ms-Intensitäten über der Blitzzahl auf, ergibt sich eine gedämpfte Oszillation mit einer Periodizität von vier. Der *miss*-Parameter lässt sich dann durch die Simulation der Oszillation mit dem Kok-Modell bestimmen, wie im folgenden erläutert wird.

Zur Simulation der Oszillationsmuster wurde das konventionelle Kok-Modell verwendet [Kok *et al.* 1970]. Die variierten Parameter dieses Modells sind der *miss*-Parameter, die Wahrscheinlichkeit für *double-hits* (das Voranschreiten um zwei Schritte im S-Zyklus) und die Ausgangsverteilung (Dunkelpopulation) der S-Zustände. Wenn die Anregung der Photosysteme, wie in dieser Arbeit, mit ns-Laserpulsen erfolgt, treten keine *double-hits* auf. Durch die Dunkeladaptation der Proben vor der Messung ist sichergestellt, dass die Zustände S_2 und S_3 abgebaut sind und somit in der Ausgangsverteilung nur S_1 und S_0 berücksichtigt werden müssen. Die Parameter der Simulation sind damit lediglich die Wahrscheinlichkeit für *misses* und die Besetzung des S_0 - bzw. S_1 -Zustandes. Vereinfachend wurde angenommen, dass der *miss*-Parameter für alle S-Übergänge gleich ist. Da das hier verwendete Verfahren auf der Erfassung der beim $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang emittierten Fluoreszenz beruht, lässt sich prinzipiell nur ein über einen 4er-Zyklus gemittelter *miss*-Parameter bestimmen (Zur S-

Zustandsabhängigkeit des *miss*-Parameters siehe z.B. [de Wijn und van Gorkom 2002b].) Die S-Zustandszusammensetzung nach dem n-ten Blitz einer Blitzserie ergibt sich dann durch die folgende Rekursionsformel:

$$\begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix}_{n+1} = \begin{bmatrix} m & 0 & 0 & (1-m) \\ (1-m) & m & 0 & 0 \\ 0 & (1-m) & m & 0 \\ 0 & 0 & (1-m) & m \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix}_n \quad (6.1)$$

Hierbei bezeichnet m den *miss*-Parameter und S_i die Besetzungswahrscheinlichkeit der einzelnen S-Zustände. Die Bestimmung des *miss*-Parameters sowie der Dunkelpopulation von S_0 und S_1 erfolgte durch Anpassung der sich aus dem Kok-Modell ergebenden S-Zustandsbesetzungen an die (normierte) 2 ms-Rekombinationsfluoreszenz. Zur Verbesserung des Signal-Rausch Verhältnisses wurde für die 2 ms-Werte über die Fluoreszenzdaten von 1 bis 3 ms gemittelt (siehe Kapitel 5).

Quantifizierung der Beiträge zum miss-Parameter

Im folgenden wird erläutert, wie sich die in Abschnitt 6.1 genannten Beiträge zum *miss*-Parameter quantifizieren lassen.

1. Geschlossene Zentren

Wie in Kapitel 4 beschrieben, lässt sich der Anteil der Photosysteme mit reduziertem Q_A durch Messung der prompten Fluoreszenz ermitteln:

$$[Q_A^-](t) = \frac{F(t) - F_0}{F_M - F_0 + (F - F_M)p} \quad (6.2)$$

Zur Berechnung von $[Q_A^-](t)$ wurde der in Kapitel 7 (Abschnitt 2) bestimmte Konnektivitätsparameter $p = 0,32$ verwendet.

2. Rekombination

Die Rate der Rekombination wird bestimmt durch die Ratenkonstante k_{rec} für den rückgerichteten Elektronentransfer vom Q_A^- zum $P680^+$ und $[P680^+, Q_A^-]$, dem Anteil der Zentren, in denen P680 in oxidiertem und Q_A in reduzierter Form vorliegt. Der Anteil der pro Zeiteinheit rekombinierenden Zentren, dN_{rec} , ist dann gegeben durch

$$dN_{rec} = k_{rec} [P680^+, Q_A^-] dt \quad (6.3)$$

Da $[P680^+, Q_A^-]$ proportional zur Intensität der Rekombinationsfluoreszenz (F_D) ist, folgt für den Anteil der rekombinierten Zentren

$$N_{rec} \sim k_{rec} \int F_D dt \quad (6.4)$$

(In diesem Fall sind die nicht- Q_A^- -korrigierten Fluoreszenzdaten zu verwenden.)

3. S-Zustandsrelaxation

Die Relaxation der S-Zustände lässt sich mit Hilfe von Literaturwerten zur Zerfallskinetik berechnen. Der über einen S-Zustandszyklus gemittelte Anteil an relaxierten Zentren ergibt sich nach

$$\langle S_{dec} \rangle = \frac{S_{2dec} + S_{3dec}}{4} \quad (6.5)$$

S_{2dec} und S_{3dec} bezeichnet den Anteil der zwischen zwei Blitzen von S_2 zu S_1 bzw. von S_3 zu S_2 relaxierten Zentren.

Der aus den Einzelbeiträgen resultierende *miss*-Parameter ist dann gegeben durch:

$$m = [Q_A^-] + (1 - [Q_A^-])N_{rec} + (1 - [Q_A^-])(1 - N_{rec}) \langle S_{dec} \rangle \quad (6.6)$$

Im Rahmen der hier angestrebten Quantifizierung wird, wie schon erwähnt, die Abhängigkeit des *miss*-Parameters – und damit auch der Einzelbeiträge – von der Blitzzahl vernachlässigt. Für die beschriebenen Berechnungen wurden daher die jeweils über einen S-Zyklus gemittelten Werte von $\langle S_{dec} \rangle$, N_{rec} und $[Q_A^-]$ verwendet.

Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeit des *miss*-Parameters wurde im Bereich von 0 bis 30 °C in Schritten von 5 °C bestimmt. Der Blitzabstand betrug 700 ms. Abbildung 6.1 zeigt die Oszillationen der 2 ms-Rekombinationsfluoreszenz für vier ausgewählte Temperaturen zusammen mit den Simulationen für die ersten 20 Blitze (Messungen und Simulation erfolgten bis Blitz 32). Die Daten wurden so normiert, dass die mittlere Fluoreszenzamplitude 0,25 beträgt.

Die Simulationen der Oszillationen erfolgte wie in der Einleitung beschrieben. Da die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz des ersten Blitzes (für alle Detektionszeiten) im Vergleich mit den nachfolgenden Blitzen einer Serie ungewöhnlich gering ist (siehe Abbildung 4.15) und sich der 2 ms-Wert durch das verwendete Kok-Modell nicht befriedigend beschreiben ließ, wurde der erste Blitz nicht berücksichtigt. (In Messungen der $P680^+$ -Absorption und der prompten Fluoreszenz werden häufig ungewöhnliche Kinetiken für den ersten Blitz beobachtet [de Wijn und van Gorkom 2002b, Jeans *et al.* 2002, Lavergne 1991], siehe auch Abbildung und 5.2). Die Temperaturabhängigkeit des *miss*-Parameters und die Dunkelpopulation des S_0 -Zustandes zeigt Abbildung 6.2. Es ergibt sich ein minimaler *miss*-Parameter von etwa 9 % für den Temperaturbereich von etwa 5 bis 10 °C. Oberhalb von 20 °C steigt der *miss*-Parameter stark an und erreicht bei 30 °C einen Wert von 12,5 %.

Im folgenden wird der Beitrag der geschlossenen Zentren (1.), der Rekombination (2.) und des S-Zustandszerfalls (3.) zum experimentell ermittelten *miss*-Parameter abgeschätzt.

1. Der Anteil der Zentren, die sich infolge der vorangegangenen Ladungstrennung noch im geschlossenen Zustand befinden, $[Q_A^-]$, wurde, wie in der Einleitung beschrieben, nach Gleichung 6.2 über die Messung der prompten Fluoreszenz ermittelt.
2. Die Rekombination kann mit Hilfe der Rekombinationsfluoreszenz abgeschätzt werden, wenn das Verhältnis zwischen Fluoreszenzintensität und relativer Konzentration des Zustandes $P680^+Q_A^-$ sowie die Ratenkonstante der Rekombination und deren Temperaturabhängigkeit bekannt sind. Zur Skalierung der Rekombinationsfluoreszenz wurde die relative Konzentration von $P680^+$ aus den in [Jeans *et al.* 2002] angegebenen freien Reaktionsenergien für den $Y_Z \rightarrow P680^+$ -Elektronentransfer berechnet. Die Skalierung erfolgte für die 40 μ s-Werte der $P680^+$ -Konzentration bzw. Rekombinationsfluoreszenz (die in [Jeans *et al.* 2002] angegebenen Reaktionsenergien beziehen sich auf den 40 μ s nach der Ladungstrennung erreichten Zustand).

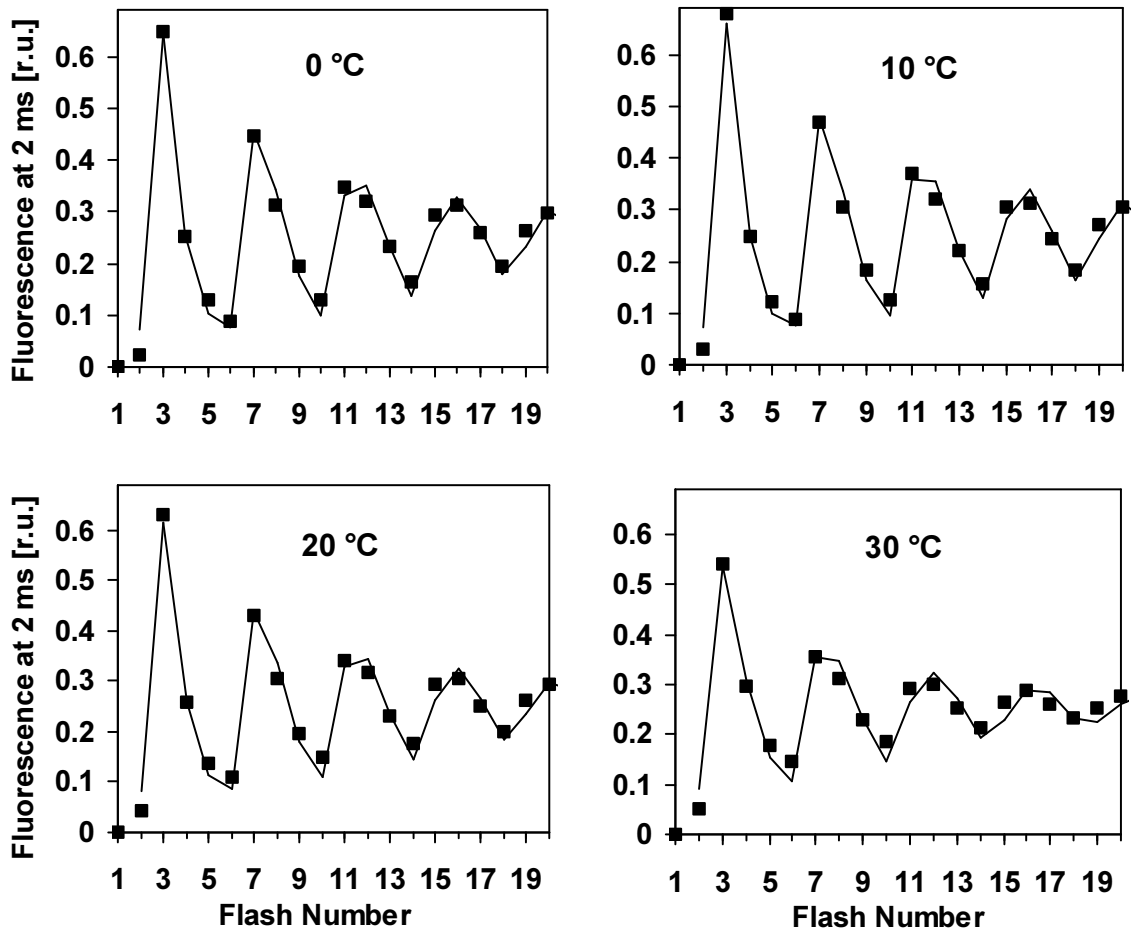


Abbildung 6.1: Oszillation der Rekombinationsfluoreszenz detektiert 2 ms nach dem jeweiligen Blitz für $T=0, 10, 20$ und 30 °C . Quadrate: Fluoreszenz, Linien: Simulation (Blitzabstand 700 ms, pH 6,4)

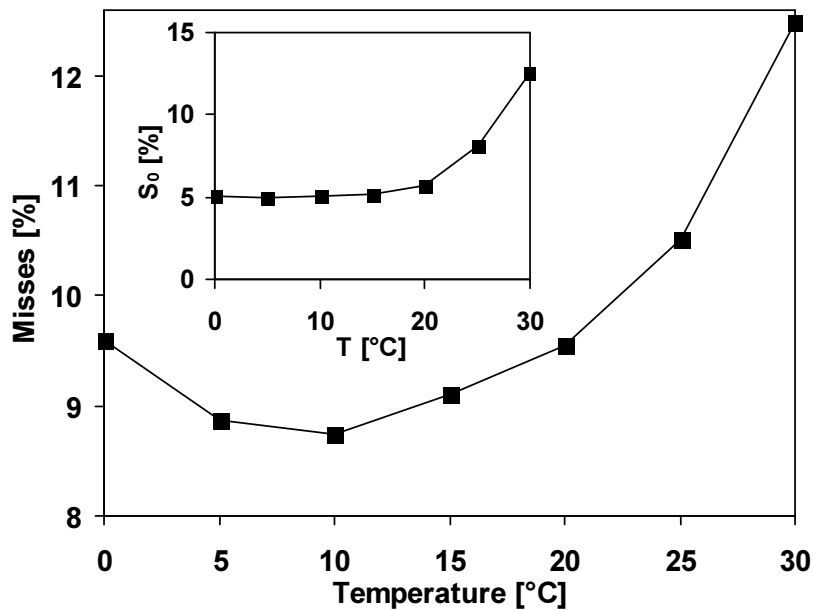


Abbildung 6.2: Temperaturabhängigkeit des *miss*-Parameters und der S_0 -Dunkelpopulation (Blitzabstand 700 ms, pH 6,4).

Die berechnete Konzentration von $P680^+$ liegt dabei zwischen 7,5 % (bei 30 °C) und 12,2 % (bei 0 °C). Die Abhängigkeit der Rekombinationsfluoreszenz von der Konzentration des Q_A^- kann vernachlässigt werden, da nach 40 μ s in praktisch allen Zentren Q_A noch in reduzierter Form vorliegt (siehe Kapitel 4). Der Anteil der rekombinierten Zentren N_{rec} ergibt sich dann wie folgt:

$$N_{rec}(T) = k_{rec}(T) \frac{[P680^+]_{40\mu s}(T)}{F_{D40\mu s}(T)} \int F_D dt \quad (6.7)$$

$[P680^+]_{40\mu s}$ und $F_{D40\mu s}$ bezeichnen die relative Konzentration von $P680^+$ bzw. die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz jeweils 40 μ s nach der Ladungstrennung. Integriert wird über das gesamte durch die Messung der Rekombinationsfluoreszenz erfasste Zeitintervall (10 μ s bis 40 ms). Die schnellen Phasen (ns-Bereich) der $P680^+$ -Reduktion werden dabei nicht berücksichtigt. Der dadurch entstehende Fehler ist aber kleiner als 20 %.

Für die Ratenkonstante der Rekombination werden in der Literatur Werte von 2 bis 10 ms^{-1} angegeben (2,2 ms^{-1} in [Rappaport *et al.* 2002], gemessen an *Synechococcus*, 6 ms^{-1} in [Conjeaud und Mathis 1980], gemessen an Spinat-Chloroplasten, 7,1 ms^{-1} in [Reinman und Mathis 1981], gemessen an Spinat-Chloroplasten, 5-10 ms^{-1} in [de Wijn und van Gorkom 2002a], gemessen an manganverarmten Spinat-Thylakoiden und 4,1 ms^{-1} in manganverarmten PSII-Membranpartikeln von *Synechococcus* [Gerken *et al.* 1989]).

Die Temperaturabhängigkeit der Rekombinationsrate erhält man aus dem Enthalpieunterschied zwischen den Zuständen $P680^+Q_A^-$ und $P680^+Phe^-$ (enthalpischer Anteil von ΔG_2 in Abbildung 4.2), da die Rekombination hauptsächlich über die Repopulierung des Zustandes $P680^+Phe^-$ erfolgt ([Rappaport *et al.* 2002] und Referenzen darin). In Kapitel 7 wird für die Enthalpiedifferenz ein Wert von -341 meV ermittelt. Die Temperaturabhängigkeit der Rekombination wird von zwei gegenläufigen Prozessen bestimmt: Einerseits nimmt die Ratenkonstante der Rekombination mit steigender Temperatur zu, andererseits verschwindet der Zustand $P680^+Q_A^-$, von dem aus die Rekombination erfolgen kann, mit zunehmender Temperatur schneller. Die hauptsächliche Ursache hierfür ist die erhöhte Elektronentransfer-Ratenkonstante vom Y_Z zum $P680^+$. (Die Reoxidation des Q_A^- durch Elektronentransfer zum Q_B verläuft demgegenüber vergleichsweise langsam.) Der Anteil der Rekombination am Abbau des Zustandes $P680^+Q_A^-$ ist gegenüber den obengenannten Prozessen vernachlässigbar. (Der Hauptreaktionsweg ist der vorwärtsgerichtete Elektronentransfer unter weiterer Stabilisierung der Ladungstrennung.)

3. Mit steigender Temperatur kommt es zu einer schnelleren Relaxation des S_2 - und des S_3 -Zustandes, was zu einer Erhöhung des *miss*-Parameters führt. Der über den S-Zyklus gemittelte Anteil der Photosysteme, die zwischen zwei Blitzen um einen Schritt im S-Zyklus zurückfällt, ergibt sich aus Gleichung 6.5. Die entsprechenden Relaxationszeiten wurden aus [Messinger *et al.* 1993, Seeliger *et al.* 1997] übernommen.

Abbildung 6.3 zeigt den Anteil der einzelnen Beiträge und den daraus resultierenden Gesamt-*miss*-Parameter, zusammen mit dem experimentell ermittelten Werten. Eine gute Beschreibung der experimentellen Werte ergibt sich unter der Annahme einer Rekombinations-Ratenkonstanten von 4,6 ms^{-1} , in guter Übereinstimmung mit den oben aufgeführten Literaturwerten.

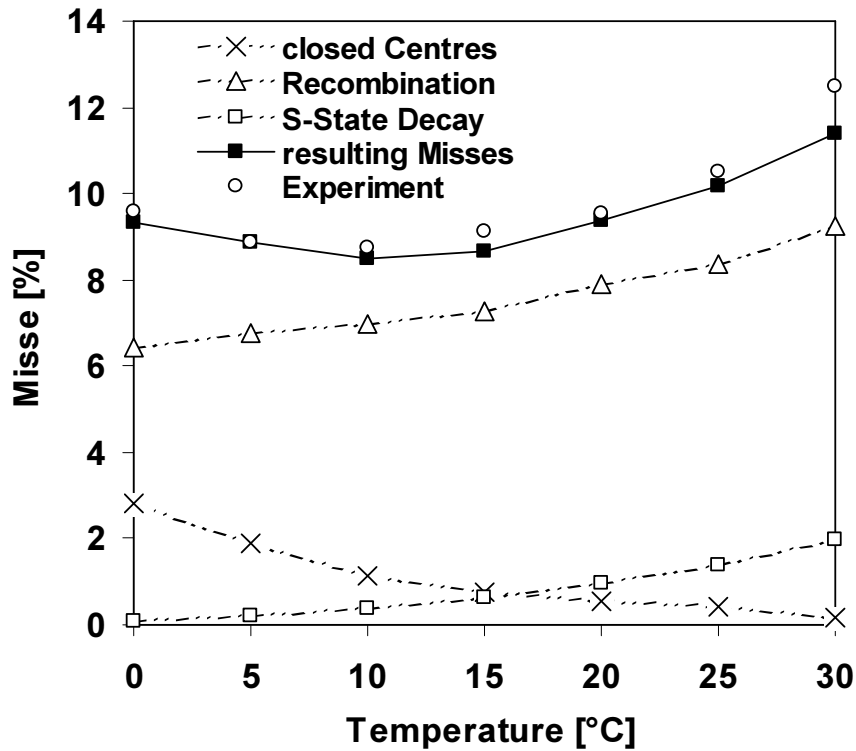


Abbildung 6.3: Temperaturabhängigkeit des Beitrags der geschlossenen Zentren, der Rekombination und der S-Zustandsrelaxation zum resultierenden Gesamt-*miss*-Parameter. Ebenfalls dargestellt sind die experimentellen Werte (Blitzabstand 700 ms, pH 6,4).

Man erkennt, dass die Hauptursache für *misses* die Rekombination des $P680^+Q_A^-$ -Zustandes ist, wobei der Anteil rekombinierenden Zentren mit steigender Temperatur zunimmt. Für 20 °C ergibt sich eine Rekombinationswahrscheinlichkeit von etwa 8 %. Aufgrund der mit fallender Temperatur abnehmenden Rate des $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfers nimmt der Anteil der geschlossenen zu kleineren Temperaturen hin zu und erreicht einen maximalen Wert von 3 % bei 0 °C. Der Anteil der S-Zustandsrelaxation nimmt mit steigender Temperatur zu und beträgt bei 30 °C etwa 2 %. Anzumerken ist, dass sowohl der Anteil der geschlossenen Zentren wie auch die S-Zustandsrelaxation vom Blitzabstand abhängen, während der überwiegende Teil der Rekombination im sub-ms-Zeitbereich stattfindet und damit unabhängig vom Blitzabstand ist.

pH-Abhängigkeit

Die pH-Abhängigkeit des *miss*-Parameters wurde im Bereich von pH 4,5 bis 8,5 untersucht. Abbildung 6.4 zeigt die normierten Oszillationen der 2 ms-Rekombinationsfluoreszenz für ausgewählte pH-Werte zusammen mit den Simulationen.

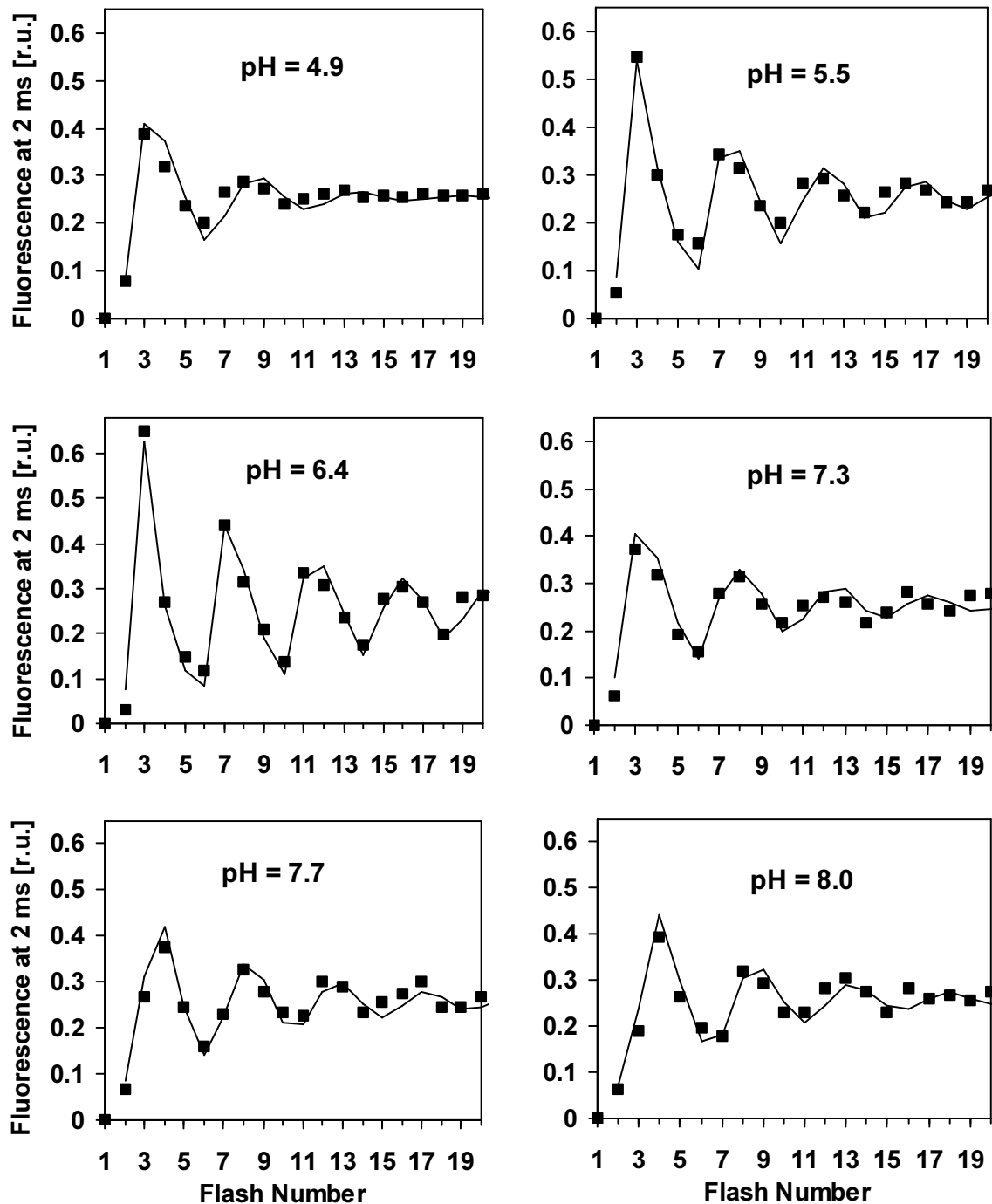


Abbildung 6.4: Oszillationen des 2ms-Wertes der Rekombinationsfluoreszenz für verschiedene pH-Werte. Die Fluoreszenzwerte wurden so normiert, dass die über einen S-Zyklus gemittelte Fluoreszenzintensität 0,25 beträgt. Quadrate: Fluoreszenz, Linien: Simulation. (Blitzabstand 700 ms, 20 °C)

Unterhalb von pH 5,0 kommt es zu einer starken Dämpfung der Oszillationen. Bei hohen pH-Werten verschiebt sich das Maximum vom dritten auf den vierten Blitz. Als Ursache hierfür wird eine schnelle Reduktion des nach dem ersten Blitz erzeugten S_2 -Zustandes zum S_1 durch einen Elektronentransfer vom Tyrosin-D zum Mangankomplex angenommen [Messinger und Renger 1994]. Möglicherweise führt eine Deprotonierung bei hohen pH-Werten am oder in der Nähe des Tyrosin-D zu einer Verringerung des Tyrosin-D-Redoxpotentials, wodurch ein „schneller“ Elektronentransfer zum Mangankomplex ermöglicht wird. Abbildung 6.5 zeigt den durch Simulation ermittelten *miss*-Parameter in Abhängigkeit vom pH-Wert sowie die ermittelte S_0 -Dunkelpopulation. Der optimale pH-Wert liegt im Bereich von 6,0 bis 7,0 mit einem *miss*-Parameter von etwa 9,5 %, in guter Übereinstimmung mit der in [Messinger und Renger 1994] ermittelten pH-Abhängigkeit. Die Zunahme der aus der Simulation resultierenden S_0 -Dunkelpopulation („ S_0 “) oberhalb von pH 6,5 ist höchstwahrscheinlich auf den schnellen S_2 -Abbau zurückzuführen und spiegelt daher nicht die tatsächliche S-Zustandsverteilung im dunkeladaptierten Zustand wider.

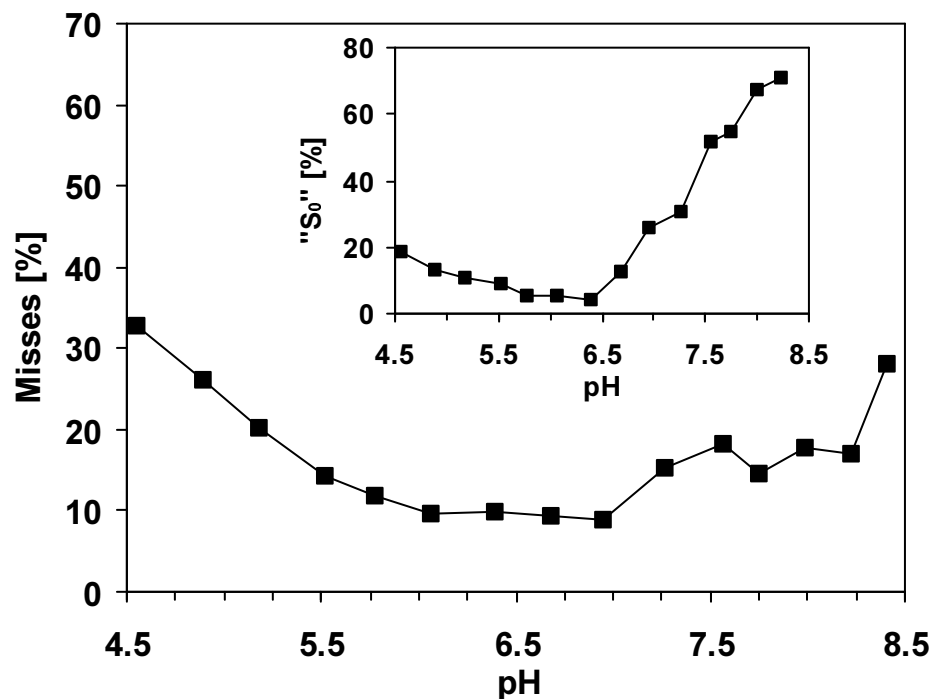


Abbildung 6.5: pH-Wert-Abhängigkeit des *miss*-Parameters und (scheinbare) S_0 -Dunkelpopulation (Blitzabstand 700 ms, 20 °C).

Analog zum vorhergehenden Abschnitt wurde versucht, das pH-Verhalten des *miss*-Parameters auf die Beiträge der geschlossenen Zentren (Q_A^-), der Rekombination und der S-Zustandsrelaxation zurückzuführen. Es wurde angenommen, dass die Ratenkonstante der Rekombination nicht vom pH abhängt [Conjeaud und Mathis 1980, Gerken *et al.* 1989]. Der mit dem pH-Wert variierende Anteil rekombinierender Zentren beruht dann nur auf der pH-abhängigen (und zeitabhängigen) Besetzungswahrscheinlichkeit des $P680^+Q_A^-$ -Zustandes, von dem aus die Rekombination erfolgt (siehe Gl. 6.7). Die pH-Abhängigkeit der S-Zustandszerfallszeiten wurden aus [Messinger und Renger 1994] entnommen. Abbildung 6.6 zeigt die Einzelbeiträge und den resultierenden *miss*-Parameter zusammen mit den experimentellen Werten. Der überwiegende Anteil der *misses* im gesamten pH-Bereich ist auf

die Rekombination des $P680^+Q_A^-$ -Zustandes zurückzuführen. Die beste Übereinstimmung mit dem experimentell bestimmten *miss*-Parameter ergibt sich unter der Annahme einer Rekombinations-Ratenkonstanten von $5,2 \text{ ms}^{-1}$. Der Anteil der Rekombination ist minimal zwischen pH 6,5 und 7,3 und beträgt dort etwa 7,5 %. Mit steigendem pH kommt es zu einer schnelleren S-Zustandsrelaxation, was ab einem pH von etwa 7,7 zu 3 % *misses* führt. Der Beitrag der geschlossenen Zentren ist bei dem verwendeten Blitzabstand von 700 ms vernachlässigbar gering.

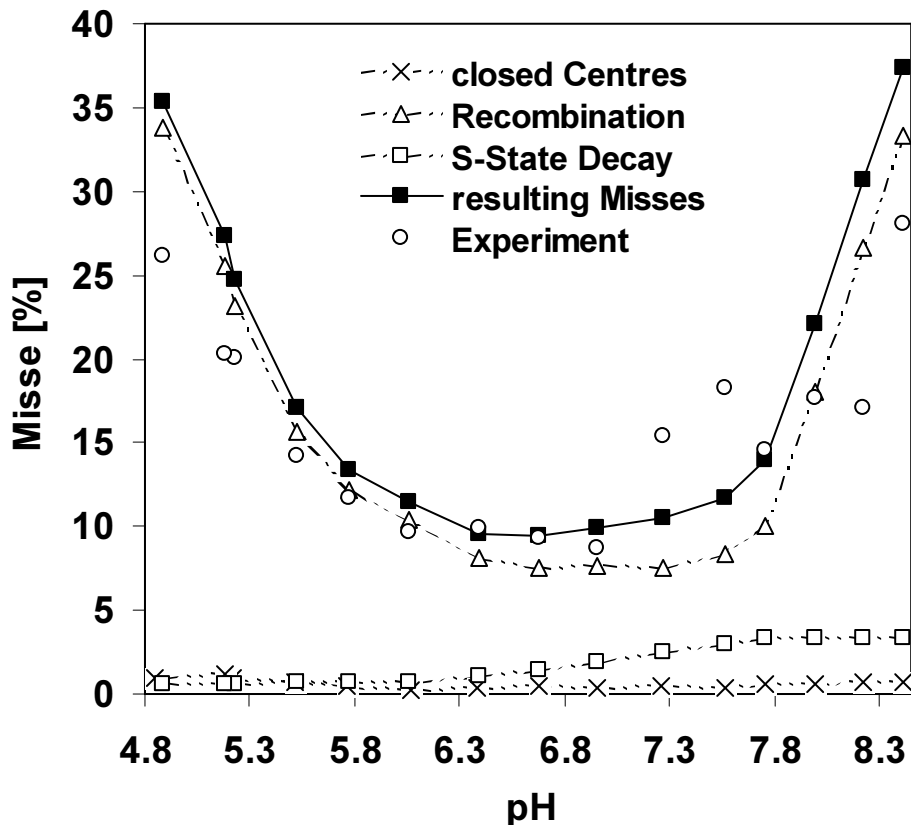


Abbildung 6.6: pH-Abhängigkeit der Beiträge der geschlossenen Zentren, der Rekombination und der S-Zustandsrelaxation zum *miss*-Parameter. Ebenfalls dargestellt sind die experimentellen Werte. (Blitzabstand 700 ms, 20 °C)

Q_A^- -Reoxidation und Rate der Sauerstoffentwicklung

Unter kontinuierlicher Beleuchtung ist die Geschwindigkeit des Elektronentransfers vom Q_A zum Q_B der die Rate der Sauerstoffentwicklung limitierende Faktor in intakten PSII. Erst nach erfolgter Reoxidation von Q_A ist eine erneute stabile Ladungstrennung möglich. In Abbildung 6.7 ist die mittlere Ratenkonstante für den $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer in Abhängigkeit vom pH-Wert sowie die pH-Abhängigkeit der Sauerstoffentwicklungsrate unter kontinuierlicher Beleuchtung (übernommen aus [Schiller und Dau 2000]) dargestellt. Zur Bestimmung der mittleren Ratenkonstante des $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfers wurde aus den Verläufen der prompten Fluoreszenz, die nach der Anregung mit einem sättigenden Laserpuls aufgezeichnet wurden (siehe z.B. Abb. 4.15), unter Berücksichtigung der PSII-Konnektivität nach Gleichung 6.2 die entsprechende Zeitabhängigkeit der Q_A^- -Konzentration berechnet

(Konnektivitätsparameter 0,32). Die Zeitverläufe von $[Q_A^-]$ wurden dann mit der Summe von drei Exponentialfunktionen und einer Konstanten simuliert und die mittlere Zeitkonstante $\langle \tau \rangle$ bzw. Ratenkonstante $\langle k \rangle$ für den $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer nach

$$\frac{1}{\langle k \rangle} = \langle \tau \rangle = \frac{A_1\tau_1 + A_2\tau_2 + A_3\tau_3}{A_1 + A_2 + A_3} \quad (6.8)$$

berechnet. Die A_i sind die Amplituden der Exponentialterme, die τ_i die entsprechenden Zeitkonstanten.

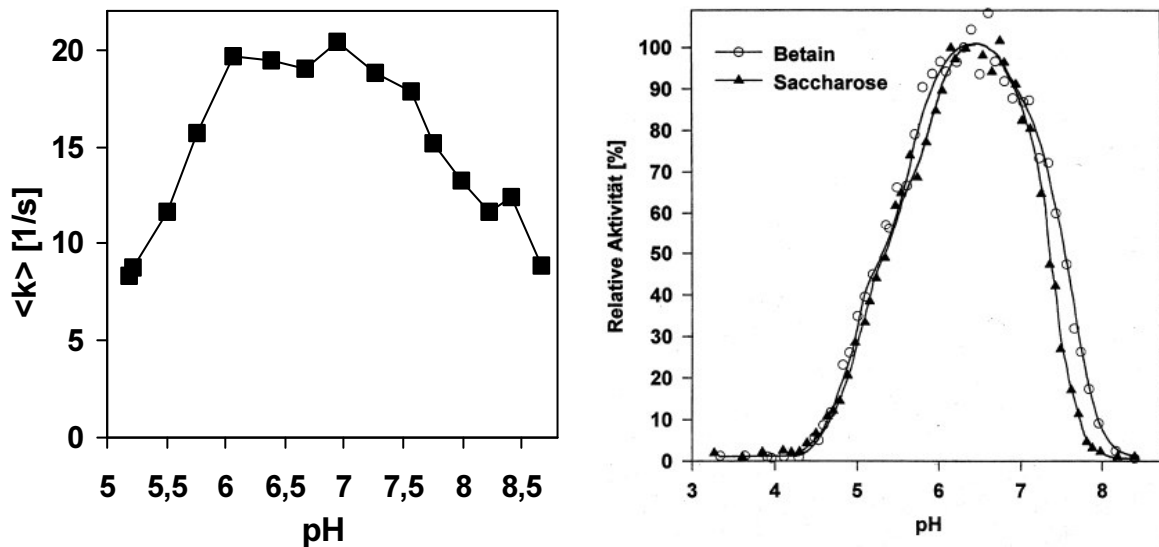


Abbildung 6.7: Vergleich zwischen der Ratenkonstante des $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfers und der Rate der O_2 -Entwicklung unter kontinuierlicher Beleuchtung in Abhängigkeit vom pH-Wert. Links: Mittlere Ratenkonstante für den $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer, berechnet aus der 3fach-exponentiellen Simulation des Zeitverlaufs der Q_A^- -Konzentration nach Anregung mit einem sättigenden Laserpuls. (Zur Berechnung der Q_A^- -Konzentration aus den Verläufen der prompten Fluoreszenz wurde der in Kapitel 7 bestimmte Konnektivitäts-Parameter von 0,32 verwendet.) Die mittlere Elektronentransfer-Zeit bei optimalem pH (6-7) beträgt 40 ms. Rechts: Rate der Sauerstoffentwicklung unter kontinuierlicher Beleuchtung mit sättigendem Licht (aus [Schiller und Dau 2000]).

Im sauren pH-Bereich besteht eine gute Übereinstimmung beider Verläufe. Dagegen ist im basischen Bereich bei pH 8 die Sauerstoffrate auf unter 10 % abgefallen, während die Q_A^- -Reoxidationsrate hier noch etwa 60 % des Maximalwertes beträgt. Berücksichtigt man den *miss*-Parameter von 20 % bei pH 8 (80 % „nicht-misses“), wäre eine Verringerung der Sauerstoffentwicklung auf $0,8 \times 0,6$, also etwa 50 % zu erwarten. Erklären ließe sich dieses unterschiedliche Verhalten bei hohen pH-Werten mit einer Schädigung der Photosysteme, die erst unter Lichteinwirkung stattfindet. (Die Zahl der während der Messung pro Photosystem absorbierten Photonen ist bei der Sauerstoffbestimmung unter kontinuierlicher Beleuchtung wesentlich größer als beim Beblitzen mit ns-Laserpulsen.)

S-Zustandsabhängigkeit der Rekombination

Es ist zu erwarten, dass der Anteil der Photosysteme, in denen es zu einer Rekombination des $P680^+Q_A^-$ -Zustandes kommt, vom S-Zustand abhängt, da sich die Rate des $Y_Z \rightarrow P680^+$ -Elektronentransfers und der Anteil der μs -Phasen an der gesamten $P680^+$ -Reduktion für die verschiedenen S-Zustände unterscheidet. Der Prozentsatz der rekombinierenden Zentren wurde in Abhängigkeit von der Blitzzahl, und damit vom S-Zustand, nach Gl. 6.7 berechnet. (Vorausgesetzt wurde, dass die Rate der Rekombination nicht vom S-Zustand abhängt.) Abbildung 6.8 zeigt den Anteil der Rekombination in Abhängigkeit von der Temperatur und vom pH-Wert.

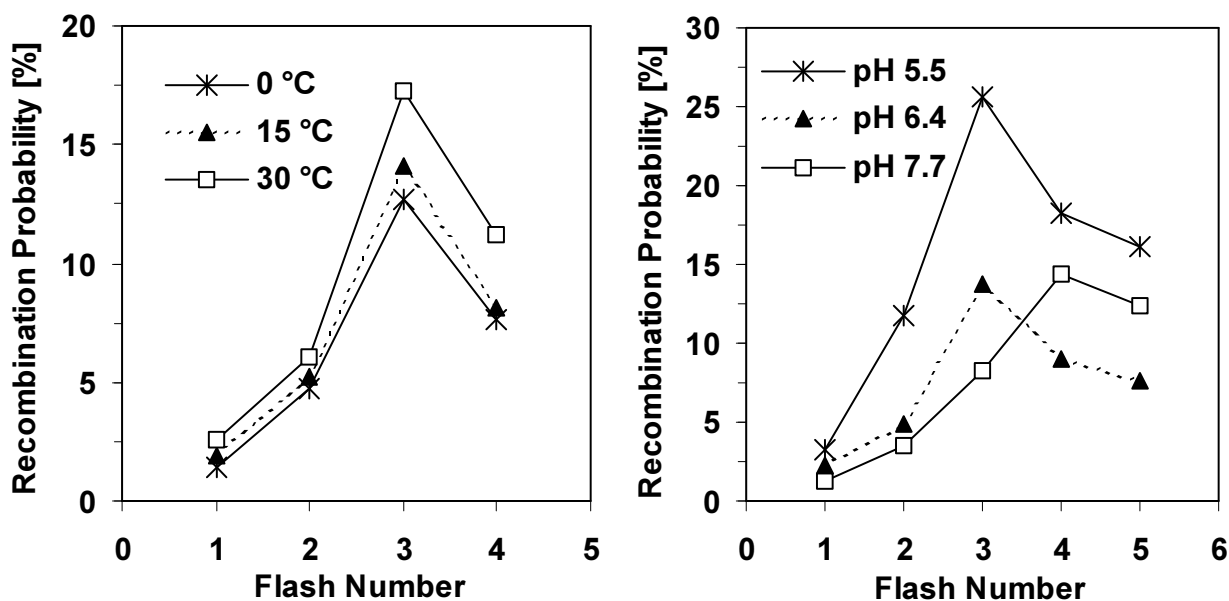


Abbildung 6.8: Rekombinationswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom S-Zustand. Links: für $T = 0, 15$ und 30 °C bei $\text{pH } 6,4$; rechts: für $\text{pH } 5,5, 6,4$ und $7,7$ bei $T = 20\text{ °C}$.

Es zeigt sich eine ausgeprägte S-Zustandsabhängigkeit, mit der höchsten Rekombinationswahrscheinlichkeit beim $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang. In diesem Schritt erfolgt die Reduktion von $P680^+$ durch Elektronentransfer vom Y_Z langsamer als in den anderen S-Zuständen, mit einer entsprechend höheren Wahrscheinlichkeit für die Ladungs-Rekombination. Bei $\text{pH } 7,7$ ist das Maximum der Rekombination auf den vierten Blitz verschoben, da hier die Photosysteme durch eine schnelle S-Zustandsrelaxation zwischen dem ersten und zweiten Blitz einen Schritt im S-Zyklus zurückgefallen sind (siehe Abb. 6.4). De Wijn und van Gorkom [de Wijn und van Gorkom 2002b] leiten eine S-Zustandsabhängigkeit des *miss*-Parameters aus einer Analyse der blitzzahlabhängigen maximalen prompten Fluoreszenz ab (gemessen an Spinat-Thylakoiden), die weitgehend der hier ermittelten S-Zustandsabhängigkeit der Rekombination entspricht, mit einem Maximum des *miss*-Parameters für den dritten Blitz (18 % *misses*). Der überwiegende Teil der *miss*-Ereignisse wird von den Autoren dem Verlust der Ladungstrennung durch Rekombination zugeschrieben.

Blitzabstands-Abhängigkeit

Abbildung 6.9 zeigt die blitzabhängige Oszillation der 2 ms-Rekombinationsfluoreszenz für verschiedene Blitzabstände bei 20 °C und pH 6,4.

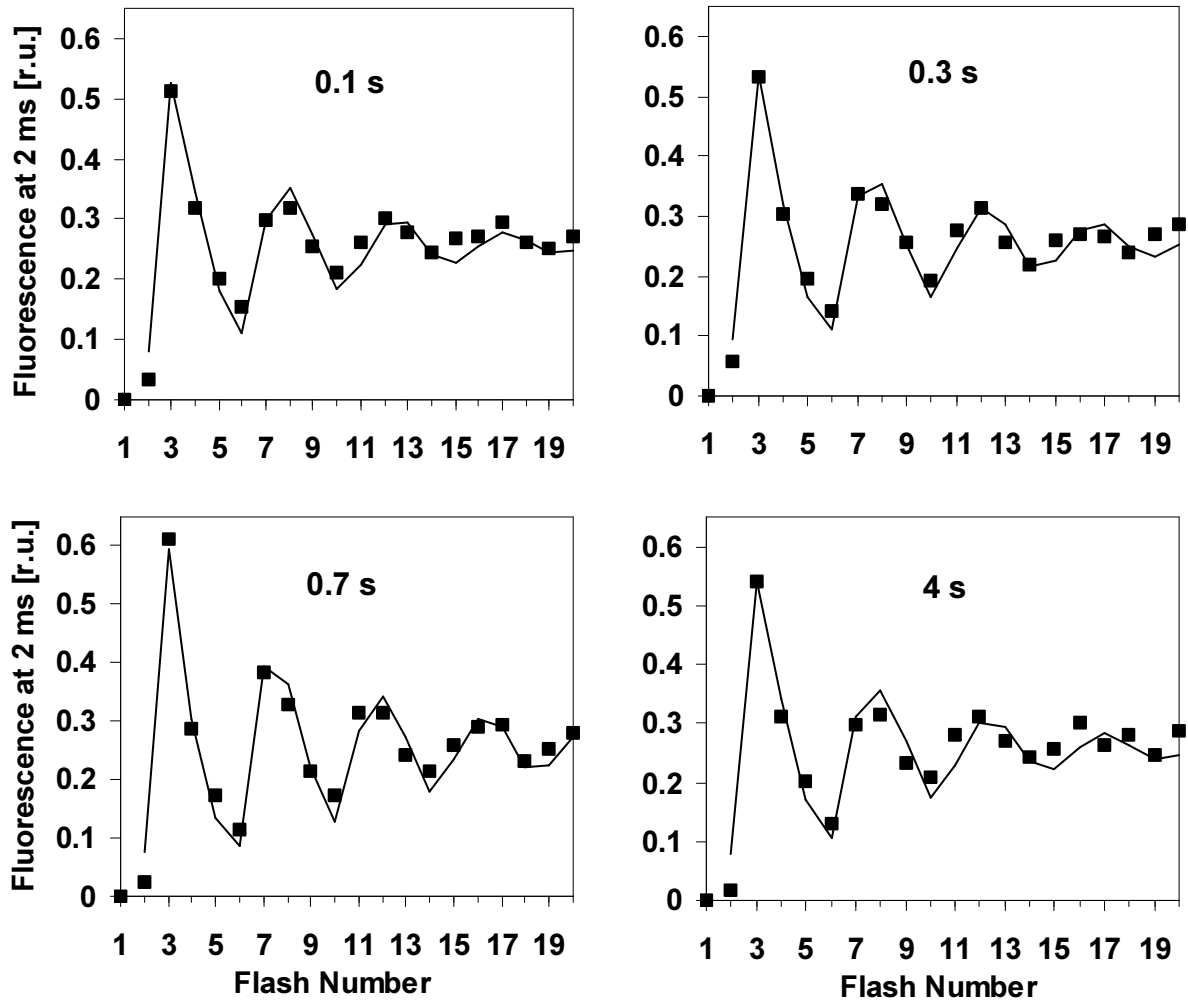


Abbildung 6.9: Oszillation des 2 ms-Wertes der Rekombinationsfluoreszenz für einen Blitzabstand von 100 ms, 300 ms, 700 ms und 4 s (bei 20 °C und pH 6,4). Quadrate: Fluoreszenz, Linien: Simulation.

Da unter identischen Messbedingungen innerhalb einer Messreihe keine signifikanten Unterschiede in der Dunkelpopulation von S_0 und S_1 zu erwarten sind, wurden alle Oszillationsmuster mit derselben S_0 -Dunkelpopulation simuliert. Verwendet wurde ein sogenannter *joint-fit*-Ansatz: Die Oszillationen für die verschiedenen Blitzabstände wurden simultan, d. h. durch Minimierung einer gemeinsamen Fehlersumme simuliert, wobei die S_0 -Dunkelpopulation variabel, aber für alle Oszillationsmuster gleich war. Abbildung 6.10 zeigt den so ermittelten *miss*-Parameter in Abhängigkeit vom Blitzabstand. Die Simulationen ergeben einen minimalen Wert von 11 % für einen Blitzabstand zwischen 0,5 und 1 s. Dieser Wert liegt um etwa 1,5 % über den bei den Temperatur- und pH-Messungen ermittelten *miss*-Parametern. Mögliche Ursache hierfür könnte unterschiedliches Probenmaterial (verschiedene

BBY-Präparationen, unterschiedliches Spinat-Ausgangsmaterial) oder Unterschiede in der Qualität des verwendeten Elektronenakzeptors (DCBQ) sein. Es ergibt sich eine S_0 -Dunkelpopulation von 11 %.

Die Zunahme des *miss*-Parameters mit kleiner werdendem Blitzabstand erklärt sich aus der zeitabhängigen Konzentration von Q_A^- , der Anstieg mit zunehmendem Blitzabstand aus der Relaxation der S-Zustände zwischen den einzelnen Blitzen.

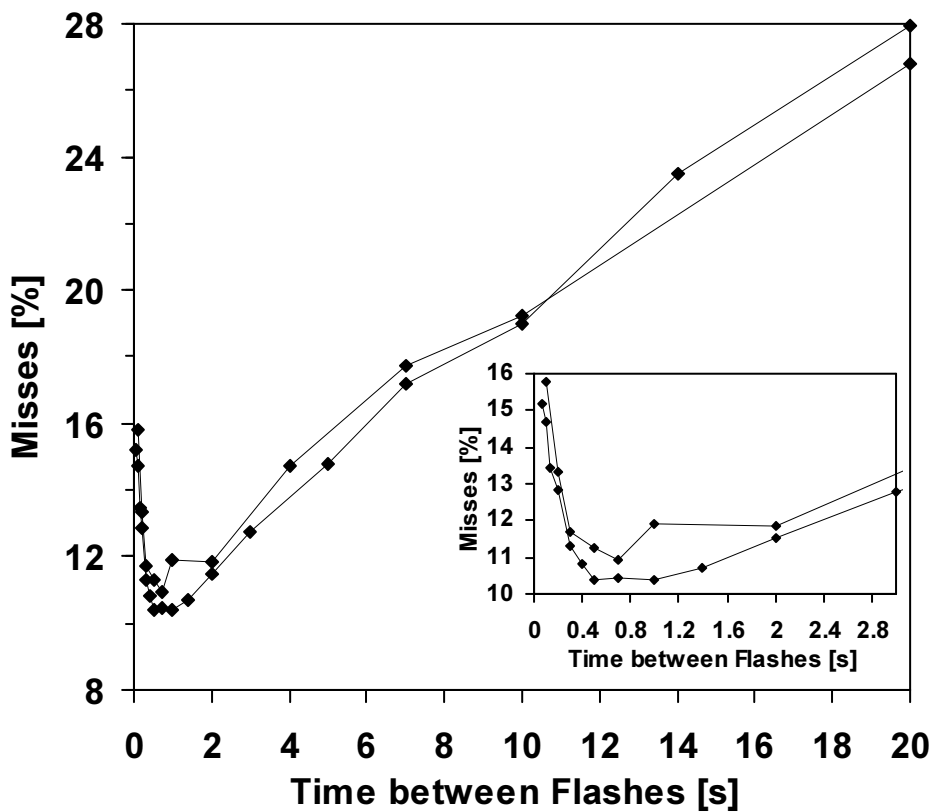


Abbildung 6.10: Blitzabstands-Abhängigkeit des *miss*-Parameters (bei 20 °C und pH 6,4). Die S_0 -Dunkelpopulation betrug 11 % für alle Blitzabstände.

Abbildung 6.11 zeigt den Beitrag der geschlossenen Zentren und der S-Zustandsrelaxation sowie den resultierenden theoretischen *miss*-Parameter unter Einbeziehung des bei der Temperatur- und pH-Untersuchung ermittelten Rekombinationsanteils von ca. 8 % zusammen mit den experimentellen Werten. Der minimale theoretische *miss*-Parameter beträgt 9,7 % bei einem Blitzabstand von 780 ms, in guter Übereinstimmung mit dem experimentell bestimmten Wert von 11 % für einen Blitzabstand zwischen 500 ms und 1 s.

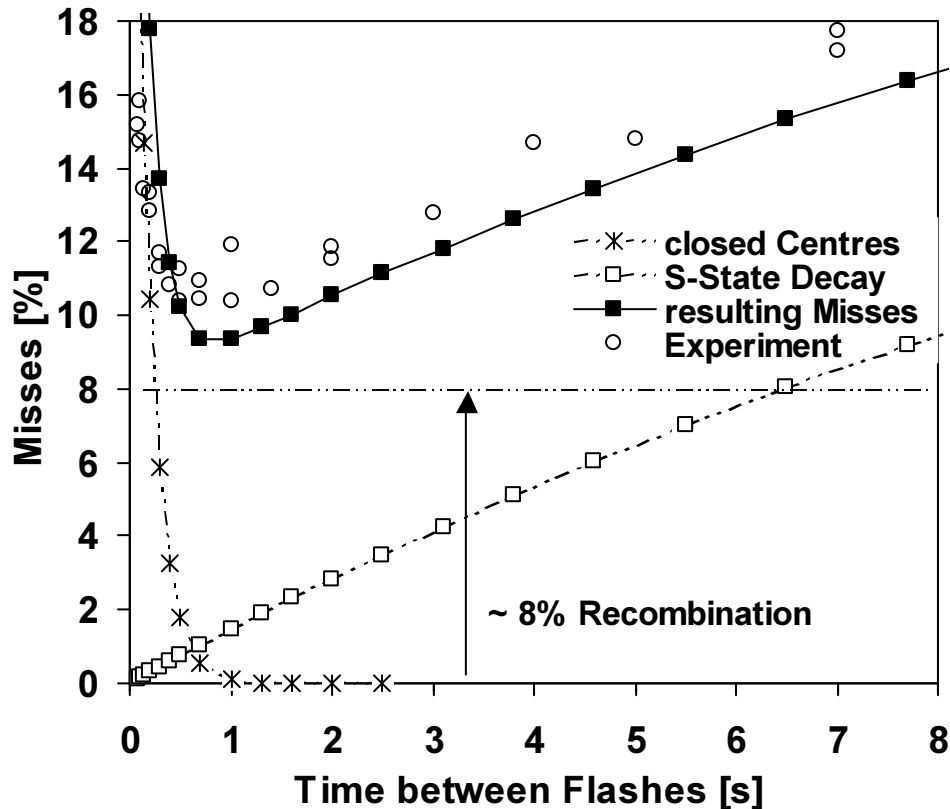


Abbildung 6.11: Blitzabstandsabhängigkeit der Beiträge der geschlossenen Zentren, der Rekombination und der S-Zustandsrelaxation zum *miss*-Parameter. Ebenfalls dargestellt sind die experimentell bestimmten Werte.

6.3 Blockierung der Akzeptorseite (*non-Q_B*-Zentren)

In einem Teil der PSII-Zentren ist der Elektronentransfer vom Q_A zum Q_B blockiert [Melis 1985, Graan und Ort 1986] oder stark verlangsamt [Chylla und Whitmarsh 1989, Lazar 1999]. In diesen Zentren ist eine Population der Zustände S_3 und S_0 durch Beblitzen nicht möglich. Die genauen Ursachen dieser Blockierung sind nicht bekannt. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit den in der lebenden Zelle ständig stattfindenden Auf- und Abbauprozessen und einer Schädigung durch zu hohe Lichtintensitäten (*photodamage*). Einen großen Einfluss auf die Funktion der Akzeptorseite hat auch die Art der Probenpräparation. So beobachtet man in PSII-Membranpartikeln eine Verlangsamung des $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfers im Vergleich mit den in Thylakoiden oder Chloroplasten gemessenen Elektronentransfer-Raten [Putrenko *et al.* 1999], was auf eine mögliche Modifizierung der Akzeptorseite infolge der Triton-Behandlung hinweist. Im folgenden wird der Anteil der Q_B -inhibierten Zentren in Präparationen von PSII-Membranpartikeln sowie der Einfluss künstlicher Elektronenakzeptoren auf die Inhibition untersucht.

Messprinzip und experimentelle Durchführung

Der Anteil der Q_B -blockierten Zentren lässt sich mit Hilfe des *pump-probe*-Verfahrens der prompten Fluoreszenz bestimmen (siehe Kapitel 4). Im dunkeladaptierten Zustand liegt in allen Zentren Q_A in oxidiertem Form vor und die Fluoreszenz ist minimal (F_0). Direkt nach Anregung der Photosysteme durch einen sättigenden Blitz ist in praktisch allen Zentren Q_A reduziert und die prompte Fluoreszenz maximal (F_M). Die Differenz zwischen dem direkt vor dem nachfolgenden Blitz gemessenen Fluoreszenzpegel F_{\min} und F_0 ist proportional zum Anteil der Photosysteme in denen, innerhalb des Zeitintervalls zwischen den Blitzen, keine Reoxidation des Q_A^- stattgefunden hat. Für den Anteil der blockierten Zentren [$Q_{B \text{ block}}$] gilt dann näherungsweise die folgende Beziehung:

$$[Q_{B \text{ block}}] = \frac{F_{\min} - F_0}{F_M - F_0} \quad (6.9)$$

Untersucht wurde die Blockierung mit und ohne Zugabe künstlicher Elektronenakzeptoren (DCBQ, PPBQ, sowie PPBQ + Kalium-Hexacyanoferrat(III)). Die Zugabe der Akzeptoren zum Messpuffer erfolgte in Form von Stammlösungen. Als Lösungsmittel diente dabei ein DMSO/Wasser-Gemisch, da sowohl DCBQ wie auch PPBQ in reinem Wasser schwer löslich sind. Beide Substanzen wurden zuerst in DMSO gelöst, und diese Lösung anschließend mit Wasser verdünnt. Die Zugabe der Akzeptor-Stammlösungen zur PSII-Suspension erfolgte eine Minute vor der Messung. Das Volumen der zugegebenen Stammlösung betrug maximal 10 % des Gesamt-Endvolumens in der Messküvette, wobei die finale Konzentration von DMSO im Messvolumen bei maximal 0,7 % (DCBQ) bzw. 2,5 % (PPBQ) lag. Alle Messungen erfolgten bei 20 °C und einer Chlorophyll-Konzentration von 10 µg/ml.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 6.12 ist der Zeitverlauf der prompten Fluoreszenz für verschiedene DCBQ-Konzentrationen dargestellt. Da DCBQ und PPBQ als Fluoreszenzlöcher wirken, ist generell eine Abnahme des Fluoreszenzsignals mit steigender Akzeptorkonzentration zu beobachten. Die Zunahme der F_M - und F_0 -Werte mit zunehmender Blitzzahl innerhalb einer Blitzserie für Messungen bei geringer Akzeptor-Konzentration (≤ 5 mM) ist auf eine sukzessive Reduktion des Plastochinon-Pools zurückzuführen, da nicht-reduziertes Plastochinon als Fluoreszenzlöcher wirkt (siehe Kapitel 4). Abbildung 6.13 zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenz-Intensität von der Blitznummer für verschiedene Zeitintervalle zwischen sättigendem Laserblitz und Abfragepuls.

Zu erkennen ist eine 4er-Oszillation der Periode für kurze Zeiten (100 µs und 500 µs) mit Minima nach dem zweiten und sechsten Blitz sowie eine 4er-Oszillation für lange Zeiten (200 ms) mit Minima nach dem dritten und siebenten Blitz. Für Zeiten von 2 bis 8 ms zwischen Laserblitz und Abfragepuls wird eine 2er-Oszillation mit Maxima bei ungerader Blitzzahl beobachtet.

2er-Oszillationen reflektieren die Eigenschaft des Q_B als 2-Elektronen-Akzeptor. Da der $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer schneller erfolgt, wenn Q_B vor dem Blitz in oxidiertem Form vorliegt, was im dunkeladaptierten Zustand für die Mehrzahl der Photosysteme der Fall ist, wären allerdings Maxima für gerade Blitzzahlen zu erwarten (die Zeitkonstanten für den $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer betragen 200-350 µs für Q_B und 600-900 µs für Q_B^- [Bowes und Crofts 1980, Robinson und Crofts 1983]).

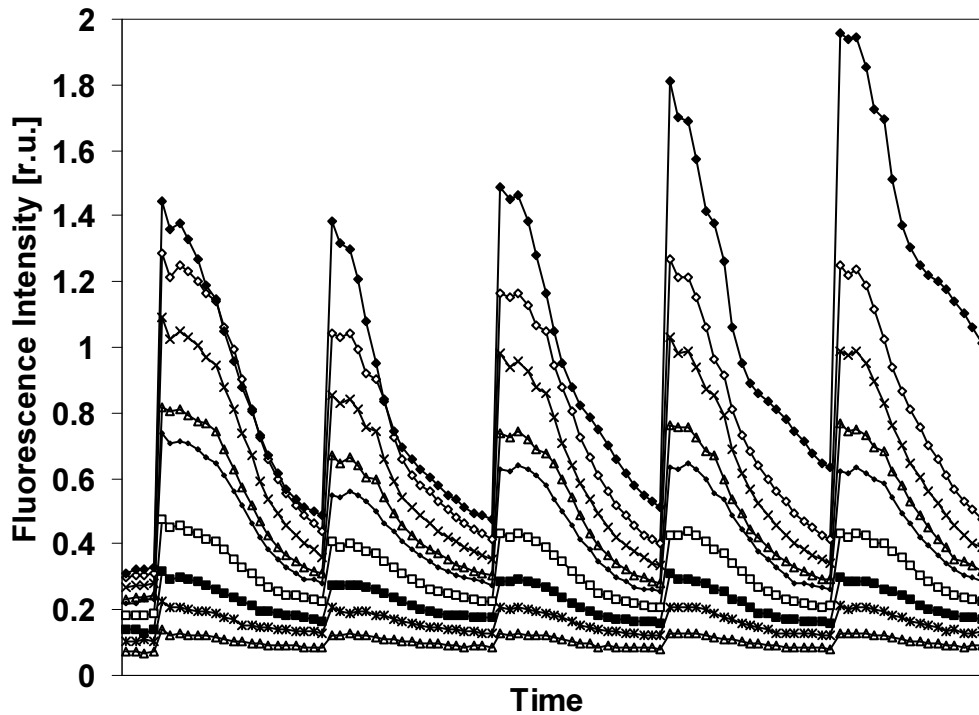


Abbildung 6.12: Zeitverlauf der prompten Fluoreszenz für eine Serie von 5 sättigenden Laserblitzen für verschiedene DCBQ-Konzentrationen (von oben nach unten: 0, 5, 10, 20, 40, 80, 140, 200, 300 μM). Blitzabstand 300 ms, Chlorophyll-Konzentration 10 $\mu\text{g/ml}$. Die Zeitachse zwischen den sättigenden Laserblitzen ist logarithmisch geteilt. Die Zeiten der einzelnen Datenpunkte zwischen den sättigenden Blitzen sind: 89,3 μs , 133 μs , 203 μs , 312 μs , 486 μs , 759 μs , 1,19 ms, 1,87 ms, 2,95 ms, 4,65 ms, 7,33 ms, 11,6 ms, 18,3 ms, 28,8 ms, 45,5 ms, 71,8 ms, 113 ms, 179 ms, 283 ms.

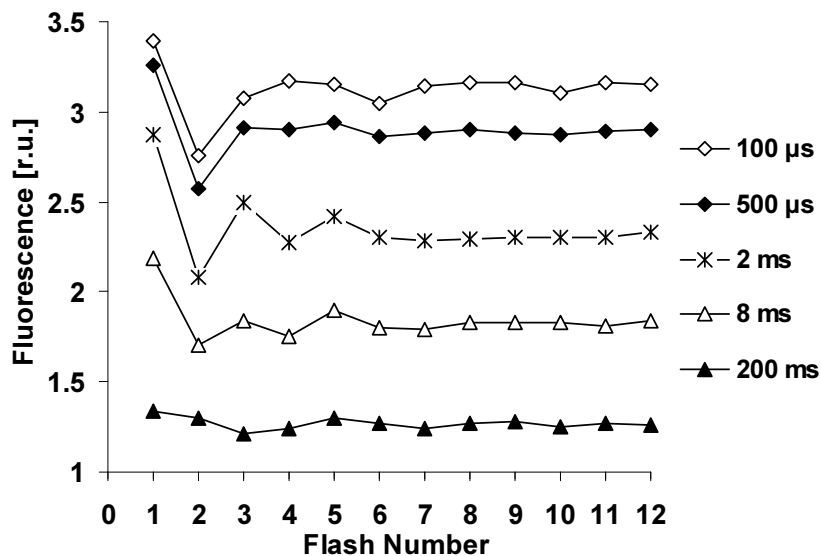


Abbildung 6.13: prompte Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Blitzzahl für verschiedene Zeiten nach dem Blitz (DCBQ-Konzentration: 20 μM).

Mögliche Ursache für das hier beobachtete entgegengesetzte Verhalten könnten diffusionslimitierte Prozesse während der Übergänge $S_1 \rightarrow S_1$ und $S_3 \rightarrow S_0$ sein: Nach der Dunkeladaptation liegt die Mehrzahl der Zentren im Zustand S_1Q_B vor, die Reaktionssequenz für eine Folge sättigender Blitze ist dann $S_1Q_B \rightarrow S_2Q_B^- \rightarrow S_3Q_B \rightarrow S_0Q_B^-$. Q_B in oxidierter Form ist im Gegensatz zum einfach reduzierten Q_B nur locker an die Q_B -Bindungsstelle gebunden, d. h. im S_1 und S_3 ist ein Teil der Q_B -Bindungsstellen unbesetzt und der $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer kann erst nach Diffusion des Q_B in die Bindungstasche erfolgen. Die Austauschzeit von zweifach reduziertem Q_B gegen oxidiertes Q_B wird in [Crofts *et al.* 1993] und [Kanazawa *et al.* 1992] mit etwa 2 ms angegeben. Nach [Robinson und Crofts 1983] beträgt der Anteil der PSII-Zentren mit nichtbesetzter Q_B -Bindungsstelle in dunkeladaptierten Chloroplasten 85 %. De Wijn *et al.* [de Wijn und van Gorkom 2001] schreiben eine 2-5 ms Komponente des $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfers einer Diffusionslimitierung zu. Komponenten in der Q_A^- -Oxidationskinetik mit binärer Oszillation und Maxima bei ungeraden Blitzzahlen mit Zeiten zwischen 10 und 17 ms werden in [Kurreck *et al.* 1995] und [Putrenko *et al.* 1999] beschrieben.

Die Oszillationen zu kurzen Zeiten (100-500 μ s) resultieren aus einer Überlagerung der akzeptorseitigen 2er-Oszillation mit einer donorseitigen 4er-Oszillation und sind schwierig zu interpretieren: Die Übergänge zwischen den S-Zuständen liegen im selben Zeitbereich, wodurch es zu einer S-zustandsabhängigen Fluoreszenzlöschung durch $P680^+$ kommt. Zudem ist in Zentren, die im S_0 - und S_1 -Zustand vorliegen, die Fluoreszenz-Quantenausbeute geringer als Zentren im S_2 und S_3 [Delosme 1971, Zankel 1973, Delosme und Joliot 2002]. (Wahrscheinlichste Ursache hierfür ist der der primären Ladungstrennung entgegenwirkende elektrostatische Einfluss einer zusätzlichen positiven Ladung am Mangankomplex in den Zuständen S_2 und S_3 .)

Die 4er-Oszillationen bei 200 ms mit Minima auf Blitz 3 und Blitz 7 (Abb. 6.13) lässt sich ebenfalls mit der geringeren Fluoreszenz-Quantenausbeute im S_0 - und S_1 -Zustand erklären. (Fluoreszenzlöschung durch $P680^+$ ist hier auszuschließen. Eine Abschätzung mit Hilfe der Rekombinationsfluoreszenz ergibt einen Anteil an $P680^+$ von maximal 0,02 % für eine Zeit von 200 ms nach dem Blitz.)

Zur Ermittlung der Q_B -Inhibition werden im folgenden nur die Mittelwerte von F_M , F_0 und F_{min} verwendet. Die Mittelung erfolgte dabei über die ersten vier Blitze (mit Ausnahme der Messungen bei einer Akzeptorkonzentration von 0 und 5 μ M, hier wurde nur über die ersten drei Blitze gemittelt, da sonst der Fluoreszenzanstieg aufgrund der zunehmenden Reduktion des Plastochinon-Pools zu Verfälschungen führen würde). Abbildung 6.14 zeigt den Anteil blockierter Zentren in Abhängigkeit von der Konzentration der verschiedenen Elektronenakzeptoren.

Die Zugabe der jeweiligen Elektronenakzeptoren bewirkt eine Reduzierung der Q_B -Blockierung um etwa 15 % (ab einer Akzeptorkonzentration von ca. 10 μ M). Der generell unterschiedliche Anteil blockierter Zentren, der sich zwischen den Messreihen ergibt (vor allem im Fall der Messung mit Kalium-Hexacyanoferrat), ist vermutlich auf Unterschiede in den PSII-Präparationen zurückzuführen (die Messungen wurden an verschiedenen Tagen mit verschiedenem Probenmaterial durchgeführt). Über einen eventuellen inhibitorischen Einfluss von Kalium-Hexacyanoferrat ist nichts bekannt.

Da DCBQ und PPBQ als Fluoreszenzlöcher wirken, kommt es bei höheren Akzeptorkonzentrationen zu einem Anstieg der Fluoreszenzverläufe. Durch die mit steigender Akzeptorkonzentration zunehmende Deaktivierung der Anregungszustände verringert sich die Wahrscheinlichkeit des Anregungsenergie transfers von geschlossenen zu offenen Zentren. Das führt zu einer scheinbaren Erhöhung des Anteils der geschlossenen Zentren.

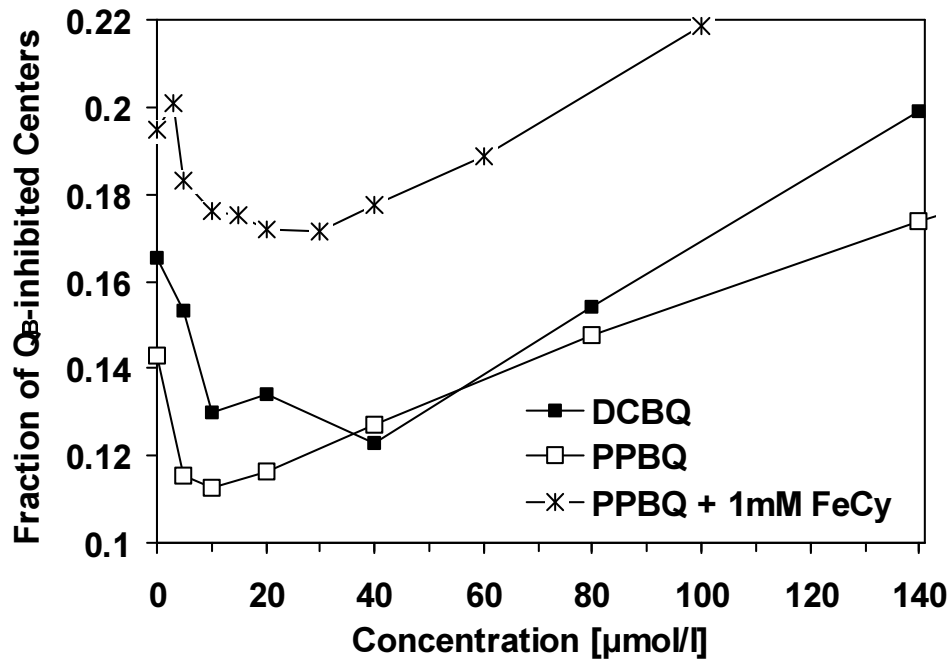


Abbildung 6.14: Anteil der Zentren mit blockiertem $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer in Abhängigkeit von der Konzentration von DCBQ, PPBQ, und PPBQ + 1mM Kalium-Hexacyanoferrat(III).

Dieser Anstieg ist demnach ein messprinzipbedingter Artefakt und spiegelt keine erhöhte Q_B -Blockierung wider.

Ein möglicher Mechanismus für die Verringerung der Q_B -Blockierung ist ein direkter Elektronentransfer vom Q_A zum artifiziellen Elektronenakzeptor. Denkbar ist auch eine Wechselwirkung zwischen Akzeptor und dem Nicht-Häm-Eisen, die zu einer Beschleunigung des $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfers führen könnte [Petrouleas und Diner 1987, Bowes und Crofts 1980]. Aufgrund der bisher nicht verstandenen Modifikationen an der Akzeptorseite, die bei der Herstellung von PSII-Membranpartikeln (Behandlung mit Triton X-100) auftreten, ist eine Erklärung derzeit noch nicht möglich.

Als Ergebnis der Messungen lässt sich festhalten, dass sich durch Zugabe von DCBQ oder PPBQ in einer Konzentration von ca. 10-30 μM der Anteil der Q_B -inhibierten PSII-Zentren um etwa 15 % reduzieren lässt.

6.4 Lichtsättigung von Röntgenabsorptions-Proben

Zur Untersuchung des Lichtsättigungsverhaltens der in Beblitzungsexperimenten (S-zustandsabhängige Röntgenabsorptionsmessungen, optische Spektroskopie) verwendeten Proben aus PSII-Membranpartikeln wurden Absorptionsmessungen an konzentrierten Proben und Suspensionen geringer Chlorophyll-Konzentration durchgeführt. Mit Hilfe des durch diese Messungen bestimmten Absorptionsquerschnitts (bzw. Extinktionskoeffizient) und dem photochemischen Wirkungsquerschnitt, der durch das Sättigungsverhalten der prompten Fluoreszenz sowie durch Messung der Fluoreszenzinduktion bestimmt wird, lassen sich Aussagen über das Sättigungsverhalten in Abhängigkeit von der Eindringtiefe des Anregungsblitzes gewinnen und die Blitzintensität angeben, oberhalb derer alle Photosysteme in der Probe angeregt werden. Eine direkte Bestimmung des Extinktionskoeffizienten an den in Röntgenabsorptions-Experimenten verwendeten hochkonzentrierten Proben ist aufgrund der hohen optischen Dichte nicht möglich. Aus diesem Grund erfolgten die Messungen an ähnlichen, aber optisch weniger dichten Proben, die durch Aufpinseln von PSII-Membranfragmenten auf einen Glasträger und anschließende Trocknung hergestellt wurden.

Probenpräparation und Messung

Die Herstellung der Suspensionen erfolgte wie in Kapitel 2 beschrieben. Zur Präparation der Schichten wurden die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten PSII-Membranpartikel (Chlorophyll-Konzentration 1-4 mg/ml) auf Eis aufgetaut, mit einem Pinsel homogenisiert und auf Glasplättchen aufgespritzt, wobei versucht wurde, möglichst verschiedene Schichtdicken zu erzielen. Anschließend wurden die Schichten zur Verringerung des Wassergehaltes zwischen 4 und 24 Stunden getrocknet. Zur Bestimmung der Chlorophyll-Flächendichte wurde nach der Messung der optischen Dichte von jeder Probe eine Fläche von 1 cm^2 in einem Aceton-Wasser-Gemisch (80 % Aceton, 20 % Wasser) aufgenommen und der Chlorophyllgehalt bestimmt (siehe Kapitel 2).

Um den Einfluss der Lichtstreuung gering zu halten, wurde für die Messung an Suspensionen eine Küvette mit zwei sich gegenüberliegenden rauhen Seitenflächen im Strahlengang verwendet. Bei der Messung an den Schichten wurde ein Diffusor zwischen Probe und Detektor verwendet. Um möglichst viel von der Einfallsrichtung abgelenktes Licht zu detektieren, wurden die Proben jeweils so nahe wie möglich vor dem Detektor platziert (siehe Abbildung 6.15).

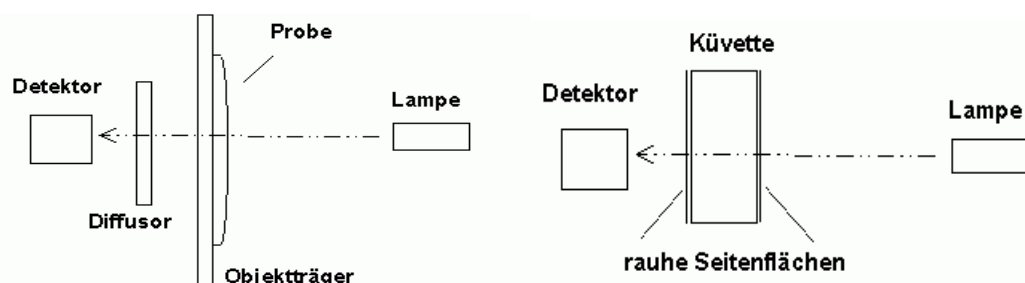


Abbildung 6.15: Messgeometrie für die Bestimmung der optischen Dichte an Schichten (links) und Suspensionen (rechts) von PSII-Membranpartikeln.

Im Falle der Schichten wurde die optische Dichte an verschiedenen Punkten der Oberfläche gemessen und die erhaltenen Werte anschließend gemittelt. Vor den Messungen erfolgte eine Untergrundkorrektur ohne Probe mit Küvette und Puffer bzw. Glasplättchen.

Bestimmung der Extinktionskoeffizienten – Streukorrektur

Es wurde versucht, den Anteil des Streuuntergrundes an der gemessenen Absorption über den Verlauf der Absorptionskurve oberhalb von 780 nm abzuschätzen. Ab dieser Wellenlänge sollte keine Absorption durch PSII-Pigmente stattfinden. Infolge ihrer Größe von einigen 100 nm liefert weder die Rayleigh-Streuung (für Teilchen wesentlich kleiner als die Lichtwellenlänge) noch die Mie-Streuung (für Teilchen größer als die Lichtwellenlänge) eine gute Beschreibung der Streuung. Die Rayleigh-Streuung würde zu einem starken Anstieg des Absorptionssignals zu kleinen Wellenlängen hin führen (die Rayleigh-Streuung ist proportional zu λ^{-4}), die Mie-Streuung zu einem wellenlängenunabhängigen Untergrund. Es wurde versucht, den Kurvenverlauf im Wellenlängenbereich von 780 bis 900 nm durch die Summe beider Streuprozesse zu beschreiben, was jedoch zu keinen sinnvollen Resultaten führte.

Da der Kurvenverlauf oberhalb von etwa 780 nm nahezu linear ist, wurde dieser Bereich mit einer linearen Funktion simuliert und die so erhaltene Streugerade zu kurzen Wellenlängen hin extrapoliert. Die tatsächliche optische Dichte wurde dann aus der Differenz zwischen dem gemessenen Signal und der extrapolierten Streugeraden bei der jeweiligen Wellenlänge ermittelt. Abbildung 6.16 (links) zeigt exemplarisch die an einer Schicht bzw. Suspension gemessenen Spektren zusammen mit der jeweiligen Streugeraden. Die Suspensionen weisen einen größeren Streuuntergrund als die Schichten auf. Ursache hierfür ist vermutlich die unterschiedliche Geometrie des Strahlenganges (siehe Abb. 6.15).

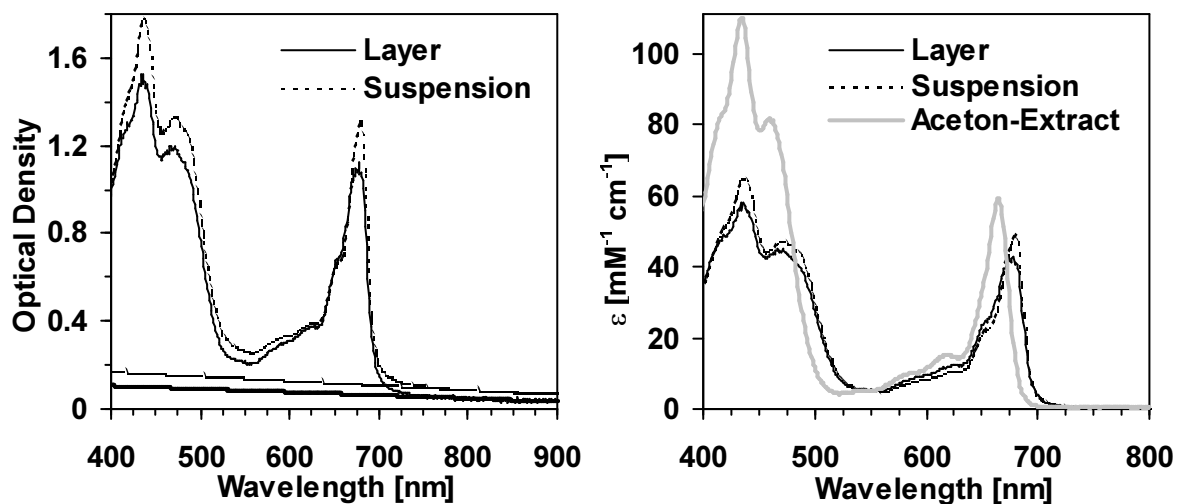


Abbildung 6.16: Absorptionsspektren der Schichten und Suspensionen von PSII-Membranpartikeln. (Chlorophyll-Flächendichte bzw. -Konzentration: $22,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. $\mu\text{g}/\text{ml}$) Links: gemessene optische Dichte und Streuuntergrund (ermittelt aus dem Anstieg der optischen Dichte im Bereich von 900 bis 780 nm). Rechts: berechneter Extinktionskoeffizient (nach Subtraktion des Streuuntergrundes). Ebenfalls dargestellt ist die Extinktion des Aceton-Extraktes.

Abbildung 6.16 (rechts) zeigt die Spektren der Suspension und der Schicht nach Subtraktion des Streuuntergrundes und Umrechnung auf den Extinktionskoeffizienten (nach Gl. 6.10) zusammen mit dem Spektrum des Aceton-Extraktes. Das Maximum der Q_Y -Bande (bei ~ 680 nm) der nativen Proben ist im Vergleich zum Aceton-Extrakt um etwa 25 % verringert, das des Maximums im kurzwelligen Spektralbereich um 45 % (Soret-Bande bei ~ 440 nm). Eine globale Verringerung der Bandenmaxima im PSII-Spektrum ist zu erwarten, da im Photosystem Chlorophyll in verschiedenen spektralen Formen vorliegt (Ursache ist die Verschiebung der Absorptionsbanden infolge von Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung), was im resultierenden Gesamtspektrum zu einer Bandenverbreiterung (ca. 30 %) mit einer entsprechenden Verringerung der Absorptionsmaxima führt. Des weiteren ist eine Verschiebung aller Banden zu längeren Wellenlängen hin zu erkennen (für die Q_Y -Bande um 14 nm, für die Soretbande um 2 nm).

Die nach dem oben beschriebenen Verfahren ermittelten optischen Dichten sind in Abbildung 6.17 für verschiedene Wellenlängen in Abhängigkeit von der Konzentration bzw. Flächendichte dargestellt. Den Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$ (Einheit $\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) erhält man aus dem linearen Zusammenhang zwischen der optischen Dichte (OD) und der Chlorophyll-Konzentration bzw. Chlorophyll-Flächendichte, d.h. aus dem Anstieg der jeweiligen Ausgleichsgeraden:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon dc} = I_0 e^{-\varepsilon \rho_A}$$

$$OD = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \lg e \cdot \varepsilon dc = \lg e \cdot \varepsilon \rho_A \quad (6.10)$$

$$\varepsilon = \frac{OD}{\lg e \cdot dc} = \frac{OD}{\lg e \cdot \rho_A}$$

Hier ist I_0 die Intensität vor der Probe, I die Intensität hinter der Probe, d die Schichtdicke in cm, c die Chlorophyll-Konzentration in mg/cm^3 und ρ_A die Chlorophyll-Flächendichte in mg/cm^2 .

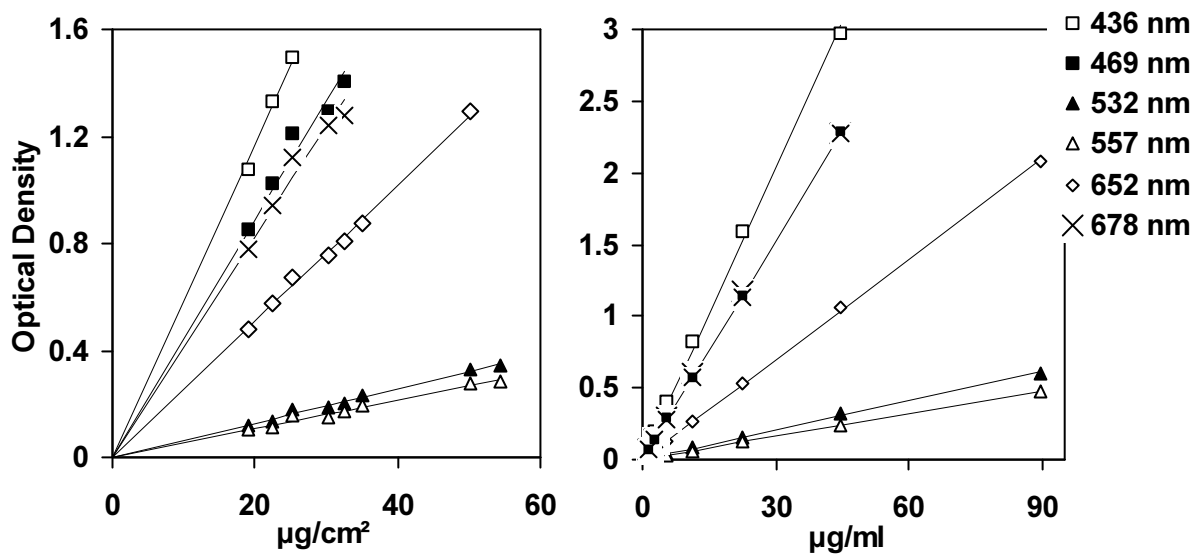


Abbildung 6.17: Optische Dichte der PSII-Membranfragmente in Abhängigkeit von der Konzentration bzw. Flächendichte für verschiedene Wellenlängen. Links: Schichten, Rechts: Suspensionen.

Ergebnisse und Diskussion

Die ermittelten Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Absorptionseigenschaften zwischen Schichten und Suspension. Korrigiert man für das Chlorophyll-a/b-Verhältnis der PSII-Proben (gemessener Wert 2,55, d.h. 72 % Chl-a und 28 % Chl-b) ergibt sich eine Extinktion der Q_Y -Bande von $82366 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. (Für die Q_Y -Bande des Aceton-Extraktes ergibt sich der Korrekturfaktor aus dem Anteil von Chl-a zur gesamten Chlorophyllmenge, da in organischen Lösungsmitteln Chlorophyll-b bei der Maximumwellenlänge der Q_Y -Bande des Chlorophyll-a kaum absorbiert.) Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Werten ($70000\text{-}90000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in Diethylether und Methanol [Lichtenthaler 1987, Eijkelhoff und Dekker 1995, Porra *et al.* 1989]). Für ein Aceton-Wasser-Gemisch wird in [Porra 2002] ein Wert von $77355 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ angegeben.

Wellenlänge	dekadischer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]			
	Schichten	Suspensionen	Wellenlänge	Aceton-Extrakt
436 nm	52841	61048	434 nm	109680
469 nm	41232	45823	459 nm	81472
532 nm	5916	6147	532 nm	4618
557 nm	4907	4805	522 nm	4161
652 nm	22500	20927	-	-
678 nm	38142	46199	664 nm	59139

Tabelle 6.1: Extinktionskoeffizient der PSII-Membranfragmente bei verschiedenen Wellenlängen, ermittelt an Schichten und Suspensionen, sowie die Extinktion des Aceton-Extraktes.

Aus den Messungen an Schichten und an Suspension ergibt sich für eine Wellenlänge von 532 nm ein mittlerer Extinktionskoeffizient von $5993 \pm 400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bzw. $6,659 \pm 0,5 \text{ cm}^2/\text{mg}$. Den entsprechenden Absorptionsquerschnitt σ_{Abs} eines Photosystems mit 200 Chlorophyllen erhält man mit der Avogadrokonstante N_A über die Beziehung

$$\sigma_{\text{Abs}} = \frac{1}{\lg e} \cdot 200 \cdot \varepsilon \frac{1}{N_A} \quad (6.11)$$

Für den Absorptionsquerschnitt eines Photosystems ergibt sich dann ein Wert von $\sigma_{\text{Abs}} = (4,61 \pm 0,35) \times 10^{-19} \text{ m}^2$.

Photochemischer Wirkungsquerschnitt

Um zu Aussagen über die Sättigung der photochemischen Ladungstrennung in Abhängigkeit von der Eindringtiefe zu gelangen, muss außer dem Absorptionsquerschnitt σ_{Abs} der Wirkungsquerschnitt für die photochemische Ladungstrennung σ_{Wirk} bekannt sein. Die Bestimmung von σ_{Wirk} erfolgt im Kapitel 7 durch die Analyse der DCMU-Fluoreszenzinduktion. Es wird dort ein Wert von $2,23 \times 10^{-19} \text{ m}^2$ ermittelt.

Eine zweite Methode zur Bestimmung von σ_{Wirk} beruht auf der Zunahme der Quantenausbeute der prompten Fluoreszenz infolge des durch Blitzanregung gebildeten Q_A^- (siehe Kapitel 7 Abschnitt 2). Die Messung der blitzinduzierten Zunahme der prompten Fluoreszenz, $F-F_0$, in Abhängigkeit von der Blitzintensität ist in Kapitel 4 beschrieben. Aus den gemessenen $F-F_0$ -Werten lässt sich unter Berücksichtigung der PSII-Konnektivität der Anteil an gebildetem Q_A^- berechnen. σ_{Wirk} erhält man dann aus der Simulation der Intensitätsabhängigkeit von $[Q_A^-]$ mit der folgenden Funktion:

$$[Q_A^-] = A(1 - e^{-I \cdot \sigma_{\text{Wirk}}}) \quad (6.12)$$

Hier ist I die Blitzintensität in Photonen pro m^2 . Abbildung 6.18 zeigt $[Q_A^-]$ in Abhängigkeit von der Blitzintensität zusammen mit der Simulationskurve. Zur Berechnung von $[Q_A^-]$ wurde der in Kapitel 7 ermittelte Konnektivitätsparameter von 0,32 verwendet. Es ergibt sich ein Wirkungsquerschnitt von $2,25 \times 10^{-19} \text{ m}^2$, in sehr guter Übereinstimmung mit dem Wert, der in dem Fluoreszenzinduktion-Experiment ermittelt wurde.

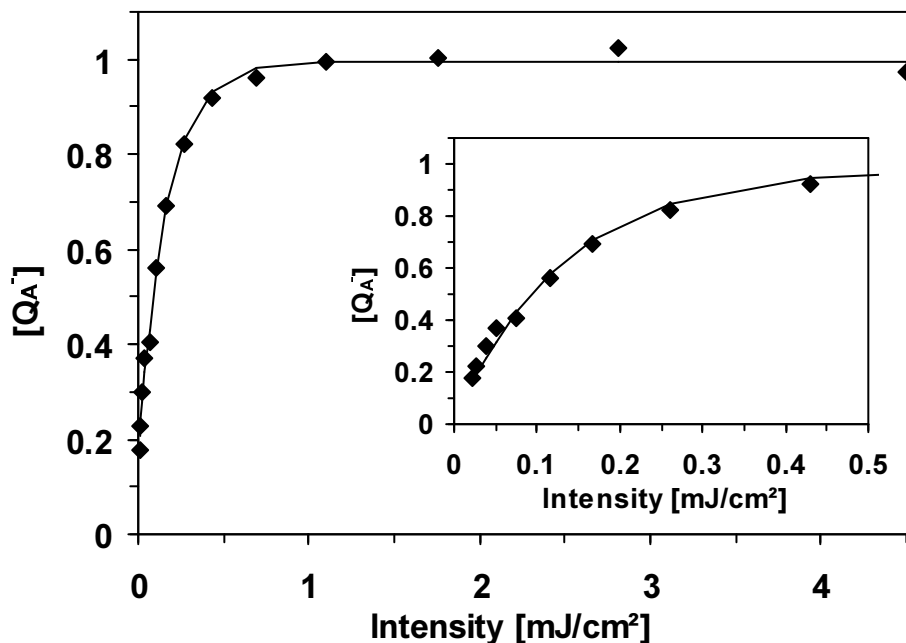


Abbildung 6.18: Sättigungsverhalten der blitzinduzierten Q_A^- -Bildung bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm (Quadrate) und einfach-exponentielle Simulation mit $[Q_A^-] = A(1 - \exp(-\sigma_{\text{Wirk}}I))$. Der ermittelte Wirkungsquerschnitt σ_{Wirk} beträgt $2,25 \times 10^{-19} \text{ m}^2$. Die Q_A^- -Konzentration wurde nach $[Q_A^-] = (F-F_0)/\{(F_M-F_0)+p(F-F_M)\}$ (Gl. 6.2) aus der in Abschnitt 4.4 bestimmten Blitzintensitäts-Abhängigkeit der prompten Fluoreszenz ermittelt. Der zur Berechnung von $[Q_A^-]$ verwendete Konnektivitätsparameter p betrug 0,32 (siehe Abschnitt 7.2).

Das Verhältnis von photochemischem Wirkungsquerschnitt zu Absorptionsquerschnitt entspricht dem Anteil an absorbierten Photonen, die nicht zur photochemischen Ladungstrennung beitragen (bei nichtsättigender Anregung, so dass maximal ein Photon pro PSII und Blitz absorbiert wird). Aus den hier ermittelten Werten von σ_{Wirk} und σ_{Abs} folgt, dass nur etwa die Hälfte der absorbierten Photonen photochemisch umgesetzt werden. Tabelle 6.2

zeigt eine Zusammenstellung der entsprechenden Werte. Diese geringe Effizienz lässt dadurch erklären, dass bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm ein großer Teil der Lichtenergie durch Karotinoide absorbiert wird. Der zur photochemischen Nutzung dieser Karotinoidanregung notwendige Energietransfer von Karotinoid- zu Chlorophyllmolekülen ist anscheinend weniger effizient als der Energietransfer zwischen Chlorophyllen [Govindjee 1999], was den hier ermittelten Unterschied zwischen Absorptions- und Wirkungsquerschnitt erklären würde.

	Absorptionsmessung an Schichten	Absorptionsmessung an Suspension	Q_A^- -Sättigung prompte Fluoreszenz	Fluoreszenz-Induktionsmessung
σ_{Abs}	$4,52 \times 10^{-19} \text{ m}^2$	$4,70 \times 10^{-19} \text{ m}^2$		
σ_{Wirk}			$2,25 \times 10^{-19} \text{ m}^2$	$2,23 \times 10^{-19} \text{ m}^2$
$\sigma_{\text{Wirk}}/\sigma_{\text{Abs}}$			0,488	0,485

Tabelle 6.2: Absorptionsquerschnitt σ_{Abs} und Wirkungsquerschnitt σ_{Wirk} sowie der Anteil der nicht zur Photochemie beitragenden Absorption $\sigma_{\text{Wirk}}/\sigma_{\text{Abs}}$.

Lichtsättigungsverhalten von konzentrierten XAS-Proben

Den Anteil der Zentren, in denen keine blitzinduzierte Ladungstrennung ausgelöst wird, $[PSII_0]$, ergibt sich nach der Poisson-Statistik aus der Blitzintensität I (Zahl der Photonen pro m^2 und Laserpuls) und dem Wirkungsquerschnitt für die Ladungstrennung σ_{Wirk} (in m^2) zu

$$[PSII_0] = e^{-\sigma_{\text{Wirk}} \cdot I} \quad (6.13)$$

Bei beidseitiger Belichtung der Probe erhält man $[PSII_0]$ in Abhängigkeit von der Eindringtiefe nach:

$$[PSII_0](x) = e^{-\sigma_{\text{Wirk}} \frac{E \cdot \lambda (hc)^{-1}}{A} \left(10^{-\epsilon x [\text{Chl}]} + 10^{-\epsilon (d-x) [\text{Chl}]} \right)} \quad (6.14)$$

Dabei ist E die Energie des Laserpulses in J, x die optische Eindringtiefe in cm, A die beblitzte Fläche in cm^2 , d die Probendicke in cm, $[\text{Chl}]$ die Chlorophyll-Konzentration in mol/l (bzw. mg/cm^3) und ϵ der Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (bzw. $\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Abbildung 6.19 (links) veranschaulicht den Prozentsatz der nicht getroffenen Photosysteme in Abhängigkeit von der Eindringtiefe bei beidseitiger Belichtung der Probe für verschiedene Chlorophyll-Flächendichten. Als Laserpuls-Energie wurden $20 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ je Probenseite angenommen. In Abbildung 6.19 (rechts) ist der Prozentsatz der insgesamt nicht getroffenen Zentren, der sich durch Integration von $[PSII_0]$ über die Schichtdicke ergibt, in Abhängigkeit von der Chlorophyll-Flächendichte für drei verschiedene Laserpuls-Intensitäten dargestellt.

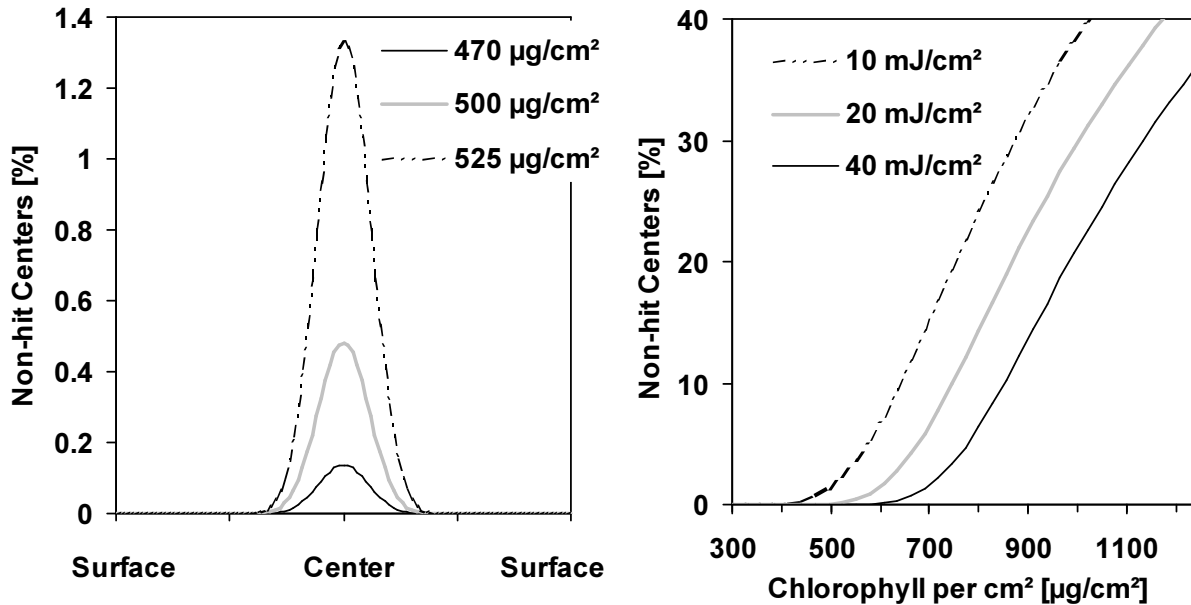


Abbildung 6.19: Sättigungsverhalten der XAS-Proben. Links: Anteil nicht getroffener PSII-Zentren in Abhängigkeit von der Eindringtiefe beim beidseitigen Laserbeblitzen für verschiedene Chlorophyll-Flächendichten bei einer Blitzintensität von $20 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ je Probenseite. Rechts: Gesamtanteil nicht getroffener Zentren in Abhängigkeit von der Chlorophyll-Flächendichte für verschiedene Blitzintensitäten.

Lichtsättigung in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge

Die Analyse der Sättigung in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge zeigt, dass es vorteilhaft ist, in der Absorptionslücke des Chlorophylls anzuregen. In Abbildung 6.20 ist die berechnete Abhängigkeit der Sättigung von der Wellenlänge für eine Chlorophyll-Flächendichte von $500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und eine Blitzintensität von $20 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ je Probenseite dargestellt. Angenommen wurde vereinfachend, dass das für 532 nm gefundene Verhältnis von Absorptions- zu Wirkungsquerschnitt von etwa $0,5$ für alle Wellenlängen gilt. Man erkennt, dass sich bei einer Anregung im Bereich geringer Absorption zwischen etwa 520 und 600 nm am leichtesten Sättigung erreichen lässt. Hier ist zwar die Absorption der Photosysteme gering, dafür ist die Eindringtiefe des Lichtes in diesem Bereich am größten, weswegen auch in der Probenmitte noch Sättigungsintensität erreicht wird.

Die bei XAS-Experimenten verwendeten Proben haben eine Chlorophyll-Flächendichte von maximal $500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Bei einer Pulsintensität von nur $10 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ergibt sich ein Sättigungsgrad von über 98% , ab $20 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ Pulsintensität ist vollständige Sättigung der gesamten Probe gewährleistet. In Abbildung 6.21 ist das Sättigungsverhalten für die in dieser Arbeit in optischen Experimenten verwendeten Suspensionen (einseitige Belichtung) sowie für die in XAS-Experimenten untersuchten hochkonzentrierten Proben (beidseitige Belichtung) dargestellt.

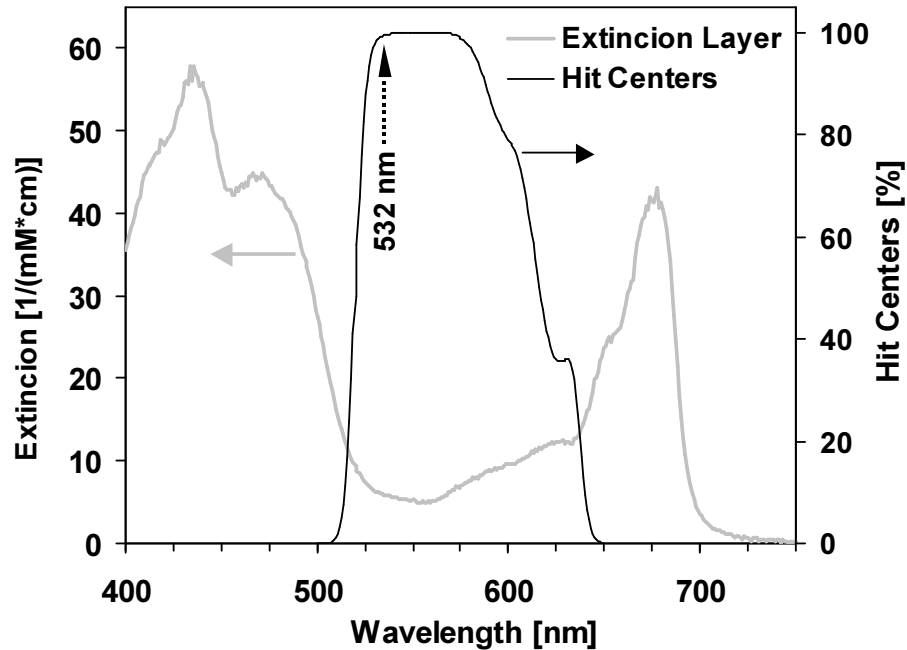


Abbildung 6.20: Anteil der getroffenen Photosysteme in der Probenmitte bei beidseitigem Laser-Beblitzen in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge (schwarze Linie, rechte Größenachse). Zur Veranschaulichung ist gleichzeitig das Extinktionsspektrum der PSII-Membranpartikel dargestellt (graue Linie, linke Größenachse). Angenommen wurde: $\sigma_{\text{Abs}}(532 \text{ nm}) = 4.61 \times 10^{-19} \text{ m}^2$, $\sigma_{\text{Wirk}} = 0,5\sigma_{\text{Abs}}$, 20 mJ/cm^2 pro Seite, Chlorophyll-Flächendichte: $500 \mu\text{g/cm}^2$.

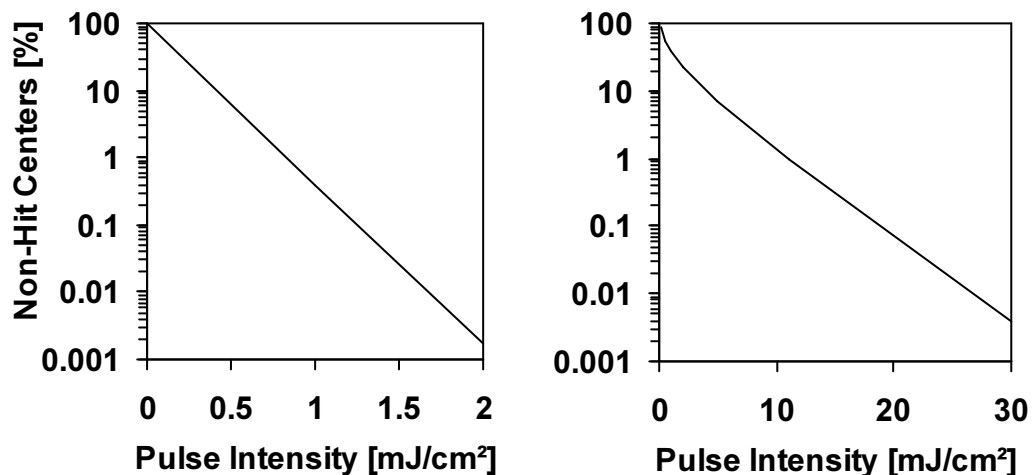


Abbildung 6.21: Zahl der nicht getroffenen Photosysteme in Abhängigkeit von der Pulsintensität ($\lambda = 532 \text{ nm}$). Links: Suspension mit einer Chlorophyll-Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ bei einseitiger Belichtung und einer Schichtdicke von 1 cm . Rechts: Schicht mit einer Chlorophyll-Flächendichte von $500 \mu\text{g/cm}^2$ bei beidseitiger Belichtung.