

8. Kinetische und energetische Charakterisierung der Relaxationsprozesse vor der O₂-Bildung im S₃ → S₀-Übergang

In diesem Kapitel werden Experimente zu den Prozessen beschrieben, die dem sauerstoffentwickelnden S₃ → S₀-Übergang vorausgehen. Diese können als eine energetische oder elektrostatische Relaxation aufgefasst werden, bei der die positive Ladung des oxidierten Y_Z Verschiebungen von Ladungen (Protonen) auslöst. Die Relaxation spiegelt sich infolge des Gleichgewichtes zwischen dem ladungsseparierten Zustand (Y_Z⁺Q_A⁻) und dem angeregten Antennenzustand direkt in der Intensität der Rekombinationsfluoreszenz wider (siehe Kapitel 4). Über Messungen des Fluoreszenzabfalls nach dem dritten Blitz einer Serie sättigender Laserblitze lässt sich die mit der Relaxation verbundene Änderung der freien Energie ermitteln sowie die Kinetik des Relaxationsprozesses untersuchen.

Einleitend wird ein für die Untersuchung der Relaxation geeigneter Simulationsansatz zur Beschreibung der Rekombinationsfluoreszenz gewählt und es wird gezeigt, wie sich daraus die mit der Relaxation verbundene Änderung der freien Energie (ΔG_{relax}) bestimmen lässt. Durch temperaturabhängige Messungen kann gezeigt werden, dass die Relaxation ein entropiegetriebener Prozess ist. Zusammen mit der pH-Abhängigkeit von ΔG_{relax} sowie vergleichenden Messungen in D₂O kann gefolgert werden, dass die Relaxation mit einer Protonenabgabe ins wässrige Medium gekoppelt ist. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich nicht um die einfache Deprotonierung einer peripheren Gruppe handelt, sondern ein komplexer Prozess vorliegt. Durch die simultane Messung von prompter Fluoreszenz und Rekombinationsfluoreszenz (mit einer Zeitauflösung von 10 μs) kann gezeigt werden, dass die Relaxation an der Donorseite stattfindet.

8.1 Simulationsansatz und Ableitung von ΔG_{relax}

Simulationsansatz

Der Verlauf der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz, der nach dem dritten Blitz einer Serie sättigender ns-Laserpulse gemessen wird, ist durch zwei gut voneinander getrennte kinetische Phasen gekennzeichnet, mit Zeitkonstanten im μs- bzw. ms-Bereich (Abbildung 8.1). Wie in Kapitel 5 erläutert, reflektiert die ms-Kinetik den Elektronentransfer vom Mangankomplex zum Y_Z während des S₃ → S₀-Übergangs, während die μs-Kinetik durch die Relaxationsprozesse bedingt ist, die dem S₃ → S₀-Übergang vorausgehen.

Abbildung 8.1 zeigt den Zeitverlauf der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz nach dem dritten Blitz (gemessenen bei pH 6,4 und 20 °C) sowie die Simulation mit der Summe aus drei Exponentialfunktionen und einer Konstanten. Dargestellt sind die Beiträge der einzelnen Exponentialfunktionen, der Konstanten sowie die daraus resultierende Kurve. Die Simulation erfolgte durch Minimierung einer in Kapitel 5 (Gleichung 5.2) beschriebenen speziellen Fehlersumme, bei der über die quadrierten Differenzen der Logarithmen von Simulation und Fluoreszenzdaten summiert wurde.

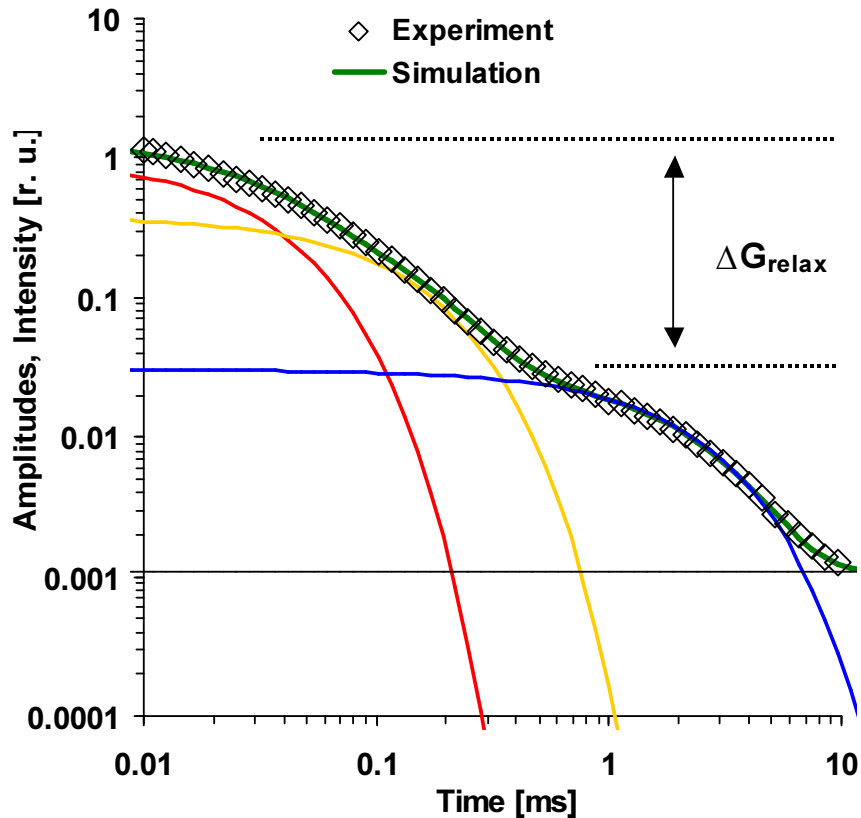


Abbildung 8.1: Simulation der Q_A^- -korrigierten Rekombinationsfluoreszenz des dritten Blitzes (offene Quadrate) mit der Summe von drei Exponentialfunktionen und einer Konstanten (pH 6,4, $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$). Dargestellt sind die Beiträge der drei Exponentialkomponenten (rote, gelbe und blaue Linie), die Konstante (schwarze Linie) sowie die daraus resultierende Kurve (grüne Linie). Zeitkonstanten: $27\text{ }\mu\text{s}$, $114\text{ }\mu\text{s}$, $1,82\text{ ms}$, relative Amplituden: 0,71; 0,268; 0,021; 0,0008; R-Wert: 2,94 %. ΔG_{relax} kennzeichnet den Fluoreszenzabfall durch die mit der Relaxation verknüpfte freie Energieänderung (siehe nächster Abschnitt).

Die ms-Phase des S₃ → S₀-Übergangs lässt sich gut mit einer Exponentialfunktion simulieren, was die Zuordnung zum Elektronentransfer vom Mangankomplex zum Y_Z bestätigt, für den (in allen S-Übergängen) eine monoexponentielle Kinetik gefunden wird [Renger und Hanssum 1992, Rappaport *et al.* 1994]. Zur Beschreibung der μs -Phase sind mindestens zwei Exponentialfunktionen notwendig, wie aus Abbildung 8.2 ersichtlich wird. Dargestellt sind hier die Abweichungen zwischen Fluoreszenz und Simulation für den 3fach-exponentiellen Ansatz aus Abbildung 8.1, für die Simulation mit nur zwei bzw. mit vier Exponentialfunktionen sowie für einen Ansatz, bei dem die μs -Phase durch eine *stretched-exponential*-Funktion beschrieben wird. Zu beachten ist, dass nicht wie üblich die normierten Differenzen zwischen Simulation und Experiment, sondern der Logarithmus der entsprechenden Quotienten dargestellt ist. Einem Wert von 0,04 entspricht dabei eine Abweichung von etwa 4 %. Die Simulationsparameter der einzelnen Ansätze sind in Tabelle 8.1 aufgeführt.

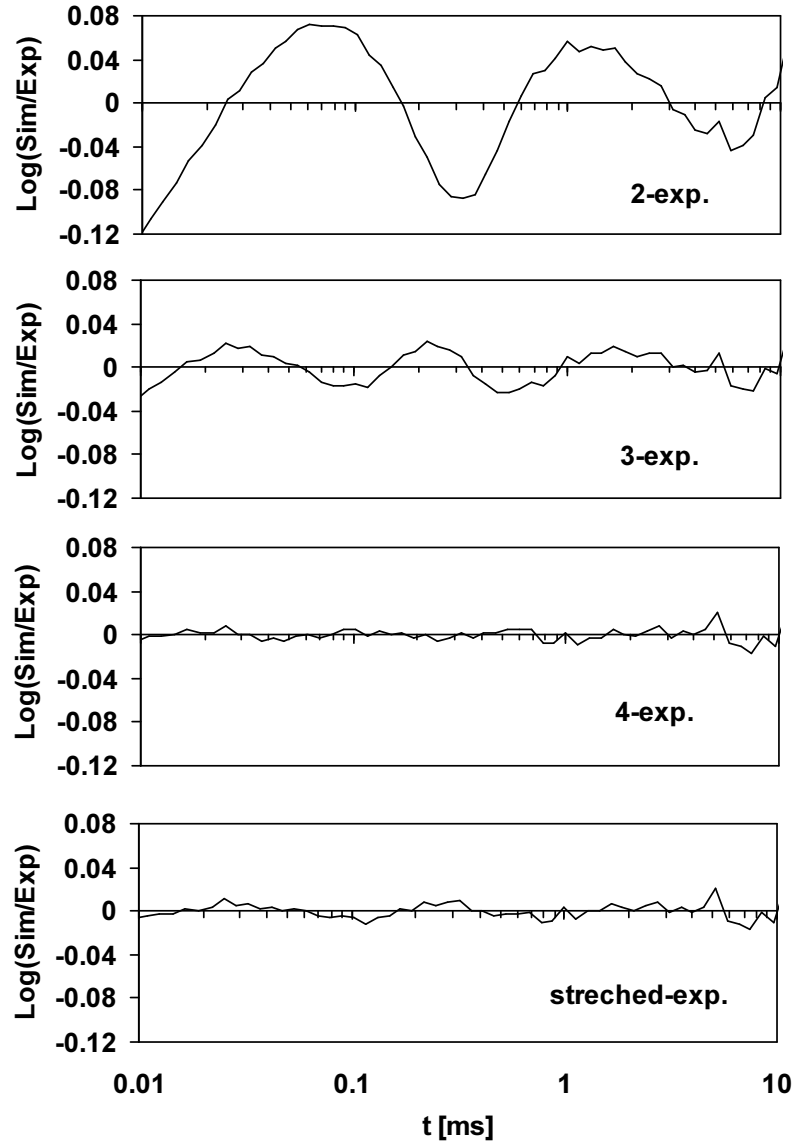


Abbildung 8.2: Residuen der Simulation der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz des dritten Blitzes für verschiedene Simulationsansätze (von oben nach unten: 2fach-, 3fach-, 4fach-exponentiell und *stretched-exponential*).

Simulations-Ansatz	τ_1 (a ₁)	τ_2 (a ₂)	τ_3 (a ₃)	τ_4 (a ₄)	const.	R [%]
2fach-exp.	67,6 μ s (0,97)	–	–	1,617 ms (0,036)	0,0012	10,1
3fach-exp.	27,2 μ s (1,01)	113,9 μ s (0,38)	–	1,825 ms (0,030)	0,0011	2,94
4fach-exp.	14,3 μ s (0,92)	64,8 μ s (0,65)	203,5 μ s (0,092)	1,916 ms (0,028)	0,001	1,01
<i>stretched-exp.</i> ($\beta = 0,51$)	16,2 μ s (2,41)	–	–	1,910 ms (0,028)	0,001	1,22

Tabelle 8.1: Parameter der verschiedenen Simulationsansätze zur Beschreibung der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz des dritten Blitzes bei pH 6,4 und T = 20 °C. Die Berechnung des R-Wertes erfolgte nach $R = (1/N) \times \sum |Sim-Exp|$.

Die *stretched-exponential*-Funktion (auch als Kohlrausch-Funktion bezeichnet [Anderssen *et al.* 2004]) liefert oft eine gute Beschreibung von Prozessen, die über eine Vielzahl von Zwischenzuständen erfolgen, und wird z.B. bei der Modellierung von Zerfalls- und

Relaxationsprozessen in Polymeren und Proteinen angewendet (siehe z.B. [Lee *et al.* 2001, Tcherkasskaya *et al.* 2002], für eine Diskussion der *stretched-exponential*-Funktion zur Beschreibung der μs-Phasen der P680⁺-Reduktion in PSII siehe [Tommos und Babcock 2000]). Sie hat die Form

$$F = Ae^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta} \quad (8.1)$$

mit $0 < \beta \leq 1$ und τ als „verallgemeinerte“ Zeitkonstante. Der Funktionsverlauf ähnelt dem einer Summe mehrerer Exponentialfunktionen, deren Amplituden mit zunehmenden Zeitkonstanten abnehmen. Der Vorteil der *stretched-exponential*-Funktion gegenüber einer Summe von Exponentialfunktionen liegt in der geringeren Zahl der notwendigen Parameter (3 für die *stretched-exponential*-Funktion, 2×(Zahl der Exponentialfunktionen) für die Summe von Exponentialfunktionen). Ein Nachteil ergibt sich daraus, dass die Angabe von unmittelbar interpretierbaren Zeitkonstanten nicht möglich ist. Eine ausführliche Darstellung der Eigenschaften der *stretched-exponential*-Funktion findet sich in [Anderssen *et al.* 2004].

Wie in Abbildung 8.2 zu erkennen ist, lassen sich die μs-Phasen gut durch eine *stretched-exponential*-Funktion beschreiben. Das deutet darauf hin, dass die hier stattfindende Relaxation über eine Vielzahl von Zwischenzuständen verläuft. Denkbar wären Konformationsänderungen der Proteinumgebung oder Protonierungs- und Deprotonierungsprozesse in einem Wasserstoffbrückennetzwerk.

Im Falle des *stretched-exponential*-Ansatzes ergibt sich jedoch eine unsinnig große Anfangsamplitude (Summe der prä-exponentiellen Faktoren) von 2,44 im Vergleich mit den Simulationen durch einfachen Exponentialfunktionen (1,42 und 1,69 für die 3fach- bzw. 4fach-exponentielle Simulation). Zudem ist, wie oben erwähnt, eine einfache Interpretation der Zeitkonstante des *stretched-exponential*-Terms nicht möglich. Aus diesen Gründen wurde auf eine weitere Verwendung dieses Ansatzes verzichtet.

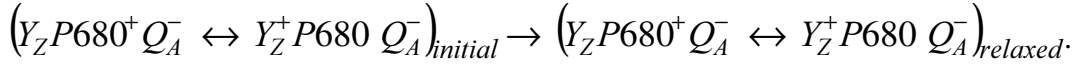
Mit zunehmender Zahl der Exponentialfunktionen im Simulationsansatz nimmt die Übereinstimmung zwischen Simulation und experimenteller Kurve generell zu. Allerdings steigt mit zunehmender Zahl der Exponentialterme die Korrelation zwischen den einzelnen Komponenten, was die Interpretation der Simulationsergebnisse erschwert. Die Simulation mit drei Exponentialfunktionen ist der einfachste Ansatz, mit dem eine ausreichend gute Übereinstimmung zwischen Simulation und Experiment erzielt wird. Für alle in diesem Kapitel durchgeführten Simulationen der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz wurde daher, wenn nicht anders vermerkt, der 3fach-exponentielle Ansatz verwendet.

Ableitung von ΔG_{relax}

Aus dem Intensitätsabfall der μs-Relaxationsphasen der Rekombinationsfluoreszenz lässt sich die mit der Relaxation verbundene Änderung der freien Energie bestimmen. Wie in Kapitel 4 erläutert, ist die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz proportional zum Produkt der Konzentrationen von P680⁺ und Q_A⁻ sowie dem Unterschied in der freien Energie ΔG^* zwischen dem ladungsseparierten Zustand P680⁺Q_A⁻ und dem angeregten Antennenzustand:

$$F_D \sim [P680^+][Q_A^-]e^{\frac{\Delta G^*}{kT}} \quad (8.2)$$

Nach der Bildung des P680⁺Q_A⁻-Zustandes und dem schnellen Elektronentransfer von Y_Z zum P680⁺ im sub-μs-Bereich stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den Zuständen Y_ZP680⁺Q_A⁻ und Y_Z⁺P680Q_A⁻ ein. Dieses Gleichgewicht wird durch Relaxationsprozesse, die im μs-Bereich stattfinden, zugunsten des Y_Z⁺P680Q_A⁻-Zustandes verschoben, wodurch die P680⁺-Konzentration abnimmt:



Für die freie Energiedifferenz zwischen den Zuständen Y_ZP680⁺Q_A⁻ und Y_Z⁺P680Q_A⁻ vor bzw. nach dem Relaxationsprozess gilt somit

$$\left(\frac{[P680]}{[P680^+]} \right)_{initial} = e^{\frac{\Delta G_{initial}}{kT}} \quad \text{bzw.} \quad \left(\frac{[P680]}{[P680^+]} \right)_{relaxed} = e^{\frac{\Delta G_{relaxed}}{kT}} \quad (8.3)$$

[P680] und [P680⁺] sind die relativen Konzentrationen von in neutraler (reduzierter) bzw. oxidiert Form vorliegendem P680. Damit ergibt sich für die mit der Relaxation verbundene Änderung der freien Energie die folgende Beziehung:

$$\frac{[P680^+]_{initial}}{[P680^+]_{relaxed}} = e^{\frac{\Delta G_{relax}^{Donor}}{kT}} \quad \text{mit} \quad \Delta G_{relax}^{Donor} = \Delta G_{relaxed} - \Delta G_{initial} \quad (8.4)$$

Die Änderung der freien Energie bezieht sich dabei nur auf Prozesse, die an der Donorseite stattfinden und daher zu einer Änderung der P680⁺-Konzentration führen. Zusammen mit Gleichung 8.2 gilt dann für die Fluoreszenzintensitäten vor und nach dem Relaxationsprozess:

$$F_D^{initial} \sim [P680^+]_{initial} [Q_A^-] e^{\frac{\Delta G^*}{kT}} \quad (8.5)$$

bzw.

$$F_D^{relaxed} \sim [P680^+]_{initial} e^{\frac{\Delta G_{relax}^{Donor}}{kT}} [Q_A^-] e^{\frac{(\Delta G^* + \Delta \Delta G^*)}{kT}} \quad (8.6)$$

ΔΔG* repräsentiert denkbare Änderungen in der freien Energiedifferenz zum angeregten Antennenzustand, die nicht zu einer Änderung der P680⁺-Konzentration führen. Insbesondere seien hier mögliche Relaxationen auf der Akzeptorseite (Q_A⁻) genannt. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Q_A⁻-Konzentration entfällt, wenn anstelle der direkt gemessenen Rekombinationsfluoreszenz die Q_A⁻-korrigierten Intensitätsverläufe verwendet werden, wie in Kapitel 4 (Abschnitt 2) beschrieben ist. Für die gesamte relaxationsbedingte freie Energieänderung,

$$\Delta G_{relax} = \Delta G_{relax}^{Donor} + \Delta \Delta G^*, \quad (8.7)$$

die sowohl Donorseiten- wie Akzeptorseitenprozesse umfasst, gilt dann

$$\frac{F_D^{initial}}{F_D^{relaxed}} = e^{-\frac{\Delta G_{relax}}{kT}} \quad \text{oder} \quad \Delta G_{relax} = -kT \ln \frac{F_D^{initial}}{F_D^{relaxed}} \quad (8.8)$$

(Wie in Abschnitt 5 gezeigt werden kann, ist der Beitrag von ΔΔG* vernachlässigbar.)

Die Bestimmung der freien Energieänderung erfolgt aus den Amplituden der einzelnen Exponentialkomponenten, die sich aus der Simulation der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz ergeben. Für den 3fach-exponentiellen Ansatz gilt dann für ΔG_{relax}:

$$\Delta G_{relax} = -kT \ln \frac{A_1 + A_2 + A_3 + const}{A_3 + const} \quad (8.9)$$

Im Zähler steht die Gesamtamplitude, die sich aus den Amplituden der Relaxationsphase und der des S₃ → S₀-Übergangs zusammensetzt, im Nenner die Amplitude nach dem Abschluss der Relaxationsphase und vor dem Beginn des S₃ → S₀-Überganges.

8.2 Temperaturabhängigkeit

Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz wurden sowohl die Rekombinationsfluoreszenz wie auch die prompte Fluoreszenz jeweils an derselben PSII-Präparation unter identischen Messbedingungen im Bereich von 0 bis 30 °C bei pH-Werten von 6,4 und 5,2 sowie in D₂O (bei pD 6,4) gemessen. (Die minimale Temperatur in D₂O betrug 2,5 °C, da unterhalb dieser Temperatur der Puffer einfro.) Jede Messkurve der Rekombinationsfluoreszenz wurden dann mit dem entsprechenden Verlauf der prompten Fluoreszenz nach der im Kapitel 4 beschriebenen Methode korrigiert und so die Q_A⁻-korrigierten Zeitverläufe der Rekombinationsfluoreszenz ermittelt.

Abbildung 8.3 zeigen die Q_A⁻-korrigierte Rekombinationsfluoreszenz des dritten Blitzes in Abhängigkeit von der Temperatur für die Messungen in H₂O und D₂O bei pH/pD 6,4. (Die Messungen bei pH 5,2 sind nicht gezeigt.) Sowohl in H₂O wie auch in D₂O ist eine deutliche Zunahme des Anfangswertes der Fluoreszenz (bei 10 μs) mit steigender Temperatur zu erkennen. Ursache ist die stärkere Populierung des angeregten Antennenzustandes, der im Boltzmann-Gleichgewicht mit dem ladungsseparierten Zustand steht (siehe Gleichung 4.8). Eine ähnliche Temperaturabhängigkeit ergibt sich für Zeiten oberhalb von etwa 10 ms. Man erkennt, dass die Fluoreszenz im Zeitbereich bis etwa 100 μs mit zunehmender Temperatur schneller abfällt, was auf eine Beschleunigung der vor dem S₃ → S₀-Übergang stattfindenden Relaxationsprozesse hindeutet. Für die S₃ → S₀-Phase im Bereich von etwa 1-5 ms ist ebenfalls eine Geschwindigkeitszunahme mit steigender Temperatur bei gleichzeitig zunehmender Amplitude zu erkennen. Die Fluoreszenzintensität in D₂O bei 10 μs liegt für alle Temperaturen über der in H₂O. Das deutet darauf hin, dass die Relaxationsprozesse, die nach 10 μs schon eingesetzt haben, in D₂O langsamer ablaufen.

Die zur Q_A⁻-Korrektur verwendeten Verläufe der prompten Fluoreszenz für die Messungen in D₂O und H₂O bei ausgewählten Temperaturen zeigt Abbildung 8.4 (bei pH/pD 6,4). Die Kurven wurden im Maximum auf eins normiert. Zu erkennen ist eine Verlangsamung der Fluoreszenzabfälle mit abnehmender Temperatur. Bei gleicher Temperatur ist die Abnahme der Fluoreszenz in D₂O langsamer als in H₂O. Der leichte Fluoreszenzanstieg im μs-Zeitbereich, deutlich erkennbar bei 2,5 °C in D₂O, lässt sich auf eine Fluoreszenzlöschung durch noch vorhandenes P680⁺ zurückführen (siehe Kapitel 4, Abschnitt 1). Die Temperaturabhängigkeit der F_M- und F₀-Werte ist in Abbildung 8.4 dargestellt. Zu erkennen ist eine Verringerung sowohl von F_M wie von F₀ mit steigender Temperatur. Dabei ist die relative Abnahme des F_M-wertes mit der Temperatur größer als die von F₀. In H₂O beobachtet man eine Abnahme um 45 % bzw. 25 % für F_M bzw. F₀ im Bereich von 0 bis 30 °C. Diese Verringerung der Fluoreszenzausbeute ist wahrscheinlich auf eine mit steigender Temperatur zunehmende thermische Deaktivierung der angeregten Antennenzustände zurückzuführen.

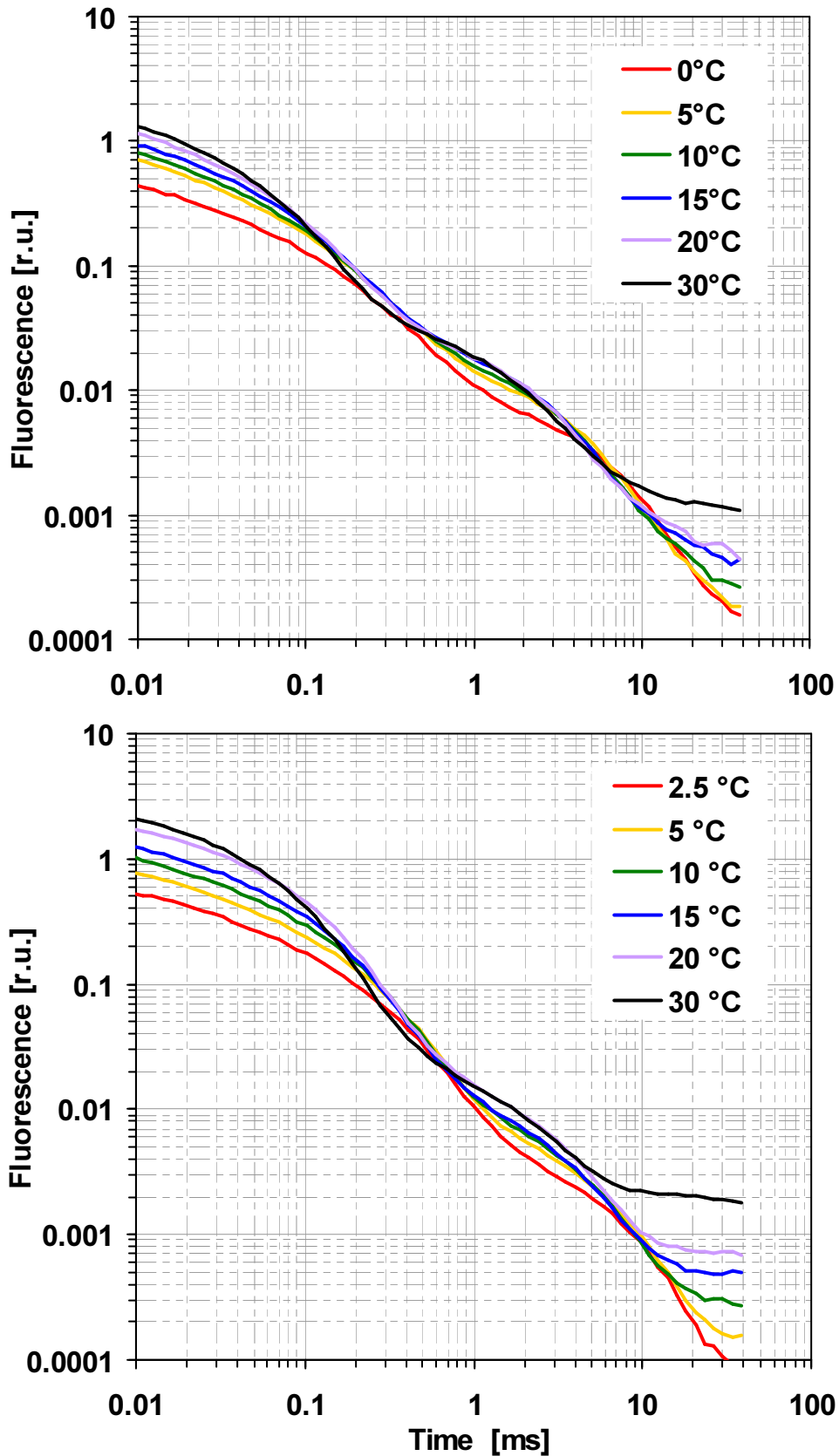


Abbildung 8.3: Temperaturabhängigkeit der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz nach dem dritten Blitz einer Serie sättigender Laserpulse in H₂O (oben) und D₂O (unten) bei pH/pD 6,4.

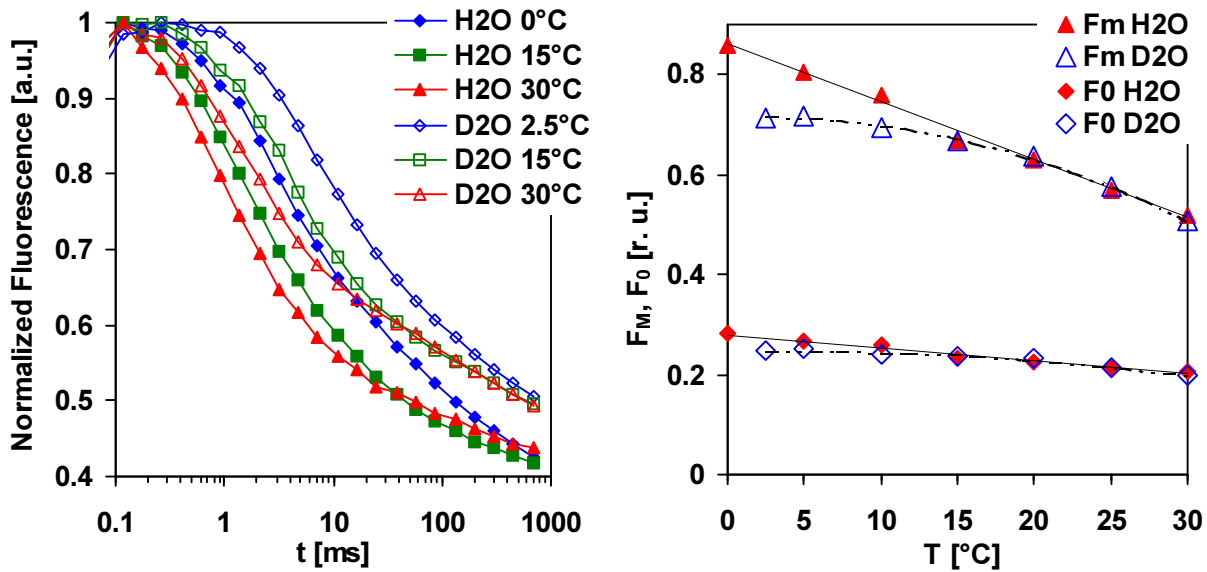


Abbildung 8.4: Prompte Fluoreszenz bei 0, 15 und 30 °C in H₂O und D₂O bei pH/pD 6,4. Links: Zeitverlauf der prompten Fluoreszenz nach dem dritten Blitz einer Serie sättigender Laserpulse, Rechts: Maximale Fluoreszenz (F_M) nach dem dritten Blitz und Fluoreszenz der dunkeladaptierten Probe vor dem ersten Blitz (F₀).

- Simulation der Q_A^- -korrigierten Rekombinationsfluoreszenz -

Die Verläufe der Q_A^- -korrigierten Rekombinationsfluoreszenz wurden mit der Summe von drei Exponentialfunktionen und einer Konstanten simuliert (Zur Wahl des Simulationsansatzes siehe Abschnitt 1). Die Anpassung des theoretischen Verlaufs an die Daten erfolgte unter Minimierung einer speziellen Fehlersumme (Verwendung der Differenzen der Logarithmen), die in Kapitel 5 (Gleichung 5.2) beschrieben ist. Der Anpassungsbereich war in allen Simulationen 10 μ s bis 12 ms. Jeder Temperaturdatensatz wurde separat simuliert und die ermittelten Simulationsparameter für identische Messungen gemittelt. Die Abbildungen 8.5 und 8.6 zeigen die so ermittelten Zeitkonstanten (τ_1 , τ_2 und τ_3), Amplituden (A_1 , A_2 und A_3), die Summe aus A_1 und A_2 , die der Gesamtamplitude der Relaxationsphase entspricht, sowie die Konstante (const) in Abhängigkeit von der Temperatur in halblogarithmischer Darstellung. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die aus den Simulationsergebnissen von jeweils vier Messungen berechnet wurde. Für alle Messungen findet man eine Abnahme der Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 mit steigender Temperatur, während τ_1 nur eine geringe Temperaturabhängigkeit zeigt. Die Amplituden aller Komponenten nehmen generell mit steigender Temperatur zu, wobei eine leichte Abnahme von A_2 und A_3 oberhalb von 20 °C bei pH 6,4 (H₂O) zu erkennen ist. In Tabelle 8.2 sind die für 20 °C ermittelten Zeitkonstanten aufgeführt.

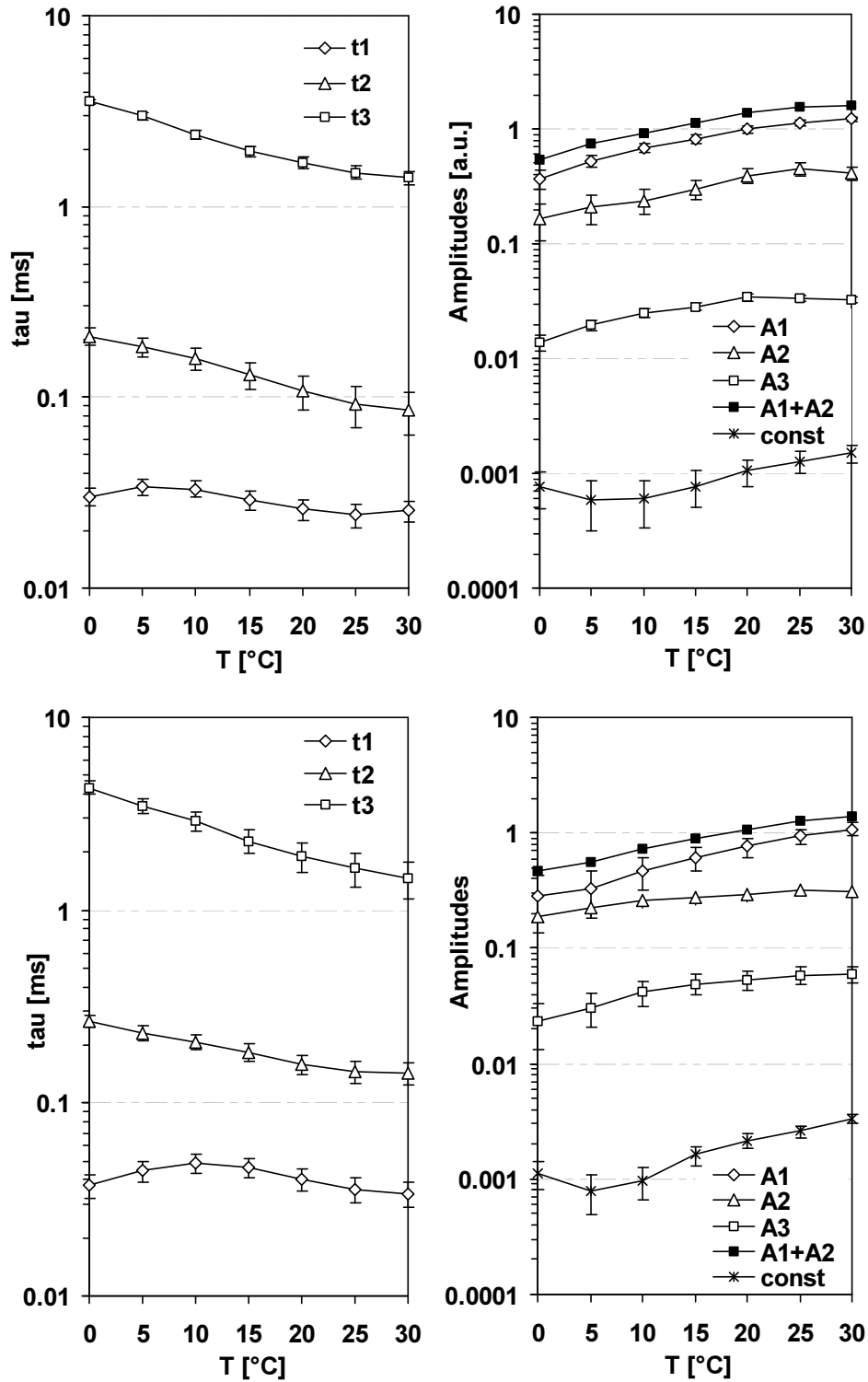


Abbildung 8.5: Simulationsparameter für die Temperaturabhängigkeit der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz in H₂O bei pH 6,4 (oben) und pH 5,2 (unten). Links: Zeitkonstanten (τ_1 , τ_2 und τ_3), Rechts: Amplituden (A_1 , A_2 und A_3) sowie die Summe aus A_1 und A_2 (A_1+A_2) und die Konstante (const). Die Simulationsparameter von vier Messungen wurden gemittelt, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

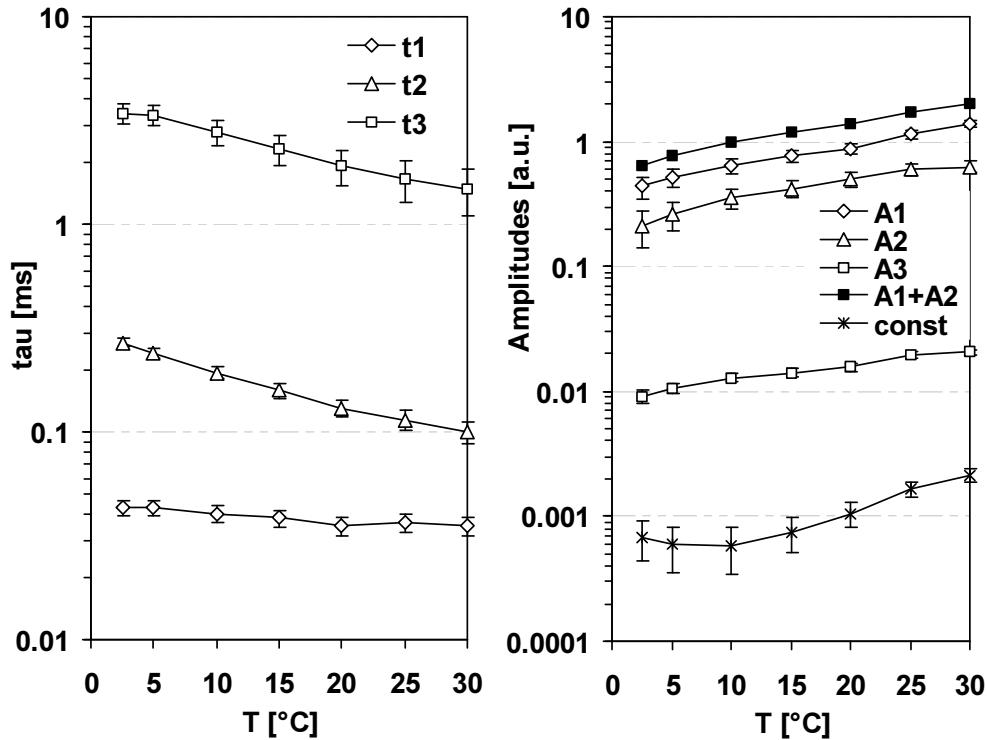


Abbildung 8.6: Simulationsparameter für die Temperaturabhängigkeit der Q_A^- -korrigierten Rekombinationsfluoreszenz in D₂O bei pD = 6,4. Links: Zeitkonstanten (τ_1 , τ_2 und τ_3), Rechts: Amplituden (A_1 , A_2 und A_3) sowie die Summe aus A_1 und A_2 (A_1+A_2) und die Konstante (const). Die Simulationsparameter von vier Messungen wurden gemittelt, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Aktivierungsenergien

Aus der Temperaturabhängigkeit der einzelnen Zeitkonstanten τ_i lassen sich die Aktivierungsenergien E_a für die Zerfallskomponenten nach der Arrhenius-Beziehung

$$\frac{1}{\tau} = k = A e^{-\frac{E_a}{kT}} \quad \text{bzw.} \quad \ln(\tau) = E_a \frac{1}{kT} - \ln A \quad (8.10/8.11)$$

ermitteln. Trägt man den Logarithmus der Zeitkonstanten τ über dem Kehrwert der Temperatur (oder über dem Kehrwert von kT) auf, ergibt sich für einen Prozess mit einer temperaturunabhängigen Aktivierungsenergie ein linearer Zusammenhang zwischen $\ln(\tau)$ und $1/T$ (oder $1/kT$) (Arrhenius-Darstellung). Die Aktivierungsenergie (in eV) ergibt sich dann aus dem Anstieg der Ausgleichsgeraden in der $1/kT$ -Darstellung ($1/kT$ in $1/\text{eV}$).

In Abbildung 8.7 sind die einzelnen Zeitkonstanten (τ_1 , τ_2 , und τ_3) sowie der Mittelwert aus τ_1 und τ_2 , mit τ_{relax} bezeichnet, in Arrhenius-Darstellung gezeigt. Die mittlere Zeitkonstante τ_{relax} wurde dabei nach

$$\tau_{\text{relax}} = \frac{A_1 \tau_1 + A_2 \tau_2}{A_1 + A_2} \quad (8.12)$$

berechnet.

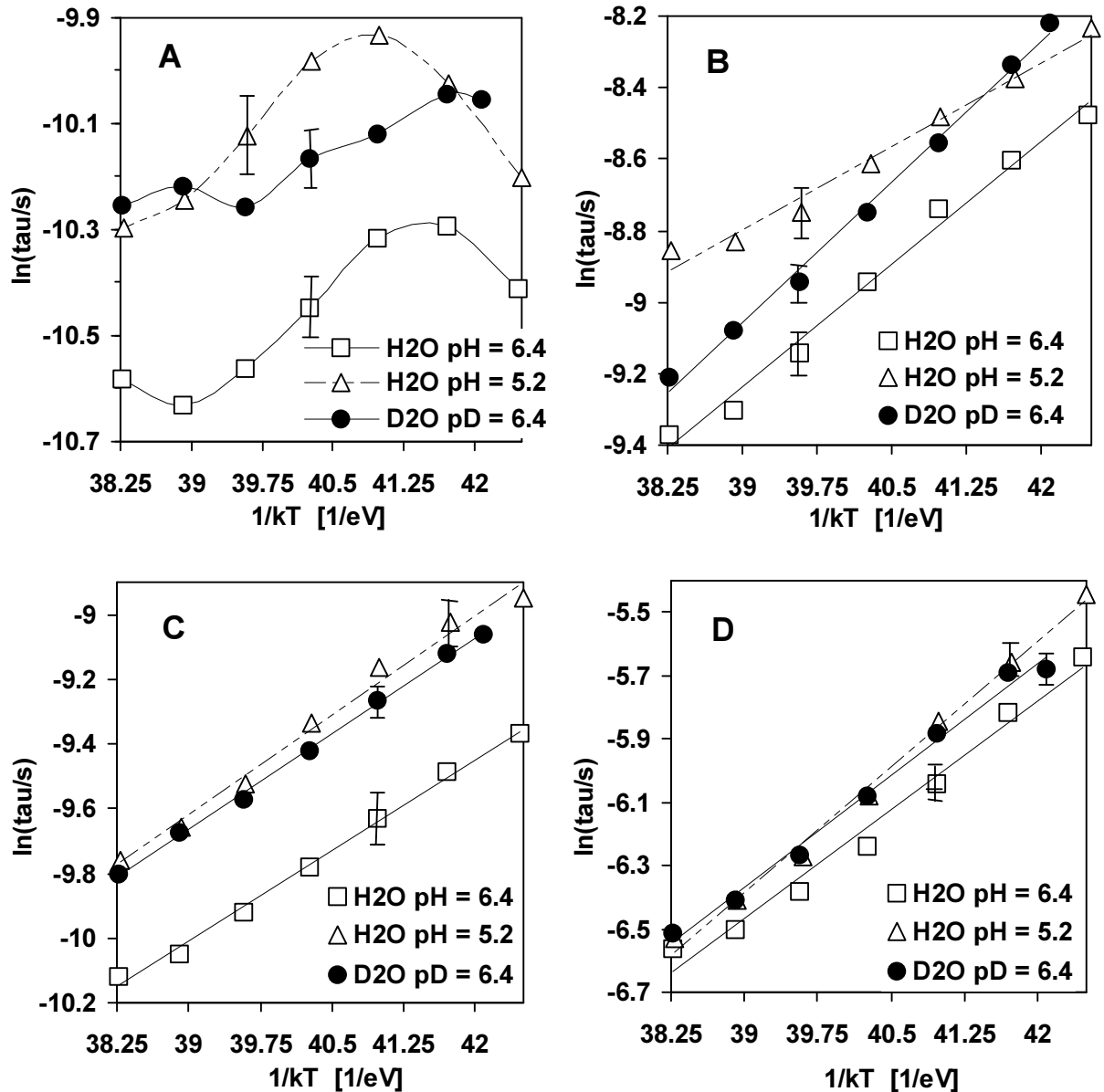


Abbildung 8.7: Temperaturabhängigkeit der Zeitkonstanten in Arrhenius-Darstellung. Dargestellt sind die Logarithmen der durch Simulation ermittelten Zeitkonstanten in Abhängigkeit von der reziproken Temperatur. A: τ_1 , B: τ_2 , C: τ_{relax} , D: τ_3 . Die Geraden in B, C und D sind lineare Simulationen gemäß Gleichung 8.11, die Aktivierungsenergie entspricht dem Anstieg der Geraden. Eingezeichnet sind die Standardabweichungen, berechnet aus je vier simulierten Fluoreszenzverläufen.

Für die τ_1 -Komponente in Abbildung 8.7 (A) ergibt sich kein Temperaturverhalten, aus dem sich eine Aktivierungsenergie ableiten lässt, während sich die τ_2 -Komponente gut mit einer Geraden beschreiben lässt (Abbildung 8.7 (B)). Einen nahezu linearen Zusammenhang erhält man für die mittlere Zerfallszeit der Relaxationsphase, τ_{relax} , in Abb 8.7 (C). Wie in Abschnitt 1 erläutert stellt die Relaxation mit großer Wahrscheinlichkeit einen multiexponentiellen Prozess dar. Die Beschreibung durch zwei Exponentialfunktionen ist mit einer gewissen Willkür behaftet und eine Korrelation zwischen den Simulationsparametern nicht auszuschließen. Dass die mittlere Zerfallszeit τ_{relax} ein fast lineares Temperaturverhalten

in der Arrhenius-Darstellung zeigt, kann als Hinweis auf den multiexponentiellen Charakter eines Relaxationsprozesses angesehen werden. Im Fall mehrerer parallel ablaufender Prozesse mit unterschiedlichen Aktivierungsenergien wäre kein Arrhenius-Verhalten zu erwarten. Für die mittlere Zeitkonstante der Relaxation ergibt sich eine Aktivierungsenergie von ca. 200 meV. Dieser Wert stimmt gut mit den in [Jeans *et al.* 2002] gefundenen 220 meV überein. Allerdings ermitteln die Autoren dort eine Zeitkonstante von nur 12,4 μs, was vermutlich dem auf 50 μs beschränkten Messintervall in dieser Studie zuzuschreiben ist.

	τ_1 [μs]	τ_2 [μs]	τ_{relax} [μs]	τ_3 [ms]
H ₂ O pH 6,4	26 ±3	107 ±11	49 ±7	1,69 ±0,1
H ₂ O pH 5,2	40 ±5	159 ±17	73 ±7	1,89 ±0,06
D ₂ O pD 6,4	35 ±4	130 ±9	70 ±4	1,90 ±0,15

Tabelle 8.2: Zeitkonstanten der Relaxationsphase, τ_1 , τ_2 und τ_{relax} sowie des S₃ → S₀-Übergangs (τ_3) bei 20 °C. Die angegebenen Fehler sind die Standardabweichungen, berechnet aus je vier simulierten Fluoreszenzverläufen.

	$E_a(\tau_{\text{relax}})$ [meV]	$E_a(\tau_2)$ [meV]	$E_a(\tau_3)$ [meV]
H ₂ O pH 6,4	187 ±21	229 ±20	228 ±25
H ₂ O pH 5,2	206 ±54	156 ±36	264 ±24
D ₂ O pD 6,4	197 ±19	263 ±36	235 ±48

Tabelle 8.3: Aktivierungsenergie der Relaxationsphase $E_a(\tau_{\text{relax}})$, $E_a(\tau_2)$ und des S₃ → S₀-Übergangs $E_a(\tau_3)$, ermittelt über die Arrhenius-Beziehung (Gl. 8.11). (Die Fehler wurden aus den extremalen Anstiegen berechnet, die unter Berücksichtigung der in Abb. 8.7 dargestellten Fehlerbalken mit der Temperaturabhängigkeit der jeweiligen Zeitkonstanten verträglich sind.)

In H₂O ist E_a bei pH 5,2 um etwa 10 % größer als bei pH 6,4. In D₂O ist E_a um etwa 5 % gegenüber H₂O erhöht. Für die τ_3 -Komponente, die dem S₃ → S₀-Übergang entspricht, erhält man eine Aktivierungsenergie von 228 meV. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit den in [Renger und Hanssum 1992] ermittelten 210 meV für Temperaturen oberhalb 6 °C. (Unterhalb von 6 °C ermitteln die Autoren einen Anstieg der Aktivierungsenergie auf 477 meV, was in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht beobachtet wird.) In [Clausen *et al.* 2004] wird ein E_a von 301 meV für den gesamten Temperaturbereich von 1 bis 31 °C ermittelt, ohne dass eine Änderung der Aktivierungsenergie beobachtet wird. (Beide Untersuchungen wurden an PSII-Membranpartikeln von Spinat durchgeführt.) Die Aktivierungsenergien sind in Tabelle 8.3 zusammengefasst.

ΔG_{relax} – Entropie- und Enthalpiebeitrag

Aus den Amplituden der Fluoreszenzkomponenten aus Abbildung 8.5 und 8.6 wurde die mit der Relaxation verbundene Änderung der freien Energie, ΔG_{relax}, nach Gleichung 8.9 berechnet. Die Abbildung 8.8 zeigt die so ermittelten ΔG_{relax}-Werte in Abhängigkeit von der Temperatur in H₂O bei pH 6,4 und 5,2 sowie in D₂O bei pD 6,4.

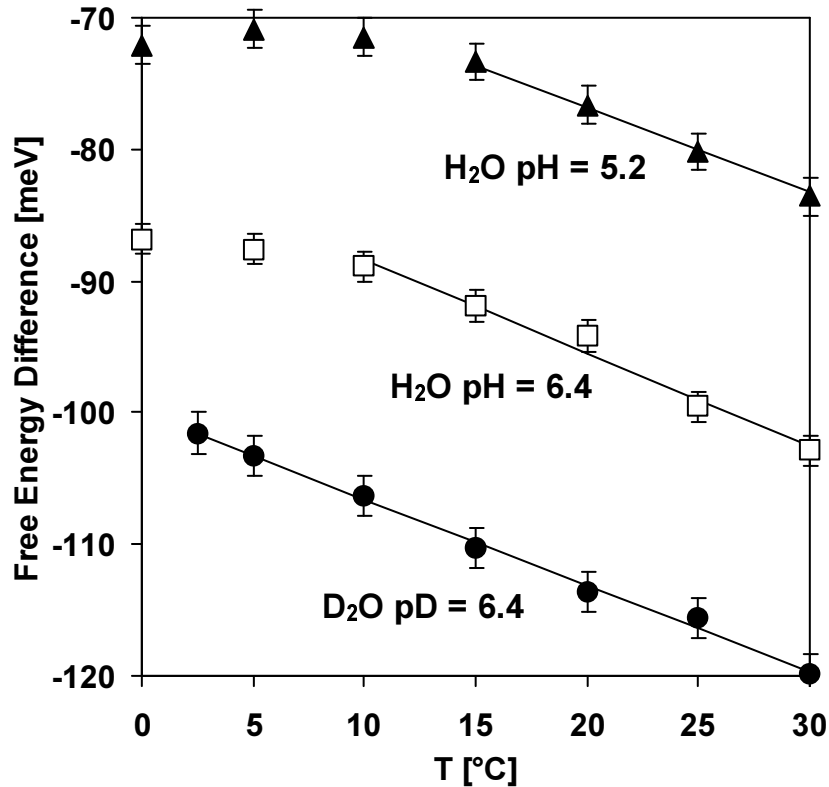


Abbildung 8.8: Temperaturabhängigkeit der freien Energiedifferenz der Relaxationsphase. Simulationsbereiche 15-30 °C (H₂O pH 5,2), 10-30 °C (H₂O pH 6,4), 2,5-30 °C (D₂O pD 6,4). Die einzelnen Datenpunkte sind die Mittelwerte von je vier Messungen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

Zu erkennen ist eine Zunahme des Betrages von ΔG_{relax} (für Temperaturen oberhalb etwa 5 °C) mit steigender Temperatur, was auf einen signifikanten entropischen Beitrag hinweist. Nach

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{und} \quad \frac{d\Delta G}{dT} = -\Delta S \quad (8.13/8.14)$$

lässt sich aus der Temperaturabhängigkeit von ΔG_{relax} die mit der Relaxation verknüpfte Entropieänderung berechnen. Für die Temperaturbereiche, in denen ΔG_{relax} linear von der Temperatur abhängt, wurde der entropische Beitrag TΔS und die Enthalpieänderung ΔH durch Simulation der ΔG_{relax}(T)-Verläufe gemäß Gleichung 8.13 ermittelt. (Simulationsbereiche: 15-30 °C für H₂O bei pH 5,2, 10-30 °C für H₂O bei pH 6,4 und 2,5-30 °C für D₂O bei pD 6,4) Die so erhaltenen Werte für ΔG, ΔH und TΔS sind in Tabelle 8.4

aufgelistet. Für alle drei Bedingungen ergibt sich im wesentlichen dasselbe Ergebnis: eine freie Energieänderung ΔG_{relax} von etwa -100 meV die sich aus einem positiven enthalpischen Beitrag ΔH von ungefähr +100 meV und einem entropischen Beitrag $T\Delta S$ von ca. +200 meV zusammensetzt. Das bedeutet, dass es sich bei der Relaxation um einen ausschließlich entropiegetriebenen Prozess handelt (positives ΔS und positives ΔH), der unter Energieaufnahme (endotherm) stattfindet.

	ΔG_{relax} [meV]	ΔH_{relax} [meV]	$T\Delta S_{\text{relax}}$ [meV]
H ₂ O pH 6,4	-95	+111	-206
H ₂ O pH 5,2	-76	+111	-187
D ₂ O pD 6,4	-113	+80	-193

Tabelle 8.4: Freie Energiedifferenz, Enthalpiedifferenz und Entropieänderung des Relaxationsprozesses bei 20 °C, bestimmt in H₂O bei pH 6,4 und 5,2 sowie in D₂O bei pD 6,4. (Fehler für ΔH_{relax} bzw. $T\Delta S_{\text{relax}}$: ±10 meV (in H₂O, pH 6,4), ±22 meV (in H₂O, pH 5,2) und ±16 (in D₂O, pD 6,4), (Standardabweichung der Simulationsergebnisse von jeweils vier Messreihen), Fehler für ΔG_{relax} : ±4 meV (abgeschätzt aus Abb. 8.8).)

Die Entropiezunahme und eine positive Enthalpieänderung und deuten auf eine Protonenfreisetzung in die wässrige Phase hin. Eine typische „Antwort“ auf die Generierung oder Verschiebung einer elektrischen Ladung innerhalb des Proteins sind Protonierungs- oder Deprotonierungsprozesse von Säure/Base-Gruppen in der Nähe der Protein-Wasser-Grenze unter Abgabe des Protons ins Wasser, verursacht durch die elektrostatische Wechselwirkung mit der Ladung im Protein. Ein solcher Prozess ist im allgemeinen mit einer positiven Enthalpieänderung und einer Entropiezunahme verbunden. Die Übertragung des Protons von der deprotonierenden Gruppe auf ein benachbartes Wassermolekül findet unter Energieaufnahme (positives ΔH) statt, wenn der pK der deprotonierenden Gruppe größer als der pK von Wasser (-1,74) ist. Die Zunahme der Entropie resultiert aus der Vielzahl der dem freigesetzte Proton zur Verfügung stehender Bindungsplätze im Wasser (H₃O⁺-Bildung). Ebenfalls auf eine Protonenfreisetzung weist der Unterschied in den Entropieänderungen zwischen den Messungen bei pH 6,4 und pH 5,2 hin (206 bzw. 187 meV). Der Entropiegewinn sinkt mit fallendem pH-Wert infolge der verringerten Zahl möglicher Protonenbindungsplätze (zunehmende H₃O⁺-Konzentration). Die Unterschiede in den Werten von ΔH und $T\Delta S$ zwischen den Messungen bei pH 6,4, pH 5,2 und D₂O liegen allerdings innerhalb der Fehlerbereiche und können daher als nur bedingt aussagekräftig angesehen werden. (Die Werte von ΔG_{relax} hingegen sind wesentlich genauer bestimmt, wie in Abbildung 8.8 ersichtlich ist (±4 meV)). Eine genauere Untersuchung des pH-Einflusses auf die Energetik (und Kinetik) des Relaxationsprozesses erfolgt im nächsten Abschnitt.

Für Temperaturen unterhalb von 10 °C ergeben sich in H₂O Abweichungen vom linearen Zusammenhang zwischen ΔG_{relax} und der Temperatur. In [Renger und Hanssum 1992] wird aus der Temperaturabhängigkeit des S₃ → S₀-Übergangs die Aktivierungsenergie für den Elektronentransfer vom Manganskomplex zum Y_Z bestimmt (an PSII-Membranfragmenten von Spinat). Unterhalb von 6 °C ergibt sich dort eine um einen Faktor von 2,3 höhere Aktivierungsenergie, verglichen mit höheren Temperaturen. Ein ähnliches Resultat wird in [Koike *et al.* 1987] erhalten (für das thermophile Cyanobakterium *Synechococcus vulcanus*

Copeland), hier mit einer Übergangstemperatur von 16 °C. Die Erhöhung der Aktivierungsenergie für den Elektronentransfer vom Mn-Komplex zu Y_Z deutet nach [Renger und Hanssum 1992] auf eine Konformationsänderung des Mangankomplexes bei 6 bzw. 16 °C hin. Es ist möglich, dass eine derartige Änderung am oder in der Nähe des Mangankomplexes die Energetik des Relaxationsprozesses, der vor dem S₃ → S₀-Übergang stattfindet, beeinflusst. Allerdings kann eine Änderung der Aktivierungsenergie des S₃ → S₀-Übergang in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

8.3 pH-Abhängigkeit

Zur Untersuchung des Einflusses der Protonenkonzentration auf die Relaxation des Y_Z⁺Q_A⁻-Zustandes wurden die Verläufe der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz im pH-Bereich von 5 bis 7 ermittelt. Die Bestimmung der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz aus den gemessenen Zerfällen der Rekombinations- und der prompten Fluoreszenz erfolgte wie im vorigen Abschnitt (bzw. in Kapitel 5) beschrieben.

Abbildung 8.9 zeigt die Q_A⁻-korrigierte Rekombinationsfluoreszenz des dritten Blitzes in Abhängigkeit vom pH-Wert in H₂O und D₂O für ausgewählte pH-Werte. In H₂O und D₂O ergeben im wesentlichen dieselben Zeitverläufe und eine ähnliche pH-Abhängigkeit. Man erkennt eine Verlangsamung des Fluoreszenzabfalls mit fallendem pH-Wert im Zeitbereich bis einige 100 μs, was auf eine Verlangsamung des Relaxationsprozesses hindeutet. Die Intensität nach Abschluss der Relaxationsphase ab etwa 500 μs steigt mit sinkendem pH an. Dies ist erklärbar durch die Annahme, dass die Relaxation mit einer Protonenfreisetzung gekoppelt ist. Das Gleichgewicht zwischen relaxiertem und nichtrelaxiertem Zustand wird in Richtung nichtrelaxiert verschoben, was eine höhere P680⁺-Konzentration und damit eine größere Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Für Zeiten oberhalb etwa 10 ms nimmt die Fluoreszenz ebenfalls mit sinkendem pH zu. Hier ist der S₃ → S₀-Übergang weitgehend abgeschlossen und es hat sich ein Gleichgewicht zwischen den Zuständen S₀Y_Z und S₃Y_Z⁺ eingestellt. Da der S₃ → S₀-Übergang mit einer Protonenfreisetzung verbunden ist [Junge *et al.* 2002], würde eine Erhöhung der Protonenkonzentration zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung S₃Y_Z⁺ führen, was mit einer höheren Fluoreszenzintensität verbunden wäre. Die leichte Abnahme des 10 μs-Wertes (siehe auch Abbildung 7.3) ist im wesentlichen auf den erhöhten *miss*-Parameters bei kleinen pH-Werten zurückzuführen (siehe Abbildung 6.5). Der Anteil der Photosysteme, die sich vor dem dritten Blitz noch im S₁- oder S₂-Zustand befinden, nimmt dann mit sinkendem pH zu. Da die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz 10 μs nach dem Blitz für Zentren im S₁ oder S₂ geringer ist als für Zentren im S₃ (Abbildung 5.2 und 5.6), kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität mit sinkendem pH. Dieser Effekt bleibt aber praktisch ohne Einfluss auf die im folgenden ermittelten energetischen und kinetischen Größen.

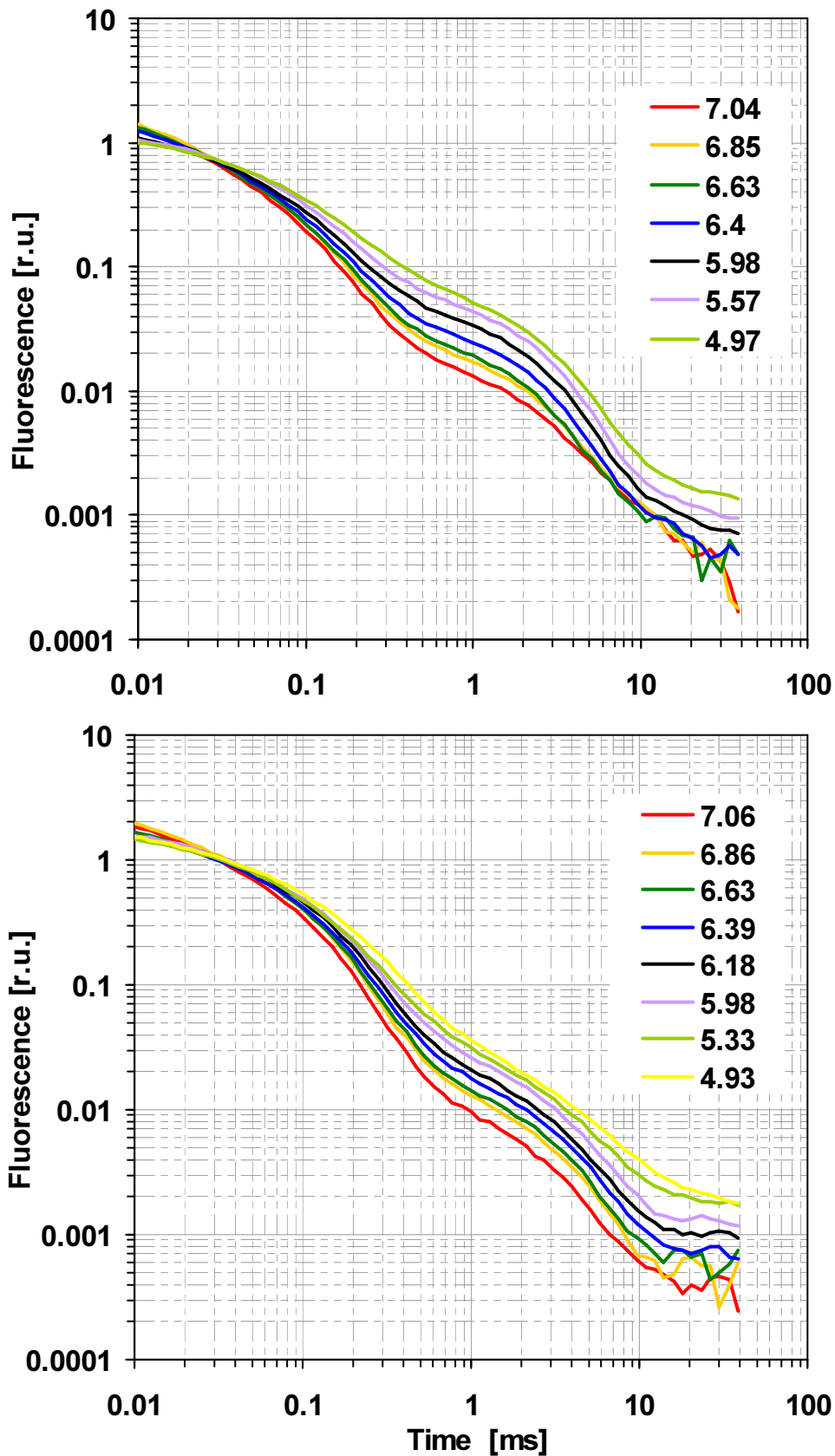


Abbildung 8.9: pH-Abhängigkeit der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz nach dem dritten Blitz einer Serie sättigender Laserpulse in H₂O (oben) und D₂O (unten) bei 20 °C.

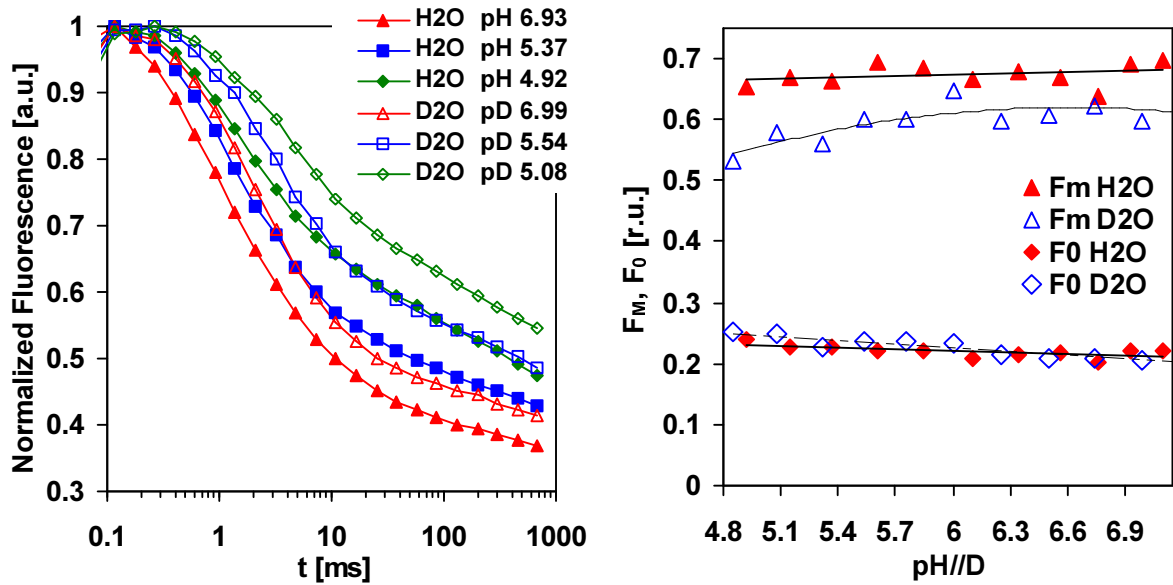


Abbildung 8.10: Prompte Fluoreszenz für verschiedene pH/pD-Werte in H₂O und D₂O bei 20 °C. Links: Zeitverlauf der prompten Fluoreszenz nach dem dritten Blitz einer Serie sättigender Laserpulse, rechts: Maximale Fluoreszenz (F_M) nach dem dritten Blitz und Fluoreszenz der dunkeladaptierten Probe vor dem ersten Blitz (F₀).

Abbildung 8.10 zeigt die zur Q_A⁻-Korrektur verwendeten normierten Verläufe der prompten Fluoreszenz des dritten Blitzes für jeweils drei pH/pD-Werte in H₂O und D₂O. Zu erkennen ist eine Verlangsamung der Fluoreszenzabfälle, und damit des Q_A → Q_B-Elektronentransfers mit kleiner werdendem pH. Bei vergleichbaren Protonenkonzentrationen erfolgt die Q_A⁻-Reoxidation in D₂O langsamer als in H₂O. Die Reduktion von Q_B ist mit einer Aufnahme von Protonen verbunden, wodurch der beobachtete Isotopeneffekt erklärbar ist. Notwendig dafür ist, dass Q_B vor dem dritten Blitz zumindest teilweise in seiner einfach reduzierten Form, als Q_B⁻, vorliegt, und die Protonierung ratenlimitierend für den Q_A⁻ → Q_B⁻-Elektronentransfer ist. In [de Wijn und van Gorkom 2001] wird zur Interpretation der Q_A⁻-Reoxidation in Spinat-Chloroplasten ein Anteil von 25-30 % Q_B⁻ angenommen. Ebenso wird dort eine Verlangsamung der Q_A⁻-Oxidation beim Austausch von H₂O durch D₂O sowie mit kleiner werdendem pH beobachtet.

Nicht zu erwarten für eine Reaktion, die mit einer Protonenaufnahme verbunden ist, ist die beobachtete Verlangsamung der Reoxidation von Q_A⁻ mit sinkendem pH, also steigender Protonenkonzentration. Verantwortlich hierfür sind vermutlich indirekte Effekte, die die Elektronentransfer-Kinetik über Protonierungsgleichgewichte der Proteinmatrix beeinflussen. Beispielsweise könnte das Redoxpotential von Q_A⁻/Q_A durch eine protonierbare Gruppe in der Umgebung von Q_A durch Änderung des Protonierungszustandes dieser Gruppe verschoben werden. Im sauren pH-Bereich wäre diese Gruppe protoniert und damit elektrisch neutral, im basischen deprotoniert und negativ geladen. Diese negative Ladung würde dann zu einer Verringerung des Redoxpotentials von Q_A⁻/Q_A führen. Die Folge wäre eine Vergrößerung der Redoxpotentialdifferenz zwischen Q_A⁻/Q_A und Q_B⁻/Q_B und damit der freien Energiedifferenz für den Q_A → Q_B-Elektronentransfer, was zu einer Erhöhung der Ratenkonstante des Elektronenübergangs führen würde. Der Isotopeneffekt ließe sich, zumindest teilweise, ebenfalls über indirekte Protonierungseffekte erklären: In D₂O kommt es gegenüber H₂O häufig zu einer Vergrößerung der pK-Werte protolytischer Gruppen (siehe unten), was bedeuten würde, dass der beobachtete Isotopeneffekt ein „indirekter“ pH-Effekt ist.

Die F_M- und F₀-Werte zeigen im Falle von H₂O praktisch keine Abhängigkeit vom pH. In D₂O steigt F_M mit wachsendem pH leicht an, während für F₀ eine geringe Abnahme zu erkennen ist. Der F_M-Wert wird (unter anderem) durch die Menge an P680⁺ beeinflusst, das als Fluoreszenzlöcher wirkt. Die Reduktion von P680⁺ durch Y_Z im μs-Bereich ist pH-abhängig und verlangsamt sich mit sinkendem pH, wie in Abbildung 8.9 zu erkennen ist. Das führt zu einer mit fallendem pH zunehmenden Fluoreszenzlöschung und damit zu einer Reduktion des F_M-Wertes. Gleichzeitig verlangsamt sich aber auch die Reoxidation von Q_A⁻ mit fallendem pH, d.h. die Fluoreszenzausbeute in diesem Zeitbereich nimmt zu. Diese beiden sich entgegengesetzt auf den F_M-Wert auswirkenden Einflüsse könnten die beobachtete pH-Abhängigkeit erklären. In H₂O würden sich die Effekte dann in etwa kompensieren und der F_M-Wert wird vom pH-Wert unabhängig.

- Simulation der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz -

Die Verläufe der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz wurden, analog zum vorigen Abschnitt (Temperaturabhängigkeit), mit der Summe von drei Exponentialfunktionen simuliert. Die Simulationsergebnisse sind in Abbildung 8.11a und 8.11b zusammengefasst.

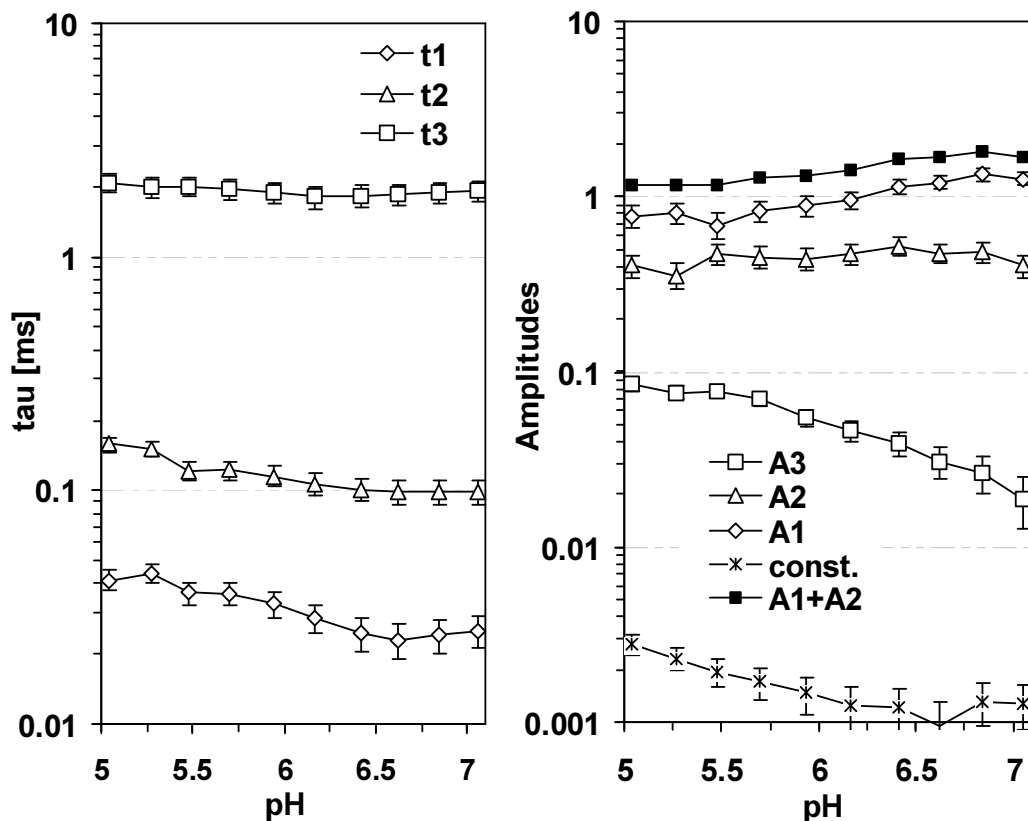


Abbildung 8.11a: Simulationsparameter für die pH-Abhängigkeit der Q_A⁻-korrigierten Rekombinationsfluoreszenz bei 20 °C in H₂O. Links: Zeitkonstanten (τ₁, τ₂ und τ₃), rechts: Amplituden (A₁, A₂ und A₃) sowie die Summe aus A₁ und A₂ (A₁+A₂) und die Konstante (const). Die Simulationsparameter von vier Messungen wurden gemittelt, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

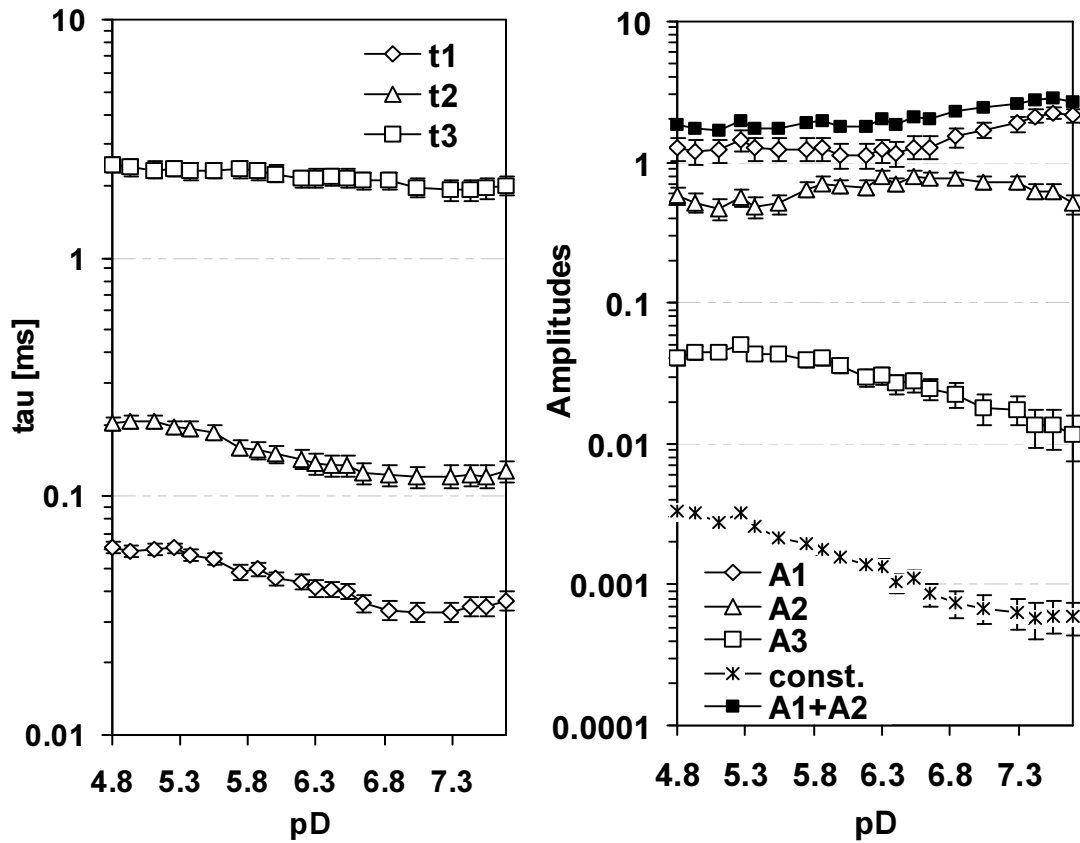


Abbildung 8.11b: Simulationsparameter für die pD-Abhängigkeit der Q_A^- -korrigierten Rekombinationsfluoreszenz bei 20 °C in D₂O. Links: Zeitkonstanten (τ_1 , τ_2 und τ_3), rechts: Amplituden (A_1 , A_2 und A_3) sowie die Summe aus A_1 und A_2 (A_1+A_2) und die Konstante (const). Die Simulationsparameter von vier Messungen wurden gemittelt, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

pH-Abhängigkeit der Relaxations- und O₂-Komponente

Abbildung 8.12 zeigt in einer linearen Darstellung die mittlere Zeitkonstante der Relaxationsphase τ_{relax} ($\tau_{\text{relax}} = (A_1\tau_1 + A_2\tau_2)/(A_1 + A_2)$) und die Zeitkonstante des S₃ → S₀-Übergangs τ_3 sowie die zugehörigen Amplituden in Abhängigkeit vom pH/pD-Wert. Die Zeitkonstante der Relaxation, τ_{relax} , nimmt mit sinkendem pH zwischen pH 7 bis 5 um etwa Faktor 2 zu.

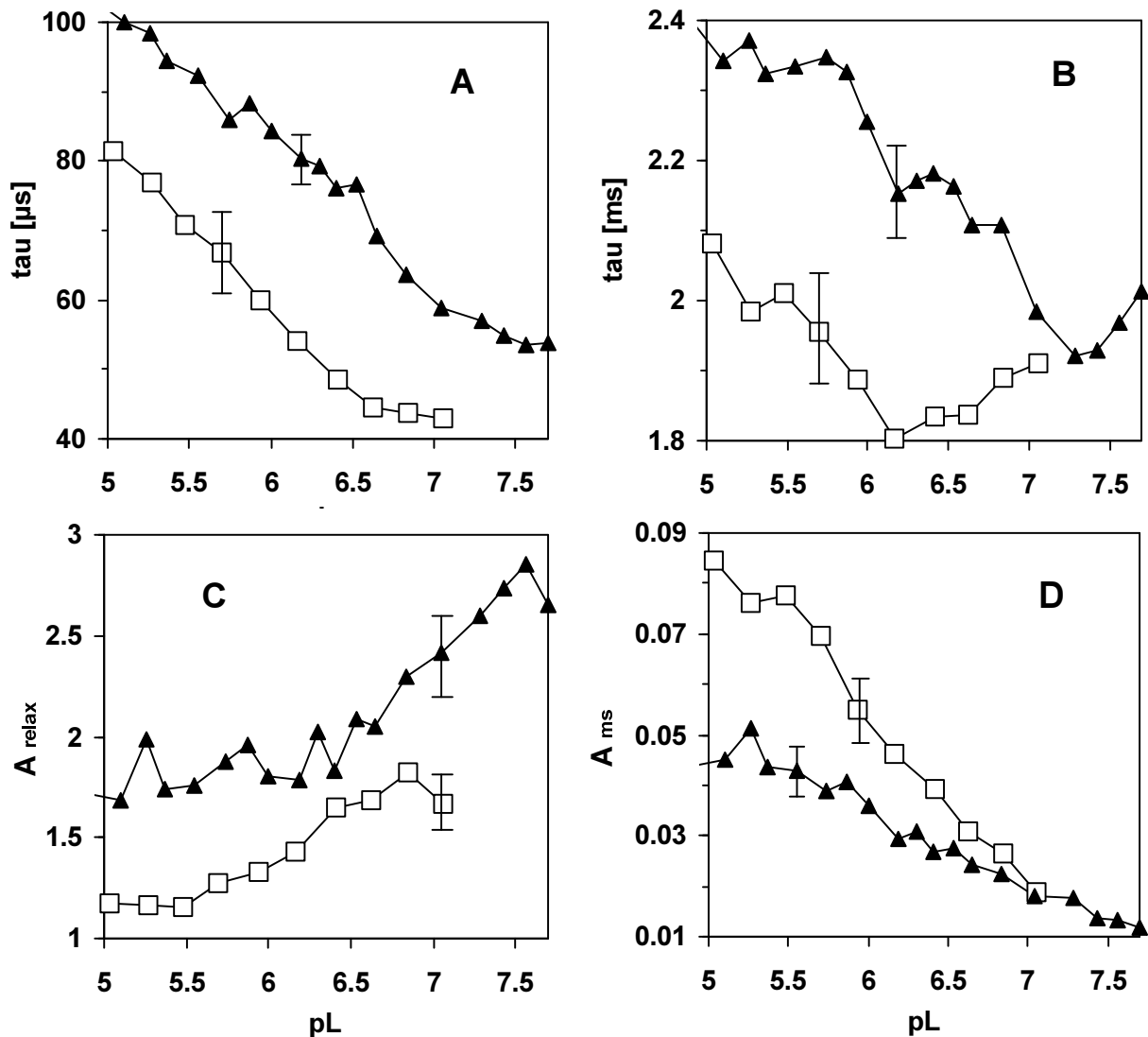


Abbildung 8.12: Simulationsparameter für die pH/pD-Abhängigkeit der Q_A^- -korrigierten Rekombinationsfluoreszenz in H₂O (offene Quadrate) und D₂O (geschlossene Dreiecke) bei 20 °C. A: mittlere Zeitkonstante der Relaxationsphase $\tau_{\text{relax}} = (A_1\tau_1 + A_2\tau_2)/(A_1 + A_2)$, B: Zeitkonstante der ms-Phase τ_3 , C: Amplitude der Relaxationsphase $A_{\text{relax}} = A_1 + A_1$, D: Amplitude der ms-Phase (A_3). Die einzelnen Punkte sind die Mittelwerte von vier Messungen, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Wenn die Relaxation durch eine Protonenfreisetzung an der Protein-Wasser-Grenzfläche und der damit verbundenen Änderung der elektrostatischen Wechselwirkungsenergie verursacht wird, müsste die Relaxationszeitkonstante mit fallendem pH-Wert abnehmen. Für die effektive Rate der Deprotonierung k_{eff} einer Säuregruppe in Wasser gilt

$$k_{\text{eff}} = k_{\text{prot}}[H^+] + k_{\text{deprot}} \quad \text{mit} \quad \frac{k_{\text{deprot}}}{k_{\text{prot}}} = K_a \quad (8.15/8.16)$$

Hier ist k_{prot} ist die Rate der Protonierung, die in der Größenordnung von 10^{10} - $10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ liegt [Gutman und Nachliel 1990, Eigen 1963], k_{deprot} die Rate der Deprotonierung und K_a die Säurekonstante der protolytischen Gruppe. Für die pH-Abhängigkeit von k_{eff} ergibt sich dann (siehe z.B. [Rappaport und Lavergne 1997])

$$k_{\text{eff}} = k_{\text{prot}} (10^{-\text{pH}} + 10^{-\text{p}K_a}) \quad (8.17)$$

In Anwesenheit von Puffersubstanzen wird die Geschwindigkeit der Deprotonierung allerdings pH-unabhängig, wenn die Konzentration des Puffers die Protonenkonzentration um mehr als zwei Größenordnungen übersteigt [Cherepanov *et al.* 2004, Gutman und Nachliel 1997]. In allen hier durchgeführten Experimenten betrug die Konzentration des Puffers mindestens 25 mM und lag damit um mindestens drei Größenordnungen über der Protonenkonzentration (pH 5,0 entspricht einer H⁺-Konzentration von 0,01 mM). Man würde daher keine pH-Abhängigkeit von τ_{relax} erwarten. Die beobachtete Zunahme der Relaxationszeitkonstanten mit fallendem pH spricht daher gegen einen einfachen Relaxationsmechanismus infolge elektrostatisch induzierter Protonenfreisetzung an der Protein-Wasser-Grenze. Die Amplitude der Relaxationsphase, A_{relax} ist nur schwach pH/pD-abhängig mit einer Abnahme um etwa 20-30 % pro pH/pD-Einheit (in H₂O und D₂O).

Für die Zeitkonstante des S₃ → S₀-Übergangs wurde nur eine sehr geringe pH-Abhängigkeit gefunden (Abbildung 8.12 (B)). In H₂O ist τ_3 minimal zwischen pH 6,0 und 6,5, in D₂O zwischen pD 7,0 und 7,5. Mit fallendem pH steigt τ_3 in H₂O und D₂O um etwa einen Faktor von 1,1 pro pH/pD-Einheit an. Die Amplitude des S₃ → S₀-Übergangs, A_3 , nimmt dagegen mit sinkendem pH/pD stark zu; in H₂O um einen Faktor von 2,8, in D₂O um einen Faktor von 2,0 pro pH/pD-Einheit. Dieser Anstieg der S₃ → S₀-Amplitude lässt sich mit einer unvollständigen Relaxation bei hohen Protonenkonzentrationen erklären. Bei einem Prozess der mit einer Protonenabgabe gekoppelt ist, führt eine erhöhte Protonenkonzentration zu einer stärkeren Populierung des Ausgangszustandes im sich nach erfolgter Reaktion einstellenden Gleichgewicht. Entsprechend nimmt die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz zu, die nach Abschluss der Relaxation gemessen wird, d. h. A_3 wächst mit sinkendem pH.

Eine unvollständige Relaxation, d. h. die höhere Populierung des nichtrelaxierten Zustandes bei niedrigen pH-Werten, steht allerdings im Widerspruch zu der weitgehenden pH-Unabhängigkeit der Zeitkonstanten des S₃ → S₀-Überganges. Zu erwarten wäre, dass die S₃ → S₀-Zeitkonstante entsprechend der geringeren Populierung des relaxierten Zustandes bei kleinen pH-Werten zunimmt: Die Konzentration von P680⁺ und damit wegen $[P680^+] + [Y_Z^+] = 1$ auch die Konzentration von Y_Z⁺ ist über Gleichung 8.3 mit der freien Energiedifferenz zwischen Y_Z⁺P680 und Y_ZP680⁺ verknüpft. Infolge der Relaxation nimmt diese Energiedifferenz und damit die Konzentration von Y_Z⁺ zu. (Angenommen wird hierbei, dass die Relaxation an der Donorseite stattfindet.) Unter der Voraussetzung, dass der S₃ → S₀-Übergang erst stattfindet, wenn die Relaxation abgeschlossen ist, ergibt sich die experimentell bestimmte Zeitkonstante des S₃ → S₀-Übergangs, τ_3 , aus der intrinsischen Zeitkonstante des Elektronentransfers vom Mangankomplex zum Y_Z, τ_3^{int} , und dem Anteil an Y_Z der im oxidierten und relaxierten Zustand vorliegt, $[Y_Z^+]_{\text{relaxed}}$, aus

$$\tau_3 = \frac{\tau_3^{\text{int}}}{[Y_Z^+]_{\text{relaxed}}} \quad (8.18)$$

Der Anteil an Y_Z⁺ nach Abschluss der Relaxation ([Y_Z⁺]_{relaxed}) ergibt sich aus der der Konzentration vor der Relaxation und der freien Energieänderung nach

$$\frac{[Y_Z^+]_{\text{relaxed}}}{[Y_Z^+]_{\text{initial}}} = e^{\frac{\Delta G_{\text{relax}}}{kT}} \quad (8.19)$$

Da die sub-μs-Reduktion von P680⁺ durch Y_Z innerhalb des hier untersuchten pH-Bereiches im wesentlichen pH-unabhängig ist [Meyer *et al.* 1989], kann davon ausgegangen werden, dass die Y_Z⁺-Konzentration vor Beginn der Relaxation für alle pH-Werte gleich ist. Aus der pH-Abhängigkeit von ΔG_{relax} (siehe Abbildung 8.8) ergibt sich dann die pH-Abhängigkeit der Y_Z⁺-Konzentration nach Abschluss der Relaxation, [Y_Z⁺]_{relaxed}, zu

$$\frac{[Y_Z^+]_{\text{relaxed}}^{\text{pH}_1}}{[Y_Z^+]_{\text{relaxed}}^{\text{pH}_2}} = e^{\frac{\Delta G_{\text{relax}}^{\text{pH}_2} - \Delta G_{\text{relax}}^{\text{pH}_1}}{kT}} \quad (8.20)$$

Für die Zeitkonstanten τ₃ bei verschiedenen pH-Werten sollte dann gelten:

$$\frac{\tau_3(\text{pH}_2)}{\tau_3(\text{pH}_1)} = e^{\frac{\Delta \Delta G_{\text{relax}}}{kT}} \quad (8.21)$$

mit ΔΔG_{relax} = ΔG_{relax}(pH₂) - ΔG_{relax}(pH₁). In H₂O müsste τ₃ beim Übergang von pH 6,5 zu pH 5,5 ein um einen Faktor von 3 ansteigen, in D₂O zwischen pD 7,0 und 6,0 um einen Faktor von 2,5. Die beobachtete Zunahme beträgt jedoch nur etwa 1,1. Diese weitgehende pH-Unabhängigkeit der S₃ → S₀-Zeitkonstanten könnte im Prinzip auf die Zunahme der Ladungsrekombination bei kleiner werdendem pH zurückgeführt werden. Für die Rate der Rekombination des [P680⁺Q_A⁻]-Zustandes, k_{rec}, wurde in Kapitel 6 ein Wert von etwa 5000 s⁻¹ ermittelt. 10 μs nach dem Blitz beträgt die relative Konzentration von P680⁺ etwa 15 %, woraus sich eine Rekombinationsrate von 5000×0,15 s⁻¹ = 750 s⁻¹ ergibt. Aus Abbildung 8.9 ist zu entnehmen, dass die P680⁺-Konzentration bei pH 6,4 nach Abschluss der Relaxation auf etwa 3 % des 10 μs-Wertes abgefallen ist (400 μs-Wert in Abb. 8.9). Für die Rekombinationsrate ergibt sich dann ein Wert von 5000×0,15×0,03 s⁻¹ = 25 s⁻¹. Bei pH 5,5 beträgt die P680⁺-Konzentration noch etwa 8 % des 10 μs-Wertes, woraus eine Rekombinationsrate von etwa 65 s⁻¹ folgt. Die Rate des S₃ → S₀-Übergangs beträgt (1,8-2,0 ms)⁻¹, also etwa 500-600 s⁻¹. Um die oben abgeschätzte Verlangsamung des S₃ → S₀-Überganges infolge der geringeren [Y_Z⁺]_{relaxed}-Konzentration zu kompensieren, müsste die Rekombination mit einer Rate von etwa 300-400 s⁻¹ erfolgen, also um einen Faktor 5 über den oben abgeschätzten 65 s⁻¹ liegen. Zur Erklärung der Diskrepanz zwischen unvollständiger Relaxation bei kleinen pH-Werten und der nahezu pH-unabhängigen Zeitkonstanten des S₃ → S₀-Übergangs bedarf es weiterer Untersuchungen.

ΔG_{relax} – pH-Abhängigkeit

Zur quantitativen Analyse der pH-Abhängigkeit wurde aus den Amplituden die mit der Relaxation verbundene freie Energieänderung ΔG_{relax} nach Gleichung 8.9 berechnet. Abbildung 8.13 zeigt die so ermittelten ΔG_{relax}-Werte in Abhängigkeit vom pH-Wert. Der Betrag von ΔG_{relax} nimmt mit sinkendem pH ab, wie für eine mit einer Protonenabgabe ins

Medium gekoppelten Reaktion zu erwarten ist. Oberhalb von pH 5,5 bzw. pD 6,0 ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen ΔG_{relax} und dem pH-Wert. Der Anstieg, der durch lineare Simulation ermittelt wurde, beträgt 28 meV/pH bzw. 23 meV/pD (Simulationsbereich: 5,70-7,06 in H₂O, pD 6,14-7,56 in D₂O).

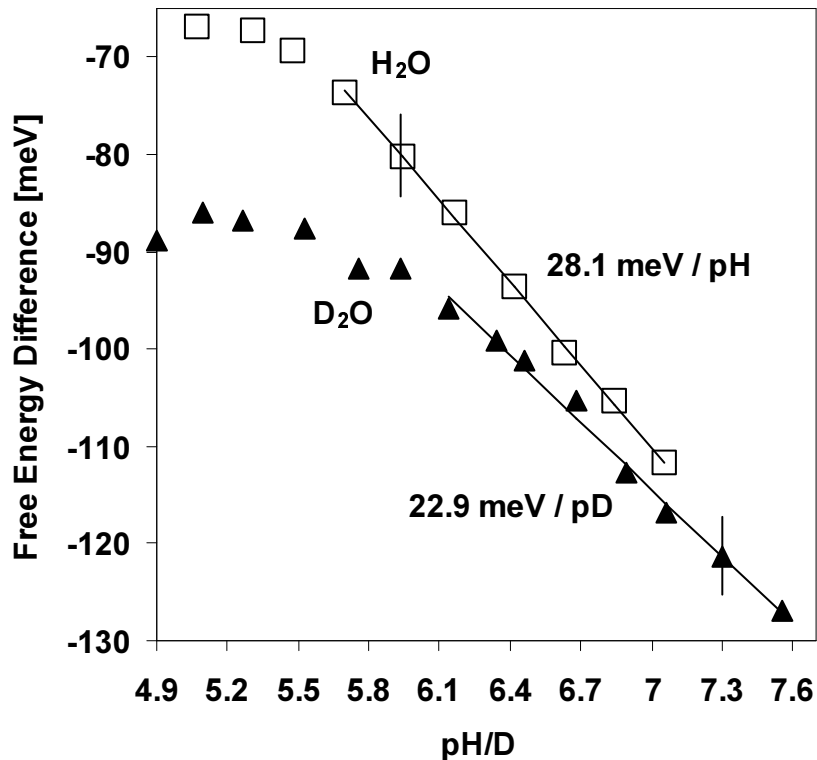


Abbildung 8.13: pH/pD-Abhängigkeit der freien Energiedifferenz der Relaxationsphase bei 20 °C. Die Linien sind lineare Simulationen. (Simulationsbereich: pH 5,70-7,06 für H₂O, pD 6,14-7,56 für D₂O; Fehler ± 4 meV (H₂O) bzw. ± 6 meV (D₂O)).

Die pH/pD-Abhängigkeit von ΔG_{relax} im gesamten untersuchten Bereich lässt sich als Teil einer Titrationskurve interpretieren. Es ist bekannt, dass die pK-Werte von Säure/Base-Gruppen beim Austausch von H₂O durch D₂O zu größeren Werten verschoben werden. Die pK-Verschiebung von einfachen Karbon- und Aminosäuren liegen dabei zwischen 0,4-0,7 [Schowen 1977, DeCoursey und Cherny 1997]. Die Simulation des ΔG_{relax} -Verlaufs unter der Annahme einer einzelnen titrierbaren Gruppe ergibt einen pK von 6,34 in H₂O und 6,80 in D₂O. Das entspricht einer pK-Verschiebung von 0,46 zwischen H₂O und D₂O. Das unterschiedliche pH-Verhalten von ΔG_{relax} lässt sich daher im Prinzip durch eine pK-Verschiebung infolge des Austauschs von H₂O durch D₂O erklären.

H₂O/D₂O-Isotopenaustauscheffekt

In Abbildung 8.14 sind vergleichend die Verläufe der Rekombinationsfluoreszenz des dritten Blitzes in H₂O und D₂O für drei Temperaturen dargestellt (jeweils bei pH/pD 6,4). Man erkennt eine Verlangsamung der Relaxationsphase in D₂O gegenüber H₂O sowie einen stärkeren Fluoreszenzabfall infolge des Relaxationsprozesses in D₂O gegenüber H₂O (siehe

Abschnitt zur Temperaturabhängigkeit). Die Relaxation ist in D₂O gegenüber H₂O um einen Faktor von etwa 1,4 verlangsamt. Ein kinetischer Isotopeneffekt ist zu erwarten, wenn die Relaxation an die Bewegung von Protonen gekoppelt ist. In Tabelle 8.5 sind die Quotienten, τ_D/τ_H , der in H₂O und D₂O ermittelten Zeitkonstanten (und die Quotienten der entsprechenden Amplituden) aufgeführt. (Die angegebenen D/H-Verhältnisse sind Mittelwerte über alle Messungen im Temperaturbereich zwischen 0 und 30 °C bei pH/pD 6,4 sowie im pH/pD-Bereich von 5-7 bei 20 °C.)

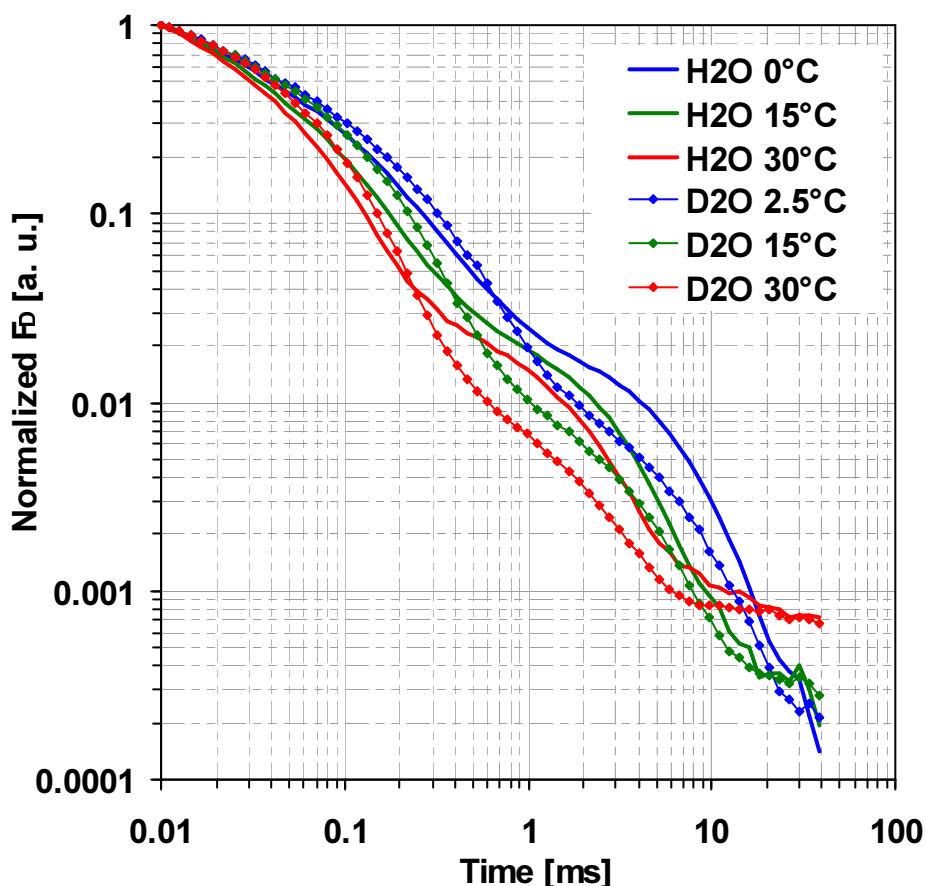


Abbildung 8.14: Normalisierte Q_A^- -korrigierte Rekombinationsfluoreszenz in D₂O und H₂O bei 0, 15 und 30 °C.

Fluoreszenz-Komponente	Zeitkonstanten τ_D/τ_H	Amplituden A_D/A_H
τ_1	1,42	1,12
τ_2	1,30	1,36
τ_{relax}	1,44	-
τ_3	1,12	0,60

Tabelle 8.5: H/D-Isotopeneffekt der Zeitkonstanten und Amplituden der Relaxationsphase (τ_1 , τ_2 und τ_{relax}) und des S₃ → S₀-Übergangs (τ_3). Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte über alle Messungen im Temperaturbereich zwischen 0 und 30 °C (bei pH/pD 6,4) sowie im pH/pD-Bereich von 5-7 (bei 20 °C). (Standardabweichung τ_1 : $\pm 0,1$, τ_2 : $\pm 0,07$, τ_3 : $\pm 0,04$).

8.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Relaxation ist ein entropiegetriebener Prozess mit einer positiven Enthalpieänderung (positives $T\Delta S$ und positives ΔH) und daher höchstwahrscheinlich mit einer Protonenfreisetzung ins wässrige Medium verbunden.
2. Der Betrag der freien Energieänderung nimmt mit kleiner werdendem pH-Wert ab, wie für eine Protonenabgabe ins Medium zu erwarten ist.
3. Die Geschwindigkeit der Relaxation wird mit fallendem pH-Wert kleiner, was gegen eine einfache Deprotonierung einer Säuregruppe an der Proteinoberfläche spricht. Für einen derartigen Prozess wäre zu erwarten, dass die Deprotonierungs-Geschwindigkeit mit fallendem pH zunimmt oder pH-unabhängig ist (siehe Diskussion der pH-Abhängigkeit von τ_{relax} in Abschnitt 4).
4. Durch vergleichende Messungen in D₂O wurde ein kinetischer Isotopeneffekt von $\tau_{\text{D}}/\tau_{\text{H}} = 1,4$ ermittelt, was ebenfalls auf eine Protonenbeteiligung hinweist.
5. Der Zeitverlauf der Relaxation zeigt eine multiexponentielle Kinetik, weshalb man davon ausgehen kann, dass es sich bei der Relaxation um einen komplexen, mehrstufigen Prozess handelt.
6. Das fast lineare Arrhenius-Verhalten für die Temperaturabhängigkeit der mittleren Relaxations-Zeitkonstanten (τ_{relax}) kann als Hinweis auf den sequentiellen Charakter eines einzelnen Relaxationsprozesses angesehen werden. (Mehrere parallel ablaufende Reaktionen würden kein Arrhenius-Verhalten erwarten lassen.)

8.5 Untersuchung des Akzeptorseiteneinflusses

Bis jetzt wurde die Frage offen gelassen, ob die Relaxation ausschließlich an der Donorseite stattfindet, oder ob auch Reaktionen an der Akzeptorseite einen signifikanten Einfluss auf die beobachteten Relaxationsphasen haben. Die Resultate der bisher durchgeführten Untersuchungen sprechen aus den folgenden Gründen für einen von der Donorseite dominierten Relaxationsprozess:

1. Eine Protonenfreisetzung ist an der Donorseite zu erwarten (Erzeugung einer positiven Ladung am P680 bzw. Y_Z), während an der Akzeptorseite eine Protonenaufnahme stattfinden sollte (negative Ladung am Q_A bzw. Q_B).
2. In Absorptionsmessungen zur Rereduktion des durch die Ladungstrennung gebildeten P680⁺ werden S-zustandsabhängige Phasen im μs -Bereich gefunden, die als eine Verschiebung des Y_Z-P680⁺-Gleichgewichtes infolge von Relaxationsprozessen in der Umgebung des Y_Z⁺ interpretiert werden [Nugent *et al.* 2004, Renger 2004].
3. Das Redoxpotential von Q_A hängt innerhalb des hier untersuchten Bereiches nicht vom pH-Wert ab [Krieger *et al.* 1995]. Bei einer protonengekoppelten Relaxation an der Akzeptorseite würde man einen Einfluss des pH auf das Q_A-Redoxpotential erwarten.

Ein signifikanter Beitrag der Akzeptorseite zum Relaxationsprozess sollte sich durch einen Vergleich der Kinetiken von Rekombinationsfluoreszenz und prompter Fluoreszenz nachweisen lassen, wie im folgenden erläutert wird.

Simultane Messung von prompter und Rekombinationsfluoreszenz

Aufgrund der fluoreszenzlöschenden Wirkung von P680⁺ kommt es zu einem anfänglichen Anstieg der prompten Fluoreszenz, die direkt nach einem sättigenden Laserpuls gemessen wird (siehe Kapitel 4, Abschnitt 1). Im Falle einer ausschließlich donorseitigen Relaxation sollte dieser Anstieg der prompten Fluoreszenz dieselbe Kinetik aufweisen wie der Abfall der Rekombinationsfluoreszenz, welche in diesem Fall proportional zur P680⁺-Konzentration ist. Beim Vergleich beider Kinetiken ist dabei der langsame Abfall der prompten Fluoreszenz infolge der Reoxidation des Q_A⁻ zu berücksichtigen. Durch simultane Messungen von Rekombinationsfluoreszenz und prompter Fluoreszenz soll im folgenden überprüft werden, ob die Akzeptorseite einen signifikanten Beitrag zum beobachteten Relaxationsprozess hat.

Unter der Annahme, dass die Effizienz von P680⁺ als Fluoreszenzlöcher etwa gleich der der Ladungstrennung (offene Zentren, Q_A oxidiert) ist, gilt

$$F - F_0 \sim [Q_A^-](1 - [P680^+]). \quad (8.22)$$

Der Term 1-[P680⁺] beschreibt dabei den fluoreszenzlöschenden Einfluss von P680⁺. Vernachlässigt wird hierbei die PSII-Konnektivität, infolge derer sich ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen F-F₀ und [Q_A⁻] ergibt. Diese Vereinfachung ist gerechtfertigt, da sich die Q_A⁻-Konzentration im untersuchten Zeitbereich (0-2 ms) nur wenig ändert und man daher näherungsweise von einer Proportionalität zwischen F-F₀ und [Q_A⁻] ausgehen kann. (Eine mögliche Fluoreszenzlöschung durch Karotinoid-Triplett-Zustände braucht aufgrund der kurzen Zerfallszeit von etwa 2 μs [Schödel *et al.* 1998, Schödel *et al.* 1999] nicht berücksichtigt zu werden.) Wenn nun die Relaxation des Y_ZQ_A⁻-Zustandes ausschließlich auf der Donorseite stattfindet, ist die P680⁺-Konzentration proportional zur Intensität der Rekombinationsfluoreszenz F_D

$$[P680^+] = s \cdot F_D. \quad (8.23)$$

(s – Proportionalitäts- oder Skalierungsfaktor) Simuliert man die Abhängigkeit der prompten Fluoreszenz von der Q_A⁻-Konzentration durch die Summe von zwei Exponentialfunktionen und einer Konstanten,

$$[Q_A^-](t) = a_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + a_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} + const \quad (8.24)$$

was für den hier untersuchten Zeitbereich (0 bis 2 ms) hinreichend genau ist, ergibt sich der theoretische Verlauf von F-F₀ aus

$$(F - F_0)_{sim} = (a_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + a_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} + const) \cdot (1 - s \cdot F_D). \quad (8.25)$$

Messdurchführung

Die Messungen erfolgten mit dem Aufbau zur Rekombinationsfluoreszenz. Zusätzlich zum sättigenden Laserpuls, der Anlass zur Emission der Rekombinationsfluoreszenz gibt, wurde die prompte Fluoreszenz der Photosysteme durch schwache LED-Testpulse angeregt. Abbildung 8.15 zeigt eine typische Messkurve. Bei t = 0 erfolgt die Anregung der Probe mit einem sättigenden Laserblitz. Nach dem Öffnen des elektronischen Verschlusses des Photomultipliers (Gating) wird die Rekombinationsfluoreszenz aufgezeichnet. Ab 10 μs erfolgt in Intervallen von 5 μs die Anregung der prompten Fluoreszenz durch LED-Pulse von 2,5 μs Dauer. Die Rekombinationsfluoreszenz entspricht der exponentiell abfallenden

Untergrundkurve, während die prompte Fluoreszenz durch die Höhe des LED-induzierten Signals oberhalb dieses Sockels der Rekombinationsfluoreszenz gegeben ist. Der Zeitverlauf der Rekombinationsfluoreszenz ergibt sich aus den Mittelwerten der gemessenen Intensität in den Intervallen, in denen die LEDs ausgeschaltet sind. Die resultierende Kurve hat dann einen Datenpunktabstand von $5 \mu s$ mit dem ersten Punkt $7,5 \mu s$ nach dem Laserblitz. Zur Separation der prompten Fluoreszenz vom darunter liegenden Sockel der Rekombinationsfluoreszenz wurde der Verlauf der Rekombinationsfluoreszenz in den Zeitbereich des jeweiligen LED-Pulses linear extrapoliert (fetter Strich in Abbildung 8.15) und über das Fluoreszenzsignal oberhalb der Extrapolationsgeraden integriert. Man erhält so den Verlauf der prompten Fluoreszenz mit einem Punktabstand von ebenfalls $5 \mu s$ und dem ersten Datenpunkt $10 \mu s$ nach dem Laserblitz.

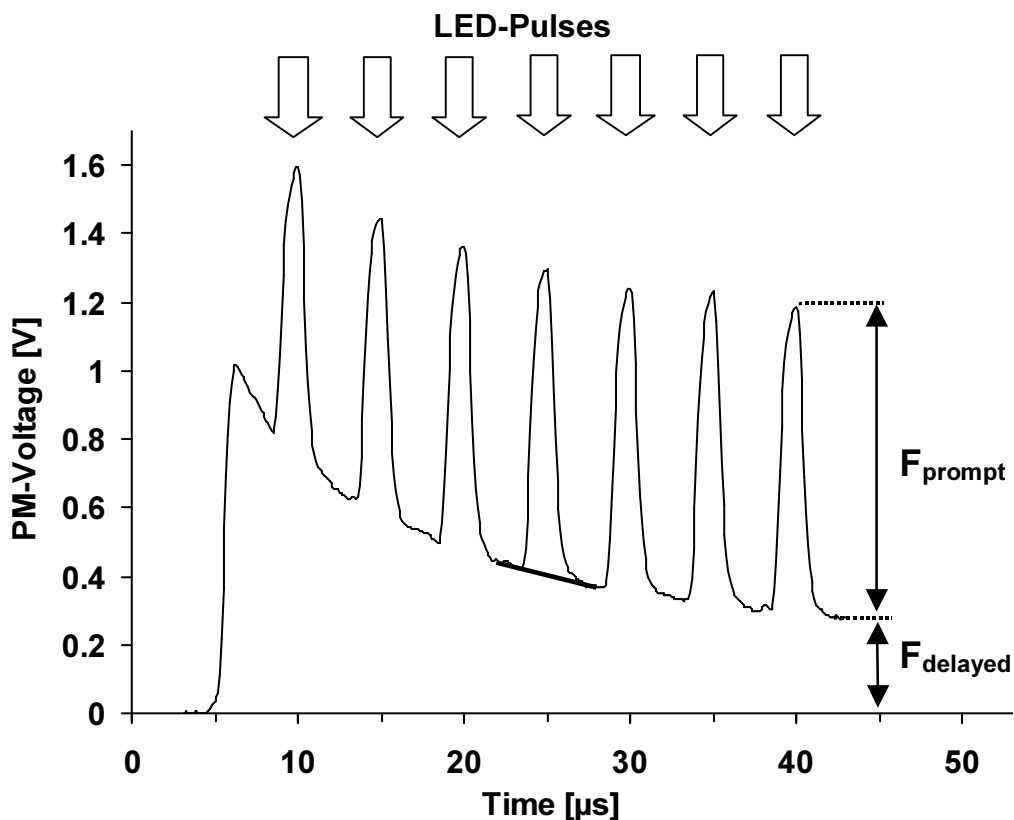


Abbildung 8.15: Simultane Messung von prompter Fluoreszenz und Rekombinationsfluoreszenz. Bei $t=0$ wird die Probe mit einem sättigenden Laserpuls angeregt, nach $5 \mu s$ öffnet sich der elektronische Verschluss des Photomultipliers und die Rekombinationsfluoreszenz wird detektiert. Ab $10 \mu s$ erfolgt in Intervallen von $5 \mu s$ die Anregung der prompten Fluoreszenz durch LED-Pulse von $2,5 \mu s$ Dauer. Die Rekombinationsfluoreszenz entspricht der langsam exponentiell abfallenden Untergrundkurve, während die prompte Fluoreszenz durch die Höhe des LED-induzierten Signals oberhalb des Sockels der Rekombinationsfluoreszenz gegeben ist. Der Zeitverlauf der Rekombinationsfluoreszenz ergibt sich aus den Intensitäten in den Intervallen, in denen die LEDs ausgeschaltet sind. Zur Extraktion der prompten Fluoreszenz wird über das LED-induzierte Signal oberhalb des Sockels der Rekombinationsfluoreszenz integriert.

Ergebnisse und Schlussfolgerung

Die Abbildungen 8.16 und 8.17 zeigen die prompte Fluoreszenz des dritten Blitzes sowie die Simulationsergebnisse entsprechend Gleichung 8.25 für verschiedene Messbedingungen (Simulationsbereich von 0 bis 2 ms). Dargestellt ist der Verlauf der prompten Fluoreszenz $F-F_0$, der sich nach Division von $F-F_0$ durch $1-sF_D$ ergebende Verlauf der Q_A^- -Konzentration $[Q_A^-](t)$, die 2fach-exponentielle Simulation von $[Q_A^-](t)$ gemäß Gleichung 8.24, die Differenz zwischen $[Q_A^-](t)$ und $F-F_0$ sowie die skalierte Rekombinationsfluoreszenz $s \cdot F_D$. Alle Kurven wurden so normiert, dass das durch Simulation ermittelte $[Q_A^-](t)$ für $t = 0$ eins beträgt.

Deutlich zu erkennen ist der Anstieg von $F-F_0$ infolge des Verschwindens von $P680^+$ im Zeitbereich bis etwa 100 μ s. Der sich daran anschließende langsame Abfall der Fluoreszenzintensität entspricht der Reoxidation von Q_A^- . Im Falle einer donorseitigen Relaxation ist, wie oben erläutert, F_D zu $[P680^+]$ proportional. Für $s \cdot F_D$ und $[Q_A^-](t)-(F-F_0)$ sollten sich damit identische Zeitverläufe ergeben. Wie in Abbildung 8.16 und 8.17 zu erkennen ist, ergibt sich im Rahmen der Messgenauigkeit eine Übereinstimmung zwischen beiden Kurven. In Tabelle 8.6 sind die Parameter der Simulationen zusammengefasst.

	τ_1 [ms] (a_1)	τ_2 [ms] (a_2)	const	s
H ₂ O pH 6,4, 20 °C	0,45 (0,32)	8,1 (0,67)	0,016	0,21
H ₂ O pH 5,2, 20 °C	0,76 (0,44)	7,2 (0,38)	0,18	0,34
H ₂ O pH 6,4 0 °C	0,83 (0,16)	10,4 (0,54)	0,30	0,58
D ₂ O pD 6,4 20 °C	0,67 (0,26)	4,1 (0,47)	0,27	0,19

Tabelle 8.6: Zeitkonstanten (τ), relative Amplituden (a), Konstante (const) und Skalierungsfaktor (s) der Simulation der prompten Fluoreszenz nach Gleichung 8.25.

Dieses Ergebnis, zusammen mit den oben aufgeführten Argumenten (Protonenfreisetzung ist an der Donorseite zu erwarten, μ s-Phasen bei Absorptionmessungen zur $P680^+$ -Reduktion, pH-Unabhängigkeit der Q_A^- -Redoxpotentials) spricht dafür, dass es sich bei der hier untersuchten Relaxation um einen Prozess handelt, der ausschließlich oder zumindest überwiegend an der Donorseite stattfindet.

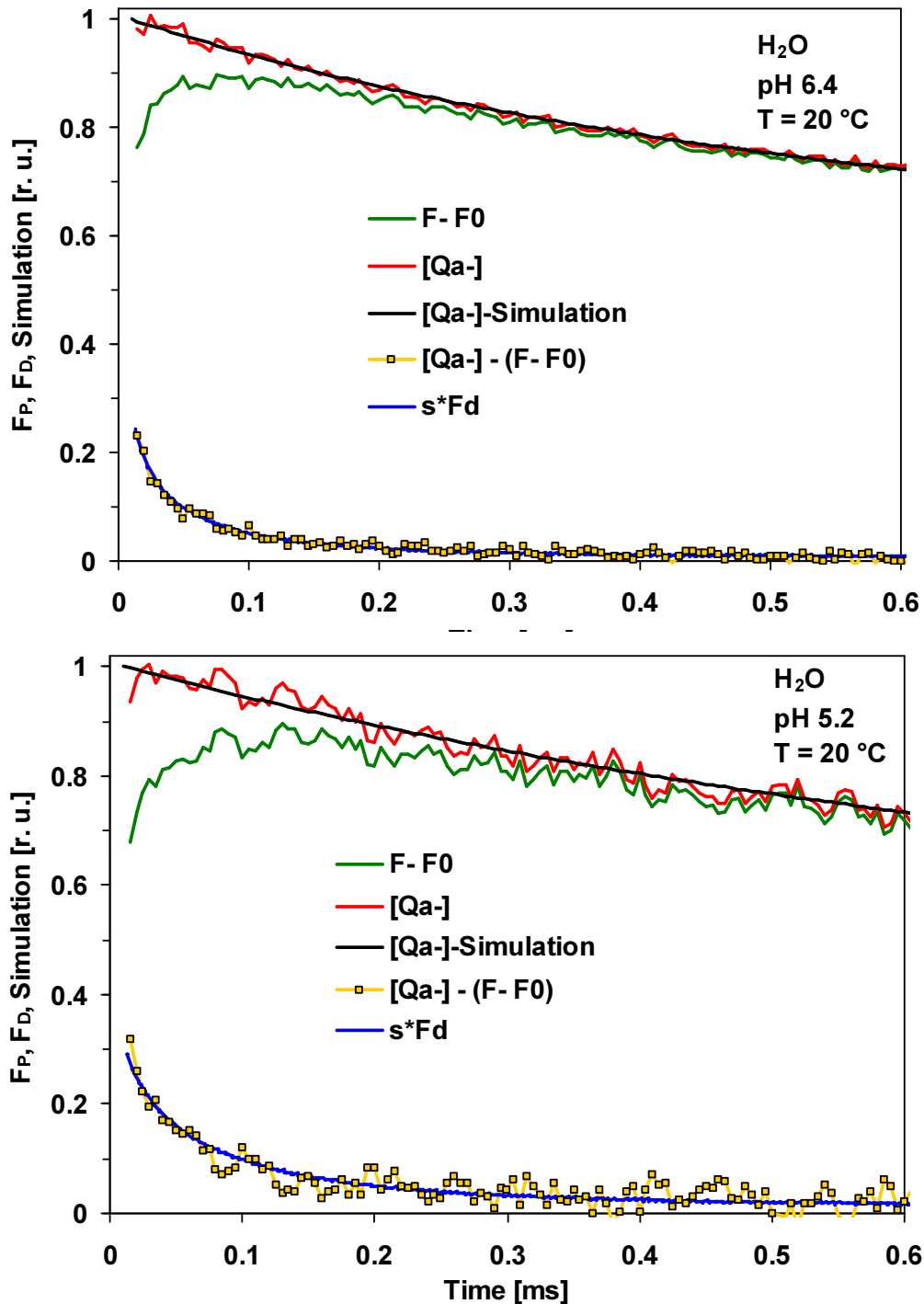


Abbildung 8.16: Löschung der prompten Fluoreszenz durch P680⁺ und Vergleich mit der Rekombinationsfluoreszenz für den dritten Blitz einer Serie sättigender Laserblitze für pH 6,4 und 20 °C (oben) sowie pH 5,2 und 20 °C (unten). Gezeigt ist der Verlauf der prompten Fluoreszenz $F-F_0$ (grüne Linie), der sich nach Division von $F-F_0$ durch $1-sF_D$ ergebende Verlauf der Q_A^- -Konzentration $[Q_A^-](t)$ (rote Linie), die 2fach-exponentielle Simulation von $[Q_A^-](t)$ (schwarze Linie), die Differenz $[Q_A^-](t)-(F-F_0)$ (gelbe Linie) sowie die skalierte Rekombinationsfluoreszenz sF_D (blaue Linie). Die Fluoreszenzverläufe sind jeweils Mittelwerte von 3-5 Messungen.

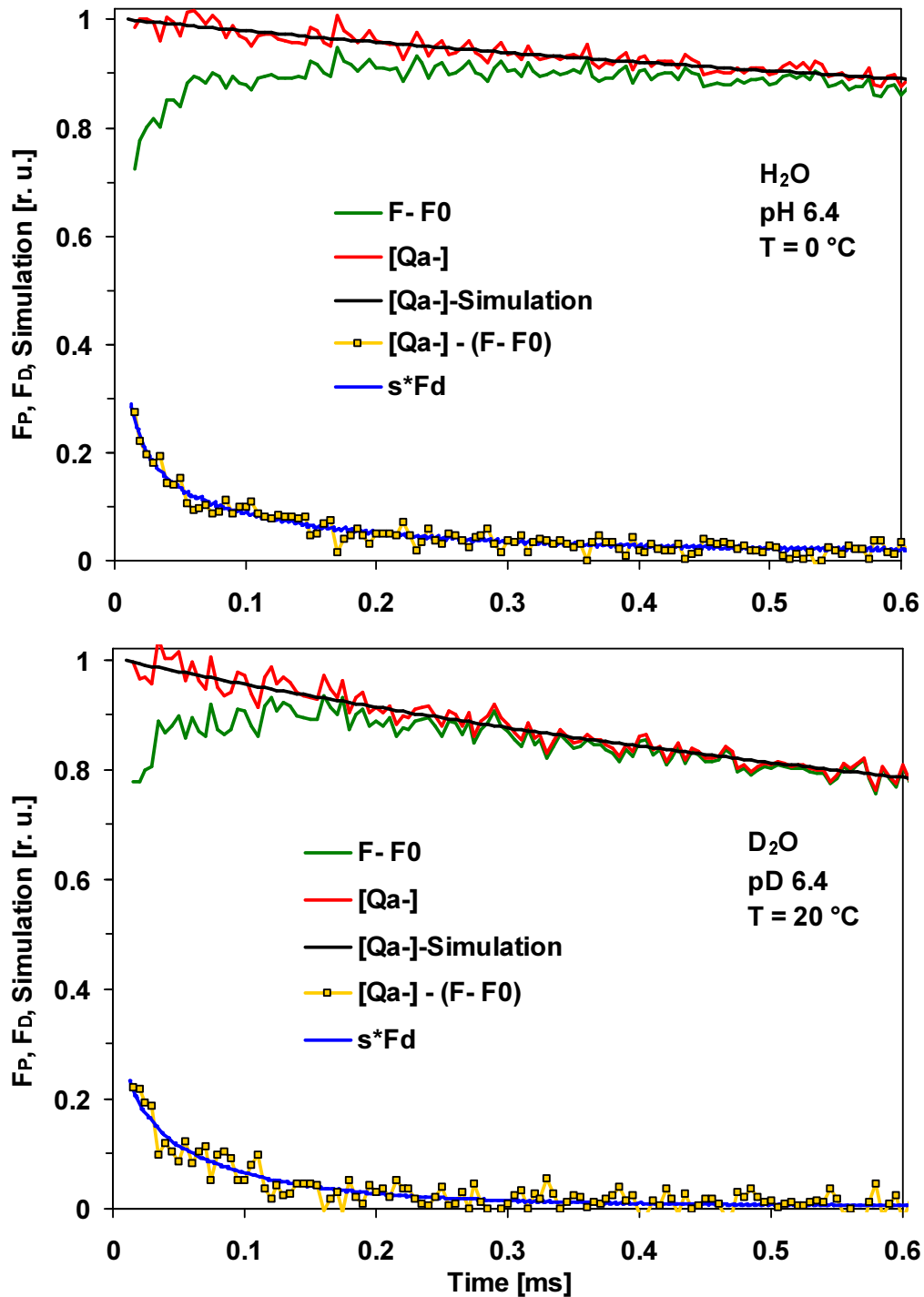


Abbildung 8.17: Löschung der prompten Fluoreszenz durch P680⁺ und Vergleich mit der Rekombinationsfluoreszenz für den dritten Blitz einer Serie sättigender Laserblitze für 0 °C und pH 6,4 (oben) sowie in D₂O bei pD 6,4 und 20 °C (unten). Gezeigt ist der Verlauf der prompten Fluoreszenz F-F₀ (grüne Linie), der sich nach Division von F-F₀ durch 1-s·F_D ergebende Verlauf der Q_A⁻-Konzentration [Q_A⁻](t) (rote Linie), die 2fach-exponentielle Simulation von [Q_A⁻](t) (schwarze Linie), die Differenz [Q_A⁻](t)-(F-F₀) (gelbe Linie) sowie die skalierte Rekombinationsfluoreszenz s·F_D (blaue Linie). Die Fluoreszenzverläufe sind jeweils Mittelwerte von 3-5 Messungen.

8.6 Diskussion – Ursprung und Mechanismus der protonischen Relaxation

In einer aktuellen Röntgenabsorptionsstudie zur zeitaufgelösten Analyse der S-Übergänge wird eine Verzögerungsphase von 250 µs für den S₃ → S₀-Übergang gefunden [Haumann *et al.* 2005b]. Genutzt wird in diesem Experiment die Korrelation zwischen dem Mangan-Oxidationszustand und der energetischen Lage bzw. der Struktur der Mangan-K-Kante des Röntgenabsorptionsspektrums. Durch diesen Ansatz ist es – im Unterschied zu anderen indirekten Messungen ([Rappaport *et al.* 1994, Razeghifard und Pace 1999, Clausen *et al.* 2004]) – möglich, spezifisch die S-Übergänge des Mangankomplexes zeitaufgelöst zu detektieren.

Die Zeitkonstante der langsamsten Komponente des Relaxationsprozesses beträgt 200 µs (4fach-exponentieller Ansatz in Abschnitt 8.1) und entspricht damit gut der in der oben genannten Studie gefundenen Verzögerungsphase des S₃ → S₀-Übergangs. Es ist daher zu vermuten, dass sich in der Relaxationsphase der Rekombinationsfluoreszenz genau der Mechanismus widerspiegelt, der zu der beobachteten Verzögerung des S₃ → S₀-Übergangs führt.

Die experimentellen Resultate dieses Kapitels – die signifikante, mit der Relaxation verbundene Entropiezunahme, die positive Enthalpieänderung, die pH-Abhängigkeit der freien Energieänderung, der kinetische Isotopeneffekt und die Übereinstimmung der Kinetiken von Rekombinationsfluoreszenz und P680⁺-Fluoreszenzlöschung – weisen darauf hin, dass die Relaxationsphase mit einer Protonenabgabe ins Lumen verbunden ist.

An dieser Stelle sei auf die Notwendigkeit hingewiesen, die Oxidation des Mangankomplexes mit kompensierenden Ladungsverschiebungen (bzw. Strukturveränderungen) zu koppeln, um trotz der Akkumulation von positiven Ladungen oder „Oxidationsäquivalenten“ im S-Zyklus eine Redoxpotential-Differenz zum Y_Z⁺ aufrechtzuerhalten, die die Oxidation durch Y_Z⁺ ermöglicht [Dau und Haumann 2004]. Die Interpretation, die sich hier anbietet, ist die, dass erst eine mit der Relaxation verbundene Deprotonierung den folgenden O₂-bildenden Schritt ermöglicht.

Eine dem S₃ → S₀-Übergang vorausgehende Protonenabgabe wurde in mehreren Untersuchungen beobachtet [Haumann und Junge 1996, Lavergne und Junge 1993, Junge *et al.* 2002]. Diese Protonenfreisetzung ist allerdings zu schnell (~30 µs), um unmittelbar die Verzögerung des S-Übergangs erklären zu können.

Ein sequentieller Prozess wäre denkbar, bei dem zuerst eine Protonenfreisetzung an der Proteinoberfläche erfolgt und es danach, mit zeitlicher Verzögerung, zu einer Deprotonierung am Mangankomplex oder in dessen Nähe kommt.

Genau diesen Mechanismus legen die Befunde dieses Kapitels nahe: Die multiexponentielle Kinetik der Relaxationsphase und die Beobachtung, dass die Geschwindigkeit des Prozesses mit fallendem pH-Wert abnimmt (siehe Gleichung 8.17), zeigen, dass es sich nicht ausschließlich um eine einfache, durch die positive Ladung am Y_Z induzierte Deprotonierung handeln kann, sondern ein komplexes Verhalten vorliegt. Zusätzlich wird für die Temperaturabhängigkeit des Gesamtprozesses (d. h. die mittlere Relaxations-Zeitkonstante) ein lineares Arrhenius-Verhalten gefunden, was als Hinweis dafür angesehen werden kann, dass es sich um einen einzelnen Relaxationsprozesses mit multiexponentiellen Charakter handelt (also auf kinetischer Ebene verschiedene Phasen nicht separiert werden können). Höchstwahrscheinlich liegt hier also eine sequentielle, über mehrere Zwischenstufen ablaufende Protonenbewegung innerhalb des Proteins vor, die mit der Abgabe eines Protons ins Lumen gekoppelt ist.

8. Charakterisierung der Relaxationsprozesse vor der O₂-Bildung im S₃ → S₀-Übergang

Aufgrund dieser Betrachtungen wird der folgende Reaktionsmechanismus vorgeschlagen (siehe Abbildung 8.18): Eine deprotonierbare Gruppe an der Protein-Wasser-Grenze gibt ihr Proton infolge der elektrostatischen Wechselwirkung mit der positiven Ladung des Y_Z⁺ ab. Die dadurch freigewordene Bindungsstelle wird durch das Proton einer benachbarten Gruppe, die weiter innerhalb des Proteins lokalisiert ist, besetzt. Diese jetzt deprotonierte Gruppe nimmt wiederum ein Proton von einer dritten benachbarten Gruppe auf u.s.w. Auf diese Weise kommt es, getrieben durch die positive Ladung des Y_Z⁺, zu einer gerichteten „Protonenloch“-Diffusion in Richtung Y_Z und Mangankomplex. Am Schlusspunkt dieser Kette erfolgt die entscheidende Deprotonierung am Mangankomplex oder in dessen Nähe, durch die der S-Übergang ausgelöst wird. Durch diese Wanderung der negativen „Protonenloch“-Ladung kommt es zu einer Absenkung des Y_Z-Redoxpotentials und damit zu der beobachteten multiphasigen Absenkung der freien Energie des Y_Z⁺Q_A⁻-Zustandes. Gleichzeitig wird aber vermutlich noch deutlicher das Redoxpotential des Mangankomplexes abgesenkt, so dass nun dessen Oxidation möglich wird (S₄-Bildung). In dem sich anschließenden O₂-bildenden Schritt kann die jetzt deprotonierte Gruppe als Protonenakzeptor für eines der bei der Wasserspaltung freiwerdenden Protonen dienen.

Eine dem S-Übergang vorausgehende Deprotonierung könnte dabei z.B. an einem Mangan-Liganden (H₂O, OH) oder an einer Säure/Base-Gruppe in der Nähe des Mangankomplexes erfolgen. Der zweite Mechanismus ist von [McEvoy und Brudvig 2004] auf Basis der in [Ferreira *et al.* 2004] ermittelten PSII-Kristallstruktur vorgeschlagen worden: Ein 4 Å vom Mangankomplex entferntes Arginin (CP43-Arg357) wird infolge der Y_Z-Oxidation deprotoniert. Die Protonenabgabe erfolgt in diesem Modell nur in den Zuständen S₂ und S₃, da erst die zusätzliche positive Ladung des Mangankomplexes in S₂ und S₃ [Saygin und Witt 1985, Haumann *et al.* 1994, Kretschmann *et al.* 1996, Haumann und Junge 1996] zusammen mit der positiven Ladung des Y_Z⁺ eine zur Deprotonierung ausreichend große pK-Verschiebung des Arginins bewirkt. Vorgeschlagen wird, dass Arg357 am Anfang eines Protonenkanals steht und das freigesetzte Proton nach der Diffusion durch die Proteinmatrix ins Lumen freigesetzt wird. Das deprotonierte Arginin fungiert dann als Akzeptor für bei der Wasserspaltung freiwerdende Protonen. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieses Modells ist, dass die Nähe des Arginin-Protons zum Mangankomplex eine drastische Absenkung des Redoxpotentials des Mangankomplexes hervorrufen sollte, durch die erst der Elektronentransfer vom Mangankomplex zum Y_Z ermöglicht wird.

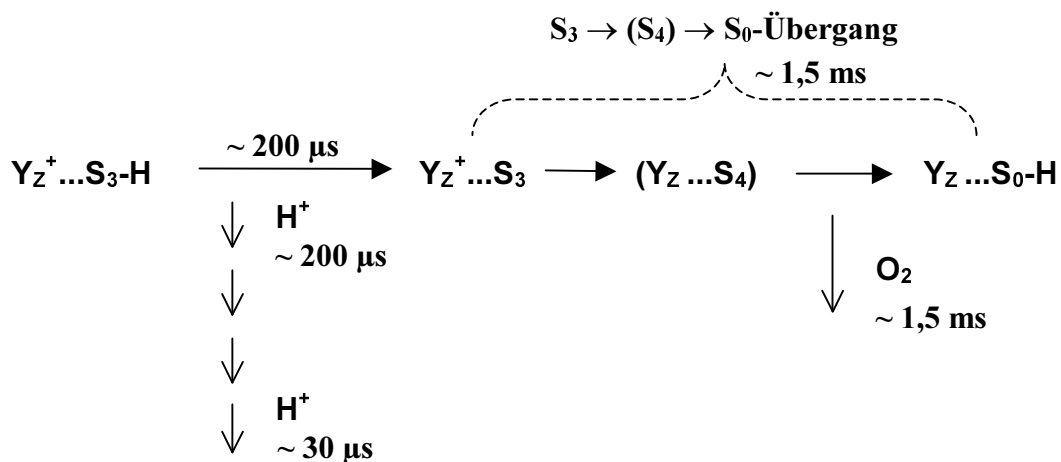


Abbildung 8.18: Schema der Reaktionen, die nach der Bildung von Y_Z⁺ im S₃-Zustand stattfinden (Erklärungen im Text).