

## 7. Energetische Parameter der primären und sekundären Ladungstrennung

In diesem Abschnitt wird der Unterschied in der freien Energiedifferenz  $\Delta G_Z^*$  zwischen dem angeregten Antennenzustand ( $\text{Ant}^*$ ) und dem ladungsseparierten Zustand  $\text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-$  ermittelt. Genutzt wird dafür der in Kapitel 4 beschriebene Zusammenhang zwischen der Intensität der Rekombinationsfluoreszenz und dem freien Energieunterschied zum angeregten Antennenzustand. Unter Einbeziehung von Literaturwerten werden die freien Energieunterschiede zwischen den sukzessive durchlaufenen ladungsseparierten Zuständen sowie die Redoxpotentiale der am Elektronentransfer beteiligten Gruppen abgeleitet.

### 7.1 Energetik und Fluoreszenzintensität

Das der folgenden Ableitung zugrunde liegende Modell ist in Kapitel 4 beschrieben. Abbildung 7.1 zeigt die für dieses Kapitel relevanten ladungsseparierten Zustände des PSII mit den entsprechenden freien Energiedifferenzen.

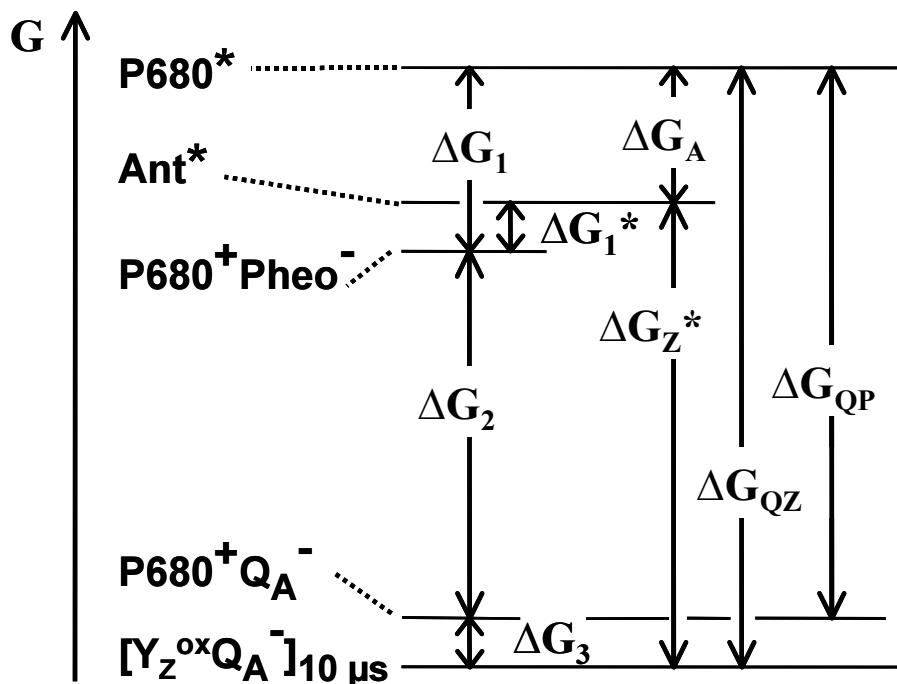


Abbildung 7.1: Energiediagramm der ladungsseparierten Zustände des PSII.

Grundlage der hier gemachten Betrachtung ist der 10  $\mu\text{s}$  nach dem dritten Blitz erreichte ladungsseparierte Zustand  $Y_Z^+Q_A^-$ . Es gilt folgende Relation zwischen der Besetzungswahrscheinlichkeit der Zustände  $Ant^*$  und  $Y_Z^+Q_A^-$  und der entsprechenden freien Energiedifferenz  $\Delta G_Z^*$ :

$$\frac{[Ant^*]}{[Y_Z^+Q_A^-]_{10\mu s}} = e^{\Delta G_Z^*/kT}. \quad (7.1)$$

Mit dem Wirkungsgrad des Detektorsystems  $C_F$  ist die experimentell gemessene Intensität der Rekombinationsfluoreszenz nach der Anregung von  $n_{PSII}$  Photosystemen mit einem sättigenden Blitz gegeben durch (siehe Kapitel 4):

$$F_D^{10\mu s} = C_F k_F n_{PSII} [Y_Z^+Q_A^-]_{10\mu s} e^{\Delta G_Z^*/kT}. \quad (7.2)$$

Das liefert einen direkten Zusammenhang zwischen gemessener Fluoreszenzintensität und  $\Delta G_Z^*$ . Bekannt sein müssen lediglich die Besetzungswahrscheinlichkeit des  $Y_Z^+Q_A^-$ -Zustandes und der Faktor  $C_F k_F n_{PSII}$ . Dieser lässt sich durch Messung der prompten Fluoreszenz ermitteln. Die Intensität der prompten Fluoreszenz ergibt sich aus der Lebensdauer des angeregten Antennenzustandes  $\tau_F$ , dem Wirkungsquerschnitt  $\sigma_{Abs}$  und der Anregungsintensität  $I_A$  wie folgt:

$$F_P = C_M k_F n_{PSII} \tau_F \sigma_{Abs} I_A. \quad (7.3)$$

Zusammen mit Gleichung 7.2 erhält man dann für  $\Delta G_Z^*$ :

$$\Delta G_Z^* = kT \ln \left( \frac{F_D \sigma_{Abs} I_A \tau_F}{F_P [Y_Z^+Q_A^-]} \right). \quad (7.4)$$

Diese Relation gilt unabhängig davon, ob die prompte Fluoreszenz im  $F_0$ - oder  $F_M$ -Zustand (oder einem beliebigen Zwischenzustand) gemessen wird, Voraussetzung ist lediglich, dass sich die Fluoreszenzlebensdauer auf den betrachteten Zustand bezieht. Gewählt wurde hier der  $F_0$ -Zustand, dessen Fluoreszenzlebensdauer nach [Dau und Sauer 1996] 240 ps beträgt (gemessen an PSII-Membranpartikeln). Aufgrund geringer Unterschiede in Probenpräparation und Versuchsbedingungen (siehe [Dau und Sauer 1996]) wird eine Ungenauigkeit von  $\pm 20\%$  angenommen. Des weiteren ist die Kenntnis der Besetzungswahrscheinlichkeit des  $Y_Z^+Q_A^-$ -Zustandes zum untersuchten Zeitpunkt notwendig. Nach [Jeans *et al.* 2002] liegt  $Y_Z$  10  $\mu\text{s}$  nach der Anregung zu etwa 80 % in oxidiert Form vor (mit einem geschätzten Fehler von  $\pm 10\%$ ).  $Q_A$  ist nach 10  $\mu\text{s}$  praktisch vollständig reduziert. Für die Besetzungswahrscheinlichkeit des  $P680^+Q_A^-$ -Zustandes kann somit ein Wert von  $0,8 \pm 0,1$  angenommen werden. Die Bestimmung des Wirkungsquerschnittes (bzw. des Produktes  $\sigma_{Abs} I_A$ ) erfolgte über ein Fluoreszenz-Induktionsexperiment, das im folgenden beschrieben wird.

## 7.2 Bestimmung von Anregungsrate und Rekombinationsfluoreszenz

Wird durch die Zugabe eines geeigneten Inhibitors die  $Q_B$ -Bindungsstelle des PSII blockiert, kann das durch die sekundäre Ladungstrennung gebildete  $Q_A^-$  nicht durch Elektronentransfer zum  $Q_B$  reoxidiert werden. Unter konstanter Beleuchtung nimmt der Anteil der Zentren mit reduziertem  $Q_A$  kontinuierlich zu, was zu einem entsprechenden Anstieg der prompten Fluoreszenz vom initialen  $F_0$ - bis zum  $F_M$ -Pegel führt (siehe Kapitel 4). Vernachlässigt man die PSII-Konnektivität, ist die Rate der  $Q_A$ -Reduktion, und damit die Rate des Fluoreszenzanstieges, bestimmt vom Produkt aus Wirkungsquerschnitt und Anregungsintensität  $\sigma_{Abs}I_A$ . ( $\sigma_{Abs}I_A$  ergibt sich dann aus dem Anfangsanstieg der Induktionskurve.) Der hier verwendete genauere Ansatz zur Ermittlung von  $\sigma_{Abs}I_A$  aus der Fluoreszenzinduktion berücksichtigt die PSII-Konnektivität und ist Anhang (A.3) beschrieben. Keine Berücksichtigung fand eine mögliche Inhomogenität in der Antennengröße (PSII $_{\beta}$ -Units, ein entsprechender Simulationsansatz wurde getestet, führte aber zu einem unsinnig großen Anteil an PSII $_{\beta}$ -Units) sowie eventuelle Rekombinations- oder Verlustprozesse. (Eine ausführliche Darstellung der PSII-Fluoreszenzinduktion findet sich in [Lazar 1999].)

Erfolgt die Fluoreszenz-Induktionsmessung an demselben Messaufbau wie die Messungen der Rekombinationsfluoreszenz, liefert die Fluoreszenz-Induktionsmessung gleichzeitig die Intensität der prompten Fluoreszenz  $F_p$  (hier die  $F_0$ -Intensität), die in Gleichung 7.4 benötigt wird. Voraussetzung dafür ist, dass prompte Fluoreszenz und Rekombinationsfluoreszenz unter identischen Versuchsbedingungen gemessen werden (Probenkonzentration, Messpuffer, Temperatur).

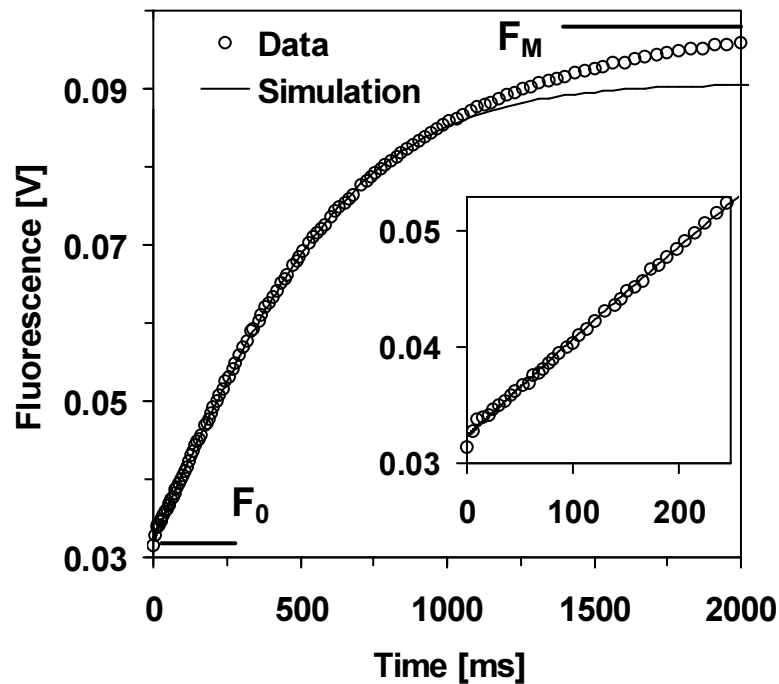
Beide Messungen erfolgten am selben Versuchstag am Messaufbau der Rekombinationsfluoreszenz unter identischen Bedingungen. Es wurde dieselbe PSII-Präparation verwendet. Die Chlorophyll-Konzentration betrug 10  $\mu\text{g/ml}$  (Puffer A, pH 6,4). Um thermisch aktivierte Deaktivierungsprozesse zu minimieren, wurde eine Proben temperatur von 5  $^{\circ}\text{C}$  gewählt. In beiden Messungen wurde DCBQ in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  zugegeben. Zur Anregung der prompten Fluoreszenz wurde ein cw-Neodym-YAG-Laserpointer (Atelier Rieter, Germany) mit einer Emissionswellenlänge 532 nm verwendet. Der Laserstrahl wurde über ein Linsensystem aufgeweitet und anschließend parallelisiert, um die Probe identisch zur Messung der Rekombinationsfluoreszenz auszuleuchten. Die Anregungsintensität betrug 16  $\mu\text{E}$  (16  $\mu\text{mol}$  Photonen pro  $\text{m}^2$  und s), gemessen mit einem Light Meter LI-189 (LI-COR). Die  $Q_B$ -Blockierung erfolgte durch Zugabe des Herbizids DCMU in einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$ . (Kontrollmessungen zur DCMU-abhängigen Blockierung ergaben eine vollständige Inhibition für Konzentrationen oberhalb 30  $\mu\text{M}$ .)

Die Ermittlung von  $\sigma_{Abs}I_A$  erfolgte durch Simulation der Fluoreszenzinduktion mit dem im Anhang (A.3) beschriebenen Ansatz. Abbildung 7.2 zeigt die gemessene Fluoreszenzinduktion zusammen mit der Simulation.

Infolge der geringen Anregungsintensität nimmt die Fluoreszenzintensität relativ langsam zu (typische Experimente zur Fluoreszenz-Induktion führen innerhalb einer Größenordnung von 100  $\mu\text{s}$  zum Erreichen des  $F_M$ -Pegels). Um den Einfluss von konkurrierenden Rekombinations- und Verlustprozessen gering zu halten, wurde daher die Simulation auf den Bereich bis 1000 ms beschränkt.

Die Simulation liefert einen Wert für  $\sigma_{Abs}I_A$  von 2,15  $\text{s}^{-1}$ . Aufgrund der Vernachlässigung einer eventuellen Heterogenität in der PSII-Antennengröße (PSII $_{\beta}$ -units, [Lazar 1999, Melis

und Homann 1975]) und möglicher Ungenauigkeiten in der Modellierung der PSII-Konnektivität (Nichtberücksichtigung der dimeren PSII-Organisation) wird ein Fehler von  $\pm 25\%$  angenommen. Der entsprechende Wirkungsquerschnitt beträgt  $2,24 \times 10^{-19} \text{ m}^2$ , was gut mit dem Intensitäts-Sättigungsverhalten des *pump-probe*-Experiments in Kapitel 5, Abschnitt 3 übereinstimmt. Die  $F_0$ -Intensität (gemessen als Photomultiplier-Spannung) betrug  $0,032 \text{ V}$  mit einem geschätzten Fehler von  $\pm 10\%$ .



**Abbildung 7.2:** DCMU-Fluoreszenzinduktion und Simulation (Erläuterungen siehe Text).

Mit dem durch die Simulation der Fluoreszenzinduktion ermittelten Konnektivitätsparameter von  $0,318$  ist es möglich, die in Kapitel 4 (Abschnitt 4) bei der Bestimmung der Sättigungsintensität gemessenen Fluoreszenzwerte mit Hilfe von Gleichung 6.2 in die Konzentration von  $Q_A^-$  umzurechnen. Aus der Abhängigkeit der  $Q_A^-$ -Konzentration,  $[Q_A^-]$ , von der Blitzintensität lässt sich dann durch einfach-exponentielle Simulation der Wirkungsquerschnitt bestimmen. In Abbildung 6.18 (Kapitel 6) ist die Abhängigkeit der durch den Blitz gebildeten Menge an  $Q_A^-$  von der Blitzintensität dargestellt. Die Simulation ergibt einen Wirkungsquerschnitt von  $2,25 \times 10^{-19} \text{ m}^2$ , in sehr guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Fluoreszenzinduktionsmessung.

### 7.3 Freie Energiedifferenzen und Redoxpotentiale

#### $\Delta G_Z^*$

Die Messung der Rekombinationsfluoreszenz ergab einen Wert von 0,663 V (Photomultiplier-Spannung) mit einem geschätzten Fehler von  $\pm 10\%$ . Mit den Ergebnissen der Fluoreszenz-Induktionsmessung ergibt sich ein  $\Delta G_Z^*$  von  $-434 \pm 17$  meV.

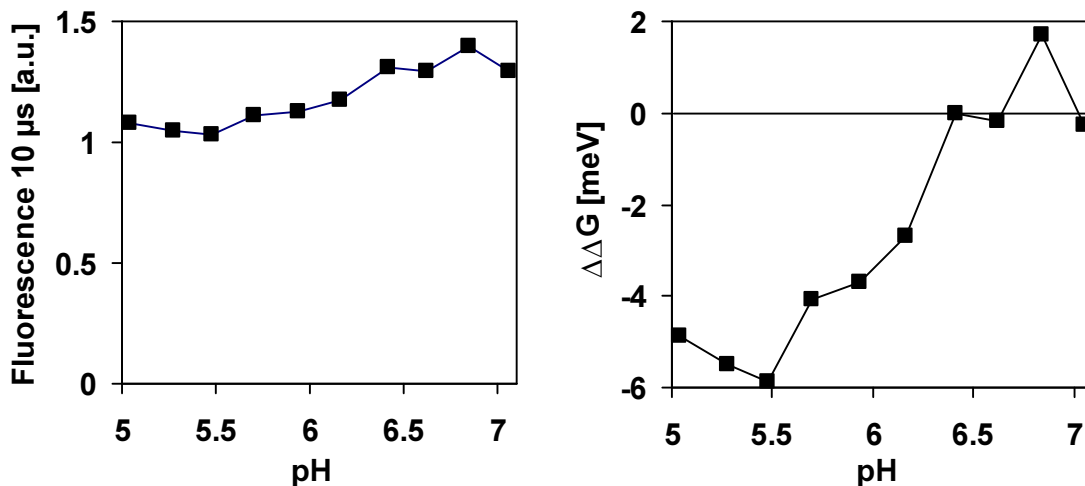
Eine temperaturabhängige Verringerung des  $F_M$ - und  $F_0$ -Pegels der prompten Fluoreszenz (Verminderung von  $F_0$  um 25 % und  $F_M$  um 45 % für einen Temperaturanstieg von 0 auf 30 °C, siehe Abbildung 8.4) lässt darauf schließen, dass bei höheren Temperaturen eine Abnahme der Besetzung des angeregten Antennenzustandes ( $Ant^*$ ) infolge erhöhter thermischer Deaktivierung angeregter Antennenzustände erfolgt. Es wird abgeschätzt, dass sich die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz infolge dieser Deaktivierung (im Vergleich mit dem aus Gleichung 7.2 resultierenden Wert) um 4-10 % verringert. Eine vergleichbare Intensitätsverringern ergibt sich bei Berücksichtigung der 9 % *misses* (Kapitel 5, Abschnitt 1). Beide Faktoren führen zu einem um  $5 \pm 2,5$  meV größeren Wert von  $\Delta G_Z^*$ , für das sich somit ein Wert von  $-429$  meV  $\pm 20$  meV ergibt..

#### pH-Abhängigkeit von $\Delta G_Z^*$

Der  $F_0$ -Pegel (und  $F_M$ -Pegel) der prompten Fluoreszenz ist nicht vom pH-Wert abhängig, wie aus Abbildung 8.10 ersichtlich wird. Unter der Annahme, dass sich alle weiteren Größen in Gleichung 7.4 nicht wesentlich mit dem pH-Wert ändern, ergibt sich die pH-Abhängigkeit von  $\Delta G_Z^*$  aus der pH-Abhängigkeit der Rekombinationsfluoreszenz:

$$\Delta_{pH} \Delta G_Z^* = kT \frac{\Delta_{pH} F_D}{F_D} \quad (7.5)$$

Die pH-Abhängigkeit der Rekombinationsfluoreszenz bei 10  $\mu$ s wurde im Bereich von pH 5 bis 7 ermittelt. Abbildung 7.3 zeigt den pH-Verlauf der Rekombinationsfluoreszenz sowie die daraus nach Gleichung 7.5 abgeleitete  $\Delta G_Z^*$ -Änderung.



**Abbildung 7.3:** pH-Abhängigkeit des 10  $\mu$ s-Wertes der Rekombinationsfluoreszenz und die daraus resultierende Änderung von  $\Delta G_Z^*$  (gemessen bei 20 °C).

Die Variation von  $\Delta G_Z^*$  mit dem pH-Wert beträgt etwa 1 %. Dieser Wert verringert sich noch, wenn man berücksichtigt, dass der *miss*-Parameter mit fallendem pH-Wert zunimmt, da infolge der dann stärkeren Durchmischung der S-Zustände die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz nach dem dritten Blitz abnimmt.  $\Delta G_Z^*$  kann also als weitgehend pH-unabhängig angesehen werden.

### Ableitung der freien Energiedifferenzen

Der ermittelte  $\Delta G_Z^*$ -Wert bezieht sich auf die freie Energie des angeregten Antennenzustandes, der durch eine Äquilibrierung der Anregung über die etwa 200 Chlorophyll-Moleküle des PSII charakterisiert ist. Daraus resultiert ein signifikanter entropischer Beitrag zur freien Energie des angeregten Antennenzustandes. Die freie Energie des P680\*-Zustandes (bzw. sein enthalpischer Beitrag im Fall eines multimeren P680\*-Zustandes) liegt um etwa 110 meV über dem angeregten Antennenzustand, was zu einer freien Energiedifferenz von -545 meV zwischen den Zuständen P680\* und  $[Y_Z^+Q_A^-]_{10\mu s}$  führt. Aus Figure 1 in [Jeans *et al.* 2002] erhält man für 10  $\mu s$  nach dem dritten Blitz eine Gleichgewichtskonstante von etwa 4,9 für die  $Y_Z$ -Oxidation durch P680<sup>+</sup> die einem  $\Delta G_3$  von -38 meV entspricht. Die Analyse der Pikosekunden-Fluoreszenz von PSII-Membranpartikeln [Dau und Sauer 1996] auf der Basis des Reversiblen-Radikalpaar-Modells [Schatz *et al.* 1988], unter Beachtung der Exziton-Äquilibrierungskomponente, führt zu einer freien Energiedifferenz  $\Delta G_1$  von -161 meV zwischen dem P680\*- und dem P680<sup>+</sup>Phe<sup>-</sup>-Zustand, in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von [Gibasiewicz *et al.* 2001] und [Leibl *et al.* 1989]. Unter Verwendung von  $\Delta G_1 = -161$  meV erhält man für die freie Energiedifferenz zwischen P680<sup>+</sup>Phe<sup>-</sup> und P680<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> ( $\Delta G_2$ ) einen Wert von -341 meV. In Tabelle 7.1 sind die freien Energiedifferenzen und die daraus abgeleiteten Redoxpotentiale zusammengefasst.

### Redoxpotentiale

Zur Ableitung der Redoxpotentiale wird angenommen, dass die Differenzen der Redoxpotentiale,  $\Delta E$ , den Differenzen der freien Energie,  $\Delta G$ , entsprechen:

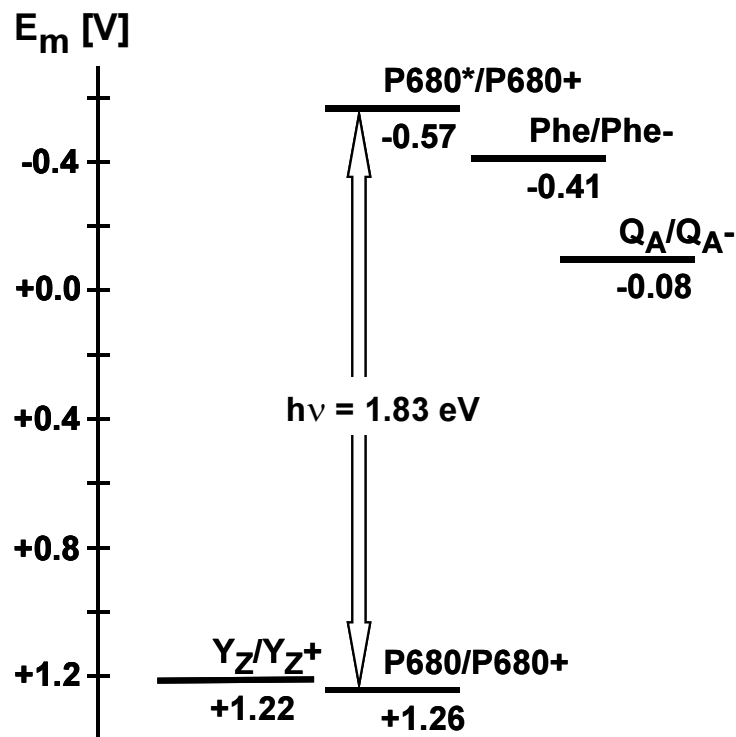
$$\Delta E = \frac{\Delta G}{e} \quad (7.6)$$

$e$  ist die Elementarladung. Als Bezugspunkt zur Bestimmung der „absoluten“ Redoxpotentiale (bezogen die Standard-Wasserstoffelektrode) wird das Potential des Redoxpaares  $Q_A/Q_A^-$  verwendet, für das in [Krieger *et al.* 1995] ein Wert von -80 mV angegeben wird (siehe Diskussion). Daraus ergeben sich direkt die Redoxpotentiale des primären Donors P680/P680<sup>+</sup>, des  $Y_Z/Y_Z^+$  und des primären Akzeptors Phe<sup>-</sup>/Phe (siehe Tabelle 7.1).

## 7. Energetische Parameter der primären und sekundären Ladungstrennung

	Zusätzliche Annahmen	Größe	Wert
1	Ergebnis dieser Arbeit; $\tau_{F0} = 240 \pm 50 \text{ ps}^a$	$\Delta G_{Z^*}$ für $\text{Chl}_{200}^* \leftrightarrow [\text{Q}_A^-, \text{Y}_Z^+]_{10 \mu\text{s}}$	$-429 \pm 20 \text{ meV}$
2	Antennenentropie, $\Delta G_A$ , von $111 \pm 6,5 \text{ meV}^a$	$\Delta G_{QZ}$ für $\text{P680}^* \leftrightarrow [\text{Q}_A^-, \text{Y}_Z^+]_{10 \mu\text{s}}$	$-540 \pm 27 \text{ meV}$
3	$\Delta G_3$ für $[\text{P680}^+, \text{Y}_Z] \leftrightarrow [\text{P680}, \text{Y}_Z^+]$ bei $10 \mu\text{s}$ beträgt $38 \pm 10 \text{ meV}^b$	$\Delta G_{QP}$ für $\text{P680}^* \leftrightarrow [\text{Q}_A^-, \text{P680}^+]$	$-502 \pm 37 \text{ meV}$
4	$\Delta G_1$ für $\text{P680}^* \leftrightarrow [\text{Phe}^-, \text{P680}^+]_{1\text{ns}}$ beträgt $161 \text{ meV}$ oder $\Delta G_1^* = 50 \pm 7 \text{ meV}^a$	$\Delta G_2$ für $[\text{Phe}^-, \text{P680}^+] \leftrightarrow [\text{Q}_A^-, \text{P680}^+]$	$-341 \pm 37^d \text{ meV}$
5	$E_{\text{P680}^*} -  \Delta G_{QP} $ ist gleich der Redoxpotentialdifferenz, $\Delta E_{1/2}^{\text{QP}} =$	$E_{1/2}(\text{P680}/\text{P680}^+) - E_{1/2}(\text{Q}_A/\text{Q}_A^-)$	$+1.33 \text{ V}$
6	$E_{1/2}(\text{Q}_A/\text{Q}_A^-) = -80 \text{ mV}^c$ $E_{1/2}(\text{Q}_A/\text{Q}_A^-) + \Delta E_{1/2}^{\text{QP}} =$	$E_{1/2}(\text{P680}/\text{P680}^+)$	$+1.26 \text{ V}$
7	$E_{1/2}(\text{P680}/\text{P680}^+) -  \Delta G_3  =$	$E_{1/2}(\text{Y}_Z/\text{Y}_Z^+)_{10\mu\text{s}}$	$+1.22 \text{ V}$
8	$E_{1/2}(\text{Q}_A/\text{Q}_A^-) -  \Delta G_2  =$	$E_{1/2}(\text{Phe}/\text{Phe}^-)_{1\text{ns}}$	$-0.41 \text{ V}$
9	$E_{1/2}(\text{Q}_A/\text{Q}_A^-) -  \Delta G_{QP}  =$	$E_{1/2}(\text{P680}^*/\text{P680}^+)_{1\text{ns}}$	$-0.57 \text{ V}$

**Tabelle 7.1:** Berechnung der freien Energiedifferenzen und Ableitung der Redoxpotentiale (a: [Dau und Sauer 1996], b: [Jeans *et al.* 2002], c: [Krieger *et al.* 1995], d: Der Fehler der Antennenentropie geht nicht mit ein, weil  $\Delta G_1^*$  direkt aus den Daten von [Dau und Sauer 1996] berechnet wurde.)



**Abbildung 7.4:** Redoxpotentiale der Elektronentransfer-Komponenten des PSII (in Volt). Der Pfeil entspricht der zur Energie eines 680 nm-Photons äquivalenten Potentialdifferenz.

## 7.4 Diskussion

### $\Delta G$ -Werte

Die ermittelte freie Energiedifferenz zwischen dem angeregten Antennenzustand und dem  $Y_Z^+Q_A^-$ -Zustand, der 10  $\mu$ s nach der Photonenabsorption im  $S_3$ -Zustand erreicht wird, beträgt  $-429 \pm 20$  meV. Der abgeschätzte Fehler von  $\pm 20$  meV erscheint klein, entspricht aber einem Bereich für die korrespondierende Gleichgewichtskonstante von  $2,5 \times 10^7$  bis  $1,3 \times 10^8$ . Dabei gibt der angegebene Fehlerbereich den maximalen Fehler an, der aus der ungünstigsten Kombination der Einzelfehler der verwendeten Daten und Messwerte resultiert.

Anzumerken ist, dass 10  $\mu$ s nach dem anregenden Laserblitz eine energetische Relaxation des  $Y_Z^+Q_A^-$ -Zustandes eingesetzt hat [Schilstra *et al.* 1998, Jeans *et al.* 2002, Schlodder *et al.* 1985, Renger 2001].  $\Delta G_Z^*$  repräsentiert daher nicht notwendigerweise eine tatsächliche freie Energiedifferenz. Diese Unsicherheit hinsichtlich der Bedeutung von  $\Delta G_Z^*$  hat aber keinen Einfluss auf die ermittelte freie Energiedifferenz zwischen  $P680^*$  und  $P680^+Q_A^-$ , und damit auf die abgeleiteten  $\Delta G$ -Werte und Redoxpotentiale in Tabelle 7.1.

Eine Analyse der Aktivierungsenergie für die Ladungsrekombination in manganverarmten PSII deutet auf eine Enthalpiedifferenz zwischen  $P680^+Q_A^-$  und  $P680^+Phe^-$  ( $\Delta H_2$ ) von nur 160 meV hin [van Gorkom 1985, Reinman und Mathis 1981], was einen negativen entropischen Beitrag von etwa 180 meV ( $-T\Delta S = -180$  meV) bedeuten würde. In D2/D2-Reaktionszentren unterhalb von 200 K scheint  $\Delta G_1$  rein entropischer Natur zu sein [Booth *et al.* 1991]. In manganverarmten PSII-Kernkomplexen ermittelten [Hou *et al.* 2001] eine Enthalpieänderung  $\Delta H_{QP}$  von -900 meV (bei pH 6) für die Reaktionen, die zum  $P680^+Q_A^-$ -Zustand führen. Das würde einen erstaunlich großen positiven entropischen Beitrag ( $T\Delta S \gg +100$  meV) erfordern, um einen plausible  $\Delta G_{QZ}$ -Werten zu erhalten. Es erscheint schwierig, zu verlässlichen Aussagen hinsichtlich entropischer Beiträge zu den betrachteten  $\Delta G$ -Werten zu gelangen.

Die freie Energiedifferenz  $\Delta G_Z^*$  ist weitestgehend pH-unabhängig (siehe Abb. 7.3), was darauf hindeutet, dass keiner der Reaktionsschritte, die innerhalb von 10  $\mu$ s zur Bildung des  $Y_Z^+Q_A^-$ -Zustandes führen, mit einer Protonenaufnahme oder Protonenabgabe gekoppelt ist. Mögliche entropische Beiträge zu  $\Delta G_Z^*$  sind daher nicht durch einen Protonenaustausch mit dem Medium zu erklären. Die hier beobachtete pH-Unabhängigkeit ist in Übereinstimmung mit dem pH-unabhängigen Redoxpotential von  $Q_A$  [Krieger *et al.* 1995].

Wiederholte Untersuchungen der Pikosekunden-Fluoreszenz von PSII-Membranpartikeln auf der Basis des Reversiblen-Radikalpaar-Modells [Schatz *et al.* 1988] lieferten übereinstimmend Werte von -45 meV bzw. -160 meV für  $\Delta G_Z^*$  bzw.  $\Delta G_1$ . Die Gültigkeit der zugrundeliegenden Annahme einer schnellen Anregungsäquilibrierung des Antennensystems ist durch [Dau und Sauer 1996] bestätigt worden und wird gestützt durch die Daten aus Abbildung 4.3 [Tsamaloukas 2001]. Da dieser Äquilibrierungsprozess bei der Ableitung der Ratenkonstanten in [Dau und Sauer 1996] explizit berücksichtigt wurde, können die dort ermittelten Werte für  $\Delta G_1$  und  $\Delta G_1^*$  als die exaktesten angesehen werden und wurden dementsprechend in den hier gemachten Ableitungen verwendet.

Aus den Werten für  $\Delta G_1$ ,  $\Delta G_1^*$  und  $\Delta G_3$  erhält man eine freie Energiedifferenz für den  $Phe \rightarrow Q_A$ -Elektronentransfer von -341 meV ( $\Delta G_2$ ). Van Gorkom und Mitarbeiter ermittelten auf der Basis von Elektrolumineszenzmessungen an Thylakoidmembranen für  $|\Delta G_2|$  einen Wert von größer oder gleich 330 meV [van Gorkom 1985]. Durch Untersuchung der Kinetik der  $P680^+Q_A^-$ -Rekombination in manganverarmtem PSII bestimmten dieselben Autoren einen



maximalen Wert von 360 meV für  $|\Delta G_2|$  [de Wijn und van Gorkom 2002a]. Basierend auf der Analyse der  $Q_A^-$ -Oxidation infolge der Rekombination des  $S_2Q_A^-$ -Zustandes in DCMU-inhibierten Zellen des Cyanobakteriums *Synechocystis* leiten [Rappaport *et al.* 2002] ein  $\Delta G_2$  von etwa -360 meV ab. Trotz der Verwendung unterschiedlicher Methoden ergibt sich also ein  $\Delta G_2$  von -330 bis -360 meV, was sehr gut mit dem Resultat dieser Arbeit (-341 meV) übereinstimmt.

### Redoxpotentiale

Die redoxaktiven Komponenten der Donorseite des PSII zeichnen sich durch ungewöhnlich hohe Potentiale aus. Diese allgemein akzeptierte Annahme beruht auf dem zur Wasserspaltung notwendigen Redoxpotential von etwa +1 V. Da eine direkte Bestimmung solch hoher Redoxpotentiale durch Redoxtitration prinzipiell nicht möglich ist, muss auf indirekte Methoden zurückgegriffen werden: Die Messung der Redoxpotentiale erfolgt an der Akzeptorseite, auf die Potentiale der Donorseite wird dann mittels  $\Delta G = e\Delta E$  geschlossen.

Als Bezugspunkt zur Bestimmung absoluter Redoxpotentiale in der hier gemachten Ableitung wurde das Redoxpotential von  $Q_A^-/Q_A$  gewählt. (Eine ausführliche Diskussion der Literaturdaten bezüglich der Redoxpotentiale der Akzeptorseite findet sich in [Rappaport *et al.* 2002].) Krieger *et al.* ([Krieger *et al.* 1995]) geben für PSII-Membranpartikel ein  $Q_A^-/Q_A$ -Redoxpotential von  $-81 \pm 16$  mV an, das ohne die Anwendung von Redoxmediatoren,  $Q_B$ -Seiten-Inhibitoren oder Tieftemperaturverfahren gemessen wurde; Bedingungen, die vermutlich Ursache der stark voneinander abweichenden Ergebnisse (-350 bis +150 mV) vorangegangener Messungen sind. Das in [Krieger *et al.* 1995] angegebene Redoxpotential erscheint daher der verlässlichste Wert zu sein.

Der Fehler in der hier gemachten Abschätzung der Redoxpotentialdifferenzen kann gegenüber der verbleibenden Unsicherheit des  $Q_A^-/Q_A$ -Redoxpotentials als gering eingeschätzt werden.

Das funktionell relevante „Arbeits“-Potential von  $Q_A^-/Q_A$  kann sich von dem durch Redoxtitration ermittelten Gleichgewichtswert infolge elektrostatischer Wechselwirkungen mit transient geladenen Gruppen ( $P680^+$ ,  $Y_Z^+$ , protonierbare Protein-Seitengruppen) unterscheiden. Dielektrische Relaxationen und Konformationsänderungen können ebenfalls zu einer Beeinflussung des relevanten  $Q_A$ -Redoxpotentials beitragen.

Frühere Abschätzungen des Redoxpotentials von  $P680/P680^+$  ergaben Werte etwa +1,12 V (für eine Diskussion siehe [Rappaport *et al.* 2002]). Auf Basis einer Analyse der Rekombination des  $S_2Q_A^-$ -Zustandes (im Wildtyp und PSII-Mutant des Cyanobakteriums *Synechosystis*) wurde kürzlich ein größerer Wert von +1,26 V ermittelt [Rappaport *et al.* 2002], was mit dem in dieser Arbeit ermittelten Redoxpotential sehr gut übereinstimmt. Die Untersuchung von Rappaport *et al.* basiert auf einer Quantenausbeute für die Rekombinationsfluoreszenz von 3 %, die an Tylakoid-Präparationen von Spinat ermittelt wurde [de Grooth und van Gorkom 1981]. Da es vermutlich Unterschiede zwischen den Rekombinationsraten der Photosysteme von Spinat und *Synechosystis* gibt [de Wijn und van Gorkom 2002a], ist eine Kombination dieser Werte nicht unproblematisch.

Im Gegensatz dazu werden in dieser Arbeit ausschließlich Daten verwendet, die an PSII-Membranpartikeln aus Spinat gemessen wurden, wodurch die oben genannte Problematik entfällt.