

IV. PS II Kernkomplexe und ihre Charakterisierung

IV.1 Biochemische Charakterisierung der Proben

IV.1.1 Probenpräparation

Sauerstoffentwickelnde PS II Kernkomplexe aus dem thermophilen Cyanobakterium *Synechococcus el.* wurden in der AG Witt / Fromme des Max-Volmer-Instituts der TU Berlin präpariert und zur Verfügung gestellt. Anzucht der Cyanobakterien sowie Isolation und Reinigung der PS II Kernkomplexe sind in den folgenden Referenzen beschrieben: Schatz und Witt (1984), Rögner *et al.* (1987), Dekker *et al.* (1988) und Zouni *et al.* (1998). Sie liegen als Monomere vor.

PS II Kernkomplexe aus Spinat wurden von Wolfgang Dörner in der AG Dau am Fachbereich Biologie/Botanik der Universität Marburg hergestellt. Die Präparationsvorschrift ist ein von W. Dörner (1999) modifiziertes Verfahren von Hankamer *et al.* (1997a). Die Kernkomplexe können sowohl in monomerer als auch in dimerer Form isoliert und gereinigt werden.

IV.1.2 Puffer

Alle Messungen wurden in folgenden Pufferlösungen durchgeführt:

Synechococcus el.

50 mM MES⁹⁰ bei pH 6.5, 20 mM CaCl₂, 10 mM Na Cl, 0.02 % β -DM⁹¹

Spinat:

50 mM MES bei pH 6.5, 20 mM CaCl₂, 10 mM Na Cl, 0.02 % β -DM, 30 % Glycerin, 5 mM Glukose, 0.1 mg/ml Glukose Oxidase, 0.1 mg/ml Katalase

Für PS II Proben aus höheren Pflanzen ist seit Jahren die stabilisierende Wirkung von Glycinbetain (Konzentration ≥ 1 M) bekannt [Mamedov *et al.* (1991)]. Deshalb findet die gesamte Präparation in Anwesenheit von Glycinbetain statt [Dörner (1999)]. Allerdings scheint es nur Auswirkungen auf die Donorseite von PS II zu haben [Papageorgiou und Murata (1995)]. Zeitaufgelöste Fluoreszenzexperimente zur Probendegradation, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten jedoch detektierbare Änderungen der Fluoreszenzkinetik schon nach ca. 20 min. Die Verwendung von 30 % Glycerin statt Glycinbetain und das Arbeiten

⁹⁰ MES - 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure.

⁹¹ β -DM - n-Dodecyl- β -D-maltosid.

unter anaeroben Bedingungen⁹² erhöhte die Probenstabilität um den Faktor 3. Vergleiche der Fluoreszenzkinetiken vor Einsetzen der Degradation zeigten keine Abhängigkeit vom verwendeten Puffer.

IV.1.3 Bestimmung der Chlorophyllanzahl pro Reaktionszentrum

Für die Charakterisierung photosynthetischer Proben ist die Antennengröße von entscheidender Bedeutung, die sich in der Anzahl der Chlorophylle pro Reaktionszentrum widerspiegelt. Besonders für annihilationsfreie Untersuchungen mittels transienter Absorption sind kleine Antennengrößen wichtig, da so größere Anregungsenergien verwendet werden können. Standardmäßig werden drei verschiedene Funktionsparameter auf die Chlorophyllkonzentration zur Bestimmung der Antennengröße normiert:

1. Konzentration des photoreduzierbaren Q_A
2. Sauerstoffentwicklung des Photosystem II
3. Konzentration von Pheophytin

Über einen Chlorophyllextrakt (Probe in 80 % Aceton und 20 % H_2O , 1 min inkubieren, 3 min zentrifugieren) läßt sich durch das Absorptionsspektrum die Chl-Konzentration messen. Die Konzentration in μM berechnet sich wie folgt [Porra *et al.* (1989)]:

$$\begin{aligned} [\text{Chl } a] &= 13.71 \cdot A_{663.6} - 2.85 \cdot A_{646.6} \\ [\text{Chl } b] &= 22.39 \cdot A_{646.6} - 5.42 \cdot A_{663.6} \end{aligned} \quad (\text{IV-1})$$

Das Verhältnis aus Chl *a* / Chl *b* kann mit dieser Methode nur bis zu einem Faktor von 8:1 zuverlässig ermittelt werden. Da sich Chl *b* nur in den äußeren Antennen LHC I und LHC II der pflanzlichen Photosynthese befindet, die bei Cyanobakterien nicht vorhanden sind, sind diese PS II Kernpräparationen frei von Chl *b*.

1. Q_A Reduktion: Die Konzentration von Zentren mit funktionstüchtigen Q_A läßt sich über die Reduktion von Q_A mit der Blitzphotolyse ($\Delta\epsilon$ (320 nm) = $1.3 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [Van Gorkom (1974)]) bei sättigender Anregung in Anwesenheit von 1 mM FeCy und 100 μM DCBQ⁹³ bestimmen. Für PS II Kernkomplexe aus *Synechococcus el.* wurden 55 Chl / Q_A , für Spinatdimere 52 Chl / Q_A und für Spinatmonomere 75 Chl / Q_A bestimmt.
2. Sauerstoffentwicklung: Die Konzentration von sauerstoffaktiven PS II Zentren läßt sich über die Sauerstoffentwicklung bei Anregung mit sättigenden *single-turnover* Anregungsblitzen messen. Dabei beträgt der Sauerstoffumsatz $\frac{1}{4} O_2$ pro Blitz pro Kernkomplex⁹⁴.

⁹² Zugabe von Glukose, Glukose Oxidase und Katalase, vgl. z. B. [Schelvis *et al.* (1995)] unter Stickstoffatmosphäre.

⁹³ 2,6-Dichloro-p-Benzochinon.

⁹⁴ Vgl. z.B. [Mauzerall und Greenbaum (1989)].

Ein Verhältnis von 69 Chl / aktives RZ für *Synechococcus el.* wurde gemessen. Bei den Spinatpräparationen mit Glycerinpuffer gibt es Probleme mit der Messung, da das Q_A teilweise erst nach mehreren Sekunden vollständig reoxidiert, wie experimentell über die Q_A -Bleichung ermittelt wurde. Dies erfordert eine wesentlich längere Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Blitzen. Ein Zerfall höherer S-Zustände des wasserspaltenden Mangankomplexes in dieser Zeit und damit eine sehr geringe O_2 -Ausbeute ist die Folge. Somit kann die Anzahl der O_2 -aktiven Zentren für Spinat nicht ermittelt werden.

3. Pheophytinkonzentration: Hankamer *et al.* (1997a) führten Pigmentanalysen mittels HPLC an Spinatkernkomplexen durch, die ähnlich präpariert worden sind, und erhielten eine Zentrengröße von 38.5 ± 2.1 Chl / 2 Pheo für Dimere und 35.5 ± 1.3 Chl / 2 Pheo für Monomere.

Es besteht somit über die Größe der Kernkomplexe eine relativ große Diskrepanz der Meßergebnisse, die folgendermaßen erklärt werden kann: Der wasserspaltende Komplex (OEC) ist bedeutend empfindlicher als die Akzeptorseite gegenüber Beschädigungen bei der Präparation der Kernkomplexe. Somit ist die Sauerstoffaktivität der Präparationen i. a. kleiner als die Redoxaktivität von Q_A . Daraus folgt eine scheinbar größere gemessene Chl-Anzahl pro RZ.

Catuchi *et al.* (1998) berichteten 6.3 % inaktive Q_A für Dimere und 45 % inaktive Q_A für Monomere an vergleichbaren Spinatkernkomplexpräparationen. Diese Ergebnisse korrespondieren gut mit den hier ermittelten Zentrengrößen von 52 bzw. 75 Chl / aktives Q_A bei einer Annahme von ungefähr gleicher Anzahl Chl / RZ. Bei Dimeren würde die Berücksichtigung der inaktiven Q_A zu einer Zentrenzahl von ca. 49 führen. Da die Spinatmonomere weit weniger intakt sind als die Dimere, werden sie in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt. Wenn die Rede von Kernkomplexen aus Spinat ist, sind im weiteren die Dimere gemeint.

Ein starker Unterschied der Zentrengrößen zeigt sich auch zwischen den gemessenen Werten von Chl / Q_A und den in der Literatur berichteten Werten von Chl / 2 Pheo, die sich nicht über die Inaktivität von 6.3 % Q_A für die Spinatdimere erklären läßt. Es ist aber bekannt, daß extrahierte Chlorophylle leicht pheophytinisieren, d. h. das Mg-Zentralatom wird gegen zwei H-Atome ausgetauscht (Chl \rightarrow Pheo [Porra (1991)]). So kann es bei der Methode der Messung der Verhältnisse zwischen Chl / 2 Pheo mittels HPLC zu einer Unterschätzung der Zentrengröße kommen.

Die Bestimmung des Chl *a/b* Verhältnisses für die Spinatpräparationen mit Formel IV-1 ergab ein Verhältnis von 40:1 bis 90:1 an der identischen Probe und wird daher nicht verwendet. Eine der hier verwendeten vergleichbare PS II Kernkomplexpräparation aus Spinat zeigte eine Chl *a/b* Verhältnis von 35:1, ermittelt mit HPLC [Hankamer *et al.* (1997a)]. Der Chl *b*

Gehalt ist vorwiegend auf LHC II Verunreinigung zurückzuführen, da dieser äußere Lichtsammelkomplex mit PS II assoziiert ist. LHC II enthält 8 Chl *a* und 7 Chl *b* [z. B. Nakayama und Mimuro (1994)] bzw. 9 Chl *a* und 6 Chl *b* [z. B. Mullineaux *et al.* (1993)]. Dies ergibt bei 52 Chl / RZ für PS II Kernkomplexdimere aus Spinat ein LHC II pro 4.5 bzw. ein pro 4 Kernkomplexe. Dabei ist nicht geklärt, ob und wie stark die LHC II noch an die Kernkomplexe gekoppelt sind. Dies reduziert die Zahl der Chl / RZ für Spinat weiter um ca. 2 Chl.

Auf Grund der Messungen und der Diskussion wird im Folgenden die Zentrengröße von 48-52 Chl / RZ für Spinat und 50-55 Chl / RZ für *Synechococcus el.* auf Grundlage der Messung der Q_A-aktiven Zentren verwendet.

IV.1.4 Test auf PS I Anteile

Zur Feststellung von Verunreinigungen durch PS I wurden Blitzphotolysemessungen zur Bleichung von P700 durchgeführt. Dabei wird die Probe durch Lichtblitze sättigend angeregt und die Ausbleichung von P700 mit $\Delta\epsilon$ (702 nm) = $6.4 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ im ms-Zeitbereich unter Anwesenheit von 5 mM Ascorbat und 5 μM PMS zur Rereduktion von P700⁺ gemessen. Es konnte kein Signal in diesem Zeitbereich detektiert werden. Über das Signal/Rausch Verhältnis der Anlage läßt sich für die *Synechococcus el.* und die Spinatpräparation P700:Chl < 1:10⁴ abschätzen. Dies bedeutet eine Konzentration von < 0.5 % PS I. Die Proben sind somit frei von PS I Anteilen.

IV.2 Stationäre Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften

IV.2.1 Absorptionsspektren

Für die Charakterisierung der PS II Kernkomplexe wurden die stationären Absorptions- und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Abbildung IV-1a zeigt das Raumtemperaturabsorptionsspektrum von *Synechococcus el.* in vitro (80% Aceton, 20 % H₂O) und in vivo im oben beschriebenen Puffer. Das Absorptionsspektrum wird durch Chl *a* dominiert. Für das Spektrum in vitro sind die Q_y- und die B-Banden bei 664, 630 und 410 nm mit Pfeilen gekennzeichnet. Die kleineren Banden bei 535, 578 und 615 nm stellen eine Überlagerung aus der Q_x(0,0)-Bande und von Übergängen in höhere vibronische Zustände Q_y(0,n) und Q_x(0,n) dar [Breton und Vermeiglio (1982), Fragata *et al.* (1988)].

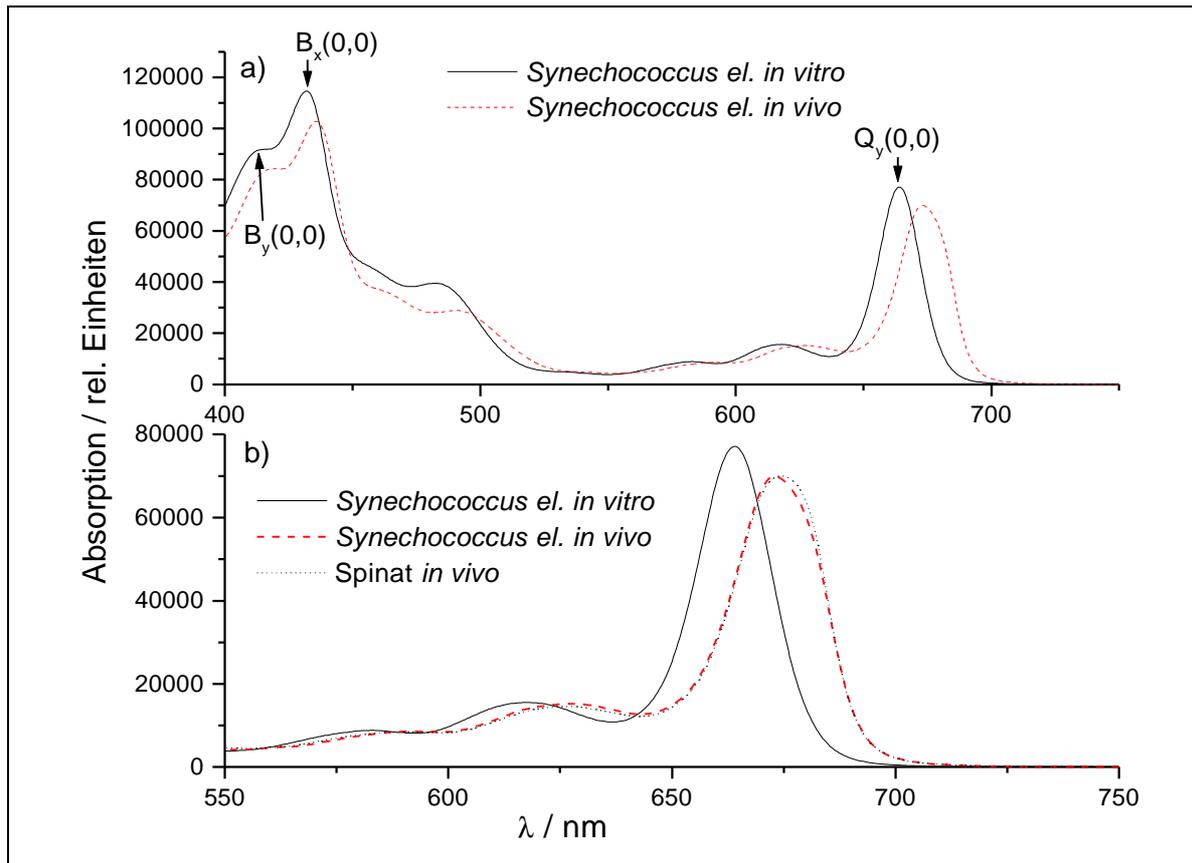


Abbildung IV-1 Raumtemperaturabsorptionsspektren der Kernkomplexe

a) Soret- und Q-Banden von *Synechococcus el. in vitro* (—) und *in vivo* (---)

b) Qy-Banden von *Synechococcus el. in vitro* (—), *Synechococcus el. in vivo* (---) und Spinat *in vivo* (···).

Die Absorptionsbanden der Chlorophylle sind in den PS II Kernkomplexen *in vivo* gegenüber Chlorophyll *in vitro* auf Grund von sowohl exzitonen Wechselwirkungen der Chlorophylle untereinander als auch durch Pigment-Protein-Wechselwirkungen rot verschoben. Das Absorptionsmaximum der $Q_y(0,0)$ -Bande⁹⁵ der Kernkomplexe *in vivo* aus *Synechococcus el.* liegt bei 673.0 nm und aus Spinat bei 674.7 nm. Zwischen 450 und 520 nm sind die Absorptionsbanden der Carotenoide zu sehen, während die Pheophytine unter den Absorptionsbanden der Chlorophylle nicht aufgelöst werden können.

Das Absorptionsspektrum der Q_y -Bande bei Raumtemperatur *in vivo* ist für beide Kernpräparationen unstrukturiert und breiter als das *in vitro*. Um erkennen zu können, ob unterschiedliche Gruppen von Chlorophyllen mit gleichem Absorptionsmaximum vorhanden sind, wurden Tieftemperaturabsorptionsspektren bei 5 K aufgenommen (Abbildung IV-2). Die Absorptionsspektren bei 5 K sind strukturierter als bei Raumtemperatur, da die Absorptionsbanden nicht thermisch verbreitert sind. Es sind drei Peaks mit unterschiedlicher Stärke für *Synechococcus el.* und Spinat bei 670, 675 und 683 nm sichtbar. Bemerkenswert ist

⁹⁵ Siehe Abbildung IV-1.

die deutliche Ausprägung einer Bande > 680 nm, also rotverschoben zum primären Donator. Die Minima der zweiten Ableitung geben Hinweise für die Maxima einer möglichen Zerlegung in Gaußbanden, die Hinweise auf die Pigmentverteilung geben könnten. Eine Bandenzerlegung mit 7 Gaußkurven wurde durchgeführt aber wegen der vielen Möglichkeiten solcher Zerlegungen hier nicht präsentiert.

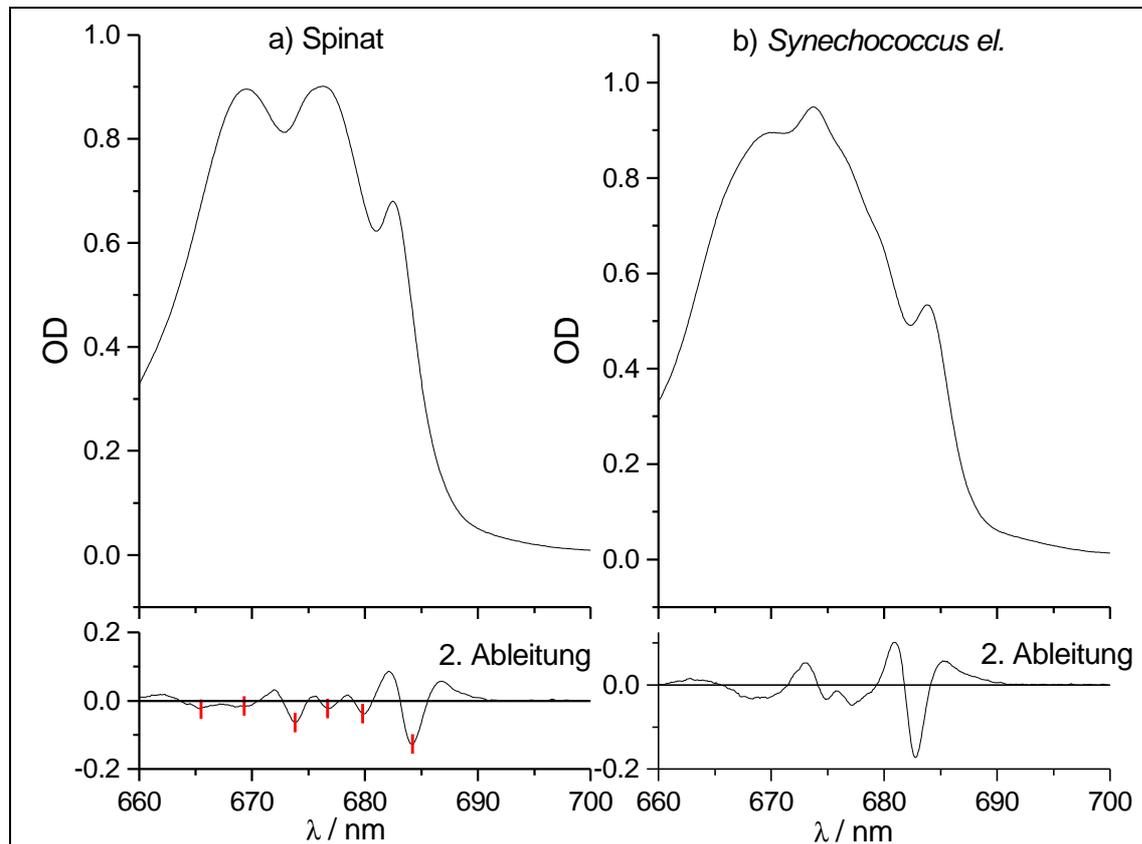


Abbildung IV-25 K-Absorptionsspektren der $Q_y(0,0)$ -Bande von a) Spinat- und b) *Synechococcus el.* PS II Kernkomplexen; unten: 2. Ableitung der Absorptionsspektren.

Somit kann festgestellt werden, daß es, wenn auch kleine, spektrale Unterschiede in der Zusammensetzung der Antennenchlorophyllkomplexe zwischen den beiden Präparationen gibt.

IV.2.2 Fluoreszenzspektren, Reinheit der Probe

Ein wesentlicher Teil der Arbeit besteht aus Messungen zeitaufgelöster Fluoreszenzspektren an den PS II Kernkomplexen. Somit ist die Charakterisierung der stationären Fluoreszenzspektren eine Voraussetzung für diese Messungen. Des weiteren stellen stationäre Fluoreszenz- und auch Anregungsspektren eine gute Untersuchungsmethode zum Testen der Probe auf Verunreinigungen, wie ungekoppelte Antennenfragmente⁹⁶ dar, soweit sie ein zum intakten PS II Kernkomplex verschiedenes Fluoreszenzspektrum aufweisen. Da die Anregungs-

⁹⁶ Ungekoppelte Antennenfragmente sind Chromophore und chromophorhaltige Proteine, die energetisch von den RZ entkoppelt sind.

nergie ungekoppelter Antennenfragmente nicht durch das RZ gelöscht werden kann, ist die Fluoreszenzquantenausbeute um ein vielfaches höher als bei Antennenkomplexen, die an das RZ gebunden sind. Somit ist die Fluoreszenz sehr sensitiv in der Detektion auch geringer Verunreinigungen.

Untersuchung der PS II Kernpräparation aus Synechococcus el.

Stationäre Fluoreszenzspektren wurden bei den *Synechococcus el.* Präparationen im Standardpuffer mit Anregung bei 430 nm (B-Bande von Chl *a*), 670 nm (Q_y-Bande von Chl *a*) und bei 610 nm durchgeführt, wo neben Chl *a* auch die Phycobilisomen, die die äußere Antenne von Cyanobakterien bilden und möglicherweise noch teilweise in der Kernkomplexpräparation vorhanden sind, absorbieren [Glazer (1984)].⁹⁷ Die Spektren sind im Maximum auf 1 normiert. Das Maximum der Fluoreszenz ist, unabhängig von der Anregungswellenlänge, bei 682 nm. Im Bereich $\lambda < 670$ nm ist für $\lambda_{\text{ex}} = 610$ nm eine bedeutend stärkere Fluoreszenz als bei 430 und 670 nm Anregung erkennbar. Dies deutet auf Verunreinigungen der Probe mit ungekoppelten Chromophoren hin. Um die Natur dieser Chromophore festzustellen, wurden Anregungsspektren bei 685 nm, d. h. im Bereich des Fluoreszenzmaximums der PS II Kernkomplexe, und bei 640 nm aufgenommen. Bei 640 nm ist die Fluoreszenzintensität der direkt angeregten Kernkomplexe bei 430 nm vernachlässigbar im Vergleich zu jener der Verunreinigung.

Das Anregungsspektrum, detektiert bei 685 nm (Abbildung IV-3b), hat prinzipiell den gleichen Verlauf wie das Absorptionsspektrum *in vivo*. Dies ist für ein gekoppeltes Chromophorsystem zu erwarten. Bei 640 nm Detektion hingegen zeigt sich ein völlig anderes Spektrum mit Maximum bei 652 nm, das dem Absorptionsspektrum von Allophycocyanin (APC) mit einem Absorptionsmaximum bei 650-655 nm [Hucke (1993), Glazer (1984)] ähnlich ist. Andere Phycobilliproteine mit Absorptionsmaxima bei 620 nm (Phycocyanin) und 567 nm (Phycoerythrin) konnten nicht detektiert werden. APC ist das innerste, dem Kernkomplex nächste Billiprotein der Phycobillisome [Glazer (1984), Glazer *et al.* (1985)], an das die anderen Phycobilliproteine gekoppelt sind. Somit ist auch daher die Wahrscheinlichkeit der Verunreinigung mit dem Billiprotein APC am wahrscheinlichsten. Die Konzentration der APC kann nicht abgeschätzt werden. Ihr Beitrag zur Fluoreszenz bei direkter Anregung ist sichtbar. Allerdings wurden alle zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen mit Anregungswellenlängen zwischen 670 und 700 nm durchgeführt. Bei 670 nm ist die Absorption von APC um eine Größenordnung geringer als bei 610 nm und die der

⁹⁷ Siehe Abbildung IV-3a.

Kernkomplexe um den Faktor 10 größer. Dieses Verhältnis wird für die direkte Anregung von APC für längere Wellenlängen noch ungünstiger, so daß der Einfluß vernachlässigt werden kann. Weiterhin zeigt der direkte Vergleich der Fluoreszenzspektren bei 670 nm und bei 430 nm Anregung keine Unterschiede, was diese Behauptung unterstützt.

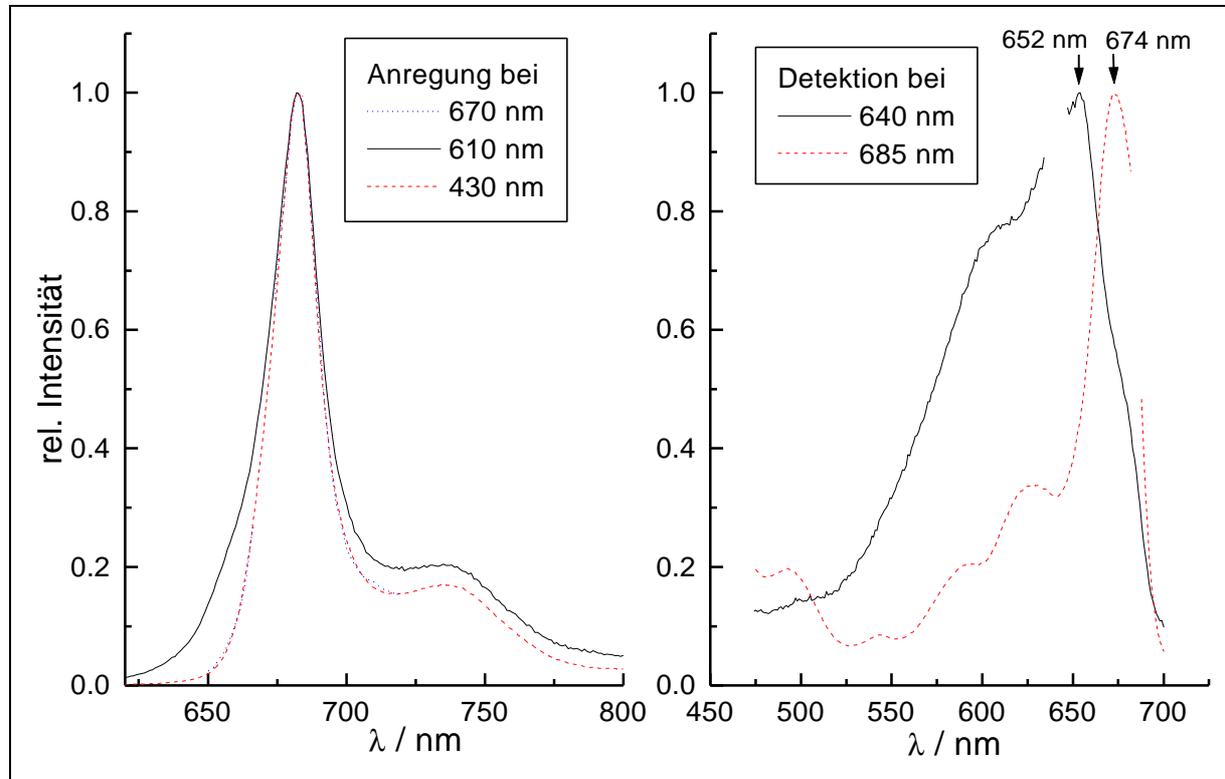


Abbildung IV-3 a) Stationäres Fluoreszenzspektrum von PS II Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* bei 670, 610 und 430 nm angeregt; b) Anregungsspektrum bei 640 und 685 nm detektiert.

Untersuchung der PS II Kernpräparationen aus Spinat

An PS II Kernpräparationen aus Spinat wurden Messungen der stationären Fluoreszenz bei offenen (+1 mM $K_3Fe(CN)_6$) und geschlossenen RZ (+10 μ M DCMU) bei verschiedenen Anregungswellenlängen durchgeführt.⁹⁸ Das Fluoreszenzmaximum ist unabhängig von der Anregungswellenlänge und dem Redoxzustand des RZ bei 682 nm. Für offene RZ können Abhängigkeiten von der Anregungswellenlänge im Bereich > 690 nm detektiert werden (Abbildung IV-4b). Diese Unterschiede treten aber nur für Anregungen bei 700 nm auf, für Anregungswellenlängen von 625, 670 und 685 nm⁹⁹ ist kein Unterschied erkennbar. Kleinere, aber kontinuierlichere Abhängigkeiten von der Anregungswellenlänge sind auch im blauen Spektralbereich detektierbar. So nimmt die Amplitude bei $\lambda < 690$ nm für wachsende Anregungswellenlängen ab. In Kernkomplexen mit geschlossenen RZ (Abbildung IV-4a) ist die disku-

⁹⁸ Siehe Abbildung IV-4.

⁹⁹ Letztere wird nicht gezeigt.

tierte Anregungswellenlängenabhängigkeit weit geringer als in offenen RZ (Abbildung IV-4b).

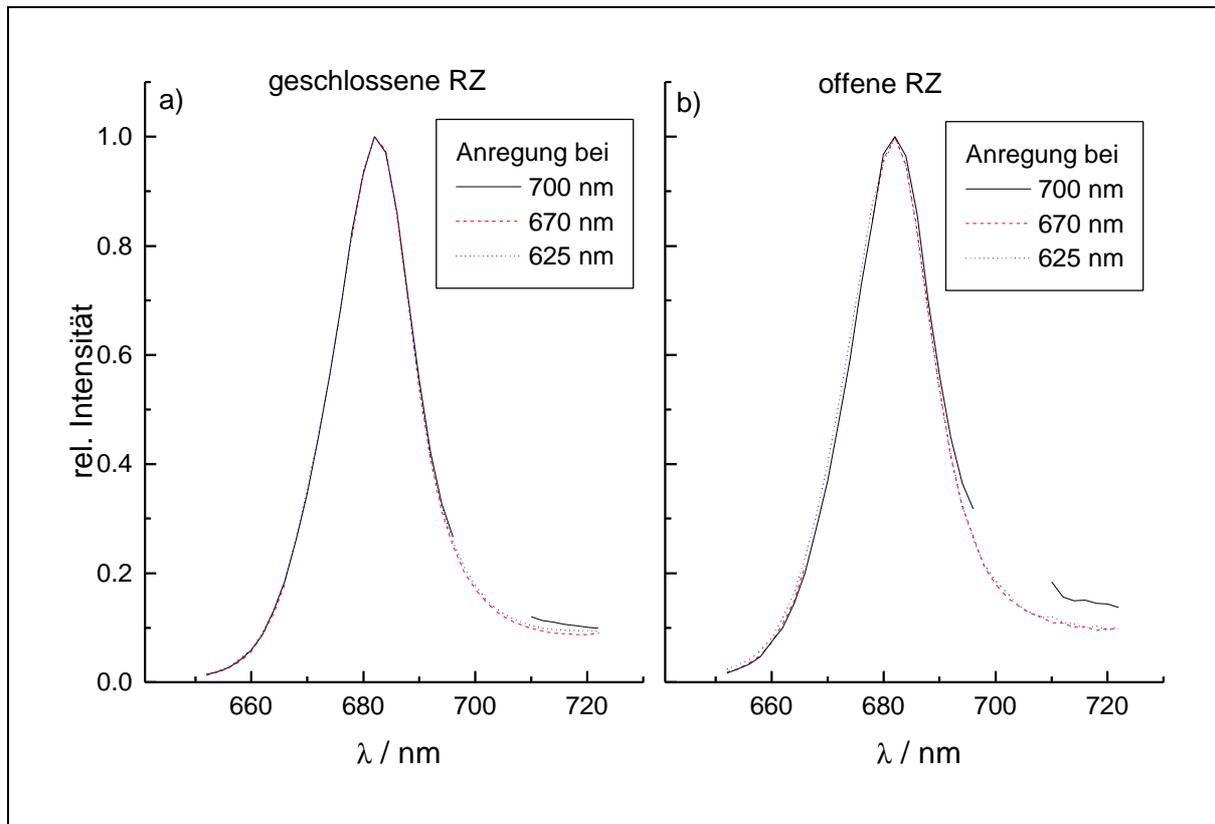


Abbildung IV-4 Normierte stationäre Fluoreszenzspektren von PS II Kernkomplexen aus Spinat bei 625, 670 und 700 nm Anregung mit a) geschlossenen RZ und b) offenen RZ.

Auch hier ist eine mögliche Erklärung das Vorhandensein von ungekoppelten Antennenkomplexen, deren Fluoreszenzquantenausbeute somit unabhängig vom Redoxzustand des RZ ist. Da geschlossene RZ eine 5-7.5 mal höhere Fluoreszenzquantenausbeute haben als offene,¹⁰⁰ sinkt damit der Einfluß von der Fluoreszenz der Verunreinigungen. Der Effekt ist im roten Spektralbereich deutlicher ausgeprägt als im blauen.

Die Abhängigkeit der stationären Fluoreszenzquantenausbeute vom Redoxzustand von PS II ist seit langem bekannt¹⁰¹. Ob der Anstieg der Fluoreszenz für geschlossene RZ mit einem der beiden Grenzfälle, der prompten oder der verzögerten Fluoreszenz durch Ladungsrecombination, beschrieben werden kann, ist u.a. Gegenstand dieser Arbeit.

Für ein *trap*-limitiertes Modell der Ladungstrennung, das eine schnelle Äquilibration der Anregungsenergie zwischen der Antenne und dem primären Donator beinhaltet, wird die Unabhängigkeit des Quotienten der Fluoreszenzintensität von PS II mit geschlossenen RZ (F_{\max}) und PS II mit offenen RZ (F_0) von der Detektions- und Anregungswellenlänge erwartet.

¹⁰⁰ Siehe unten und Abbildung IV-5.

¹⁰¹ Siehe z. B. Review von Van Gorkom (1986).

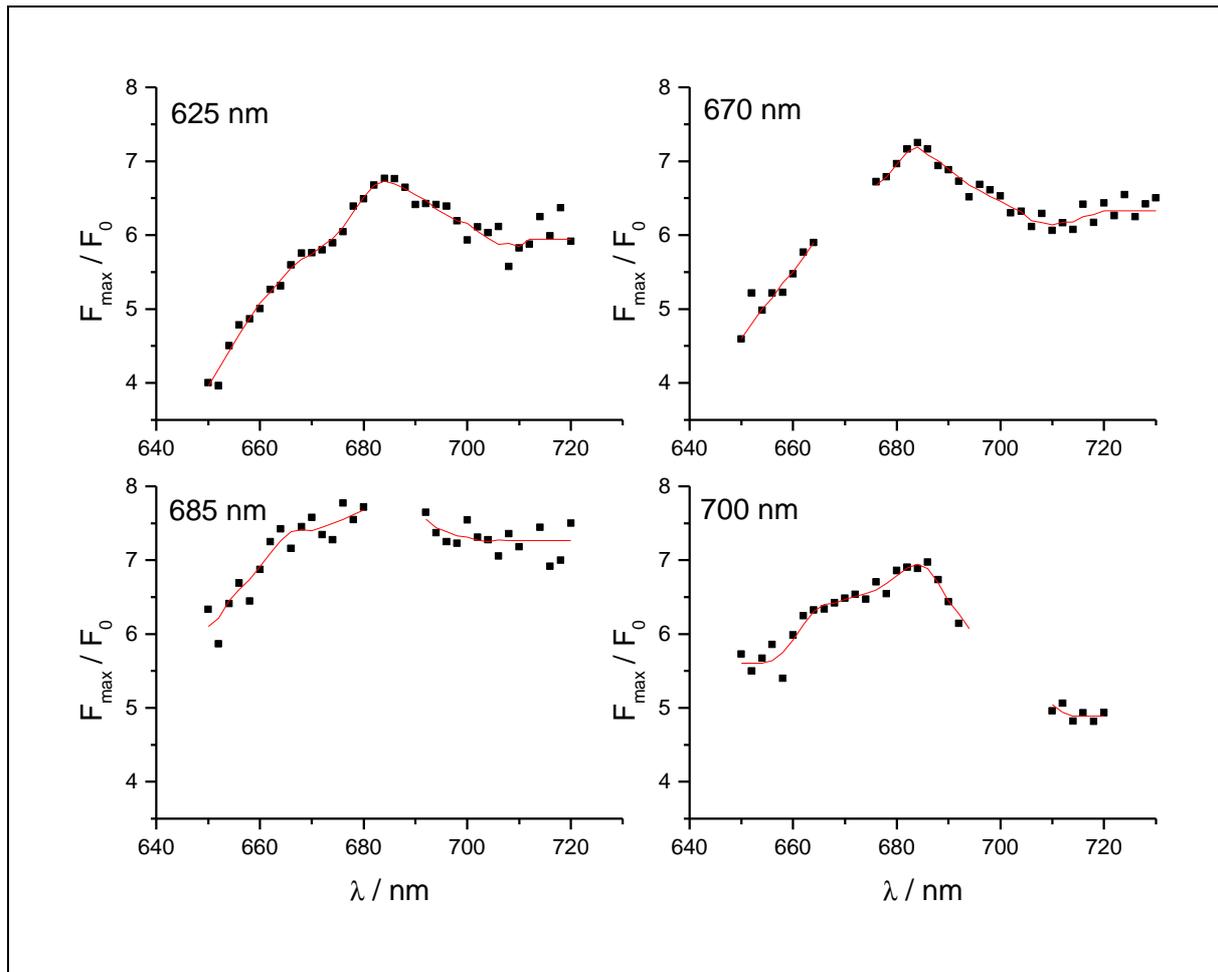


Abbildung IV-5 Quotient stationärer Fluoreszenzspektren aus PS II Kernkomplexen mit geschlossenen (F_{\max}) und offenen (F_0) RZ bei 625, 670, 685 und 700 nm Anregung.

Abbildung IV-5 zeigt allerdings eine starke Abhängigkeit des Faktors F_{\max}/F_0 von Anregungs- und Emissionswellenlänge. Dau und Sauer (1996) haben eine ähnliche Abhängigkeit an PS II Membranen, allerdings nur mit max. 10 % Abweichung, gemessen. Sie begründen dies mit der Äquilibration der Anregungsenergie zwischen den äußeren Antennen LHC II und der inneren Kernantenne. Bei den Kernkomplexpräparationen ist die äußere Antenne nicht vorhanden und die Antenne somit bedeutend kleiner. Weiterhin zeigt sich bei Dau und Sauer nur bei Anregung der höherenergetisch absorbierenden Antennen (d. h. LHC II) einen Abfall des F_{\max}/F_0 Verhältnisses im blauen Detektionbereich ($\lambda < 670$ nm), das mit ihrer These übereinstimmt. Im Gegensatz dazu ist bei diesen Messungen der Effekt eines sinkenden F_{\max}/F_0 Verhältnisses für $\lambda < 670$ nm, unterschiedlich stark ausgeprägt, unabhängig von der Anregungswellenlänge zu detektieren. Er nimmt allerdings mit wachsendem λ ab. Das Maximum von F_{\max}/F_0 ist bei ca. 685 nm Detektion, unabhängig von der Anregungswellenlänge. Das größte F_{\max}/F_0 Verhältnis wird bei Anregung mit $\lambda = 685$ nm mit dem Faktor 7.5 erreicht. Ein Abfall dieses Verhältnisses ist nicht nur im blauen sondern auch im roten Spek-

tralbereich mit $\lambda > 690$ nm zu detektieren, der bei 700 nm Anregung am stärksten ausgeprägt ist.

Die Annahme einer transferlimitierten Ladungstrennungskinetik könnte die Verstärkung des Abfalls des F_{\max} / F_0 Verhältnisses in der Nähe der Anregungswellenlänge erklären, wie er bei Anregung in der blauen und der roten Flanke der Q_y -Bande auftritt. Der prinzipielle spektrale Verlauf mit Maximum bei ~ 685 nm und Abfall des F_{\max} / F_0 Verhältnisses unabhängig von der Anregungswellenlänge ist im Gegensatz dazu nicht kompatibel mit dieser Annahme. Einen Aufschluß über die Limitierung der Ladungstrennungskinetik werden die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen in dieser Arbeit geben.

Die wahrscheinlichere Erklärung für die gemessenen Effekte ist eine Kontamination der Probe mit ungekoppelten Antennenfragmenten, deren Fluoreszenzintensität damit unabhängig vom Redoxzustand des RZ ist. Die Analyse von Hankamer *et al.* (1997a) zeigte durch Detektion von Chl *b*,¹⁰² daß auch Reste von extrinsischen Antennen vorhanden sein müssen. LHC II, die äußere Antenne von PS II, hat ein zu den Kernkomplexen blauverschobenes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum [Nakayama und Mimuro (1993), Ide *et al.* (1987)]. Somit ist der Einfluß der Fluoreszenz im blauen Detektionsbereich, wo die Fluoreszenz der Kernkomplexe stark abnimmt, am größten. Die Änderung des F_{\max} / F_0 Verhältnisses in diesem Bereich nimmt bei längerwelliger Anregung ab, da der Extinktionskoeffizient von LHC II relativ zu dem der Kernkomplexe abnimmt.

Für die Abnahme von F_{\max} / F_0 im langwelligen Bereich können mit der gleichen Argumentation Verunreinigungen durch verstärkt in diesem Bereich absorbierende und emittierende Antennenfragmente, wie z. B. im roten Bereich absorbierende Antennenfragmente von CP43 und CP47 der PS II Kernkomplexe oder auch LHC I, der äußeren Antenne von PS I [Nechushtai *et al.* (1996)] diskutiert werden.

Aus der Charakterisierung kann geschlossen werden, daß wegen der Empfindlichkeit der Fluoreszenz in diesen gut präparierten Proben noch ungekoppelte Antennenfragmente auf Grund ihrer hohen Fluoreszenzquantenausbeute detektierbar sind. Dieser Anteil muß bei den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen zumindest für die Spinatpräparationen berücksichtigt werden.

Die langsame Reoxidationszeit von Q_A^- der Spinatpräparationen im Sekundenbereich verhindert Absorptionsdifferenzmessungen an offenen RZ unter Einsatz der Rotationsküvette¹⁰³,

¹⁰² Siehe oben.

¹⁰³ Siehe auch Kap. V.4.

bei der die Wiedereintrittszeit der Probe in das Meßvolumen ca. 160 ms¹⁰⁴ beträgt. Die PS II Kernkomplexe aus *Synechococcus el.* wären für diese Messungen geeignet, standen aber nicht in ausreichender Menge zur Verfügung.

¹⁰⁴ Siehe Kap. III.2.