

9. Zusammenfassung

1. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die erste systematische Untersuchung zu röntgeninduzierten Modifikationen des PSII-Mangankomplexes (*radiation damage*). Durch Röntgenabsorptionsmessungen konnte gezeigt werden, dass es schon nach wenigen Minuten Bestrahlung durch hochintensive Synchrotronstrahlungsquellen zu einer Ein-Elektronen-Reduktion kommt, die mit signifikanten Strukturveränderungen verbunden ist. Die Reduktionsrate ist dabei stark vom Oxidationszustand des Metallzentrums abhängig. Eine längere Bestrahlung führt zur vollständigen Zerstörung des Komplexes unter Bildung von Mn(II). Zudem zeigt die gefundene Temperaturabhängigkeit der Photoreduktion, dass proteinspezifische Bewegungen einen Einfluss auf die Strahlenchemie besitzen. Eine ähnlich klare Korrelation zwischen der Rate eines physiko-chemischen Prozesses (Reduktion des Metallzentrums) und der Temperaturabhängigkeit der Proteindynamik ist bisher nicht berichtet worden. Diese Ergebnisse sind von wesentlicher Bedeutung in Hinblick auf Strukturuntersuchungen an Röntgenstrahlungsquellen.
2. Ein Messplatz zur Rekombinationsfluoreszenz des PSII wurde erstellt, der *single-shot*-Messungen bei einer Abnahme der Signalintensität um mehr als vier Größenordnungen und über vier Dekaden im Zeitbereich ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass die zeitaufgelöste Detektion der Rekombinationsfluoreszenz eine gut geeignete Methode zur Untersuchung von Energetik und Kinetik der Elektronentransfer-Prozesse des PSII ist. Im Gegensatz zu anderen Messmethoden, wie sie in der Vergangenheit vorrangig für die Untersuchung der Redoxprozesse des PSII verwendet wurden (P680⁺-, Mangan-Absorptionsmessungen), ist dieser Ansatz nicht durch die optischen Eigenschaften der Probe limitiert (Lichtstreuung). Dadurch und durch das hervorragende Signal-Rausch-Verhältnis werden Messungen über einen wesentlich längeren Zeitbereich (~50 ms) nach der Ladungstrennung ermöglicht.
3. Durch Analyse der Blitzabhängigkeit der Rekombinationsfluoreszenz wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf den *miss*-Parameter des S-Zyklus untersucht und die optimalen Bedingungen für ein Voranschreiten im katalytischen Zyklus ermittelt. Die verschiedenen Ursachen, die zu *miss*-Ereignissen führen, wurden quantifiziert und es konnte gezeigt werden, dass der Hauptverlustprozess die Rekombination des ladungsseparierten Zustandes ist (~8 % Rekombination). Durch die Bestimmung der optischen Parameter konzentrierter PSII-Proben (Extinktionskoeffizient, Wirkungsquerschnitt) wurden die Bedingungen ermittelt, unter denen in Beblitzungsexperimenten eine vollständige Anregung aller Photosysteme in der Probe gewährleistet ist. Die hier gewonnenen Ergebnisse sind von Relevanz für alle Arten von Experimenten, bei denen die S-Zustände des Mangankomplexes durch kurze Lichtblitze gezielt populierte werden (XAS, EPR, optische Messungen).
4. Die Änderung der freien Energie, die mit der Bildung des ladungsseparierten Zustandes $Y_Z^+Q_A^-$ (innerhalb von 10 μ s) verbunden ist, wurde durch vergleichende Messungen von prompter und Rekombinationsfluoreszenz bestimmt. Damit war es möglich, die Redoxpotentiale des P680 und des Tyrosin-Z abzuleiten (+1,26 bzw. +1,22 V), die einer

direkten Messung nicht zugänglich sind. Die hier ermittelten Werte sind positiver als bisher angenommen, was von unmittelbarer Relevanz für den Mechanismus der katalytischen Wasserspaltung ist. Im Gegensatz zu einer neueren Studie, die zu ähnlichen Resultaten gelangt, wurden die in der hier vorliegenden Arbeit bestimmten Redoxpotentiale aus direkt ermittelten ΔG -Werten abgeleitet und beruhen ausschließlich auf Experimenten, die an PSII-Membranfragmenten eines einzigen Organismus (Spinat) durchgeführt wurden.

5. Die dem sauerstoffentwickelnden $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang vorausgehende energetische Relaxation des ladungsseparierten Zustandes $Y_Z Q_A^-$ (μs -Phasen des Elektronentransfers vom Y_Z zum $P680^+$) wurden untersucht. Diese mit Protonenbewegungen gekoppelte Relaxation steht vermutlich in direktem funktionellen Zusammenhang mit der katalytischen Wasserspaltung am Mangankomplex. Bisherige Interpretationen dieser Relaxation stützten sich ausschließlich auf den gefundenen H/D-Isotopeneffekt für die μs -Phasen des $Y_Z \rightarrow P680^+$ -Elektronentransfers. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Bestimmung des entropischen Beitrages zur Relaxation (Entropiezunahme), der pH-Abhängigkeit des Prozesses sowie durch Analyse der Kinetik der Reaktion gezeigt werden, dass während der Relaxation eine komplex verlaufende Deprotonierungsreaktion stattfindet, die mit einer Protonenfreisetzung in das wässrige Medium verbunden ist. Höchstwahrscheinlich handelt es sich um einen Protonentransport vom katalytischen Zentrum zur Proteinoberfläche, der vor dem sauerstoffentwickelnden $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang stattfindet. Zusammen mit neuesten zeitaufgelösten Röntgenabsorptionsmessungen führen diese Ergebnisse zu einer neuen Interpretation der Schritte unmittelbar vor der Sauerstoffentwicklung.