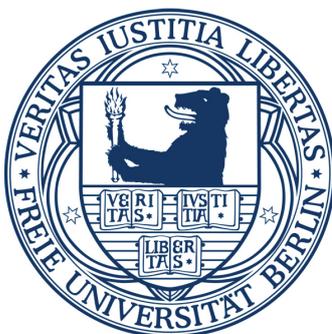


Joachim Buchta

Zeitaufgelöste Messungen der  
Rekombinationsfluoreszenz  
zur Untersuchung energetischer  
und kinetischer Parameter  
des Photosystems II aus  
höheren Pflanzen, Grünalgen  
und Cyanobakterien

im Fachbereich Physik  
der Freien Universität Berlin  
eingereichte Dissertation

2014



1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Dau
2. Gutachterin: Prof. Dr. Ulrike Alexiev

Datum der Disputation: 14. Juli 2014

# Kurzzusammenfassung

Das Photosystem II (PSII) spielt als einer der wichtigsten Bausteine der Photosynthese und bei der Bildung von Sauerstoff eine entscheidende Rolle für das Leben auf der Erde. Darüber hinaus dient es auch als Modellsystem für die solarbetriebene Wasserspaltung. Für ein genaues Verständnis der Funktionsweise ist eine Kenntnis sowohl des strukturellen Aufbaus als auch der energetischen und kinetischen Parameter erforderlich. Die zeitaufgelösten Messungen der verzögerten und prompten Chlorophyllfluoreszenz ermöglichen es, diese Parameter zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Die Temperaturabhängigkeit des sauerstoffbildenden Schritts ( $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$ -Übergang im Kok-Zyklus) wurde im Temperaturbereich  $-2,7$  bis  $27^\circ\text{C}$  gemessen, um das Auftreten eines möglichen Knickpunktes in der Arrhenius-Darstellung zu ermitteln. Dieser konnte nicht festgestellt werden, und die erhaltenen Ratenkonstanten lassen sich in guter Näherung mit einem monophasischen Arrhenius-Verhalten ( $E_A = 231 \text{ meV}$ ) beschreiben.

Messungen an genetisch veränderten PSII-Membranpartikelproben der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, denen die Carboanhydrase Cah3 fehlt, haben ergeben, dass die Protonenfreisetzung im  $S_3 \rightarrow S_4$ -Übergang deutlich schneller abläuft, wenn Hydrogencarbonat zur Verfügung steht. Dieses Ergebnis unterstreicht die wichtige Rolle der mit den Elektronentransfer-Schritten verbundenen Protonenbewegungen.

Für Core-Partikel-Proben von *Thermosynechococcus elongatus* (thermophile Cyanobakterien) konnten Bindungskonstanten für die PSII-Inhibitoren Terbutryn und Stigmatellin bestimmt werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde (von der kooperierenden Gruppe von A. Zouni, TU Berlin) das erste kristallographische Modell eines Photosystems mit gebundenem Herbizid erstellt. Damit lässt sich der Einfluss der Herbizide auf das  $Q_A$ -Redoxpotential erklären.

Die Untersuchungen zweier PsbA-Varianten von *Thermosynechococcus elongatus* zeigen Unterschiede in mindestens zwei PSII-Redoxpotentialen. Daraus ergeben sich Anhaltspunkte, wie Cyanobakterien auf Lichtstress reagieren und sich vor schädlichem Singulett-Sauerstoff schützen.

An PSII-Proben aus Spinat (*Spinacia oleracea*), bei denen der Mangankomplex entfernt wurde, konnten die Energieniveaus der Gibbs'schen freien Energie sowie Aktivierungsenergien für drei Radikalpaarzustände ( $Y_Z^+Q_A^-$ ,  $Y_Z^+P680^+Q_A^-$  und  $Y_Z^+Q_A^-/Q_B^-$ ) ermittelt werden. Mithilfe dieser Ergebnisse konnte ein umfassendes Energieschema für Mn-befreites PSII erstellt werden.

## Abstract

Photosystem II (PSII) as one of the most important components of the photosynthetic machinery plays an important role in oxygen evolution and thus for life on earth. Furthermore, it serves as a model system for solar water splitting. Besides knowing the structure, the precise understanding of PSII function and the related energetic and kinetic parameters are essential. Time-resolved delayed and prompt chlorophyll fluorescence measurements allow the determination of these parameters. In the context of this thesis, the following results were obtained:

The temperature-dependence of the oxygen-evolving step ( $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$ -transition of the reaction cycle) was measured for temperatures ranging from  $-2.7$  to  $27^\circ\text{C}$ , in order to determine a possible break-point behaviour in the Arrhenius plots. The presence of a break point cannot be excluded completely, but the obtained data can be described to a good approximation by a monophasic Arrhenius behaviour ( $E_A = 231 \text{ meV}$ ).

Measurements on genetically modified PSII of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, lacking the carbonic anhydrase denoted as Cah3, resulted in clearly enhanced proton release during the  $S_3 \rightarrow S_4$  transition when bicarbonate was available. This result underlines the important role of proton movements associated with the individual electron transfer steps.

Binding constants for PSII inhibitors terbutryn and stigmatellin could be determined for PSII core particles of *Thermosynechococcus elongatus*, a thermophilic cyanobacterium. Based on these results, the first crystallographic model of a photosystem with bound herbicide was obtained (by the cooperating group of A. Zouni, TU Berlin). An explanation of the influence of herbicide binding on the  $Q_A$  redox potential became possible.

Examination of PSII with two variants of the psbA subunits of *Thermosynechococcus elongatus* show differences in at least two PSII redox potentials. This gives evidence how cyanobacteria respond to light stress and protect themselves from harmful singlet oxygen.

In Mn-depleted PSII samples prepared from spinach (*Spinacia oleracea*), Gibbs free-energy levels and activation energies for three radical pair states ( $Y_Z^+ Q_A^-$ ,  $Y_Z^+ P680^+ Q_A^-$  and  $Y_Z^+ Q_A^- / Q_B^-$ ) could be attained. The results facilitated the establishment of a comprehensive energy scheme for Mn-free PSII.

---

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1 Grundlagen</b>	<b>9</b>
1.1 Photosynthese . . . . .	9
1.2 Photosystem II . . . . .	10
1.3 Chlorophyllfluoreszenz . . . . .	17
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1 Präparation von PSII-Membranfragmenten aus Spinat . . . . .	25
2.2 Messung der prompten Fluoreszenz . . . . .	27
2.3 Messung der Rekombinationsfluoreszenz . . . . .	29
2.3.1 Fluoreszenzdetektion . . . . .	30
2.3.2 Auswertung der Zeitverläufe . . . . .	32
2.4 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie . . . . .	33
2.5 Mathematische Auswertung der untersuchten Größen . . . . .	35
2.5.1 Temperaturabhängigkeit . . . . .	35
2.5.2 pH-Abhängigkeit . . . . .	35
2.5.3 Konzentrationsabhängigkeit . . . . .	36
<b>3 Aktivierungsenergie des sauerstoffbildenden Schritts</b>	<b>37</b>
3.1 Motivation . . . . .	37
3.2 Ergebnisse . . . . .	39
<b>4 Rolle der Carboanhydrase im Photosystem II von Grünalgen</b>	<b>45</b>
4.1 Die Rolle von Hydrogencarbonat im PSII . . . . .	45
4.2 Ergebnisse der Messungen . . . . .	48
4.3 Schlussfolgerungen . . . . .	57

<b>5</b>	<b>Bindung des Herbizids Terbutryn an cyanobakterielles Photosystem II</b>	<b>61</b>
5.1	Messungen mit Inhibitoren . . . . .	61
5.2	Bestimmung des optimalen pH-Bereichs . . . . .	64
5.3	Ermittelte Bindungskurven . . . . .	66
5.4	Kristallstruktur mit gebundenem Herbizid . . . . .	70
5.5	Zusammenfassung . . . . .	73
<b>6</b>	<b>Funktionelle Untersuchung zur <i>psbA</i>-Genfamilie von <i>Thermosynechococcus elongatus</i></b>	<b>75</b>
6.1	Die <i>psbA</i> -Genfamilie . . . . .	76
6.2	Messungen . . . . .	77
6.3	Zusammenfassung und Schlussfolgerung . . . . .	84
<b>7</b>	<b>Ladungsrekombination in PSII-Proben ohne Mn-Komplex</b>	<b>87</b>
7.1	Untersuchung der $P680^+Q_A^-$ -Rekombination . . . . .	87
7.2	Untersuchung der $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination . . . . .	95
7.3	Langsamer $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$ -Rekombinationsprozess . . . . .	102
7.4	Verfolgung der langsamen Rekombination mit FT-Infrarot-Spektroskopie . .	108
7.5	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen . . . . .	125
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>129</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>133</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>137</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>153</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>157</b>
<b>A</b>	<b>Pufferlösungen</b>	<b>159</b>
<b>B</b>	<b>Technische Daten</b>	<b>161</b>
B.1	Messplatz - Verzögerte Fluoreszenz . . . . .	161
B.2	Laser . . . . .	162
B.3	Photomultiplier . . . . .	162
<b>C</b>	<b>Ergänzende Abbildungen zu Kapitel 7</b>	<b>163</b>
C.1	Abbildungen $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination . . . . .	163
C.2	Abbildungen $S_2Q_A^-$ -Rekombination . . . . .	164
C.3	Abbildungen $P680^+Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination . . . . .	166
C.4	Abbildungen zur langsamen $Y_Z^+Q_A^-/Q_B^-$ -Rekombination . . . . .	167



---

## Abkürzungsverzeichnis

---

BBY	Berthold, Babcock und Yocum
CA	Carboanhydrase
DCBQ	2,6 Di-Chloro-1,4-benzochinon
DCMU	3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethylurea
DMSO	Dimethylsulfoxid
DF	Delayed Fluorescence, verzögerte Fluoreszenz, Rekombinationsfluoreszenz
$E_a$	Aktivierungsenergie
EZ	Ethoxazolamid
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
HeNe-Laser	Helium-Neon-Laser
ITC	Isotherme Titrationskalometrie
$k_B$	Boltzmann-Konstante
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MIR	mittlerer Infrarot-Bereich
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Nd:YAG-Laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NR	Neutralrot
PF	Prompte Fluoreszenz
PSI, PSII	Photosystem I, Photosystem II
TEMED	Tetramethylethyldiamin ( $C_6H_{16}N_2$ )
Terbutryn	2-t-Butylamino-4-Ethylamino-6-Methylmercapto-s-Triazin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan ( $C_4H_{11}NO_3$ )
TXRF	Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse
WT	Wildtyp
$Y_Z$	Tyrosin 161 des D1-Proteins (PSII)

### 1.1 Photosynthese

Die Photosynthese ist einer der bedeutendsten und ältesten biologischen Prozesse auf der Erde. Während der oxygenen Photosynthese wird Lichtenergie der Sonne von höheren Pflanzen, Algen und Cyanobakterien in chemisch gebundene Energie umgewandelt. Der dabei gebildete molekulare Sauerstoff wird in die Atmosphäre freigesetzt und ermöglicht damit erst das Leben der höheren Organismen.

In Pflanzen lässt sich der Gesamtprozess der Photosynthese in verschiedene Schritte unterteilen, die alle innerhalb der Chloroplasten stattfinden (Licht- und Dunkelreaktionen). In den Chloroplasten befinden sich Thylakoidmembranen, die eine innere Phase (Lumen) von einer äußeren Phase (Stroma) abgrenzen. Der in den Thylakoidmembranen eingelagerte grüne Blattfarbstoff Chlorophyll ist dafür zuständig Lichtenergie zu absorbieren und somit die Photosynthese in Gang zu setzen, indem Wasser oxidiert wird [Häder, 1999]. Die daraus gewonnenen Elektronen werden entlang der Thylakoidmembran transportiert und reduzieren schließlich  $\text{NADP}^+$ . Die in diesem Prozess ablaufenden photochemischen Reaktionen finden in zwei Multiproteinkomplexen statt, dem Photosystem I (PSI) und dem Photosystem II (PSII), die sich ebenfalls in den Thylakoidmembranen befinden (siehe Abb. 1.1). Des Weiteren wird während der *Lichtreaktion* Energie in Form eines Protonengradienten gespeichert

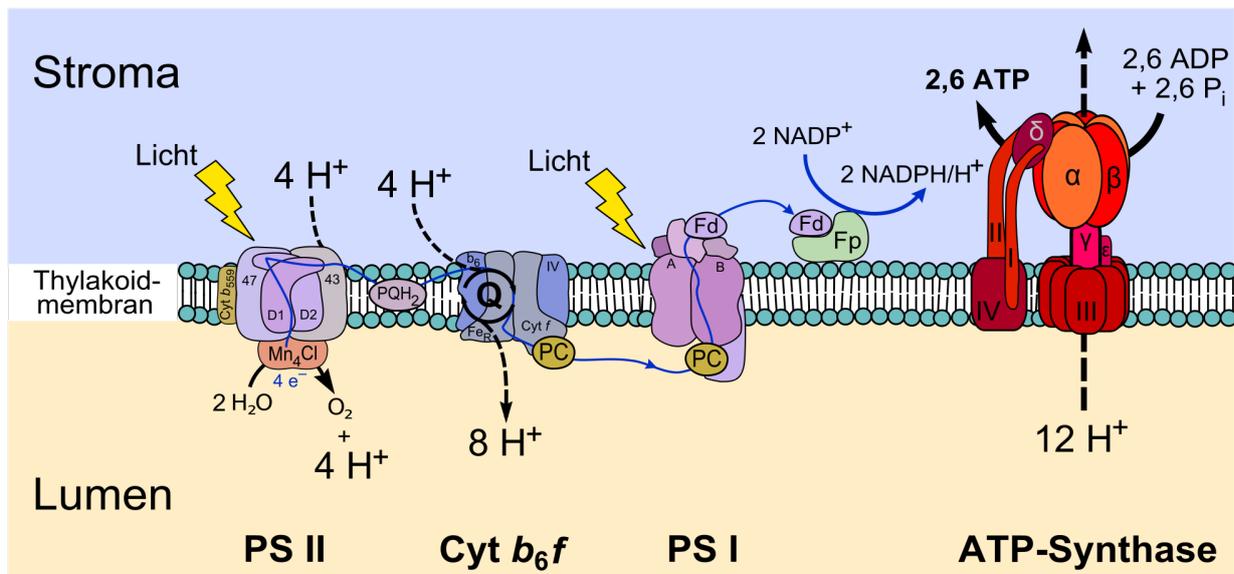
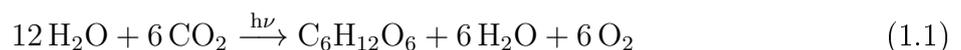


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Proteinkomplexe der oxygenen Photosynthese in der Thylakoidmembran. Ausgehend vom PSII findet ein Elektronentransport entlang der Membran über den Cytochrom- $b_6f$ -Komplex zum PSI statt. Senkrecht zur Membran entsteht zwischen Lumen und Stroma ein elektrochemischer Protonengradient. Während auf der Lumen-Seite die Wasseroxidation sowie die Freisetzung von Protonen erfolgt (PSII), wird auf der Stroma-Seite  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}/\text{H}^+$  reduziert (PSI) und unter Nutzung des Protonengradienten ATP synthetisiert. Entnommen aus [<http://de.wikipedia.org/wiki/Photosynthese>], Stand: 16.02.2014.

und zur Bildung von ATP genutzt. Das ATP wird anschließend im sogenannten Calvin-Zyklus dazu verwendet, um in der *Dunkelreaktion* aus Kohlendioxid Kohlenhydrate aufzubauen. Kombiniert man beide Reaktionen miteinander, lässt sich folgende Gesamtgleichung aufstellen:



Den prinzipiellen Verlauf des Elektronentransportes durch beide Photosysteme zeigt Abb. 1.2.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen und Ergebnisse befassen sich ausschließlich mit dem PSII. Im Folgenden werden daher nur der molekulare Aufbau und die Reaktionen innerhalb des PSII beschrieben.

## 1.2 Photosystem II

Das PSII ist ein Multiprotein-Komplex, der sich in den Thylakoidmembranen von Pflanzen, Algen und Cyanobakterien befindet. Es besteht aus dem multimeren Lichtsammelsystem LHCII (light harvesting complex, „Antennenkomplex“) und dem Kernkomplex, der in der Regel als *Core-Komplex* bezeichnet wird.

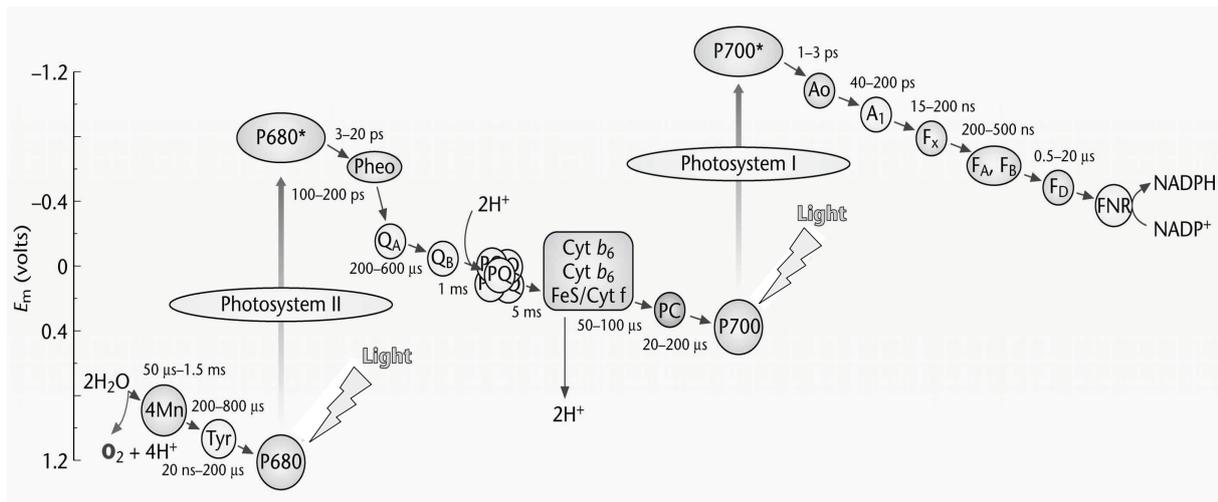
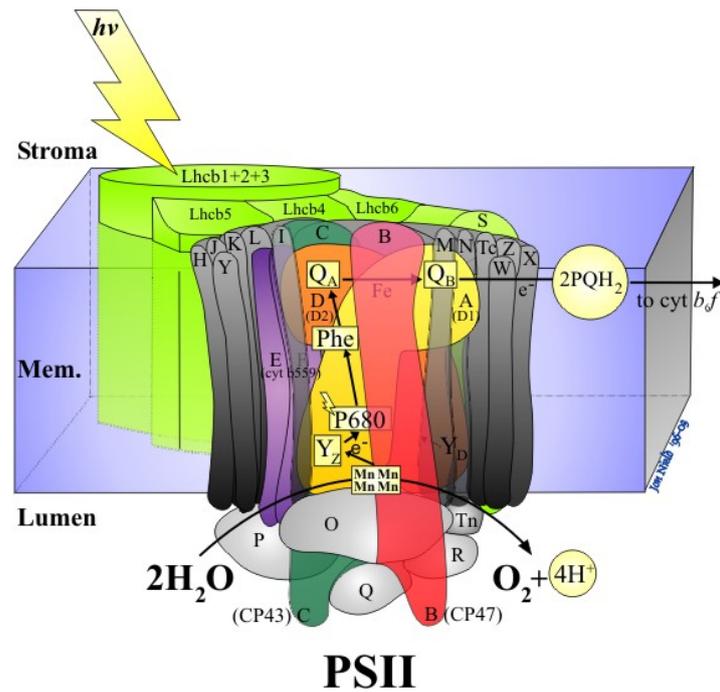


Abb. 1.2: Z-Schema der photosynthetischen Elektronentransportkette. Die Achse auf der linken Seite des Diagramms zeigt die Energie bezüglich des Redoxpotentials  $E_m$  bei pH 7 an. Nach Photonenabsorption gehen die Reaktionszentren von Photosystem II (P680) und Photosystem I (P700) jeweils in den angeregten Zustand P680\* bzw. P700\* über. P680\* gibt ein Elektron an das Pheophytin (Pheo) ab, welches anschließend an die Plastochinone  $Q_A$  und  $Q_B$  weitergeleitet wird. Auf der oxidierenden Seite des PSII wird das oxidierte P680 von Tyrosin Z (Tyr,  $Y_Z$ ) rereduziert.  $Y_Z$  erhält seine Elektronen wiederum vom Mangankomplex, der sie seinerseits dem Wasser entzieht. Abbildung aus [Whitmarsh and Govindjee, 2001].

Zum Kernbereich gehören neben dem Reaktionszentrum, auf das noch ausführlicher eingegangen wird, die beiden intrinsischen Polypeptide CP43 und CP47. Ihr Name leitet sich von ihrer jeweiligen Größe von 43 kDa bzw. 47 kDa ab. Sie binden zwischen 30 und 40 interne Chlorophylle und andere interne Komponenten des Lichtsammelsystems. Neben den intrinsischen zählen auch die extrinsischen Polypeptide zum Corekomplex. Drei von ihnen, psbO (33 kDa), psbP (23 kDa) und psbQ (17–18 kDa), werden dem wasserspaltenden Komplex zugeordnet. Sie dienen hauptsächlich der Stabilisierung des Mangankomplexes (siehe folgenden Abschnitt) [Barber, 2006].

Das Reaktionszentrum selbst setzt sich aus den beiden intrinsischen Polypeptiden D1 (psbA) und D2 (psbD) zusammen. D1 und D2 bilden ein Heterodimer und binden eine Vielzahl der für die Photochemie notwendigen Komponenten wie das Chlorophyll P680, Pheophytin, das Tyrosin  $Y_Z$  sowie die Plastochinone  $Q_A$  und  $Q_B$  [Richter, 1996]. Auf die Funktionsweise dieser einzelnen Bestandteile wird im weiteren Verlauf dieses Abschnitt genauer eingegangen. Anhand kristallographischer Messungen wurden in den vergangenen Jahren eine Reihe von Strukturmodellen des PSII mit Auflösungen von bis zu 1,9 Å veröffentlicht [Zouni et al., 2001; Ferreira et al., 2004; Loll et al., 2005; Guskov et al., 2009; Umena et al., 2011].

Der Photosyntheseprozess wird mit der Anregung des Chlorophyll-a-Molekülpaars P680 in Gang gesetzt. Die Anregungsenergie wird dabei in den meisten Fällen über einen Exzitonentransfer von den angrenzenden Antennenkomplexen zur Verfügung gestellt. Das angeregte



## PSII

Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Photosystems II und der Komponenten der Elektronentransportkette innerhalb der Thylakoidmembran. Entnommen aus [<http://www.bio.ic.ac.uk/research/barber/psIIimages/PSII.jpg>], Stand: 16.02.2014.

P680\* überträgt innerhalb 3 ps ein Elektron auf das Pheophytin a. Von dort wird das Elektron nach 300–500 ps an das Plastochinon  $Q_A$  weitergegeben, welches so zu  $Q_A^-$  reduziert wird. Die sich anschließende Reoxidation erfolgt über ein weiteres Plastochinon,  $Q_B$ , welches im Gegensatz zu  $Q_A$  nach erneuter Anregung noch ein zweites Elektron aufnehmen kann, bevor es dann nach Aufnahme zweier Protonen als Plastohydrochinol  $PQH_2$  die Elektronen zum Cytochrom- $b_6/f$ -Komplex befördert. An die frei gewordene Stelle rückt ein neues Plastochinon  $Q_B$  aus dem sog. Plastochinonpool [Kern and Renger, 2007].

Auf der Donorseite rereduziert  $Y_Z$  das kurz nach der Anregung entstandene  $P680^+$ . Dadurch kommt es zu einer Stabilisierung der Ladungstrennung, da die Rekombination zwischen  $P680^+$  und  $Q_A^-$  verhindert wird. Das nun oxidierte  $Y_Z^+$  wird anschließend vom Mangankomplex reduziert.

## Mangankomplex und Kok-Zyklus

Am Mangankomplex, der aus vier Mangan- und einem Calcium-Atom besteht, findet die katalytische Wasserspaltung statt. Die Oxidation zweier Wassermoleküle unter Bildung von molekularem Sauerstoff erfolgt nach der sukzessiven Absorption von vier Photonen und der entsprechenden Ansammlung vier positiver Ladungen im Mangankomplex. Dabei handelt es sich um einen zyklischen Prozess, d.h. anschließend werden wieder vier Photonen benötigt,

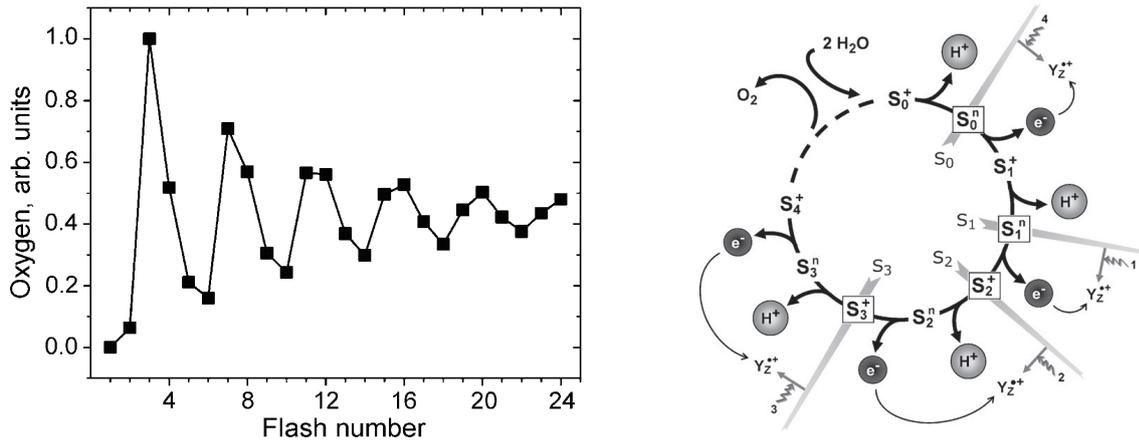


Abb. 1.4: Kok-Zyklus. Links: Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit von der Blitzzahl. Rechts: Schema der photosynthetischen Wasseroxidation. Entnommen aus [Shinkarev, 2005; Dau and Haumann, 2007].

um dem Mangankomplex vier Elektronen zu entziehen, bevor es zur erneuten Wasserspaltung und Sauerstoffbildung kommt. Dieser Vierer-Zyklus wurde erstmals 1969 von Joliot [Joliot et al., 1969] entdeckt und im darauffolgenden Jahr von Kok [Kok et al., 1970] erklärt und wird daher auch Kok-Zyklus genannt. Belichtet man dunkeladaptierte Photosysteme mit einer Serie sättigender kurzer Lichtblitze, so lässt sich eine Oszillation der Sauerstoffentwicklung mit Maxima nach jedem vierten Blitz beobachten (siehe Abb. 1.4). Man bezeichnet dabei die verschiedenen durchschrittenen Oxidationszustände des Mangankomplexes mit  $S_0$  bis  $S_4$ , wobei die Indizes die sich durch sukzessive Ladungstrennung angesammelten Oxidationsäquivalente angeben (S-Zustandszyklus). Nachdem die Ladungstrennung im  $S_3$ -Zustand zur Bildung eines intermediären  $S_4$ -Zustands geführt hat, erfolgt die Freisetzung molekularen Sauerstoffs während der  $S_4$ -Zustand spontan zu  $S_0$  reduziert wird.

Die S-Zustände sind mit Ausnahme von  $S_1$  alle instabil und relaxieren im Dunkeln zum  $S_1$ -Zustand. Bei  $S_2$  und  $S_3$  geschieht dies unter Elektronenaufnahme, bei  $S_0$  unter Abgabe eines Elektrons. Dunkeladaptierte Proben liegen daher hauptsächlich im  $S_1$ -Zustand vor. Dies erklärt auch, weshalb das erste Maximum der Sauerstoffentwicklung bereits nach dem dritten Blitz zu beobachten ist. Da die  $S_0$ -Relaxation sehr langsam stattfindet, ist eine  $S_0$ -Restpopulation von bis zu 25% möglich. Nicht in allen Photosystemen finden nach einer Beblitzung eine stabile Ladungstrennung und eine darauf verbundene Oxidation des Mangankomplexes (S-Übergang) statt. Dadurch kommt es zu einer zunehmenden Durchmischung der S-Zustände, was in der Dämpfung der Sauerstoffoszillation zu beobachten ist. Mathematisch wird diese Dämpfung durch den Miss-Parameter beschrieben, der genau den Anteil der Zentren angibt, in denen nach einer Blitzanregung kein Übergang ausgelöst wird. Führen Photosysteme während eines Blitzes zwei Übergänge aus, spricht man von „Double hits“. In der Praxis kommen sie bei Verwendung von ns-Laserpulsen aufgrund der kurzen Pulsdauern

nicht vor. Der Miss-Parameter ist u. a. abhängig von den geschlossenen Zentren (Photosysteme mit reduziertem  $Q_A$ ), auftretender Rekombination des Zustands  $P680^+Q_A^-$ , einer S-Zustandsrelaxation und einer nicht sättigenden Blitzintensität [Grabolle, 2005].

Die Zeiten der einzelnen S-Übergänge, die mit den Elektronentransferzeiten vom Mangankomplex zum  $Y_Z$  übereinstimmen, unterscheiden sich einerseits für die jeweiligen S-Zustände, sind auf der anderen Seite aber auch stark von der jeweiligen Probenpräparation (PSII-Membranfragmente, PSII-Core-Komplexe, intakte Chloroplasten) abhängig. In Klammern sind hinter dem jeweiligen S-Übergang die in der Literatur zu findenden Zeitkonstanten angegeben [Nugent et al., 2001]:

- $S_1 \rightarrow S_2$  (30–140  $\mu$ s): Diese Zeitkonstante ist pH-unabhängig und der kinetische Isotopeneffekt ist klein. Daher wird für diesen Übergang angenommen, dass nur der Elektronenübergang  $Mn_4Ca \rightarrow Y_Z$  stattfindet, jedoch keine Deprotonierung dieser Donorseiten-Redoxfaktoren.
- $S_2 \rightarrow S_3$  (100–500  $\mu$ s): Vermutlich wird dieser Übergang kinetisch von Protonenbewegungen gesteuert (pH-abhängige Zeitkonstante, temperaturabhängiger kinetischer Isotopeneffekt von 1,4–2). Nach der Formierung des  $Y_Z$ -Radikals und vor der Mn-Oxidation könnte ein Proton vom Mangankomplex oder seiner Ligandenumgebung freigesetzt werden und die experimentell erhältlichen kinetischen Eigenschaften des Übergangs bestimmen.
- $S_3 \rightarrow S_0$  (1–4,5 ms): Dieser Übergang setzt sich eigentlich aus mehreren einzelnen Übergängen zusammen:  $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S'_4 \rightarrow S_0$ . Vor der Sauerstoffbildung wird der intermediäre  $S_4$ -Zustand gebildet, vermutlich durch eine Protonenfreisetzung. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Sauerstoffentwicklung ( $t_{1/2}$  von ca. 1,2 ms) ist anschließend der Elektronentransfer  $Mn_4Ca \rightarrow Y_Z$ , gefolgt vom Beginn der Wasseroxidation und Mn-Reduktion.
- $S_0 \rightarrow S_1$  (3–250  $\mu$ s): Bei diesem Übergang findet vermutlich zuerst ein Elektronentransfer statt, dem ein Deprotonierungsschritt folgt.

Die Kinetik dieser einzelnen Elektronenübergänge lässt sich sehr gut mit einem einfach-exponentiellen Verhalten beschreiben [Dau and Haumann, 2008].

## Der Elektronenübergang $Y_Z \rightarrow P680^+$

Um das Zeitverhalten des Elektronenübergangs von  $Y_Z$  zu  $P680^+$  zu beschreiben, benötigt man sowohl schnelle Phasen im Nanosekundenbereich als auch langsame Komponenten im Mikrosekundenbereich [Christen et al., 1998; Christen and Renger, 1999]. Dabei hängen die

jeweiligen Zeitkonstanten und relativen Amplituden vom S-Zustand des Mangankomplexes ab. Während im S<sub>0</sub>- und im S<sub>1</sub>-Zustand der überwiegende Teil des P680<sup>+</sup> im Zeitbereich von 20 bis 50 ns reduziert wird, erfolgt dieser Schritt in den Zuständen S<sub>2</sub> und S<sub>3</sub> um ca. eine Zehnerpotenz langsamer (200 bis 700 ns). Die kinetischen Phasen im Mikrosekundenbereich finden sich in allen S-Zuständen wieder, ihr Anteil an der gesamten P680<sup>+</sup>-Reduktion ist allerdings vom jeweiligen S-Zustand abhängig [Schilstra et al., 1998]. Es wird vermutet, dass bei der Y<sub>Z</sub>-Oxidation ein Proton innerhalb einer Wasserstoffbrücke zum benachbarten Histidin 190 (D1-His190) verschoben wird [Hays et al., 1998; Mamedov et al., 1998]. Dieser Prozess wird bei der sich anschließenden Y<sub>Z</sub><sup>+</sup>-Reduktion durch den Mangankomplex wieder rückgängig gemacht. Das zwischenzeitlich oxidierte Y<sub>Z</sub> liegt als neutrales Radikal vor, wie in FTIR- [Berthomieu et al., 1998] und EPR-Messungen [Babcock et al., 1989; Barry et al., 1990] gezeigt werden konnte.

Der Verlust des Mangankomplexes verlangsamt die Y<sub>Z</sub>-Oxidationsrate deutlich [Buser et al., 1990; Yerkes and Babcock, 1980]. Erste Untersuchungen ergaben Werte zwischen 2 μs<sup>-1</sup> bei pH 9 und 44 μs<sup>-1</sup> bei pH 4 [Conjeaud and Mathis, 1980]. Genauere Messungen zeigten, dass die Y<sub>Z</sub>-Oxidationsrate multiphasisch ist, wobei die schnellsten Komponenten (τ = 1,4 μs [Ahlbrink et al., 1998] bzw. 320 ns [Hays et al., 1999]) keine pH-Abhängigkeit zeigen, während die zugehörigen Amplituden vom pH-Wert abhängig sind (pK-Werte 7,0 bzw. 7,5).

## Energetik der PSII-Wasseroxidation

Das PSII wird von ungewöhnlich hohen Redoxpotentialen geprägt. Ihre direkte Bestimmung an der Donorseite ist per Redoxtitration jedoch nicht möglich, da es dabei zu Schädigungen der Kofaktoren und der Proteinmatrix kommen würde. Darüber hinaus hängt das relevante Arbeitspotential für einen Elektronentransfer von oder zu einem bestimmten PSII-Redoxfaktor aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen vom Redoxzustand weiterer Kofaktoren ab sowie von den jeweiligen Protonierungszuständen und der Transmembranspannung [Dau and Zaharieva, 2009]. Nur für das Q<sub>A</sub>/Q<sub>A</sub><sup>-</sup>-Redoxpaar konnte per Redox-titration ein E<sub>m</sub>-Wert (Mittelwertspotential) von -80 mV in Membranpartikeln bestimmt werden [Krieger et al., 1995]. Wenn man diesen Wert als Referenz verwendet, lassen sich die anderen Redoxpotentiale über die bekannten Differenzen in der Gibbs'schen freien Energie (ΔG-Werte) berechnen:

$$|E_{m1} - E_{m2}| = |\Delta G_{12}| \quad (1.2)$$

Dabei sind E<sub>m1</sub> und E<sub>m2</sub> die Mittelpunktspotentiale der Redoxfaktoren 1 und 2 und ΔG<sub>12</sub> die ermittelte Differenz in der Gibbs'schen freien Energie [Dau and Sauer, 1996; Grabolle and Dau, 2005].

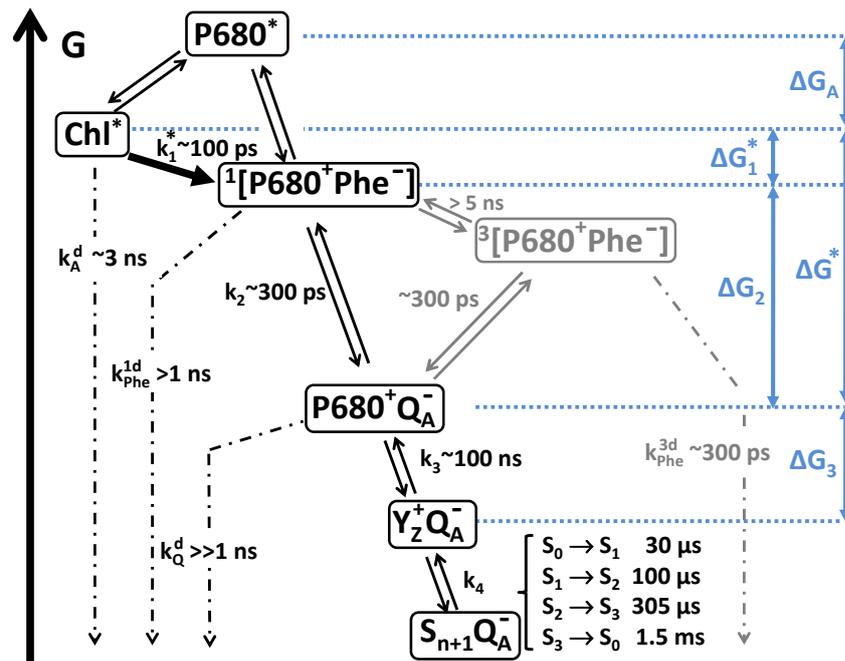


Abb. 1.5: Energetik und Kinetik der PSII-Radikalpaarzustände. Gezeigt werden die Übergänge zwischen den Radikalpaarzuständen. Die Zeitkonstanten entsprechen den jeweiligen Ratenkonstanten. Übergänge zum Grundzustand werden durch die gestrichelten Pfeile angegeben. Die Ratenkonstanten im einzelnen:  $k_1^*$ : Zerfall des angeregten Antennenzustands  $Chl^*$  infolge der primären Ladungstrennung;  $k_1^*$  ist vom Antennenzustand abhängig;  $k_2$ : Elektronentransfer  $Phe^- \rightarrow Q_A$ ;  $k_3$ : Elektronentransfer  $Y_Z \rightarrow P680^+$ ;  $k_A^d$ : Zerfall des angeregten Antennenzustands  $Chl^*$  durch Fluoreszenz und thermische Deaktivierung;  $k_{Phe}^{1d}$ : Zerfall des Singulett-Zustandes ( $P680^+Phe^-$ ) durch andere Mechanismen als  $Q_A$ -Reduktion oder Rekombination unter Wiederanregung des  $Chl^*$ -Zustands;  $k_Q^d$ : Zerfall des  $P680$ ;  $k_4$ : Elektronentransfer Mn-Komplex  $\rightarrow Y_Z^+$  (S-Übergang). Editiert nach [Grabolle, 2005].

In Abbildung 1.5 sind die Energetik und die Kinetik der Radikalpaarzustände im PSII dargestellt. Die Energie des angeregten Zustands  $P680^*$  wird auf 1,825 eV geschätzt, was der Energie  $E_{680}$  eines 680 nm-Photons entspricht. Diese Energie steht zur Verfügung, um die Photochemie zu betreiben. Die anschließende Bildung des ersten Radikalpaar-Zustands  $P680^+Phe^-$  (Singulettzustand) bedeutet eine Absenkung um etwa 160 meV ( $\Delta G_A + \Delta G_1^*$ ) in der Gibbs'schen freien Energie. Der ebenfalls in der Abbildung gezeigte Triplettzustand wird bei der primären Ladungstrennung nicht erreicht. Die  $P680^+Q_A^-$ -Rekombination verläuft dagegen hauptsächlich über ihn [Gorkom, 1985; Rappaport et al., 2002]. Die Bildung des zweiten Radikalpaarzustandes  $P680^+Q_A^-$  (Elektronentransfer  $Phe \rightarrow Q_A$ ) bedeutet einen hohen Abfall der Gibbs'schen freien Energie ( $\Delta G_2 = 340$  meV), sodass bereits 30 % von  $E_{680}$  verbraucht sind [Dau and Zaharieva, 2009].

Der Energieverlust an der Donorseite ist deutlich geringer als an der Akzeptorseite, was in Zusammenhang mit der niedrigen Überspannung (engl. *overpotential*) der PSII-Wasseroxidation steht [Dau and Zaharieva, 2009].

## 1.3 Chlorophyllfluoreszenz

In diesem Abschnitt werden die theoretischen Hintergründe von prompter und verzögerter Chlorophyllfluoreszenz besprochen, welche zum überwiegenden Teil die beiden Techniken darstellen, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden. Wie die Namen bereits suggerieren, handelt es sich bei der prompten Fluoreszenz um eine Fluoreszenzemission, die unmittelbar (im Nanosekundenbereich) nach Lichtabsorption erfolgt, ohne dass es zu einer stabilen Ladungstrennung kommt. Die verzögerte oder auch Rekombinationsfluoreszenz basiert im Wesentlichen darauf, dass nach Lichtabsorption alle im PSII stattfindenden Energie- und Elektronentransferprozesse reversibel sind. Das bedeutet, dass Rückreaktionen von ladungsseparierten Zuständen möglich sind (Rekombination), die zu einer erneuten Anregung der Chlorophylle des Reaktionszentrums und des Antennensystems und einer daraus resultierenden Fluoreszenzemission bis in den Sekunden- oder Minutenbereich führen.

Die bei Raumtemperatur beobachtete Fluoreszenz in nativen Systemen stammt hauptsächlich vom PSII, Einflüsse von PSI tragen nur zu wenigen Prozent zum Gesamtsignal bei und sind daher zu vernachlässigen. Des Weiteren ist nur die PSII-Fluoreszenz stark variabel und von Änderungen in der Photochemie abhängig [Govindjee, 2004]. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben handelt es sich ausschließlich um PSII-Präparationen (siehe auch 2.1), welche nur noch einen verschwindend geringen Anteil an PSI enthalten.

### Prompte Chlorophyllfluoreszenz

Im Jahr 1834 entdeckte Sir David Brewster die rote Lichtemission in extrahiertem Chlorophyll. Ungefähr 40 Jahre später stellte N.J.C. Müller fest, dass die Fluoreszenzintensität in lebenden, grünen Blättern wesentlich geringer ist als in der Chlorophylllösung. Außerdem beobachtete er eine inverse Beziehung zwischen Fluoreszenz und Photosyntheseaktivität. 1931 veröffentlichten Kautsky und Hirsch erste systematische Untersuchungen des Zeitverlaufs der Chlorophyllfluoreszenz [Kautsky and Hirsch, 1931], der mit der 1920 von Warburg veröffentlichten Kohlenstoffassimilierung korreliert ist. Die Fluoreszenz steigt bei Einsetzen kontinuierlicher Beleuchtung schnell an und zeigt anschließend ein komplexes Verhalten (Kautsky-Effekt). Duysens und Sweers konnten 1963 schließlich erklären, dass die Fluoreszenzquantenausbeute vom  $Q_A$ -Oxidationszustand abhängig ist [Duysens and Sweers, 1963; Govindjee, 2004].

Wie im Folgenden beschrieben wird, ist die prompte Fluoreszenz vom  $Q_A$ -Redoxzustand abhängig und dient daher der Untersuchung der PSII-Akzeptorseite, während man mit der Rekombinationsfluoreszenz Effekte der PSII-Donorseite untersucht. Neben der Abhängigkeit vom  $Q_A$ -Redoxzustand, haben auch der P680-Redoxzustand, der S-Zustand des Mangankomplex sowie weitere Faktoren einen Einfluss auf die Quantenausbeute der prompten Fluoreszenz.

### Fluoreszenzemission nach Blitzanregung

Nach der Blitzanregung erfolgt die Emission der prompten Fluoreszenz im Zeitbereich innerhalb weniger Nanosekunden. Das durch Lichtabsorption generierte Exziton wird innerhalb weniger hundert Pikosekunden unter Bildung des Zustandes  $P680^+Q_A^-$  deaktiviert. Da die primäre Ladungstrennung reversibel ist, lässt sich eine zweifach-exponentielle Kinetik beobachten [Dau and Sauer, 1996], die durch das Reversible-Radikalpaar-Modell beschrieben werden kann (siehe folgender Abschnitt). Dabei entspricht die mittlere Fluoreszenz-Abklingzeit in etwa der Elektronentransferrate  $Phe \rightarrow Q_A$  (300 ps).

Das infolge der Ladungstrennung gebildete  $P680^+$  ist dabei ein effizienter Fluoreszenzlöcher und führt zu einem schnellen, strahlungslosen Abbau der verbliebenen Anregungsenergie im Sub-Nanosekundenbereich. Die Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer ist durch die Rekombination des  $P680^+Phe^-$ -Zustands möglich. Betrachtet man die Zeitkonstante für den Rückwärts-Elektronentransfer  $Phe^- \rightarrow P680^+$  von ca. 1–3 ns [Leibl et al., 1989; Dau and Sauer, 1996], so lässt sich der Zeitbereich für die Emission der prompten Fluoreszenz auf wenige Nanosekunden beschränken.

### Das Reversible-Radikalpaar-Modell (RRP-Modell)

In Abbildung 1.6 ist schematisch das Reversible-Radikalpaar-Modell nach Schatz [Schatz et al., 1988] dargestellt. Es gibt die primären Reaktionen an, die nach einer Absorption eines Photons durch das PSII-Antennensystem ablaufen. Die Anregungsenergie equilibriert zwischen allen PSII-Chlorophyllen einschließlich P680, von welchem aus verschiedene Reaktionen möglich sind: Die Relaxation in den Grundzustand unter Fluoreszenzemission ( $k_F$ ), die strahlungslose Relaxation in den Grundzustand ( $k_{dec}$ ) und der Elektronentransfer zum Pheophytin ( $k_1$ ), durch den das primäre Radikalpaar  $P680^+Phe^-$  gebildet wird. Von diesem Zustand sind sowohl die Rückreaktion zum angeregten Antennenzustand ( $k_{-1}$ ) möglich als auch der weitere Elektronentransfer  $Phe \rightarrow Q_A$  ( $k_2$ ), der die Bildung des sekundären

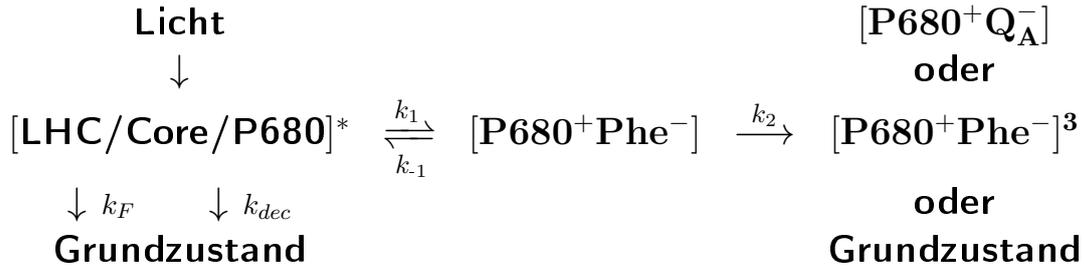


Abb. 1.6: Das Reversible-Radikalpaar-Modell. Die angegebenen Ratenkonstanten bezeichnen im Einzelnen:  $k_F$ : Relaxation unter Emission eines Fluoreszenzphotons;  $k_{dec}$ : strahlungslose Relaxation;  $k_1/k_{-1}$ : Hin-/Rückreaktion der primären Ladungstrennung;  $k_2$ : Elektronentransfer  $\text{Phe}^- \rightarrow \text{Q}_\text{A}$ /Übergang ins Triplettssystem/Übergang in den Grundzustand. Editiert nach [Dau, 1994].

Radikalpaares  $\text{P680}^+\text{Q}_\text{A}^-$  zur Folge hat. Darüber hinaus sind in  $k_2$  der Übergang ins Triplettssystem  $[\text{P680}^+\text{Phe}^-]^3$  und die strahlungslose Rekombination in den Grundzustand inbegriffen. Streng betrachtet müsste man die Fluoreszenzemission, die durch die Rekombination des  $\text{P680}^+\text{Phe}^-$ -Zustands und den dadurch erneut angeregten Antennenzustand verursacht wurde, als Rekombinationsfluoreszenz (siehe Abschnitt 1.3) bezeichnen. Da sowohl die sofortige Emission eines Fluoreszenzphotons als auch die  $\text{P680}^+\text{Phe}^-$ -Rekombinationsfluoreszenz in demselben Zeitbereich (Piko- bis Nanosekunden) stattfinden und damit kinetisch nicht unterschieden werden können, bezeichnet man beide als prompte Fluoreszenz.

### Abhängigkeit vom $\text{Q}_\text{A}$ -Redoxzustand

Die Quantenausbeute  $\Phi$  der Fluoreszenz lässt sich nach [Dau, 1994] wie folgt formulieren:

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_{dec} + p_{680} \left( \frac{1}{k_1} + \frac{k_{-1}}{k_1} \cdot \frac{1}{k_2} \right)^{-1}} \quad (1.3)$$

$p_{680}$  gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass der angeregte Zustand am P680 lokalisiert ist. Die Ratenkonstanten  $k_1$ ,  $k_{-1}$  und  $k_2$  (siehe Abb. 1.6) sind vom  $\text{Q}_\text{A}$ -Redoxzustand abhängig. Es lassen sich dabei folgende Fälle unterscheiden:

- $\text{Q}_\text{A}$  liegt in reduzierter Form vor. Unter Vernachlässigung des Übergangs in das Triplettssystem bzw. der strahlungslosen Rekombination des Zustands  $\text{P680}^+\text{Phe}^-$  wird die Ratenkonstante  $k_2$  null, da der Elektronentransfer  $\text{Phe}^- \rightarrow \text{Q}_\text{A}$  nicht mehr möglich ist. Die Fluoreszenzquantenausbeute nimmt dann ihren maximalen Wert an:

$$\Phi_M = \frac{k_F}{k_F + k_{dec}} \quad (1.4)$$

Man spricht in diesen Fällen auch von geschlossenen Reaktionszentren.

- $Q_A$  liegt in oxidiertem Zustand vor. Die Quantenausbeute nimmt dann ihren minimalen Wert an:

$$\Phi_0 = \frac{k_F}{k_F + k_{dec} + k_{PC}} \quad (1.5)$$

mit

$$k_{PC} = p_{680} \left( \frac{1}{k_1} + \frac{k_{-1}}{k_1} \cdot \frac{1}{k_2} \right)^{-1}. \quad (1.6)$$

Die Reaktionszentren werden als geöffnet bezeichnet.

Betrachtet man ein Ensemble an Photosystemen mit beliebigem  $Q_A$ -Redoxzustand, gilt für die Quantenausbeute

$$\Phi \sim \Phi_M [Q_A^-] + \Phi_0 (1 - [Q_A^-]), \quad (1.7)$$

wobei  $[Q_A^-]$  genau den Anteil der Zentren angibt, in denen  $Q_A^-$  vorliegt.

Aus der Proportionalität zwischen der Quantenausbeute und der Fluoreszenzintensität folgt schließlich

$$F = F_0 + (F_M - F_0) [Q_A^-]. \quad (1.8)$$

Im dunkeladaptierten Zustand sind die Reaktionszentren geöffnet und die Fluoreszenzausbeute ist gering ( $F_0$ -Level). Das Photosystem ist bereit, die für die Photochemie benötigte Lichtenergie zu absorbieren. Erfolgt ein kurzer Lichtblitz, so steigt das Fluoreszenzlevel auf den Maximalwert ( $F_M$ -Level) an. Die Reaktionszentren sind nun geschlossen und überschüssige Lichtenergie wird somit als Fluoreszenzlicht emittiert.

Der mit Hilfe der prompten Fluoreszenz gemessene  $Q_A^-$ -Zerfall zeigt in seinem Zeitverlauf mehrere Phasen, welche verschiedene Prozesse widerspiegeln, die mit der  $Q_A^-$ -Reoxidation verbunden sind [de Wijn and van Gorkom, 2001; Krivanek et al., 2007]:

- Die schnellste Phase (400–600  $\mu$ s in PSII-Membranpartikeln) entspricht dabei dem Vorwärtselektronentransfer von  $Q_A^-$  zu  $Q_B$  oder dem Semichinon  $Q_B^-$  bzw. zu einem künstlichen Elektronenakzeptor (z. B. DCBQ).
- Die mittlere Phase (wenige ms) steht für die Bindung von  $Q_B^-$ -Molekülen an ursprünglich unbesetzte bzw. frei gewordene Bindungsstellen.
- Die langsame Phase (mehrere s) zeigt schließlich die Ladungsrekombination von  $Q_A^-$  mit der Donorseite (z. B.  $S_2$ -Zustand).

### Abhängigkeit vom P680-Redoxzustand

Befindet sich P680 im oxidierten Zustand  $P680^+$ , so ist offensichtlich, dass der primäre Ladungstrennungsschritt  $P680^* \rightarrow P680^+Phe^-$  nicht mehr stattfinden kann. Das  $P680^+$ -Kation

quencht die Fluoreszenzemission der PSII-Antennen [Butler, 1972]. Der Grund dafür ist vermutlich ein effizienter Anregungsenergietransfer zum  $P680^+$  und ein schneller, strahlungsloser Zerfall des angeregten Zustands. Die fluoreszenzlöschende Wirkung von  $P680^+$  scheint von ähnlicher Stärke zu sein wie diejenige offener Zentren [Mauzerall, 1972; Sonneveld et al., 1979; Deprez et al., 1983]

Aufgrund der Rereduktion des infolge der Ladungstrennung gebildeten  $P680^+$  ist nach der Anregung mit einem ns-Laserpuls ein Anstieg der PF auf einer Nano- bis Mikrosekundenzeitskala zu beobachten [Mauzerall, 1972]. Die Kinetik der  $P680^+$ -Rereduktion lässt sich somit mit Hilfe der PF bestimmen.

### **Abhängigkeit vom S-Zustand des Mangankomplexes**

Messungen der prompten Fluoreszenz nach einem sättigenden Laserblitz zeigen eine ausgeprägte viererperiodische Oszillation. Dies ist zum einen durch die S-Zustandsabhängigkeit der  $P680^+$ -Rereduktionskinetik zu erklären. Aber auch wenn  $P680^+$  bereits vollständig reduziert ist, ist die Abhängigkeit vom S-Zustand zu erkennen. Die Quantenausbeute der PF ist im  $S_2$ - und  $S_3$ -Zustand höher als in  $S_0$  und  $S_1$ . Vermutlich beeinflusst eine positive Ladung am Mangankomplex die Ratenkonstanten der primären Ladungstrennung  $k_1$  bzw. Ladungsrekombination  $k_{-1}$  [Dau, 1994].

### **Abhängigkeit vom Plastochinonpool**

Wenn sich der Plastochinonpool aufgrund von Lichteinfluss zunehmend reduziert, beobachtet man einen Anstieg der  $F_0$ - bzw.  $F_M$ -Niveaus. Dies lässt sich bspw. bei Messungen an PSII-Proben ohne Zugabe eines künstlichen Elektronenakzeptors beobachten. Die Ursache dafür ist die fluoreszenzlöschende Wirkung von oxidierten (Plasto-)Chinonen [Vernotte et al., 1979].

### **Verzögerte Chlorophyllfluoreszenz**

Die verzögerte Chlorophyllfluoreszenz (engl. *delayed chlorophyll fluorescence*) wurde Anfang der 1950er-Jahre von Strehler und Arnold entdeckt [Strehler and Arnold, 1951; Tyystjärvi and Vass, 2004]. Bereits die frühen Experimente deuteten daraufhin, dass das Phänomen der verzögerten Emission von Licht mit dem Photosyntheseprozess zusammenhängt [Amesz and van Gorkom, 1978]. Im Gegensatz zur prompten Chlorophyllfluoreszenz, bei der  $P680$  entweder über direkte Lichtabsorption oder durch schnellen Energietransfer von anderen Chlorophyllmolekülen angeregt wird, beruht die verzögerte Fluoreszenz auf einem rückwärts gerichteten Elektronentransfer, einer Ladungsrekombination im PSII-Reaktionszentrum und

einer sich anschließenden Wiederanregung des  $\text{Chl}^*$ -Zustands. Daraus hat sich auch der heute gebräuchliche Name *Rekombinationsfluoreszenz* abgeleitet [Goltsev et al., 2009]. In Abbildung 1.5 werden die damit zusammenhängende Energetik und die Kinetik der Radikalpaarzustände im PSII gezeigt.

Der angeregte Antennenzustand  $\text{Chl}^*$  ist gegenüber dem  $\text{P680}^*$ -Zustand um den Betrag  $\Delta G_A$  energetisch abgesenkt. Dies liegt an der Delokalisierung der Anregungsenergie über die ca. 200 Chlorophyllmoleküle des Antennensystems (Exzitonenequilibrium), die zu einer vornehmlich entropischen Verringerung der freien Energie führt.

Streng genommen kann bereits die Rekombination des Zustands  $\text{P680}^+\text{Phe}^-$  als die schnellste Komponente der verzögerten Fluoreszenz bezeichnet werden. In der Praxis wird diese Komponente allerdings der PF zugeordnet [Schatz et al., 1988], da sie aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer nicht von der PF unterschieden werden kann.

## Theoretische Beschreibung

Die Intensität der verzögerten Fluoreszenz und ihr zeitlicher Verlauf nach einer Anregung durch einen kurzen Lichtimpuls lassen sich durch eine Gleichgewichtsbetrachtung beschreiben. Diese Herangehensweise ist zulässig, da der Einfluss von Verlustprozessen in den Populationen jeweils vernachlässigbar ist [Grabolle and Dau, 2005], d.h. dass  $k_1^* \gg k_A^d$ ,  $k_2 \gg k_{\text{Phe}}^d$ ,  $k_3 \gg k_Q^d$  (s.a. Abb. 1.5).

Für ein PSII-Ensemble wird angenommen, dass derjenige PSII-Anteil, der sich im  $\text{Chl}^*$ -Zustand [ $\text{Chl}^*$ ] befindetet, durch die Differenz der Gibbs'schen freien Energie zwischen dem angeregten Antennenzustand und dem jeweils erreichten Radikalpaar-Zustand [RP] bestimmt werden kann:

$$\frac{[\text{Chl}^*]}{[\text{RP}]} = e^{\frac{\Delta G_{\text{RP}}^*}{k_B T}}. \quad (1.9)$$

Dabei gibt  $\Delta G_{\text{RP}}^*$  die Differenz der Gibbs'schen freien Energie ( $\Delta G_{\text{RP}}^* < 0$ ) zwischen dem angeregten Antennenzustand ( $\text{Chl}^*$ ) und dem betrachteten Radikalpaarzustand (RP) an,  $k_B$  ist die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur in Kelvin. Die Intensität der verzögerten Fluoreszenz ergibt sich daraufhin zu:

$$F_D = S[\text{Chl}^*] = S[\text{RP}]e^{\frac{\Delta G_{\text{RP}}^*}{k_B T}} \quad (1.10)$$

und für  $[\text{RP}] \approx 1$

$$F_D = S e^{\frac{\Delta G_{\text{RP}}^*}{k_B T}}, \quad (1.11)$$

wobei  $S$  ein zeitunabhängiger Faktor ist, der durch die Ratenkonstante der Fluoreszenzemission der Antennenchlorophylle bestimmt wird [Grabolle and Dau, 2005].

Nach einer Blitzanregung nimmt die verzögerte Fluoreszenz des PSII schnell ab. Die Abnahme in der Fluoreszenzintensität lässt sich durch die Übergänge von einem ersten Radikalpaar-Zustand (RP1) zu einem zweiten Radikalpaar-Zustand (RP2) erklären. Dabei ist  $\Delta G_{RP2}^*$  stärker negativ als  $\Delta G_{RP1}^*$ . Folglich nimmt die Intensität der verzögerten Fluoreszenz im Verlauf dieses Übergangs von  $F_D^{\text{initial}}$  (bestimmt durch  $\Delta G_{RP1}^*$ ) nach  $F_D^{\text{final}}$  (bestimmt durch  $\Delta G_{RP2}^*$ ) ab. Für das Verhältnis der beiden Fluoreszenzniveaus gilt:

$$\frac{F_D^{\text{initial}}}{F_D^{\text{final}}} = \frac{e^{-\frac{\Delta G_{RP1}^*}{k_B T}}}{e^{-\frac{\Delta G_{RP2}^*}{k_B T}}} = e^{\left(\frac{\Delta G_{RP1}^* - \Delta G_{RP2}^*}{k_B T}\right)} \quad (1.12)$$

Für einen kinetisch auflösbaren, energetisch abwärts gerichteten Übergang zwischen zwei Radikalpaar-Zuständen kann der zugehörige Unterschied der Gibbs'schen freien Energie nach Gleichung 1.12 bestimmt werden. Der Fluoreszenzzerfall von  $F_D^{\text{initial}}$  nach  $F_D^{\text{final}}$  spiegelt den Zeitverlauf des Übergangs zwischen den beiden Zuständen wider und kann dazu verwendet werden, die Werte der zugehörigen Ratenkonstanten zu bestimmen.

Alternativ dazu ist häufig auch die im Folgenden beschriebene Herleitung zu finden. Zu jeder Zeit kann die Intensität der verzögerten Fluoreszenz in guter Näherung durch den PSII-Anteil mit reduzierten  $Q_A$  ( $[Q_A^-]$ ) und oxidiertem P680 ( $[P680^+]$ ) beschrieben werden:

$$F_D(t) = S e^{\frac{\Delta G^*}{k_B T}} [P680^+](t) [Q_A^-](t). \quad (1.13)$$

$\Delta G^*$  bezeichnet dabei die Differenz in der Gibbs'schen freien Energie zwischen dem angeregten Antennenzustand und dem Radikalpaar ( $P680^+$ ,  $Q_A^-$ ). Für die Bildung eines bestimmten Radikalpaars in der Mehrheit der PSII ist diese Gleichung völlig gleichwertig mit Gleichung 1.11. Liegt bspw. der Radikalpaarzustand ( $Q_A^-$ ,  $Y_Z^{\bullet+}$ ) vor, gilt für  $P680^+$ :

$$[P680^+] = [Y_Z^{\bullet+}] e^{\frac{\Delta G_{P680-Y_Z}}{k_B T}}, \quad (1.14)$$

wobei  $\Delta G_{P680-Y_Z}$  die freie Energie angibt, die mit der Bildung des  $Y_Z^{\bullet+}$ -Zustandes zusammenhängt. Unter der Annahme, dass sich in den den meisten PSII  $Q_A^-$  und  $Y_Z^{\bullet+}$  gebildet haben, erhält man folgende Beziehung:

$$F_D = S e^{\frac{\Delta G^*}{k_B T}} [Y_Z^{\bullet+}] [Q_A^-] e^{\frac{\Delta G_{P680-Y_Z}}{k_B T}} \quad (1.15)$$

$$F_D = S e^{\frac{\Delta G^* + \Delta G_{P680-Y_Z}}{k_B T}} \quad (1.16)$$

Der Vergleich mit Gleichung 1.10 verdeutlicht, dass die Gleichungen 1.11 und 1.13 eine gleichwertige Beschreibung darstellen.

Ziel der Messungen der verzögerten Fluoreszenz ist die Untersuchung der PSII-Donorseite. Wie auch in der oben beschriebenen Herleitung ersichtlich ist, hängt die Intensität der verzögerten Fluoreszenz  $F_D$  sowohl von der P680<sup>+</sup>- als auch der Q<sub>A</sub><sup>-</sup>-Konzentration ab.  $F_D$  ändert sich in einem für die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen typischen Zeitraum von 10  $\mu$ s bis 10 ms um mehr als drei Größenordnungen. Die Q<sub>A</sub><sup>-</sup>-Konzentration ändert sich in demselben Zeitraum nur um etwa einen Faktor 4. Dieser Einfluss ist zwar klein, aber dennoch nicht zu vernachlässigen, insbesondere für  $t > 300 \mu$ s. Daher ist eine Korrektur für die Abhängigkeit von der Q<sub>A</sub><sup>-</sup>-Konzentration erforderlich. Die dafür gewählte Vorgehensweise wird in Abschnitt 2.3.1 erläutert.

### Zerfall nach Blitz 3

Eine besonders wichtige Rolle in der Untersuchung nimmt die verzögerte Fluoreszenz nach dem dritten Nanosekunden-Laserblitz ein. Der Zerfall lässt sich in zwei Bereiche aufteilen. Der erste Bereich vom Anfangswert bei 10  $\mu$ s bis zur Plateauphase bei etwa 1 ms spiegelt den S<sub>3</sub> → S<sub>4</sub>-Übergang wider. Der darauffolgende Zerfall im Millisekunden-Zeitbereich entspricht der Freisetzung des Sauerstoffs [Zankel, 1971; Grabolle and Dau, 2005; Clausen et al., 2005b; Buchta et al., 2007] (s.a. Abschnitt 2.3.2). Trägt man die Fluoreszenzwerte des Millisekunden-Zeitbereichs über der Anzahl der Blitze auf, so erhält man das typische Sauerstoff-Blitzmuster (siehe 1.2).

---

### Materialien und Methoden

---

In diesem Kapitel werden die Probenpräparation, die Messaufbauten sowie die üblicherweise verwendeten Auswerteverfahren vorgestellt. Die Zusammensetzungen der in diesem Kapitel vorkommenden Puffer sind in Anhang A aufgelistet.

#### 2.1 Präparation von PSII-Membranfragmenten aus Spinat

Die Präparation der PSII-Membranpartikel erfolgte auf der Grundlage der Vorschrift von Berthold, Babcock und Yocum [Berthold et al., 1981], nach deren Initialen auch der in der Umgangssprache verwendete Begriff *BBY-Partikel* entstanden ist. In der AG Dau wird eine modifizierte Version dieser Vorschrift verwendet, bei welcher u. a. Glycin-Betain zur Probenstabilisierung hinzugefügt wird [Iuzzolino et al., 1998; Schiller and Dau, 2000].

Für die in der AG Dau hergestellten PSII-Präparationen wurde Spinat (*Spinacia oleracea*) als Ausgangsmaterial eingesetzt. Im Gegensatz zu Präparationen aus z. B. Cyanobakterien ist die Herstellung von PSII-Proben aus Spinat weniger aufwendig und ergibt eine sehr gute Ausbeute mit hoher Sauerstoffaktivität.

Das Präparationsverfahren lässt sich in folgende Schritte unterteilen:

1. **Zellaufbruch:** Der grob zerkleinerte Spinat wird in einem Mixer zusammen mit sogenanntem Aufbruchpuffer (Puffer A) püriert und anschließend filtriert.
2. **Aufbruch der Chloroplasten und Extrahierung der Thylakoidmembran:** Für diesen Schritt wird das zentrifugierte Filtrat in hypotonischem Puffer B homogenisiert. Anschließend folgen weitere Zentrifugationsschritte.
3. **Abtrennung des PSI:** Zur PSII-Anreicherung wird mit Hilfe des Detergens Triton X-100 und des Inkubationspuffers C der PSI-Anteil aus der Thylakoidmembran entfernt.
4. **Reinigung und Lagerung der PSII-Membranfragmente:** Mehrere Zentrifugationsschritte sorgen dafür, dass Stärke herausgewaschen wird. Abschließend werden die Pellets in Puffer D homogenisiert (Chl-Gehalt ca 2–3 mg/ml) und bei -80 °C in kleinen Aliquots (0,2–2 ml) eingefroren

Die Sauerstoffaktivität unter sättigendem weißem Licht bei 28 °C betrug 1000–1400  $\mu\text{mol O}_2$  (mg Chl h)<sup>-1</sup>, das Chl a/Chl b-Verhältnis ca. 2,4.

## Entfernung des Mangankomplexes

Um den Mangan-Komplex des PSII's zu entfernen und die Sauerstoffentwicklung damit zu unterbinden, sind verschiedene Methoden in der Literatur bekannt, wie die Behandlung mit Hydroxylamin ( $\text{H}_2\text{NO}$ ) oder TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) [Cheniae and Martin, 1972, 1978]. Für die in unserer Gruppe verwendeten Membranpartikelproben stellte sich folgende Vorgehensweise als am geeignetesten heraus [Allakhverdiev et al., 1994]:

In einem ersten Schritt werden die entweder frisch hergestellten oder aufgetauten intakten Proben bei einer Chlorophyllkonzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  in einem TEMED-haltigen (Tetramethylethyldiamin) Puffer (Puffer MnDepletion1, pH 6,5) für eine Dauer von zehn Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 20500 rpm (50000 g) zentrifugiert. Das Pellet wird in einem TRIS-haltigen, alkalischen Puffer (Puffer MnDepletion2, pH 9,0) resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird insgesamt zwei Mal durchgeführt, bevor die Probe schließlich in Puffer D resuspendiert wird und zur Messung verwendet werden kann. Es ist bekannt, dass bei dieser Methode neben dem Mangan-Komplex auch die drei extrinsischen Polypeptide extrahiert werden.

Die erfolgreiche Funktionsweise des beschriebenen Protokolls lässt sich auf verschiedene Weise überprüfen (TXRF- und FTIR-Spektroskopie, verzögerte Fluoreszenz).

## Probenpräparation für die Fluoreszenzmessungen

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten PSII-Membranpartikel wurden ein bis zwei Stunden auf Eis aufgetaut und mit Hilfe eines weichen Pinsels in Puffer D resuspendiert. Zur Entfernung von eventuell noch vorhandener Stärke und freigesetztem Chlorophyll wurde die Suspension zwölf Minuten bei 50000 g zentrifugiert und das Pellet in wenigen Millilitern Puffer D resuspendiert. Anschließend folgte die Chlorophyllgehaltsbestimmung. Dazu wurden  $40\ \mu\text{l}$  der Chlorophylllösung in 10 ml Aceton-Wasser-Gemisch (80:20 (v/v)) gegeben und mindestens eine Minute inkubiert, um die Pigmente des PSII-Komplexes zu extrahieren. Im Anschluss wurden die Proben in einer Tischzentrifuge (Rotofix 32, Hettich) fünf Minuten bei 1600 g zentrifugiert, um die ausgefallenen Proteine abzutrennen. Mit einem UV-Vis-Spektrometer (Cary 50 Conc, Varian) konnte nun die Chlorophyllkonzentration über die Messung der optischen Dichte bei den Wellenlängen 646 nm und 663 nm bestimmt werden [Lichtenthaler, 1987].

Mit dem jeweils verwendeten Messpuffer wurde die Chlorophyllkonzentration zunächst auf  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$  eingestellt. Unmittelbar vor der Messung erfolgte die Verdünnung auf die standardmäßig verwendete Konzentration von  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  und eine evtl. Zugabe des künstlichen Elektronenakzeptors DCBQ bzw. des Inhibitors DCMU.

## 2.2 Messung der prompten Fluoreszenz

Die prompte Fluoreszenz wurde in einem *Pump-Probe*-Verfahren gemessen. Die Probe wird dazu mit sättigenden Lichtblitzen durch den S-Zustandszyklus geschaltet (*pump*), zwischen den Blitzen wird die prompte Fluoreszenz mit schwachen Testlichtpulsen abgefragt (*probe*).

Die Messung der Signale und die Bereitstellung der Testlichtpulse erfolgte durch ein kommerzielles Gerät (Double-Modulation Fluorometer FL 3000, Photo Systems Instruments s.r.o. Czech Republic). Das Messlicht wurde durch zwei gegenüber- und senkrecht zum anregenden Laserpuls liegende Felder aus je sieben orangefarbenen LEDs ( $\lambda_{max} = 615\ \text{nm}$ ; HLMP-DH08; Hewlett Packard) bereitgestellt. Die Detektion erfolgte durch eine PIN-Photodiode mit einer Anstiegszeit von  $2\ \mu\text{s}$ , die sowohl rechtwinklig zu den Testlichtpulsen als auch zum anregenden Laserpuls im Messaufbau integriert ist. Vor der Photodiode sind zwei Filter, ein Interferenz- und ein Absorptionsfilter, eingebaut (siehe Abb. 2.1), die sowohl gestreutes Anregungslicht als auch restliches Raumlicht ausblenden. Die gesamte Steuerung der Messung, einschließlich des externen Lasers, erfolgte durch eine dem Fluorometer zugehörigen Software (FluorWin) über einen Windows-PC, der seriell mit dem Fluorometer verbunden ist. Die entsprechenden Messprotokolle wurden je nach Bedarf angepasst. In der Regel wurde dabei für die anregenden Blitze eine lineare Zeitskala mit einem Blitzabstand von 700 ms gewählt,

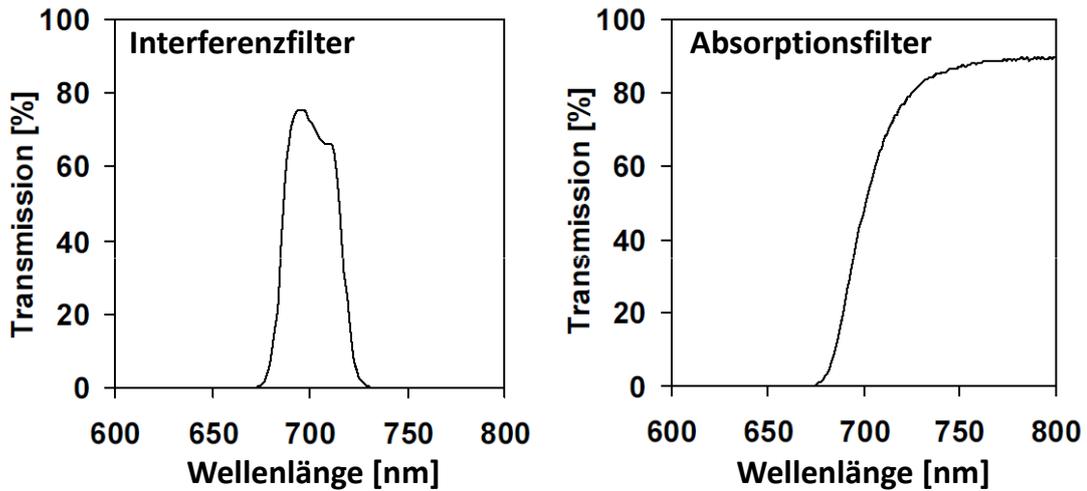


Abb. 2.1: Gezeigt werden jeweils die Transmissionsspektren des Interferenz- und des Absorptionsfilter, die im Fluorometer in Reihe vor der detektierenden Photodiode eingebaut sind. Editiert nach [Grabolle, 2005]

während die Testlichtpulse in logarithmisch zunehmenden Zeitabständen erfolgten. Dadurch konnte der aktinische Einfluss der Testlichtpulse gering gehalten werden.

Die PSII-Proben wurden für die Messung in Polystyren-Küvetten pipettiert und in den von der institutseigenen Werkstatt gebauten, temperierbaren Halter gestellt. Am Küvettenhalter sind auch die beiden Messlichtlampen sowie die Photodiode befestigt. Die Temperierung erfolgte über einen mit einem Wasser-Ethylenglykol-Gemisch (50 %-Mischung) gefüllten Thermostat (DC50, Badgefäß K40, HAAKE).

## Laseranregung

Zur Anregung der PSII-Proben wurde ein gütegeschalteter (*Q-switched*), frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (Continuum Minilite II) mit einer Wellenlänge von 532 nm und einer Pulsbreite von 3–5 ns verwendet. Die Verwendung dieser in der Absorptionslücke des PSIIs liegenden Wellenlänge hat den Vorteil, dass der Intensitätsgradient innerhalb der Probe gering ist und eine sättigende Anregung aller Photosysteme garantiert wird. Die Anregungsenergien wurden entsprechend [Grabolle, 2005] oberhalb der Sättigungsgrenze von 1,5 mJ/cm<sup>2</sup> gewählt.

Die Anregungsenergien lassen sich über einen eingebauten Abschwächer stufenlos einstellen. Vor Erreichen der Probe wurde der Laserstrahl mit Hilfe einer Konkavlinse auf einen Durchmesser von ca. 3 cm aufgeweitet und anschließend mit einer Konvexlinse parallelisiert.

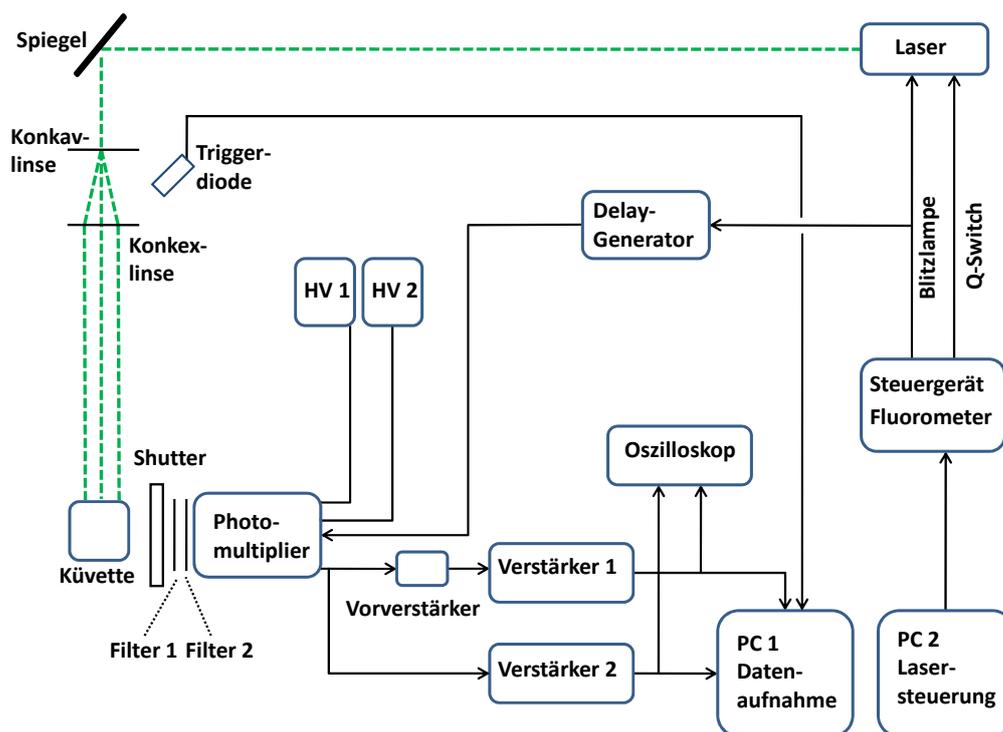


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Messung der verzögerten Fluoreszenz. Die einzelnen Bestandteile werden im Anhang B.1 genauer beschrieben. Editiert nach [Grabolle, 2005].

Dadurch wurde sichergestellt, dass die gesamte Querschnittsfläche der probengefüllten Küvette (ca.  $1\text{ cm}^2$ ) homogen und mit der zur Sättigung ausreichenden Intensität belichtet wird. Die Intensität der Laserpulse wurde vor den Messungen mit Hilfe eines kalibrierten Energiemessgeräts LEM-2410 (Messkopf: PEM11; Sensor- und Lasertechnik) bestimmt.

## 2.3 Messung der Rekombinationsfluoreszenz

Die Messung der Rekombinationsfluoreszenz erfolgte an dem von Markus Grabolle erstellten und beschriebenen Aufbau und ist in Abb. 2.2 schematisch dargestellt [Grabolle, 2005]. Zur Anregung der Proben wurde der im vorherigen Abschnitt beschriebene Nd:YAG-Laser verwendet.

### 2.3.1 Fluoreszenzdetektion

Die Aufnahme der verzögerten Fluoreszenz erfolgte senkrecht zum Anregungslicht mit dem Photomultiplier (R2066, Hamamatsu). Dieser Photomultiplier zeichnet sich durch eine besonders im roten Spektralbereich erhöhte Empfindlichkeit aus. Das Signal wurde über den gesamten Wellenlängenbereich integriert. Mit Hilfe eines speziellen Schaltsockels (PMT Gated Socket Assembly C1392-55) wurde der Photomultiplier zwischen  $7\ \mu\text{s}$  vor und  $3\ \mu\text{s}$  nach dem Laserblitz unempfindlich geschaltet, um eine Sättigung des Detektorsystems durch das starke prompte Fluoreszenzsignal der Probe zu verhindern. Gestreutes Laserlicht wurde mit einer Kombination zweier Langpassfilter (LINOS Photonics, DT-Red und DT-Magenta mit Abschneidfrequenzen von 600 bzw. 632nm) abgeblockt. Nach der im Folgenden noch beschriebenen Verstärkung wurde das Signal  $200\ \mu\text{s}$  vor bis 56 ms nach dem Laserblitz bei 1 MHz von einer 12-Bit-A/D-Karte (ADLINK, PCI 9812) abgefragt. Um sowohl die Anzahl der Datenpunkte als auch den Rauschpegel zu reduzieren, wurden die Datenpunkte direkt nach der A/D-Umwandlung logarithmisch gemittelt. Damit ist gemeint, dass die Größe der für die Mittelung verwendeten Zeitintervalle exponentiell ansteigt, so dass das Verhältnis der Längen zweier benachbarter Intervalle konstant bleibt. Trägt man die Datenpunkte nun auf einer logarithmischen Achse auf, führt diese Art der Mittelung zu einem konstanten Abstand zwischen den erhaltenen Datenpunkten (18 Datenpunkte pro Dekade).

Da sich die Intensität der verzögerten Fluoreszenz im Zeitbereich von  $10\ \mu\text{s}$  bis 60 ms um einen Faktor zwischen  $10^4$  und  $10^6$  verringert und damit die 12-Bit-Auflösung der verwendeten A/D-Karte an ihre Grenzen stößt, wird das Signal am Ausgang des Photomultipliers in zwei parallele Kanäle unterteilt. Das Signal von Kanal 1 wird direkt an den Tektronix-Verstärker (Tektronix AM 502) geleitet, Kanal zwei wird dagegen mit einem Vorverstärker 30-fach verstärkt und anschließend zu einem zweiten Tektronix-Verstärker geleitet. Die Ausgangssignale der beiden Tektronix-Verstärker werden separat in digitale Signale umgewandelt. Das Signal von Kanal 2 übersteigt innerhalb der ersten  $400\ \mu\text{s}$  nach dem Blitz die Obergrenze der A/D-Karte (Sättigung), während das Signal von Kanal 1 im Millisekunden-Zeitbereich unter die Auflösungsgrenze der A/D-Karte sinkt. Nachdem die Signale beider Kanäle logarithmisch gemittelt wurden, werden sie anschließend wieder zusammengefügt, indem man Kanal 2 mit einem entsprechenden Faktor multipliziert. Schließlich erhält man aus Kanal 1 die Datenpunkte für  $t < 500\ \mu\text{s}$  und aus Kanal 2 die Datenpunkte für  $t > 500\ \mu\text{s}$ .

### Artefaktkorrektur

Das detektierte Fluoreszenzsignal stammt nicht ausschließlich vom PSII, sondern auch durch Anregung von verzögerter Fluoreszenz im Kathodenmaterial des Photomultipliers sowie durch Streulicht des Anregungsblitzes [Grabolle, 2005]. Das reine PSII-Signal muss daher

um diesen Artefaktbeitrag korrigiert werden. Um diesen zu bestimmen, wurde wie folgt vorgegangen: Wenn die Probe mit einer Laserintensität oberhalb der Sättigungsgrenze angeregt wird, werden alle PSII-Zentren getroffen und das Signal der verzögerten Fluoreszenz ist maximal. Im Idealfall sollte eine weitere Erhöhung der Anregungsenergie kein weiter erhöhtes Signal nach sich ziehen. In der Praxis wird jedoch ein linear mit der Intensität ansteigendes Signal beobachtet. Um diesen Artefaktbeitrag weitestgehend zu beseitigen, wurden Messungen mit der Blitzintensität knapp oberhalb der Sättigungsgrenze ( $2 \text{ mJ/cm}^2$ ) und genau dem doppelten Wert davon ( $4 \text{ mJ/cm}^2$ ) durchgeführt. Aus der Differenz der beiden Messungen erhält man genau den Artefaktbeitrag, der sich bei Anregung mit der einfachen Intensität ergibt und von diesem Signal abgezogen werden kann.

Die mathematische Beschreibung davon ist:

$$I \rightarrow F_{\text{mess1}}(t) = F_{\text{gesättigt}}(t) + A(t) \quad (2.1)$$

$$2 \cdot I \rightarrow F_{\text{mess2}}(t) = F_{\text{gesättigt}}(t) + 2 \cdot A(t) \quad (2.2)$$

Daraus folgt der Artefaktbeitrag bei der einfachen Intensität durch Bildung der Differenz der beiden Messungen:

$$A(t) = F_{\text{mess2}}(t) - F_{\text{mess1}}(t) \quad (2.3)$$

$$F_{\text{gesättigt}}(t) = F_{\text{mess1}}(t) - A(t) \quad (= 2 \cdot F_{\text{mess1}}(t) - F_{\text{mess2}}(t)) \quad (2.4)$$

## Korrektur für den Einfluss der Akzeptorseite

Die Intensität der verzögerten Fluoreszenz hängt von den Konzentrationen von  $P680^+$  und  $Q_A^-$  sowie der freien Energiedifferenz zum angeregten Antennenzustand ab (Gleichung 1.13). Möchte man sich bei der Messdatenauswertung auf die Donorseitenprozesse beschränken, ist eine Korrektur für die  $Q_A^-$ -Konzentrationsabhängigkeit erforderlich. Dazu wird der durch die zeitabhängige  $Q_A^-$ -Konzentration bestimmte Zeitverlauf der prompten Fluoreszenz unter denselben Bedingungen (pH-Wert, Temperatur etc.) wie die Rekombinationsfluoreszenz gemessen. Für die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz  $F_D$  gilt [Grabolle, 2005]:

$$F_D \sim \Phi_{\text{rec}} \frac{F - F_0}{F_M - F_0} \quad (2.5)$$

mit

$$\Phi_{\text{rec}} \sim [P680^+] e^{\frac{\Delta G^*}{k_B T}} \quad (2.6)$$

Die korrigierten Werte ergeben sich schließlich durch:

$$F_D^{\text{kor}}(t) \sim F_D(t) \left( \frac{F(t) - F_0}{F_M - F_0} \right)^{-1} \quad (2.7)$$

### 2.3.2 Auswertung der Zeitverläufe

Nachdem die Korrekturen sowohl für den Artefaktbeitrag als auch den  $Q_A^-$ -Einfluss durchgeführt worden sind, wurden die Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz im Zeitbereich von 10  $\mu\text{s}$  bis 11 ms mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen angepasst:

$$\sum_{i=1}^3 \left( a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \right) + c \quad (2.8)$$

Bei Untersuchung längerer Zeitbereiche wurde gegebenenfalls eine vierte Zeitkonstante hinzugefügt. Die Kurvenanpassung selbst erfolgte durch Minimierung eines logarithmischen Fehlers  $\epsilon$ :

$$\epsilon = \sum_N \left( \log \frac{F_{\text{sim}}}{F_{\text{exp}}} \right)^2 \quad (2.9)$$

Diese Art der Fehlerbestimmung gewährleistet im Gegensatz zum üblichen *Least-Squares*-Ansatz, bei dem die Summe über die quadrierten Abweichungen minimiert wird, dass sich die Werte bei kurzen Zeiten nicht übermäßig in der Fehlersumme widerspiegeln. Dies wäre beim klassischen Ansatz sowohl wegen der erheblich größeren Werte sowie aufgrund der höheren Datenpunktdichte (logarithmische Mittelung) zu erwarten.

Aus den erhaltenen Parametern lassen sich nach der Kurvenanpassung folgende Größen berechnen:

- mittlere Zeitkonstante für den  $S_3 \rightarrow S_4$ -Übergang:

$$\tau_{12} = \frac{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2}{a_1 + a_2} \quad (2.10)$$

- Differenz der Gibbs'schen freien Energie für den  $S_3 \rightarrow S_4$ -Übergang:

$$\Delta G = -k_B T \cdot \ln \left( \frac{a_1 + a_2 + a_3 + c}{a_3 + c} \right) \quad (2.11)$$

$k_B$  bezeichnet hier und im Folgenden die Boltzmann-Konstante.

## Bestimmung von $\Delta G$ -Werten

Zum Zeitpunkt  $10 \mu\text{s}$  nach dem dritten anregenden Laserblitz befinden sich intakte PSII-Proben zu 80 % im  $Y_Z^+ Q_A^-$ -Zustand [Jeans et al., 2002]. Betrachtet man den Fluoreszenzpegel zu diesem Zeitpunkt, lässt sich daraus die Differenz der Gibbs'schen freien Energie zwischen dem angeregten Antennenzustand  $\text{Chl}^*$  und  $Y_Z^+ Q_A^-$  zu  $(-429 \pm 25) \text{ meV}$  bestimmen. Eine ausführliche Darstellung der Vorgehensweise findet sich in [Grabolle and Dau, 2005].

Der genannte Wert lässt sich als Referenz für die Abschätzung von  $\Delta\Delta G$ -Werten zwischen diesem und anderen Redoxzuständen verwenden, wenn man unter denselben Bedingungen (Messapparatur, Chlorophyllkonzentration, Temperatur) sowohl den Fluoreszenzzerfall, der den gewünschten Redoxzustand wiedergibt, als auch den Fluoreszenzzerfall nach dem dritten Laserblitz in intakten PSII-Proben misst. Aus dem Vergleich der beiden Fluoreszenzpegel (der jeweiligen Redoxzustände) lässt sich nun eine Abschätzung von Differenzen der Gibbs'schen freien Energie vornehmen. Die den Ergebnissen zugeordneten Fehlerbereiche entsprechen der von der *OriginPro 8* ermittelten Standardabweichung.

## 2.4 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

### Messapparatur

Die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie-Messungen (FTIR) (für die Methode siehe Review [Berthomieu and Hienerwadel, 2009]) wurden an einem Vertex 70-FTIR-Spektrometer (Bruker) durchgeführt. Eine schematische Überblick des Spektrometers und eine ausführlichere Darstellung seiner Komponenten findet sich in [Süss, 2011; Menzel, 2009]. Die Strahlung im mittleren Infrarot-Bereich (MIR) wird durch einen Silizium-Carbid-Stab (Globar) erzeugt und mit einem Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Detektor gemessen. Die exakte Bestimmung der Spiegelposition wird mit Hilfe des geräteinternen HeNe-Lasers ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) gewährleistet. Als Anregungslaser diente ein Nd:YAG-Laser (Quantel) mit der Wellenlänge  $\lambda = 532 \text{ nm}$ , der extern von einem Pulsgenerator (9514 Plus Pulse Generator) getriggert wird.

Der Messraum einschließlich der Probenkammer wurde kontinuierlich mit Trockenluft (Purge Gas-Generator Model PG14L, cmc Instruments GmbH) gespült, um den störenden Einfluss von Wasserbanden im Spektrum zu minimieren. Temperiert wurden die Proben mit Peltier-Elementen (Peltron).

## Probenpräparation und Messung

Die PSII-Proben wurden wie für die Fluoreszenzmessungen vom Mangankomplex befreit. Nach Inkubation im zu untersuchenden pH-Puffer erfolgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 20500 rpm. Das erhaltene Pellet wurde wenige Minuten unter Trockenluft getrocknet, bis es eine zähe Konsistenz aufwies. Die getrocknete PSII-Probe wurde zwischen zwei Kalziumfluoridplättchen aufgetragen und in den Probenraum eingebracht. Mit einem Scan-Vorgang wurde überprüft, welche der maximal 314 Punkte auf der Probe (geometrische Einteilung durch B. Süss) die optimale Schichtdicke aufwies (Details siehe [Süss, 2011; Menzel, 2009]). Anschließend wurden die Messungen an den zuvor ermittelten Stellen bei einer Zeitauflösung von ca. 77 ms aufgenommen. Dabei wurden 20 Messpunkte vor der Laseranregung und 135 Messpunkte danach detektiert. Die Wellenzahlauflösung betrug  $8 \text{ cm}^{-1}$ .

## Datenauswertung

Die gemessenen Daten wurden mit Hilfe der dem Gerät zugehörigen Software OPUS ausgewertet. Zunächst wurden die gemessenen Spektren arithmetisch gemittelt. Von den gemittelten Spektren wurde anschließend das Dunkelspektrum  $I_{Dunkel}$  (Messpunkte vor dem Laserblitz) extrahiert, um das gewünschte Differenzspektrum  $I_{Diff}$  nach folgender Gleichung zu ermitteln:

$$I_{Diff}(\nu) = -\log_{10} \left( \frac{I_{Blitz}(\nu)}{I_{Dunkel}(\nu)} \right) \quad (2.12)$$

Die Ergebnisse können sowohl auf ihre Wellenzahl- als auch Zeitabhängigkeit untersucht werden. Um beides miteinander zu kombinieren, lassen sich gemeinsame Zeitkonstanten simultan für den gesamten Wellenzahlbereich bestimmen. Die zugehörigen Amplituden werden entsprechend angepasst (*globaler Fit*):

$$A(t, \nu) = \sum_{i=1}^n A_i(\nu) \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (2.13)$$

Dabei bezeichnen  $A(t, \nu)$  die zeit- und wellenzahlabhängigen Änderungen des FTIR-Signals. Aus den erhaltenen  $A_i(\nu)$  lassen sich Rückschlüsse auf die entsprechenden Zerfallsprozesse ziehen. Ein entsprechendes Simulationsprogramm, um den globalen Fit zeitsparend durchzuführen, wurde arbeitsgruppenintern von Dr. Petko Chernev zur Verfügung gestellt.

Zur Bestimmung der Wellenzahlen der jeweiligen Maxima und Minima wurde die Analysemethode *Impulse und Basislinie* des Programms Origin 8.5 verwendet. Diese Methode

erlaubt nach Festlegung einer Basislinie (für diese Arbeit  $y = 0$ ) die Auffindung von lokalen Extremwerten. Dabei wurde zur Impulsfilterung die Empfindlichkeit der Impulssuche zwischen 15 und 20 % variiert. Darüber hinaus wurden mit Origin die Bildschirmkoordinaten für Peaks ausgelesen, die aufgrund einer experimentell bedingt abweichenden Basislinie (Amid-I-Region) von der o.g. Methode nicht berücksichtigt wurden.

## 2.5 Mathematische Auswertung der untersuchten Größen

### 2.5.1 Temperaturabhängigkeit

Aus den Messungen der Temperaturabhängigkeit einzelner Zeitkonstanten  $\tau_i$  lassen sich mit Hilfe der Arrheniusbeziehung die Aktivierungsenergien  $E_{A,i}$  der untersuchten Prozesse bestimmen. Es gilt dabei für die Ratenkonstanten  $k$ :

$$\frac{1}{\tau} = k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{k_B T}} \quad (2.14)$$

bzw.

$$\ln\left(\frac{1}{\tau}\right) = \ln(k) = \ln(A) - \frac{E_A}{k_B} \cdot T^{-1} \quad (2.15)$$

Trägt man daher den natürlichen Logarithmus der Ratenkonstanten über der reziproken Temperatur auf, ergibt sich für einen Prozess mit einer temperaturunabhängigen Aktivierungsenergie ein linearer Zusammenhang. Die Aktivierungsenergie ergibt sich dann aus der Steigung der Ausgleichsgeraden. Der y-Achsenabschnitt, hier  $\ln(A)$ , gibt einem den (präexponentiellen) Frequenzfaktor  $\nu$  an. Die untersuchten Temperaturabhängigkeiten wurden mit dem Programm *OriginPro 8* mit einer linearen Gleichung angepasst und die ausgegebenen Fehlerwerte des Steigungsparameter zur Bestimmung des Fehlerintervalls  $\Delta E_A$  verwendet. Um das Fehlerintervall für den Frequenzfaktor  $\nu$  zu bestimmen, wurden die minimale bzw. maximale Aktivierungsenergie  $E_A \pm \Delta E_A$  in die lineare Gleichung eingesetzt. Die daraus ermittelten Frequenzfaktoren  $\nu_{min}$  und  $\nu_{max}$  geben dann die untere bzw. obere Grenze des Fehlerintervalls an.

### 2.5.2 pH-Abhängigkeit

Aus der Formulierung einer allgemeinen Säure-Base-Reaktion und dem Massenwirkungsgesetz leitet sich die Hendersson-Hasselbalch-Gleichung ab:

$$pK = pH \pm n \cdot \log_{10}\left(\frac{\alpha}{1 - \alpha}\right), \quad (2.16)$$

wobei  $\alpha$  den Dissoziationsgrad bezeichnet. Durch geeignete Umformung ergibt sich folgende Beziehung:

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{(pK-pH) \cdot n-1}} \quad (2.17)$$

Um den pK-Wert einer in dieser Arbeit untersuchten pH-abhängigen Größe  $a(pH)$  zu ermitteln, wurde die von *OriginPro 8* bereitgestellte Funktion *DoseResp* verwendet:

$$a(pH) = a_{\min} + \frac{a_{\max} - a_{\min}}{1 + 10^{(pK-pH) \cdot n-1}} \quad (2.18)$$

$a_{\min}$  und  $a_{\max}$  bezeichnen dabei die Minimal- und Maximalwerte der untersuchten Größe dies- und jenseits des pK-Werts. Die den Ergebnissen zugeordneten Fehlerbereiche entsprechen der von der *OriginPro 8* ermittelten Standardabweichung.

### 2.5.3 Konzentrationsabhängigkeit

Zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen Inhibition von Herbiziden wurde die Hill-Gleichung verwendet, die einer erweiterten Michaelis-Menten-Gleichung entspricht:

$$\theta = \frac{x^n}{k^n + x^n} \quad (2.19)$$

Die Dissoziationskonstante  $k$  gibt an, bei welcher Konzentration genau die Hälfte des zugegebenen Herbizids gebunden ist (mikroskopische Dissoziationskonstante).  $n$  bezeichnet den Hill-Koeffizienten.

Um die Dissoziationskonstante  $k$  einer in dieser Arbeit untersuchten konzentrationsabhängigen Größe  $\theta(x)$  zu ermitteln, wurde die von *OriginPro 8* bereitgestellte Funktion („Hill1“) verwendet:

$$\theta = \theta_{\min} + (\theta_{\max} - \theta_{\min}) \cdot \frac{x^n}{k^n + x^n} \quad (2.20)$$

$\theta_{\min}$  und  $\theta_{\max}$  bezeichnen dabei die Minimal- und Maximalwerte der untersuchten Größe dies- und jenseits der Dissoziationskonstanten. Die den Ergebnissen zugeordneten Fehlerbereiche entsprechen der von der *OriginPro 8* ermittelten Standardabweichung.

---

## Aktivierungsenergie des sauerstoffbildenden Schritts

---

Dieses Kapitel behandelt die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Ratenkonstante des sauerstoffbildenden Schritts. Insbesondere war dabei von Interesse, ob sich der gesamte untersuchte Temperaturbereich von  $-2,7$  bis  $27^\circ\text{C}$  mit einer Aktivierungsenergie beschreiben lässt oder ob bei einer bestimmten Temperatur ein Knickpunkt im Arrheniusplot auftritt und damit zwei verschiedene Aktivierungsenergien zu beobachten sind. Die Ergebnisse der Messungen wurden im Rahmen der internationalen Photosynthese-Konferenz in Pushchino, Russland vorgestellt und im Journal *Biochimica et Biophysica Acta* im Jahr 2007 veröffentlicht [Buchta et al., 2007].

### 3.1 Motivation

Der Sauerstoffentwicklungsschritt, der im Kok-Zyklus (siehe Abb. 1.4) dem  $S_4 \rightarrow S_0$ -Übergang entspricht, ist seit langer Zeit Gegenstand intensiver Forschung, insbesondere hinsichtlich der Bildung von intermediären Zuständen und deren Eigenschaften. Mit der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit und der dadurch erhaltenen Aktivierungsenergie erhofft man sich, Einblicke in die genaue Natur der intermediären Zustände zu gewinnen. Frühere Messungen zeigten in dieser Frage keine eindeutigen bzw. sogar widersprüchliche Ergebnisse, die in diesem Abschnitt kurz zusammengefasst werden.

Aus den ersten Untersuchungen zu diesem Thema, die bereits Mitte der 1960er-Jahre und im folgenden Jahrzehnt anhand von  $\text{O}_2$ -Polarographie-Messungen erfolgten [Joliot et al., 1966;

Etienne, 1968; Sinclair and Arnason, 1974], ergaben sich Aktivierungsenergien im Bereich zwischen 256 und 334 meV, die kontinuierlich für den jeweils untersuchten Temperaturbereich gelten. Dagegen zeigt sich bei UV-Absorptionsmessungen an den thermophilen Cyanobakterien *Synechococcus vulcanus* eine anomale Änderung der Aktivierungsenergie. Bei ca. 16 °C ist ein Knickpunkt (engl. *break point*) in der Temperaturabhängigkeit der Ratenkonstanten zu erkennen, was bedeutet, dass sich die Aktivierungsenergien für diesen Prozess über- und unterhalb dieser Temperatur unterscheiden [Koike et al., 1987]. Aus dem Vergleich der Zeitkonstanten der  $Y_Z^+$ -Reduktion mit denen der Sauerstofffreisetzung deuten die Autoren, dass in Spinat-Thylakoiden der Elektronentransport von Mangankomplex in seinem  $S_3$ -Zustand zum  $Y_Z^+$  bei Raumtemperatur der ratenlimitierende Schritt der Gesamtreaktion ist. Nimmt man dasselbe bei Cyanobakterien an, so ließe dies die Existenz zweier verschiedener Konformationszustände im  $S_3$ -Zustand vermuten. Da der Knickpunkt sehr scharf ausgebildet ist, könnte mit ihm ein Phasenübergang der ganzen Membran einhergehen. Außerdem wurde festgestellt, dass die Temperatur des Knickpunkts mit der Schwellentemperatur übereinstimmt, bei welcher der  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang in Thermolumineszenzmessungen merklich verlangsamt wird. Da diese Schwellentemperatur in Spinat-Thylakoiden bei einem deutlich tieferen Wert, etwa 0 °C liegt, sollte der Knickpunkt bei diesen Proben auch in diesem Bereich auftreten [Koike et al., 1987].

Dieselbe Gruppe veröffentlichte schließlich Ergebnisse zur Temperaturabhängigkeit von UV-Absorptionsmessungen sowohl an PSII-Membranfragmenten [Renger and Hanssum, 1992] als auch PSII-Core-Partikeln [Karge et al., 1997], die jeweils aus Spinat gewonnen wurden. Beide Ergebnisse weisen je einen Knickpunkt im Arrheniusplot auf, bei einer Temperatur von 10 °C für die PSII-Core-Partikel und bei einer Temperatur von 6 °C für die PSII-Membranfragmente. Dieser ist allerdings nur sehr schwach ausgeprägt und darüberhinaus lässt sich die Streuung der Daten aufgrund der geringen Anzahl an Datenpunkten in den entsprechenden Diagrammen kaum abschätzen. Aus der Anwesenheit dieser Knickpunkte wird geschlossen, dass der  $S_3$ -Zustand zwei redox-isomere Unterzustände  $S_3(I)$  und  $S_3(II)$  einnehmen kann, wobei letzterer einen Peroxidcharakter aufweist (siehe auch [Haumann and Junge, 1999]).

Im Gegensatz dazu konnten Haumann *et al.* in UV-Absorptionsmessungen weder für Thylakoide noch für Core-Partikel, jeweils aus Erbsenpflanzen hergestellt, einen Knickpunkt in der Aktivierungsenergie feststellen [Haumann et al., 1997]. Und auch erneute Messungen der  $O_2$ -Polarographie an PSII-Membranpartikeln aus Spinat sowie aus *Synechocystis* ergaben wie die UV-Absorptionsuntersuchung an *Synechocystis* keinen Hinweis auf einen temperaturbedingten Wechsel zwischen zwei bestimmten ratenlimitierenden Reaktionen [Clausen et al., 2004].

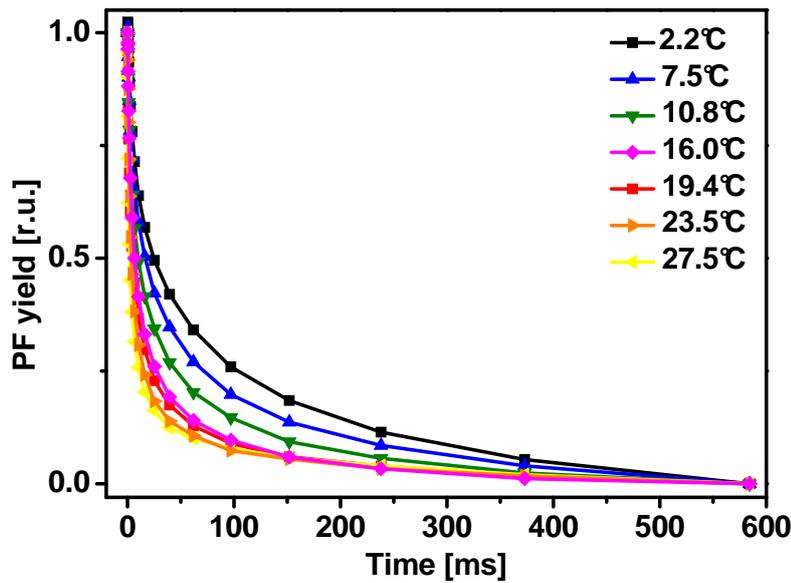


Abb. 3.1: Normierte Zeitverläufe der prompten Chlorophyllfluoreszenz (PF) von PSII-Membranpartikeln nach Laserpulsanregung für verschiedene Temperaturen. Die Ausbeute (yield) der prompten Chlorophyllfluoreszenz des PSII spiegelt den Redoxzustand des  $Q_A$  wider (maximale Fluoreszenz für reduziertes  $Q_A$  in allen PSII). Mit Hilfe dieser Zeitverläufe wurde der  $Q_A^-$ -Einfluss auf die verzögerte Fluoreszenz korrigiert.

Die Rekombinationsfluoreszenz eignet sich zur Untersuchung der Ratenkonstante der Sauerstoffbildung in besonderem Maße. Da die bisherigen Studien, die entweder mit Hilfe von UV-Absorption oder  $O_2$ -Polarographie durchgeführt wurden, zu keinem einheitlichen Ergebnis führten, haben wir eine eigene Messreihe zur Klärung dieses Sachverhalts angestrebt. Der zu untersuchende Temperaturbereich wurde dabei so gewählt, dass der bislang in der Literatur gefundene und bei  $6^\circ\text{C}$  liegende Knickpunkt bei PSII-Membranpartikeln aus Spinat ersichtlich sein sollte.

## 3.2 Ergebnisse

Die Temperaturabhängigkeit der Ratenkonstanten kann nur in einem engen Bereich gemessen werden, da das PSII bei höheren Temperaturen unter Aufbrechen der Wasserstoffbrücken zerfällt [Renger and Hanssum, 1992], während die Reaktionen bei niedrigeren Temperaturen thermisch blockiert sind [Koike et al., 1987].

Die bisherigen Messungen an Spinat-Membranpartikeln, bei denen ein Knickpunkt aufgetreten ist, wurden im Temperaturbereich 0 bis  $20^\circ\text{C}$  durchgeführt [Renger and Hanssum, 1992]. Für die hier vorgestellte Messreihe wurde der Temperaturbereich auf  $-2,7^\circ\text{C}$  erweitert,

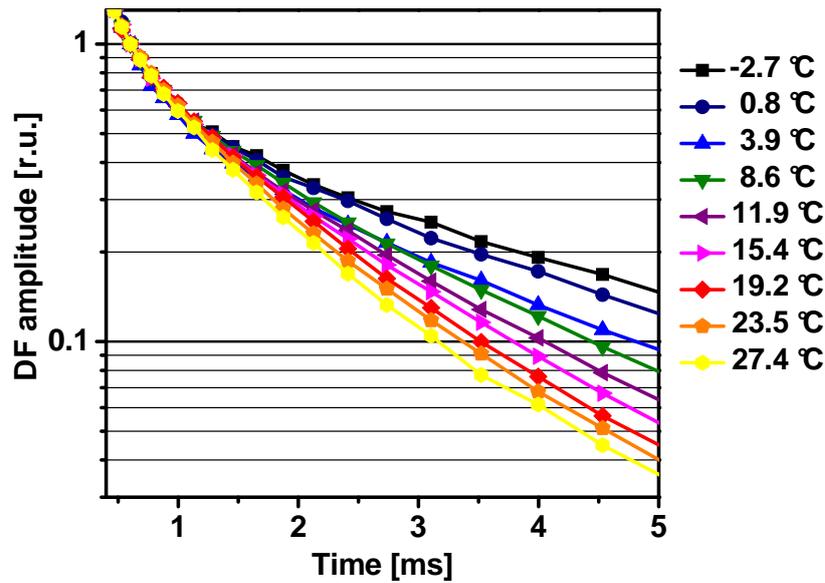


Abb. 3.2: Temperaturabhängigkeit der Sauerstoffphase der verzögerten Fluoreszenz. Exemplarisch gezeigt werden neun Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz nach dem dritten anregenden Blitz. Die Kurven sind für den Zeitpunkt 0,6 ms auf den Wert 1 normiert. In der semilogarithmische Darstellungweise ist die Temperaturabhängigkeit der Sauerstoffphase am Grad der jeweiligen Steigung deutlich zu erkennen.

indem der PSII-Probe 10 % Glycerol hinzugefügt wurde, um den Gefrierpunkt zu erniedrigen. Insgesamt wurden 60 Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz gemessen und anschließend um den Streuartefaktbeitrag und den  $Q_A^-$ -Einfluss korrigiert. Um diesen zu bestimmen, wurde unter denselben Bedingungen (Probenpräparation, Messpuffer etc.) wie bei der Rekombinationsfluoreszenz die Temperaturabhängigkeit der prompten Fluoreszenz gemessen. Das Rational der  $Q_A^-$ -Korrektur ist in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Exemplarisch sind in Abbildung 3.1 sieben Zerfälle der prompten Fluoreszenz dargestellt. Wie zu erkennen ist, verläuft die  $Q_A^-$ -Reoxidation umso schneller, je höher die Temperatur ist.

In Abbildung 3.2 sind die normierten Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz im Zeitraum 0,5–5 ms nach dem dritten Blitz für mehrere Temperaturen zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Fluoreszenzzerfall bei steigender Temperatur schneller vonstatten geht. Die Zeitverläufe der Rekombinationsfluoreszenz wurden im Zeitintervall 10  $\mu$ s–11 ms mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen und einer Konstanten simuliert (siehe Abschnitt 2.3.2). Abbildung 3.3 zeigt die Werte der so bestimmten Sauerstoff-Ratenkonstanten in Abhängigkeit von der Temperatur. Der Arrheniusplot lässt sich auf zwei verschiedene Weisen interpretieren. Diagramm A zeigt zwei Geraden, die zwei verschiedenen Aktivierungsenergien entsprechen ( $E_a = (182 \pm 12)$  meV für  $T > 15^\circ\text{C}$  und  $E_a = (257 \pm 15)$  meV für  $T < 6^\circ\text{C}$ ). Anstatt eines klaren Knickpunkt-Verhaltens könnte man sich einen kontinuierlichen

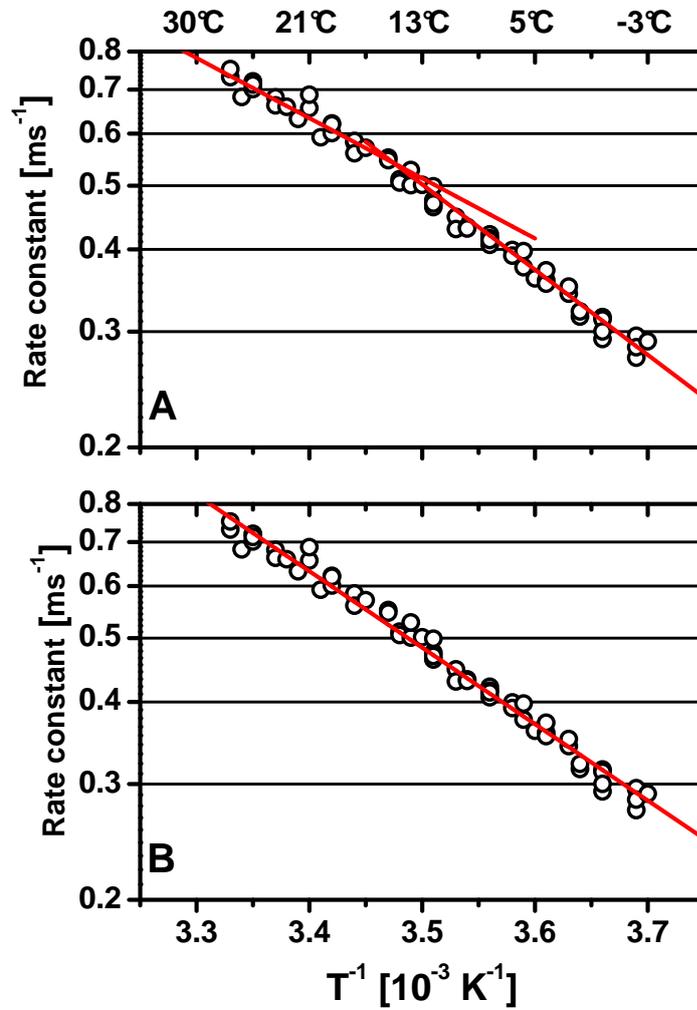


Abb. 3.3: Temperaturabhängigkeit der Ratenkonstante der Sauerstoffentwicklung. Die kreisförmigen Symbole zeigen die aus insgesamt 60 gemessenen Zeitverläufen der verzögerten Fluoreszenz ermittelten Ratenkonstanten. Die Datenpunkte in A und B sind identisch. A: Die simulierten Geraden geben Aktivierungsenergien von  $(257 \pm 15)$  meV (ermittelt für  $T < 6^\circ\text{C}$ ) und  $(182 \pm 12)$  meV (ermittelt für  $T > 15^\circ\text{C}$ ) an. B: Die simulierte Gerade entspricht einer Aktivierungsenergie von  $(231 \pm 3)$  meV für den gesamten Bereich.

Übergang zwischen der niedrigen Aktivierungsenergie (für  $T > 15^\circ\text{C}$ ) und der hohen Aktivierungsenergie ( $T < 6^\circ\text{C}$ ) vorstellen. Diagramm B zeigt die Simulation mit einer Geraden für den gesamten Temperaturbereich, die zu einer Aktivierungsenergie von  $(231 \pm 3)$  meV führt.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den bisher veröffentlichten Ergebnissen, so lässt sich feststellen, dass dieser Wert (231 meV) in guter Übereinstimmung mit der von Renger und Hanssum ermittelten Aktivierungsenergie von 207 meV für Werte oberhalb von  $6^\circ\text{C}$  sind [Renger and Hanssum, 1992]. Der ebenfalls an Spinat-PSII-Membranpartikeln gemessene Wert von Clausen *et al.*,  $(309 \pm 1)$  meV liegt darüber. Allerdings sind die aus der  $\text{O}_2$ -Polarographie erhaltenen Ergebnisse wegen der komplexen Temperaturabhängigkeit der Elektrodenprozesse nicht sehr zuverlässig. Hochaktive PSII-Membranpartikel aus demselben Labor lieferten bei Messungen der photothermischen Strahlableitung denselben Wert [Krivanek et al., 2008]. Eine Übersicht über die in der Literatur veröffentlichten Messungen zeigt Tabelle 3.1.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Auftreten eines Knickpunktes in der Temperaturabhängigkeit der Ratenkonstante der Sauerstoffentwicklung zwar nicht ausgeschlossen werden kann, die Daten jedoch in einer guten Näherung mit einem einfachen monophasischen Arrhenius-Verhalten beschrieben werden können. Eine weitere Ausweitung des Temperaturbereichs oder die Untersuchung des PSII von thermophilen Cyanobakterien könnte eine eindeutige Ermittlung eines temperaturabhängigen Wechsels zwischen zwei verschiedenen Aktivierungsenergien ermöglichen.

$E_A$ [meV]	$\tau_{Ox}(RT)$ [ms]	Temp.- bereich	Methode	Organismus	Quelle
256	$3,3 \pm 0,2$	8 – 42 °C	O <sub>2</sub> -Polarographie	ganze Grünalgen-Zellen ( <i>Chlorella</i> )	[Sinclair and Arnason, 1974]
616 161	1,9	1 – 16 °C 16 – 50 °C	UV-Absorption	Core-Partikel ( <i>Synechococcus v.</i> )	[Koike et al., 1987]
477 207	1,5	0 – 6 °C 6 – 20 °C	UV-Absorption	PSII-Membranpartikel (Spinat)	[Renger and Hanssum, 1992]
$389 \pm 2$	2,3	3 – 34 °C	UV-Absorption	Thylakoide (Erbsen)	[Bögershausen et al., 1996] [Haumann et al., 1997]
694 161	$5,2 \pm 0,4$	2 – 11 °C 11 – 25 °C	UV-Absorption	Core-Partikel (Spinat)	[Karge et al., 1997]
$342 \pm 1$ $422 \pm 9$ $309 \pm 1$	1,9 1,6 3,0	4,6 – 21 °C -2,1 – 31,7 °C 0,8 – 30,8 °C	UV-Absorption O <sub>2</sub> -Polarographie	Membranfragmente ( <i>Synechocystis</i> ) Membranfragmente ( <i>Synechocystis</i> ) PSII-Membranpartikel (Spinat)	[Clausen et al., 2004]
$257 \pm 15$ $182 \pm 12$ $231 \pm 3$	$1,6 \pm 0,1$	-2,7 – 6 °C 15 – 27,5 °C -2,7 – 27,5 °C	Verzögerte Fluoreszenz	PSII-Membranpartikel (Spinat)	diese Arbeit, [Buchta et al., 2007]
230	1,6	-1 – 33 °C	Photothermische Strahlableitung	PSII-Membranpartikel (Spinat)	[Krivanek et al., 2008]

Tab. 3.1: Übersicht über in der Literatur veröffentlichten Aktivierungsenergien für den sauerstoffbildenden Schritt.



---

## Rolle der Carboanhydrase im Photosystem II von Grünalgen

---

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse verschiedener Messungen an der Mutante *cia3* der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* vorgestellt. Dieser Mutante fehlt die Carboanhydrase *Cah3*, die für die schnelle Umsetzung von Kohlenstoffdioxid in Hydrogencarbonat sorgt, und ermöglicht daher den Einfluss von Hydrogencarbonat auf die Funktionsweise des PSIIs zu untersuchen. Die Messungen wurden in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen durchgeführt. Von mir wurde dabei die verzögerte und prompte Fluoreszenz analysiert. Die weiteren vorgestellten Messungen fanden an der Universität Umeå in der Arbeitsgruppe Samuelsson und in der Arbeitsgruppe Junge (Polarographie) an der Universität Osnabrück statt. Die Ergebnisse wurden im Jahr 2008 im EMBO-Journal veröffentlicht [Shutova et al., 2008] und auf dem 14. Internationalen Photosynthese-Kongress in Glasgow vorgestellt [Buchta et al., 2008]. Einleitend wird ein kurzer Überblick über die Rolle von Hydrogencarbonat in der Funktionsweise des PSIIs, sowohl an der Akzeptor- als auch an der Donorseite, gegeben.

### 4.1 Die Rolle von Hydrogencarbonat im PSII

Bereits 1958 wurde von Warburg und Krippahl entdeckt, dass Hydrogencarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ , engl. *bicarbonate*), die Salze der einfach dissoziierten Kohlensäure, den Elektronenfluss in der Hill-Reaktion stimulieren [Warburg and Krippahl, 1958]. Heutzutage steht fest, dass  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen für die optimale Aktivität des PSIIs notwendig sind [Klimov and Baranov, 2001]. Die genaue Rolle, die das Hydrogencarbonat dabei spielt, bleibt jedoch weiterhin umstritten.

Zur Untersuchung des Phänomens wurden für die jeweiligen Experimente (Chlorophyll-Fluoreszenz, EPR-, FTIR- und Mössbauer-Spektroskopie etc.) folgende Ansätze gewählt: (1) Ersetzung des Hydrogencarbonats an den möglichen Bindungsstellen durch andere Anionen wie z.B. Formiat; (2) eine starke Verdünnung konzentrierter PSII-Proben in  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -befreiten Medien; (3) Verschiebung des pH-Werts auf einen Wert unterhalb des pK-Werts der  $\text{H}_2\text{CO}_3$ -Dissoziation (pH 6,4).

## Auswirkungen auf die PSII-Akzeptorseite

Erste Anzeichen für einen Hydrogencarbonat-Effekt an der Akzeptorseite des Photosystems II wurden 1975 von Wydrzynski und Govindjee bei Messungen von Chl a-Fluoreszenz-Induktionskurven in  $\text{CO}_2$ -freiem Medium gefunden [Wydrzynski and Govindjee, 1975; van Rensen, 2002]. Die Ergebnisse zeigten einen raschen Anstieg der variablen Fluoreszenz, ähnlich wie es bei Messungen mit dem Herbizid DCMU aufgrund der Blockierung des  $\text{Q}_A\text{Q}_B$ -Elektronentransfers der Fall ist. Messungen der  $\text{Q}_A^-$ -Reoxidation in Abhängigkeit von der Blitzanzahl wurden zu einer wichtigen Methode, den Einfluss von Hydrogencarbonat zu untersuchen. Govindjee fand unter normalen Bedingungen keine Unterschiede der Fluoreszenzintensität (nach etwa 160 ms), wenn eine Reihe von Blitzen auf die PSII-Proben gegeben wurden [Govindjee et al., 1976]. Im  $\text{CO}_2$ -freiem Medium stellte er nach den ersten beiden Blitzen nur geringe Unterschiede fest, nach drei und mehreren Blitzen stieg die Fluoreszenz dagegen stark an. Auch die  $\text{Q}_A^-$ -Reoxidation verläuft im  $\text{CO}_2$ -freiem Medium bei höheren Blitzzahlen deutlich langsamer als nach den ersten beiden Blitzen, während dieser Unterschied unter Normalbedingungen nicht zu sehen ist. Daraus konnte geschlossen werden, dass bei  $\text{CO}_2$ -Verarmung der  $\text{Q}_A\text{Q}_B$ -Elektronenübergang selbst wesentlich weniger stark beeinflusst wird als die Protonierung von  $\text{Q}_B^{2-}$  bzw. der Austausch von  $\text{Q}_B\text{H}_2$  (Plastochinol) mit dem Plastochinonpool.

Anhand von Experimenten mit verschiedenen Inhibitoren, Elektronenakzeptoren und -donoren konnte auf eine Bindungsstelle zwischen  $\text{Q}_A$  und dem Plastochinonpool geschlossen werden. EPR- und Mössbauer-Spektroskopie führten schließlich zu der Annahme, dass das zwischen  $\text{Q}_A$  und  $\text{Q}_B$  liegende Non-Häm-Eisen eine Bindungsstelle für Hydrogencarbonat ist. Des Weiteren wurde noch eine weitere Akzeptorseiten-Bindungsstelle nahe des Arginin 257 entdeckt [Xiong et al., 1996, 1998].

Die Funktion des Hydrogencarbonats an der Akzeptorseite könnte zum einen darin liegen, dass es an der Protonierung von  $\text{Q}_B^-$  beteiligt ist, gewissermaßen als Protonen-Vermittler zwischen  $\text{Q}_B$  und der wässrigen Phase. Eine zusätzliche Rolle könnte es als Stabilisator der  $\text{Q}_A - \text{Fe} - \text{Q}_B$ -Struktur spielen. Die Entfernung des Hydrogencarbonats würde eine Veränderung des  $\text{Q}_A\text{Q}_B$ -Abstands nach sich ziehen und damit die Elektronentransferrate verlangsamen [Blubaugh and Govindjee, 1988; Diner and Petrouleas, 1990].

## Auswirkungen auf die PSII-Donorseite

Neben der Akzeptorseite sind auch auf der PSII-Donorseite Auswirkungen bei Entfernung des Hydrogencarbonats zu beobachten. Viererperiodische, blitzinduzierte Absorptionsänderungen (bei 295 nm) wurden bei Formiatzugabe unterdrückt [Wincencjusz et al., 1996]. Im Vergleich zu den Experimenten an der Akzeptorseite genügt sogar eine 100–1000fach geringere Menge an Formiat, um Hydrogencarbonat von seiner dortigen Bindungsstelle zu entfernen und den Elektronentransfer auf der Donorseite zu inhibieren. EPR-Messungen zeigten, dass Hydrogencarbonat sowohl für die Funktionalität als auch die Struktur an der Donorseite wichtig ist [Klimov et al., 1997a,b]. Die Reduktion des photooxidierten  $Y_Z$  in Anwesenheit von Formiat (sichtbares EPRII-Signal) verlangsamt sich stark und kann nicht mehr durch den wasserspaltenden Komplex stattfinden, sondern hauptsächlich über Rückreaktionen mit reduzierten Elektronenakzeptoren. Strukturelle Änderungen lassen sich anhand des 6-Linien-EPR-Signals erkennen, welches bei Freisetzung von freiem  $Mn^{2+}$  auftritt (ein oder zwei Atome pro PSII-Reaktionszentrum). Hydrogencarbonat hat also einen schützenden Effekt auf den wasserspaltenden Komplex. Messungen der FTIR-Spektroskopie legen die Vermutung nahe, dass Hydrogencarbonat ein Ligand des wasserspaltenden Komplexes ist [Yruela et al., 1998]. Ausgeschlossen werden konnte die ursprüngliche Vermutung, dass Hydrogencarbonat als direkter Donor für den wasserspaltenden Komplex dienen könnte [Clausen et al., 2005a; Hillier et al., 2006].

## Carboanhydrasen

Carboanhydrasen (CA, engl. *carbonic anhydrase*) sind zinkhaltige Metalloenzyme, die die schnelle Umwandlung von Kohlenstoffdioxid in Hydrogencarbonat und Protonen katalysieren. Die Umsetzung wird durch die CA um einen Faktor  $>10^6$  beschleunigt [Lindskog, 1997]. Hydrogencarbonat steht mit gelöstem ( $CO_2$ ) in einem pH-abhängigen Gleichgewicht:



Verschiedene Formen der CA sind in der Natur bekannt. Sie erfüllen vielfältige Aufgaben im Stoffwechsel von Algen und Pflanzenzellen, die mit Carboxylierungs- oder Decarboxylierungsreaktionen verbunden sind, also auch in der Photosynthese und Atmung. Ferner ist bekannt, dass Carboanhydrasen auch am Transport anorganischen Kohlenstoffs zu aktiv Photosynthese betreibenden Zellen beteiligt sind [Henry, 1996].

## Die Carboanhydrase Cah3 in Grünalgen-PSII

Die erste intrazelluläre Carboanhydrase in Algen, Cah3, wurde in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gefunden [Karlsson et al., 1998]. Die Bindung an PSII wurde im darauf folgenden Jahr nachgewiesen [Park et al., 1999]. Es wurde gezeigt, dass sich Cah3 auf der Lumen-Seite der Thylakoidmembranen befindet und in Core-Partikeln im Vergleich zu Membranfragmenten angereichert ist. Des Weiteren wurde eine funktionelle Verbindung zur Donorseite des PSII festgestellt, da sowohl intakte Zellen, Thylakoide als auch PSII-angereicherte Membranfragmente einer *C. reinhardtii*-Mutante *cia3*, der Cah3 fehlt, eine verminderte Fähigkeit der Wasserspaltung zeigen [Villarejo et al., 2002].

### 4.2 Ergebnisse der Messungen

Gemessen wurde an folgenden PSII-Membranpartikelproben, die aus *C. reinhardtii*-Algenkulturen gewonnen wurden:

- Wildtyp, der das Cah3-Protein enthält.
- Cah3-freie Mutante (*cia3*).

Die durchschnittliche Rate der Sauerstoffentwicklung der PSII-Membranfragmente lag bei  $170\text{--}190 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Das Puffermedium bestand aus 50 mM MES-KOH (pH 5,5), 400 mM Sucrose und 35 mM NaCl. Der Puffer wurde von endogenem  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  befreit, indem er ca. 1 h mit  $\text{CO}_2$ -freier Luft gesprudelt wurde. Die  $\text{CO}_2$ -freie Luft wurde erzeugt, indem Luft durch eine Lösung aus 50 % KOH und einer 20 cm dicken Schicht aus *Ascarite* (Korngröße 5-20 Mesh, Sigma-Aldrich), einem  $\text{CO}_2$ -Adsorbenten, geleitet wurde. Der pH-Wert 5,5 liegt bei oder knapp unterhalb des pH-Werts des Thylakoidlumens im Licht und unterhalb des  $\text{pK}_2$ -Werts der Kohlensäure, was die Umwandlung von  $\text{HCO}_3^-$  zu  $\text{CO}_2$  begünstigt [Hager and Holocher, 1994; Shutova et al., 2008].

### Messungen der Sauerstoffrate und Polarographie

Die Sauerstoffentwicklung im stationären Zustand (steady state) wurde unter kontinuierlicher Beleuchtung mit einer Clark-Sauerstoffelektrode gemessen (Abb. 4.1). Es zeigte sich, dass die  $\text{O}_2$ -Rate (jeweils pro Reaktionszentrum) in *cia3*-PSII-Membranfragmenten in  $\text{CO}_2$ -freiem Puffer geringer war als die der WT-Proben. Die Zugabe von 2 mM  $\text{HCO}_3^-$  erhöhte die Rate um durchschnittlich 40 %. Wenn zusätzlich das überexprimierte und aufgereinigte Cah3-Enzym zusammen mit Hydrogencarbonat hinzugefügt wurde, stieg die Rate auf den doppelten Wert und erreichte wieder die  $\text{O}_2$ -Rate des Wildtyps. Mit der Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$  allein, also ohne zusätzliches Cah3, konnte bei keiner der untersuchten Konzentrationen und

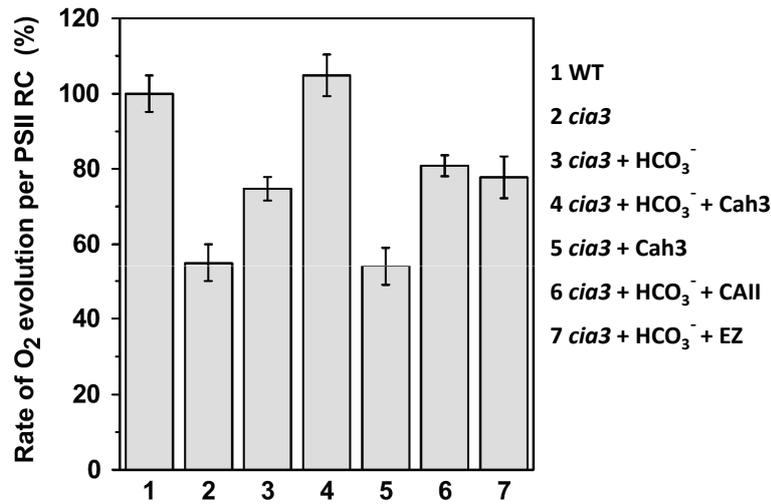


Abb. 4.1: Die Rate der Sauerstoffentwicklung relativ zur WT-Rate und pro PSII-Reaktionszentrum. 1) WT-Zellen, 2) *cia3*-Mutante, 3) *cia3*-Mutante + 2 mM KHCO<sub>3</sub>, 4) *cia3*-Mutante + 2 mM KHCO<sub>3</sub> + 0,1 μM Cah3, 5) *cia3*-Mutante + 0,1 μM Cah3, 6) *cia3*-Mutante + 2 mM KHCO<sub>3</sub> + 0,1 μM CAII (Rinderenzym), 7) *cia3*-Mutante + 2 mM KHCO<sub>3</sub> + 0,1 μM Cah3 + 0,2 μM Ethoxyzolid (EZ). Die Abbildung ist entnommen aus [Shutova et al., 2008].

Messbedingungen (pH, Temperatur, Puffersystem etc.) die volle WT-Rate erreicht werden. Bei Zugabe von Ethoxyzolid (EZ), einem spezifischen CA-Inhibitor, wurde eine vollständige Reaktivierung der Sauerstoffentwicklung in gleichem Maße verhindert wie bei Weglassen des Substrats HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Auch wenn eine alternative CA (CAII), ein Rinderenzym mit hoher Aktivität, hinzugefügt wurde, konnte keine stärkere Steigerung der Sauerstoffentwicklung erreicht werden als es bei HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Zugabe allein der Fall war.

Blitzinduzierte, polarographische Messungen mit einer Clark-Sauerstoffelektrode wurden an der Universität Osnabrück durchgeführt. Für dunkeladaptierte WT-Proben wurde eine „Halb-Anstiegszeit“ (des exponentiellen Anstiegs) der Sauerstofffreisetzung von 1,3 ms nach dem dritten Blitz gemessen, was mit früheren Messungen [Clausen et al., 2004] übereinstimmt. Das Hinzufügen von Cah3 oder HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ergab keine nennenswerte Änderung dieses Wertes. Die Ergebnisse der *cia3*-PSII-Proben sind in Abb. 4.2 dargestellt. Ohne HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> wurde eine wesentlich langsamere Halb-Anstiegszeit von 1,9 ms ermittelt. Die Zugabe von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> beschleunigte den Anstieg um 20 %, die zusätzliche Zugabe von Cah3 ergab eine weitere Beschleunigung. Die Amplituden der gemessenen Kurven waren davon unbeeinflusst, was für eine unveränderte Anzahl aktiver Zentren spricht. Die mathematische Beschreibung der Sauerstofffreisetzungskinetik mit einer einzelnen Anstiegszeit ist allerdings zu vereinfacht dargestellt. Tatsächlich lässt sich das Signal in drei Abschnitte einteilen: 1) eine anfängliche

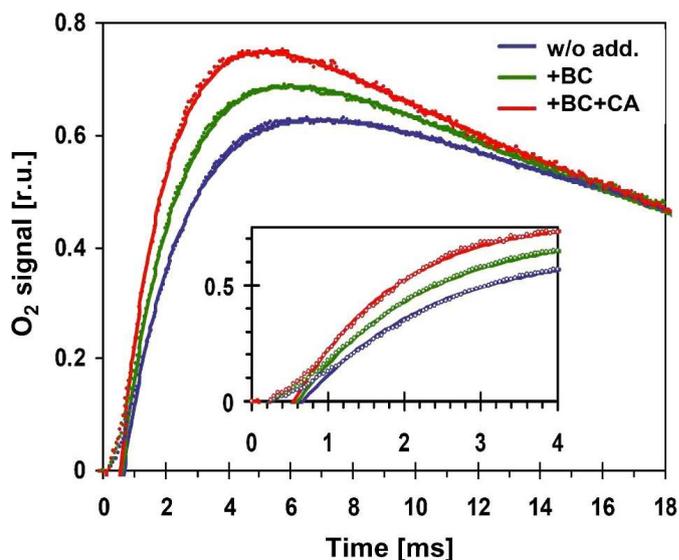


Abb. 4.2: Ergebnisse der blitzinduzierten polarographischen Messungen. Die Einfügung gibt den Anstieg innerhalb der ersten Millisekunden genauer wieder. Dargestellt sind in blau: *cia3*-Mutante im  $\text{HCO}_3^-$ -freien Puffer; grün: *cia3*-Mutante + 1 mM  $\text{KHCO}_3$ ; rot: *cia3*-Mutante + 1 mM  $\text{KHCO}_3$  + 0,7  $\mu\text{M}$  Cah3-Protein. Die durchgezogenen Linien sind durch Simulationen bestimmt worden, genauere Angaben siehe Text. Entnommen aus [Shutova et al., 2008].

Verzögerungsphase ( $t < 600 \mu\text{s}$ ), 2) die (eigentliche) Anstiegszeit der Sauerstofffreisetzung durch PSII und 3) ein Zerfall aufgrund der Sauerstoff-Diffusion innerhalb der Elektrodenzelle. Für die Messungen an der Mutante ohne Zugabe von Cah3 bzw.  $\text{HCO}_3^-$  war eine biexponentielle Beschreibung der Anstiegszeit notwendig. Die langsame Phase trägt dabei zu 10 bis 30 % zum gesamten Anstieg bei. Die Simulationen zeigten u. a., dass die schnellere der beiden Phasen unabhängig von der  $\text{HCO}_3^-$ /Cah3-Zugabe ist und im Wesentlichen mit den ermittelten Konstanten der Messungen der verzögerten Fluoreszenz übereinstimmt. Daher lässt sich die beschleunigte  $\text{O}_2$ -Freisetzung bei  $\text{HCO}_3^-$ /Cah3-Zugabe hauptsächlich mit einem geringeren Beitrag der langsamen Phase erklären.

## Einfluss auf die Akzeptorseite

Wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, bindet Hydrogencarbonat an das Non-Häm-Eisen auf der PSII-Akzeptorseite [Ferreira et al., 2004; Loll et al., 2005]. Um zu klären, ob der stimulierende Effekt von  $\text{HCO}_3^-$  auf die Sauerstoffrate in den Cah3-freien Mutanten von der Akzeptorseite stammt, wurden blitzinduzierte Messungen der Quantenausbeute der prompten Fluoreszenz durchgeführt (siehe Abb. 4.3).

Sowohl in der CA-freien Mutante als auch im Wildtyp führt die Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$  in das

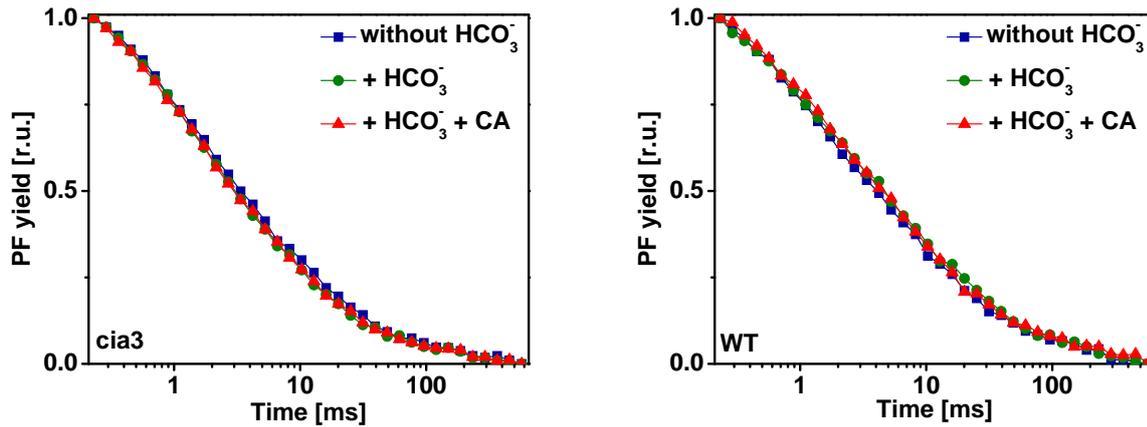


Abb. 4.3: Dargestellt ist die mit der prompten Fluoreszenz gemessene  $Q_A^-$ -Reoxidation nach dem dritten Blitz, links für die *cia3*-Mutante und rechts für den WT. Die Kurven im Einzelnen sind dabei: Blau:  $\text{HCO}_3^-$ -freier Puffer; Grün: Zugabe von 1 mM  $\text{HCO}_3^-$ ; Rot: Zugabe von 1 mM  $\text{HCO}_3^- + \text{Cah3}$ . Zwischen den einzelnen Messungen ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

vorher  $\text{HCO}_3^-$ -befreite Puffermedium zu keiner signifikanten Auswirkung auf den Elektronentransfer  $Q_A \rightarrow Q_B$  der Akzeptorseite. Ebenso hat auch die Zugabe der Carboanhydrase in beiden Fällen keinen Einfluss auf die Kinetik. Dies deutet stark daraufhin, dass der beschriebene *Cah3*-/ $\text{HCO}_3^-$ -Effekt nicht mit Änderungen an der Akzeptorseite der *Cah3*-freien Mutanten verbunden ist. In den Abbildungen sind jeweils die Fluoreszenzzerfälle nach dem dritten Blitz dunkeladaptierter Proben dargestellt, aber auch nach allen anderen Blitzen einer Blitzsequenz sind keine Unterschiede zu erkennen.

Um den in Abschnitt 4.1 beschriebenen Einfluss auf die PSII-Akzeptorseite zu beobachten, muss auch das gebundene  $\text{HCO}_3^-$  durch Formiatzugabe entfernt werden. Eine einfache  $\text{HCO}_3^-$ -Entfernung in der Pufferlösung scheint unzureichend sein, um das an das Non-Häm-Eisen gebundene  $\text{HCO}_3^-$  zu entfernen.

## Einfluss auf die Donorseite

Die beschleunigende Wirkung der Carboanhydrase *Cah3* auf die Reaktion



ist bekannt (siehe 4.1). Daher ist auch vorstellbar, dass *Cah3* die Protonenfreisetzung an der PSII-Donorseite und damit die Wasseroxidation erleichtert. Dies wäre mit den Ergebnissen der Sauerstoffentwicklungs- (Abb. 4.1) und den Polarographiemessungen (Abb. 4.2) im Einklang. Die Hypothese ist dabei, dass  $\text{HCO}_3^-$  die Protonenfreisetzung aus der Umgebung des Mangankomplexes beschleunigt. Dies ist unerlässlich für die Energetik der Wasseroxidation [Dau and Haumann, 2007, 2008; Dau and Zaharieva, 2009].

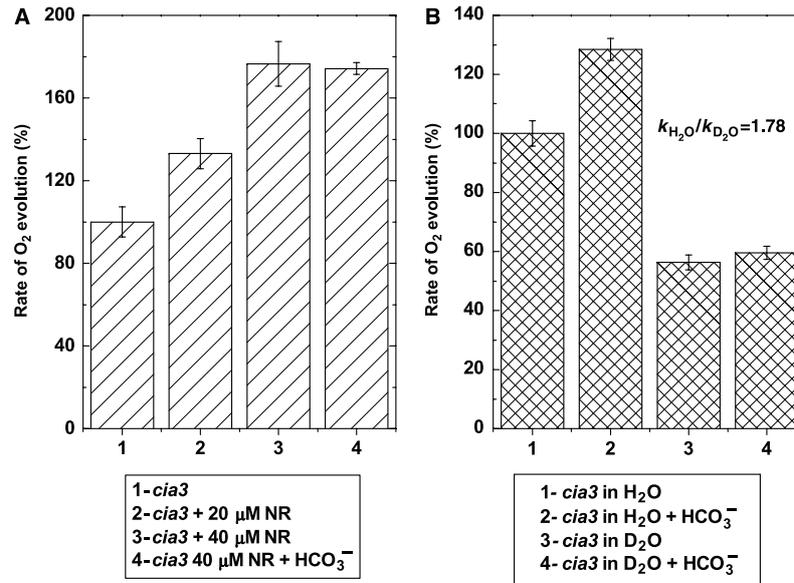


Abb. 4.4: Messung der Sauerstoff-Rate mit einer Clark-Sauerstoffelektrode. A: Messungen mit dem künstlichen Protonendonator/-akzeptor Neutralrot. B: Isotopen-Austauschexperimente. Die Abbildungen sind entnommen aus [Shutova et al., 2008].

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der amphiphile pH-Indikator Neutralrot (NR) eingesetzt, der sowohl ein effizienter Protonendonator als auch Protonenakzeptor ist [Auslander and Junge, 1975; Junge et al., 2002]. Wie in Abb. 4.4A ersichtlich ist, wurde die Sauerstoffentwicklung durch diesen Farbstoff deutlich stimuliert: Durch Zugabe von 20 μM NR erhöhte sich die Sauerstoffentwicklungsrate von *cia3* entsprechend einer Zugabe von 2 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Verdoppelt man die zugegebene NR-Konzentrationen auf 40 μM, entspricht dies einer gleichzeitigen Zugabe von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und Cah3. War die optimale NR-Konzentration erreicht, ergab eine weitere Zugabe von 2 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> keine weitere Erhöhung der O<sub>2</sub>-Rate, bei NR-Konzentrationen über 50 μM verringerte sie sich sogar wieder. In WT-PSII ergab die NR-Zugabe keinen signifikanten Anstieg der O<sub>2</sub>-Rate.

NR stellt also auf effektive Weise die Wasseroxidation im Cah3-freien PSII wieder her, andere Puffer mit passendem pK<sub>a</sub> hatten diese Eigenschaft nicht. Im Gegensatz zu diesen Puffern hat NR die Eigenschaft, dass es sich entlang der Membranoberfläche ausrichtet und die Protonen direkt von den Donoren aufnimmt anstatt aus der sog. *Bulk-Phase* (umgebende Volumenphase) des Lumens [Shutova et al., 2008].

Einen weiteren unabhängigen Anhaltspunkt, der für eine Protonenlimitierung in der *cia3*-Mutante spricht, lieferten Isotopen-Austauschexperimente (Abb. 4.4B), wenn also austauschbare Protonen durch Deuteronen ersetzt wurden. Der kinetische Isotopeneffekt ( $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$ ) auf die Sauerstoffrate beträgt in der Mutante 1,78, im WT nur 1,15. Im kohlenstofffreien Medium und bei fehlender Cah3-Aktivität wird die Rate der Wasseroxidation vermutlich durch

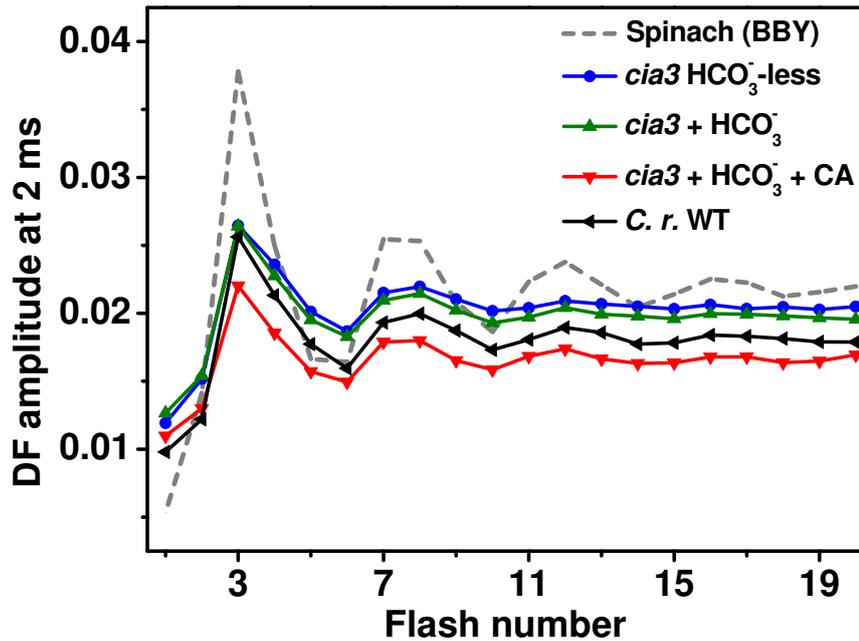


Abb. 4.5: Vergleich der aus der verzögerten Fluoreszenz ermittelten Sauerstoffmuster. Dargestellt werden die ms-Amplituden der verzögerten Fluoreszenz in Abhängigkeit der Blitzanzahl.

einen Prozess limitiert, der mit der Umlagerung von Protonen verknüpft ist. Während die O<sub>2</sub>-Rate bei Verwendung von H<sub>2</sub>O-Puffer um 37% erhöht wurde, ergab die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Zugabe im D<sub>2</sub>O-basierten Puffer nur einen unwesentlichen Anstieg.

Um den HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Einfluss auf die Rate des Protonentransfers vom Mangankomplex ins umgebende Medium des Lumens noch genauer zu untersuchen, wurden Messungen der verzögerten Fluoreszenz (siehe 2.3) durchgeführt: Die Abbildung 4.5 zeigt zunächst die gemessenen Blitzmuster der ms-Amplitude der verzögerten Fluoreszenz für den Wildtyp und die *cia3*-Mutante. Zum Vergleich ist in grau eine Messung an PSII-Membranpartikeln aus Spinat eingezeichnet. Es ist zu erkennen, dass der nach dem ersten Blitz gemessene Offset in den *C. reinhardtii*-Proben im Vergleich zum Spinat erhöht ist, was auf eine relativ hohe Anzahl inaktiver Reaktionszentren hindeutet. Diese PSII-Zentren nehmen nicht an den Vierer-Oszillationen teil und beeinträchtigen daher das eigentliche Blitzmuster nicht. Eine Veränderung des Blitzmusters durch Zugabe von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CA ist nicht zu erkennen, ebenso gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen der *cia3*-Mutante und dem Wildtyp. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die WT- und *cia3*-Präparationen von etwa gleicher Qualität sind und die Sauerstoffentwicklung selbst vermutlich nicht von der Hydrogencarbonatzugabe betroffen ist.

In den Fluoreszenzzerfällen nach den ersten drei Blitzen in Abb. 4.7 sind dagegen deutliche Unterschiede zu erkennen. Die Zugabe von Hydrogencarbonat beschleunigt die Zerfälle

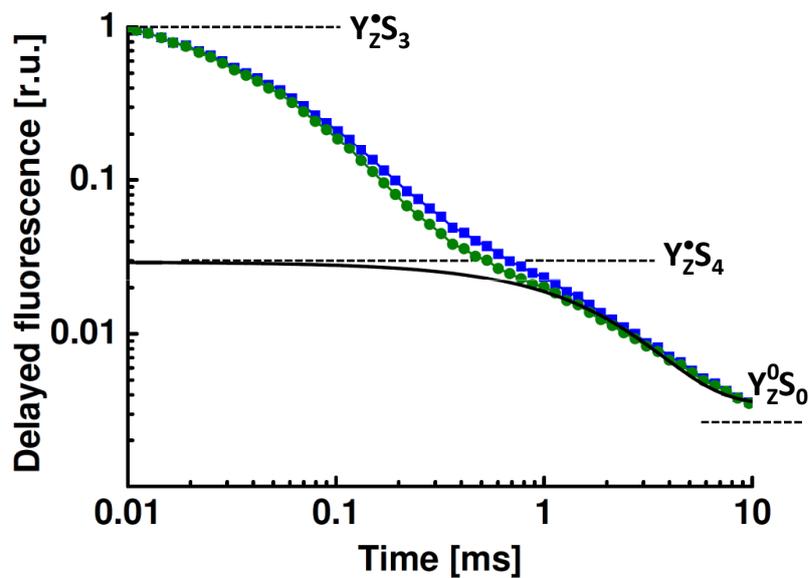


Abb. 4.6: Zerfall der verzögerten Fluoreszenz nach dem dritten Blitz. Blau:  $HCO_3^-$ -freier Puffer, grün:  $+2\text{ mM } HCO_3^-$ . Die durchgezogene Linie gibt die Simulation der langsamsten Phase (Sauerstoffphase) an.

der verzögerten Fluoreszenz nach den Blitzen zwei und drei, während nach dem ersten Blitz kein Unterschied besteht.

Betrachtet man in Abb. 4.6 den Zeitverlauf der verzögerten Fluoreszenz nach dem dritten Blitz (siehe Abschnitt 1.3) in der doppellogarithmischen Darstellung im Detail, ist zu erkennen, dass die Protonenfreisetzung im  $S_3 \rightarrow S_4$ -Übergang in der Cah3-freien Mutanten deutlich beschleunigt wird, wenn  $HCO_3^-$  hinzugefügt wurde. Der darauffolgende  $S_4 \rightarrow S_0$ -Übergang (Sauerstoffphase) ist davon unbeeinflusst. Im WT sind für den gesamten Zeitverlauf keine Unterschiede zu erkennen.

Die Simulationsergebnisse der Kurvenanpassungen werden in den Tabellen 4.1 und 4.2 gezeigt. Ein deutlicher Unterschied konnte wie zu erwarten für die Zeitkonstante  $\tau_2$  festgestellt werden.  $\tau_2$  verringert sich bei  $HCO_3^-$ -Zugabe von  $(198 \pm 37)\mu\text{s}$  auf  $(146 \pm 18)\mu\text{s}$ , was einer Beschleunigung des Prozesses um ca. 25 % entspricht. Die  $HCO_3^-$ -Hinzugabe hat keinen Einfluss auf die Zeitkonstante der Sauerstoffentwicklung,  $\tau_3$ . Sie bleibt bei einem konstanten Wert von ungefähr 1,9 ms in der Mutanten bzw. 1,5 ms im Wildtyp.

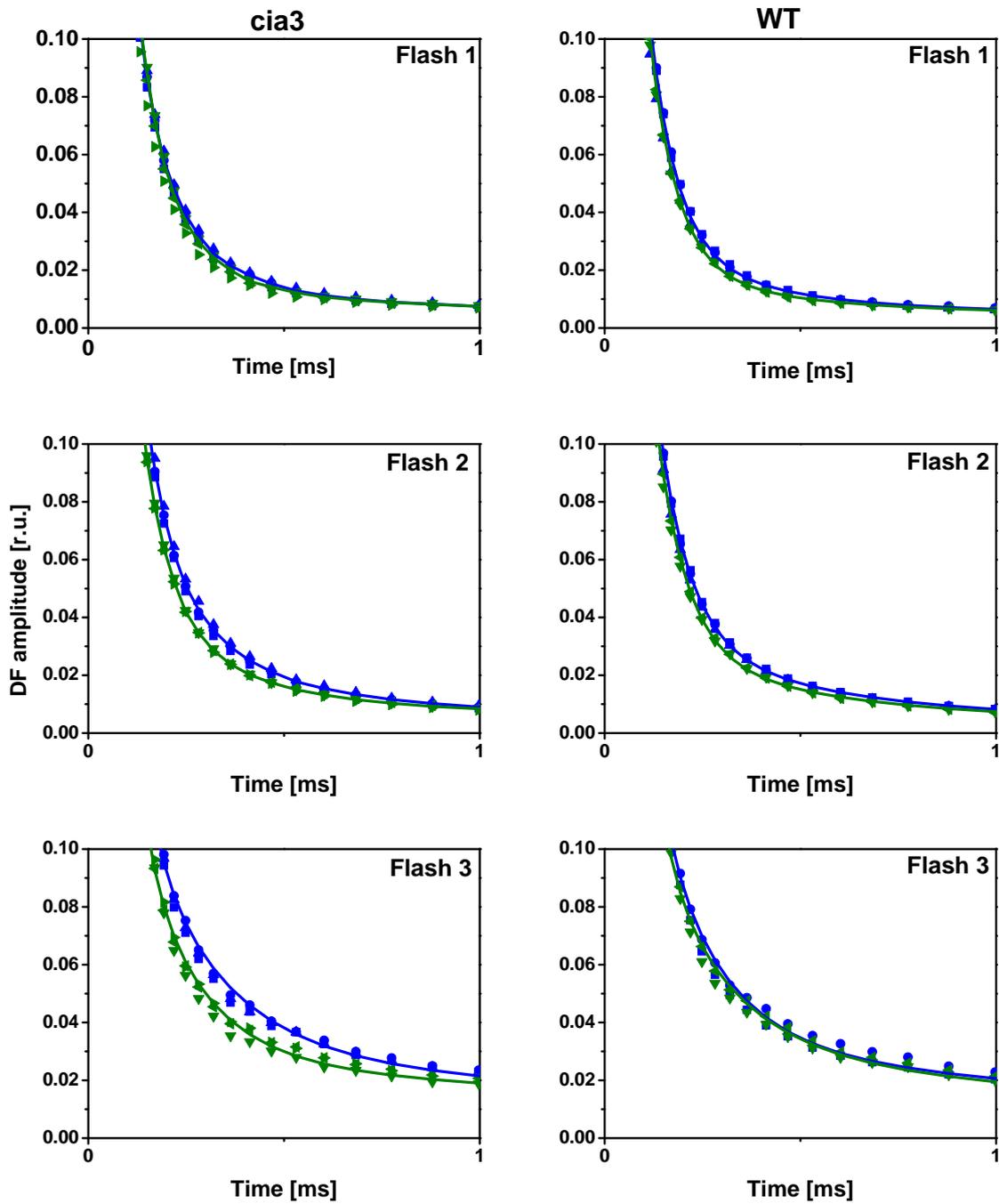


Abb. 4.7: Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz nach Blitz 1, Blitz 2 und Blitz 3 an dunkeladaptierten PSII-Proben. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur und einem pH-Wert 6,2 durchgeführt. In blau sind die Ergebnisse mit  $\text{HCO}_3^-$ -freiem Puffer, in grün die Ergebnisse nach Zugabe von 2 mM  $\text{HCO}_3^-$  dargestellt. Die linke Spalte zeigt die Messungen an der CA-freien Mutante, die rechte Spalte die Messungen am Wildtyp. Die Symbole entsprechen jeweils Ergebnissen einzelner Messungen, die durchgezogenen Linien zeigen die simulierten Kurven des jeweiligen Mittelwerts.

	ohne HC	HC	HC + CA
$A_1$	$0,92 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,02$	$0,94 \pm 0,02$
$A_2$	$0,17 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,04$
$A_3$	$0,029 \pm 0,002$	$0,026 \pm 0,002$	$0,023 \pm 0,004$
$y_0$	$3,5 \cdot 10^{-3} \pm 6,0 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-3} \pm 2,5 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-3} \pm 1,2 \cdot 10^{-4}$
$\tau_1$ [ $\mu\text{s}$ ]	$40 \pm 4$	$36 \pm 2$	$37 \pm 3$
$\tau_2$ [ $\mu\text{s}$ ]	$198 \pm 37$	$146 \pm 18$	$144 \pm 22$
$\tau_{S3-S4}$ [ $\mu\text{s}$ ]	$63 \pm 2$	$54 \pm 1$	$54 \pm 3$
$\tau_{S4-S0}$ [ms]	$1,90 \pm 0,06$	$1,89 \pm 0,11$	$1,88 \pm 0,14$
$\Delta G$ [meV]	$-90,5 \pm 1,9$	$-93,9 \pm 1,8$	$-97,3 \pm 3,8$

Tab. 4.1: Fit-Ergebnisse zu den DF-Zeitverläufen aus Abb. 4.7 für die *cia3*-Mutante der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Blitz 3, Summe aus drei Exponentialfunktionen).

	ohne HC	HC	HC + CA
$A_1$	$0,93 \pm 0,01$	$0,95 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,01$
$A_2$	$0,19 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,02$
$A_3$	$0,033 \pm 0,004$	$0,029 \pm 0,003$	$0,027 \pm 0,005$
$y_0$	$3,2 \cdot 10^{-3} \pm 1,8 \cdot 10^{-4}$	$2,9 \cdot 10^{-3} \pm 3,5 \cdot 10^{-4}$	$2,9 \cdot 10^{-3} \pm 9,2 \cdot 10^{-5}$
$\tau_1$ [ $\mu\text{s}$ ]	$35 \pm 2$	$35 \pm 6$	$36 \pm 1$
$\tau_2$ [ $\mu\text{s}$ ]	$157 \pm 1$	$155 \pm 53$	$145 \pm 7$
$\tau_{S3-S4}$ [ $\mu\text{s}$ ]	$55 \pm 1$	$53 \pm 6$	$53 \pm 1$
$\tau_{S4-S0}$ [ms]	$1,52 \pm 0,06$	$1,54 \pm 0,01$	$1,54 \pm 0,02$
$\Delta G$ [meV]	$-89,1 \pm 3,1$	$-92,5 \pm 3,5$	$-93,7 \pm 4,0$

Tab. 4.2: Fit-Ergebnisse zu den DF-Zeitverläufen aus Abb. 4.7 für den Wildtyp der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Blitz 3, Summe aus drei Exponentialfunktionen).

### 4.3 Schlussfolgerungen

Ein stimulierender Effekt auf die Sauerstoffentwicklung wurde durch die Hinzugabe von  $\text{HCO}_3^-$ , Cah3 oder beiden Substanzen zusammen erreicht, sowohl unter kontinuierlichem Licht als auch nach Anregung mit kurzen Lichtblitzen. Die Stimulierung nach der Beblitzung fiel dabei geringer aus, was dadurch erklärt werden kann, dass die unter kontinuierlichem Licht erzeugten Protonen zu einer Sättigung der Protonenakzeptoren führen. Wenn diese nur einer kleinen Anzahl von kurzen Blitzen ausgesetzt werden, findet die Sättigung nicht statt und verringert daher den stimulierenden Effekt durch  $\text{HCO}_3^-$  und Cah3.

Bei jedem Durchlauf des Wasseroxidationszyklus werden vier Protonen des Mangankomplexes in die Volumenphase (*Bulk-Phase*) des Lumens übertragen. Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse haben gemeinsam, dass die eine durch  $\text{HCO}_3^-$  begünstigte, effizientere Protonenfreisetzung nahelegen. Dies gilt für jeden der vier Protonenfreisetzungsschritte, allerdings nicht die Erzeugung der Protonen selbst am katalytischen Zentrum.

Die Abbildung 4.8 stellt die mögliche Abfolge der nach dem dritten Blitz ablaufenden Ereignisse des  $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$ -Übergangs bildlich dar. Anhand des Schemas wird im Folgenden der Einfluss von  $\text{HCO}_3^-$  auf die Sauerstoffbildung in der Cah3-freien Mutanten diskutiert:

1. Der  $\text{Y}_Z^{\bullet+}$ -Bildung folgt die Herauslösung eines Proton, die durch  $\text{HCO}_3^-$  um ca. 50  $\mu\text{s}$  beschleunigt wird, was die Ergebnisse der Rekombinationsfluoreszenz- und Polarographiemessungen andeuten (Beitrag zur Verzögerung vor dem  $\text{O}_2$ -Anstieg,  $T_{\text{lag}1}$ ).
2. Der Elektronentransfer  $\text{Mn} \rightarrow \text{Y}_Z^{\bullet+}$  bleibt jedoch von der  $\text{HCO}_3^-$ -Zugabe unbeeinflusst ( $T_{\text{ox}}^{\text{main}} \approx 1.9 \pm 0.1 \text{ ms}$ ).
3. Die darauffolgende Sauerstoffbildung ist schneller als der vorhergehende Elektronentransfer ( $k_{\text{ET}} \ll k_{\text{O}=\text{O}}$ ) und ist daher in einer kinetischen Studie nicht direkt messbar.
4. Der Sauerstoffbildung folgt die Sauerstofffreisetzung. Bei diesem Schritt wird angenommen, dass er reversibel ist [Clausen and Junge, 2004], so dass ein beträchtlicher Anteil des Sauerstoffs gebunden bleibt. Die Sauerstofffreisetzung könnte ebenfalls zur Verzögerungsphase im  $\text{O}_2$ -Signal ( $T_{\text{lag}2}$ ) beitragen [Clausen et al., 2004].
5. Der abschließende Schritt in Abb. 4.8 ist mit einer Protonenfreisetzung verknüpft, die in der Abwesenheit von  $\text{HCO}_3^-$  langsamer als die  $\text{Y}_Z^{\bullet+}$ -Reduktion und Sauerstoffbildung ist ( $k_{\text{DP}2} < k_{\text{ET}}$ ). Dies erklärt die biphasische Sauerstofffreisetzung der zeitaufgelösten polarographischen Messungen, da die langsame Protonenfreisetzung in Verbindung mit der reversiblen Sauerstofffreisetzung einen Beitrag der langsamen Phase zum  $\text{O}_2$ -Signal ( $T_{\text{ox}}^{\text{slow}}$ ) impliziert. Wird der Mutanten  $\text{HCO}_3^-$  und Cah3 hinzugefügt, beschleunigt sich

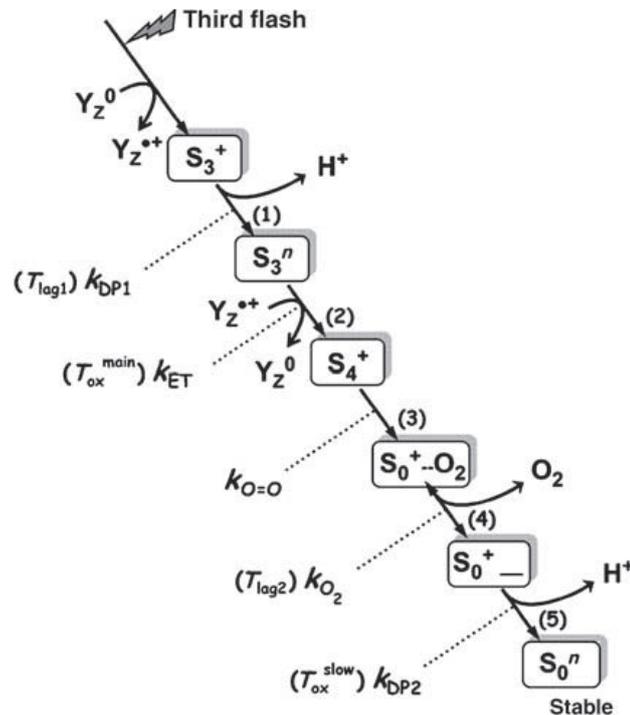


Abb. 4.8: Vorgeschlagene Sequenz von Ereignissen, die durch den dritten Blitz hervorgerufen wird. Nach der  $Y_Z$ -Oxidation wird zuerst ein Proton aus dem Mangankomplex entfernt (Schritt 1), gefolgt von einem Elektronentransfer  $Mn \rightarrow Y_Z^+$  (Schritt 2). Der letzte ET-Schritt ist kinetisch nicht von der Sauerstoffbildung und der damit verbundenen Reduktion des Mangankomplexes zu unterscheiden (Schritt 3). Die darauffolgende Sauerstofffreisetzung (Schritt 4) ist vermutlich reversibel. Schließlich wird ein zweites Proton freigesetzt (Schritt 5). Eine ausführlichere Beschreibung der Sequenz befindet sich im Text. Die Abbildung ist aus [Shutova et al., 2008] entnommen.

der letzte Protonenfreisetzungsschritt ( $k_{DP2} > k_{ET}$ ) und wird schneller als die  $Y_Z^{\bullet+}$ -Reduktion/Sauerstoffbildung und damit unsichtbar im  $O_2$ -Signal.

Bislang ist *Chlamydomonas reinhardtii* der einzige Organismus, bei dem man eine zugehörige Carboanhydrase finden konnte. Zwar wurde auch in höheren Pflanzen eine CA-Aktivität festgestellt [Moubarak-Milad and Stemler, 1994; Clausen et al., 2005a; Hillier et al., 2006; McConnell et al., 2007], jedoch konnte bei keinem der Enzyme eine Verbindung zum PSII festgestellt werden. Auch in den bisher untersuchten Cyanobakterien konnte keine PSII-assoziierte CA gefunden werden.  $HCO_3^-$  ist aber auch in den cyanobakteriellen PSII für die Donorseitenfunktion notwendig [Carrieri et al., 2007], wird dort aber durch aktiven  $HCO_3^-$ -Transport bereitgestellt. Vermutlich wurden von den jeweiligen Organismen verschiedene Strategien entwickelt, um die  $HCO_3^-$ -Konzentration im PSII ausreichend hoch zu halten. Abgesehen von der weiterhin offenen Frage, ob in höheren Pflanzen eine zu Cah3 homologe CA vorhanden sein könnte, beziehen sich die Ergebnisse dieses Kapitels auf Fragen, die

von allgemeiner Wichtigkeit für die photosynthetische Wasseroxidation sind. Sauerstoff und Protonen sind Reaktionsprodukte der Wasseroxidation an der PSII-Donorseite und es wurde nachgewiesen, dass der Schritt der Sauerstofffreisetzung kritisch für die Energetik und damit die Effizienz der photosynthetischen Wasseroxidation sein könnte [Clausen and Junge, 2004]. Die hier vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass die Freisetzung der Protonen vom Mangankomplex ein Prozess ist, der die photosynthetische Sauerstoffbildung limitieren könnte, zumindest bei kontinuierlichem und sättigendem Licht bei einem pH-Wert von 5,5 im Lumen. Das mit dem PSII verbundene CA/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-System unterdrückt diese Limitierung vermutlich nicht vollständig, aber kann sie reduzieren.

Des Weiteren unterstützen die Ergebnisse die Überlegungen [Dau and Haumann, 2007, 2008] zu der entscheidenden Rolle der verschiedenen Protonenfreisetzungsschritte für die Energetik und den Mechanismus der photosynthetischen Wasseroxidation [Krishtalik, 1986]. Die hier beschriebenen Untersuchungen verstärken eine jüngere Entwicklung bei der Diskussion der photosynthetischen Wasseroxidation speziell sowie bei biologischen Redoxprozessen generell, bei der sich eine Verschiebung des Fokus von der Betrachtung des Elektronentransferschritts hin zur Analyse der Kopplung zwischen Protonen- und Elektronenverlagerungen ergeben hat.



---

## Bindung des Herbizids Terbutryn an cyanobakterielles Photosystem II

---

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zu den Messungen mit verschiedenen Herbiziden vorgestellt, die in Zusammenarbeit mit der AG Zouni von der Technische Universität Berlin (Proben, Kristallisation) sowie der AG Saenger von der FU Berlin (Röntgenstrukturuntersuchungen) entstanden sind. In diesem Zusammenhang konnte die erste Kristallstruktur des Core-Komplexes des Cyanobakteriums *Thermosynechococcus elongatus* mit einem gebundenen Herbizid bei einer Auflösung von  $3,2 \text{ \AA}$  im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht werden [Broser et al., 2011]. Weitere Ergebnisse der Zusammenarbeit sind in der Dissertation von Matthias Broser [Broser, 2010] und der Diplomarbeit von Carina Glöckner [Glöckner, 2009] (beide TU Berlin) veröffentlicht.

### 5.1 Messungen mit Inhibitoren

Herbizide spielen als Pflanzenschutzmittel eine wichtige Rolle in der Landwirtschaft. Ihre Wirkung kann an verschiedenen Stellen ansetzen: der Biosynthese von Aminosäuren, Chlorophyllen, Carotenoiden und Plastochinon [Oettmeier, 1999]. Die in diesem Kapitel besprochenen Herbizide haben gemeinsam, dass sie den Elektronentransfer von  $Q_A$  zum terminalen Akzeptorchinon an der  $Q_B$ -Seite blockieren, indem sie mit dem natürlich vorkommenden Plastochinon um die Bindungsstelle konkurrieren. Da sie dabei eine höhere Bindungsaffinität besitzen, folgt aus der Verdrängung des Plastochinons die Unterbrechung des linearen Elektronenflusses im PSII. Die Pflanze stirbt in diesem Fall ab.

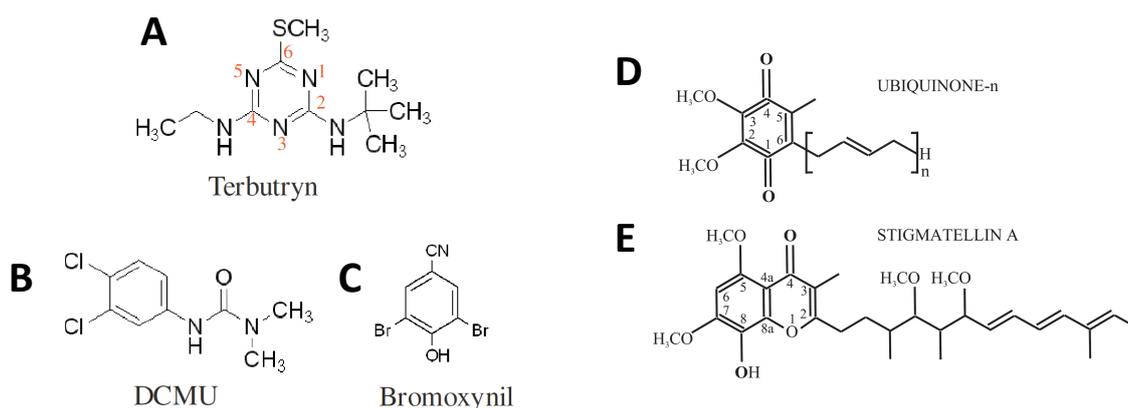


Abb. 5.1: Schematische Strukturen von Herbiziden (A-C) und nativen Elektronenakzeptoren (D, E), die die Elektronentransferkette an der PSII-Akzeptorseite unterbrechen. Jedes der Moleküle gehört einer der verschiedenen Klasse an. A: Terbutryn (Triazine) B: DCMU (Urea) C: Bromoxynil (Phenolderivat). D: Ubichinon. E: Stigmatellin (Antibiotikum). Entnommen aus [Broser, 2010] und [Gerencser et al., 2004]

Die Bindung von Herbiziden an PSII wird seit mehreren Jahrzehnten mit einer Vielzahl an Methoden untersucht. In einer Studie an den Core-Komplexen von *Thermosynechococcus elongatus* wurde der Einfluss verschiedener Herbizide mit Isothermischer Titrationskalometrie (ITC), zirkulärer Dichroismusspektroskopie und Messungen der Sauerstoffentwicklung bestimmt [Zimmermann et al., 2006].

Die am häufigsten untersuchten PSII-Inhibitoren sind Urea (z. B. DCMU), Triazine (z. B. Terbutryn) und Phenolderivate (z. B. Bromoxynil) [Trebst, 1980; Rutherford et al., 1982; Ginet and Lavergne, 2008]. Ihre Strukturen sind schematisch in Abb. 5.1 A-C dargestellt. Triazinderivate blockieren auch den Elektronentransfer in den photosynthetischen Reaktionszentren von Purpurbakterien, die als ein Modellsystem für die Herbizidbindung an PSII-Reaktionszentren dienen.

Neben der inhibitorischen Wirkung zeigen Herbizide einen weiteren Effekt: Je nach Art des gebundenen Herbizids ändert sich das Redoxpotential von  $Q_A$  zu niedrigeren (Bromoxynil) bzw. zu höheren Werten (DCMU) [Krieger-Liszkay and Rutherford, 1998; Rutherford and Krieger-Liszkay, 2001]. Diese Verschiebungen des Redoxpotenzials könnten durch eine durch Herbizide veränderte Wasserstoffbindung der Chinon-Kopfgruppe am  $Q_A$  herbeigeführt werden, wie FTIR-Messungen und theoretische Berechnungen vermuten lassen [Takano et al., 2008]. Ein weiterer Unterschied zwischen den Herbizidklassen besteht in Bezug auf ihre Bindungsparameter. Phenolische Herbizide binden endothermisch an PSII und destabilisieren es, während Triazine und urea-artige Herbizide eine negative Bindungsenthalpie aufweisen

und den Komplex stabilisieren. Aus diesem Grund eignen sich die letzteren besser für die Kristallisation der PSII-Proben.

Neben den bislang angesprochenen Herbiziden zeigt auch das aus den Myxobakterien *Stigmatella aurantiaca* gewonnene Antibiotikum Stigmatellin (siehe Abb. 5.1E) einen inhibierenden Einfluss auf den  $Q_A \rightarrow Q_B$ -Übergang [Oettmeier et al., 1985].

## Methodik zur Bestimmung der Bindungskurven

Die im Folgenden vorgestellten Bindungskurven für die untersuchten Inhibitoren wurden mit Hilfe von prompten und verzögerten Fluoreszenz-Messungen bestimmt.

Während der schnellen Phase der prompten Fluoreszenz (siehe Abschnitt 1.3) findet in Kontrollproben der  $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronenübergang statt. Da diese Phase bei Blockierung der  $Q_B$ -Bindungsstelle durch einen Inhibitor verschwindet, ist sie ein besonders anschaulicher Parameter, um Bindungskurven zu bestimmen.

Die Amplitude der schnellen Phase  $A_{\text{fast}}$  wurde folgendermaßen aus den Zeitverläufen der prompten Fluoreszenz nach Blitz 1 bestimmt:

$$A_{\text{fast}} = \frac{F_M - F_{7,2}}{F_M - F_{700}} \quad (5.1)$$

$F_M$ ,  $F_{7,2}$  bzw.  $F_{700}$  geben jeweils den Fluoreszenzpegel am Maximum, nach 7,2 ms (Beendigung der schnellen Phase) bzw. nach ca. 700 ms (maximale Reoxidation) an. In Kontrollproben findet ca. 80 % der gesamten  $Q_A$ -Reoxidation innerhalb dieses Zeitintervalls statt.

Der Einfluss des Herbizids lässt sich auch auf der PSII-Donorseite erkennen und anhand von Messungen der verzögerten Fluoreszenz bestimmen. Zum einen wirkt sich das Herbizid auf die Qualität des Sauerstoff-Blitzmusters aus, das bei hohen Konzentrationen fast vollständig verschwindet. Zum anderen verringert sich auch die Amplitude der verzögerten Fluoreszenz in dem Zeitbereich, in dem der  $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronenübergang stattfindet (bei ca. 200  $\mu\text{s}$ ).

Die jeweils ermittelten Bindungskurven wurden mit der in Abschnitt 2.19 vorgestellten Hill-Gleichung angepasst und daraus die Bindungskonstante ermittelt. Die angegebenen Fehlerbereiche wurden ebenfalls aus diesem Fit ermittelt.

## 5.2 Bestimmung des optimalen pH-Bereichs

Vor den herbizidabhängigen Untersuchungen sollte der optimale pH-Bereich für die Messungen an den Core-Komplexen von *Thermosynechococcus elongatus* (Dimer- und Monomerproben) bestimmt werden.

Der optimale pH-Bereich für Untersuchungen an PSII-Membranpartikeln aus Spinat wurde anhand der Wahl eines möglichst geringen Miss-Parameters (siehe Abschnitt 1.2) vorgenommen [Grabolle, 2005]. Das anhand der verzögerten Fluoreszenz gemessene Blitzmuster reflektiert das Sauerstoff-Blitzmuster, ist aber nicht identisch. Dies wird insbesondere dadurch deutlich, dass die DF-Amplituden aufgrund der Protonenfreisetzung im  $S_3 \rightarrow S_4$ -Übergang bei fallendem pH-Wert ansteigen.

Da bei den nachfolgend vorgestellten Messungen auf einen künstlichen Elektronenakzeptor verzichtet werden sollte, um mögliche Wechselwirkungen zwischen Elektronenakzeptor und dem jeweiligen Inhibitor zu vermeiden, hat dies zur Folge, dass das anhand der verzögerten Fluoreszenz ermittelte Sauerstoff-Blitzmuster bereits nach einer geringen Anzahl an Blitzen abbricht. Eine zuverlässige Bestimmung des Miss-Parameters ist damit nicht möglich. Als Alternative wurden andere Parameter des Sauerstoff-Blitzmusters gewählt, die ebenfalls die Güte der Sauerstoffmuster beschreiben sollen:

- Der Wert der Millisekunden-Amplitude nach Blitz 3 (maximale Sauerstofferzeugung im  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang) soll möglichst hoch und ihr Wert nach Blitz 6 ( $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang) möglichst gering sein. Daher wird für die Differenz aus beiden Werten gefordert, dass sie möglichst groß ist.
- Die Differenz der Millisekunden-Amplituden nach den Blitzen 2 und 6, wenn sich die Reaktionszentren jeweils im  $S_2$ -Zustand befinden, sollte möglichst gering sein. Ein hoher Miss-Parameter wirkt sich auf die Dämpfung aus.

Beide Kriterien wurden kombiniert, indem der Quotient aus den Differenzen gebildet und somit die Qualität  $q$  des Blitzmusters bestimmt wurde:

$$q = \frac{\text{Blitz 3} - \text{Blitz 6}}{\text{Blitz 6} - \text{Blitz 2}} \quad (5.2)$$

Als weitere Forderung wäre bspw. eine möglichst große Differenz zwischen den Werten nach Blitz 6 und Blitz 7 in Betracht gekommen, wenn zum zweiten Mal das Maximum der Sauerstoffentwicklung erreicht wird. Für die pH-Werte zwischen 5,5 und 7,5 wurde MES (pK 6,15) als Puffersubstanz verwendet; für die pH-Werte 6 und unterhalb davon zusätzlich ein Citrat-Puffer. In der Abbildung 5.2 sind in der oberen Hälfte die Sauerstoffmuster für die

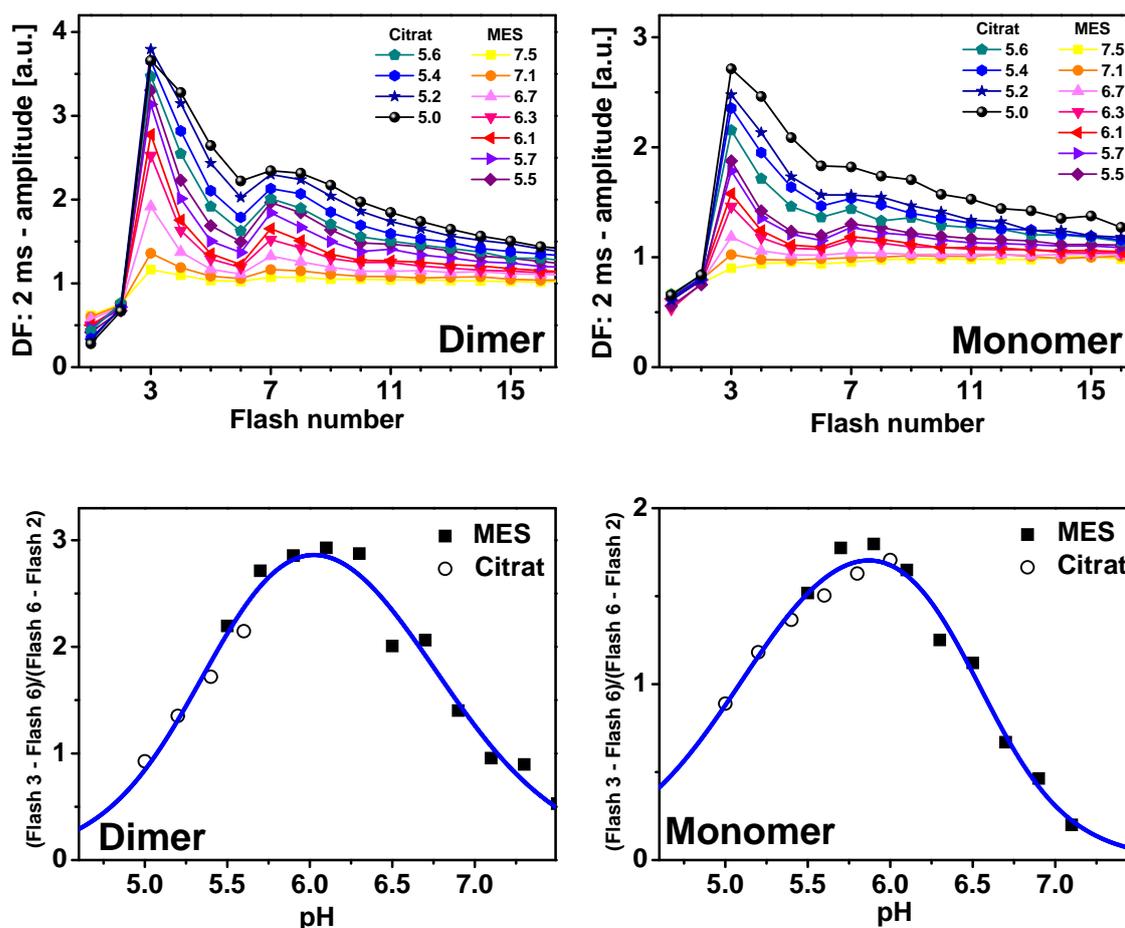


Abb. 5.2: Core-Partikel von *Thermosynechococcus elongatus* bei verschiedenen pH-Werten. Oben: Die Blitzmuster der DF-Amplitude bei 2 ms für verschiedene pH-Werte (PSII-Dimere links; PSII-Monomere rechts). Unten: Abhängigkeit des Gütekriteriums  $q$  (Gleichung 5.2) vom pH-Wert für die Dimere (links) und die Monomere (rechts). Der pH-Wert wurde entweder in einem Citratpuffer oder in einem MES-Puffer auf die jeweils angegebenen Werte eingestellt. Die Fitkurven wurden jeweils aus einer Kombination aus zwei Henderson-Hasselbalch-Kurven bestimmt. Dabei wurden folgende  $pK$ -Werte ermittelt, in Klammern befinden sich die zugehörigen Amplituden: Dimer ( $pK_1$ : 5,4 (2,1);  $pK_2$ : 6,7 (1,9)) und Monomer ( $pK_1$ : 5,1 (1,5);  $pK_2$ : 6,5 (1,5)).

Dimer- (links) und die Monomerproben (rechts) bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Die untere Hälfte zeigt die Abhängigkeit des Güteparameters  $q$  vom pH-Wert. Deutlich zu erkennen ist, dass die Dimer-Proben im Optimum der Qualität  $q$  um ca. einen Faktor 1,5 höher liegen als die Monomere. Vergleichbare Werte für  $q$  bei Membranpartikel-Proben (Spinat) ergeben Werte von ca. 4–7 (Daten nicht gezeigt). Der optimale pH-Bereich der Dimer-Proben liegt zwischen pH 5,6 und 6,4. Derjenige der Monomer-Proben zwischen pH 5,4 und 6,3. Für die Membranpartikel-Proben (Spinat) wurde ein optimaler pH-Bereich zwischen 6,0 und 7,0 ermittelt [Grabolle, 2005]. Zur Untersuchung des Herbizid-Einflusses (folgender Abschnitt) wurde ein Messpuffer mit pH-Wert 6,3 gewählt.

## 5.3 Ermittelte Bindungskurven

Die Messungen der prompten und verzögerten Fluoreszenz an den PSII-Dimerproben von *T. elongatus* in Abhängigkeit der Terbutryn- bzw. der Stigmatellin-Konzentration wurden bei einem pH-Wert von 6,3 und einer DMSO-Konzentration von 2% im Puffer durchgeführt. Die Wirkung der beiden Inhibitoren wurde bis zu einer maximalen Konzentration von  $5 \cdot 10^{-4}$  M gemessen, jeweils ein Messpunkt pro Dekade. In den für die Ermittlung der Bindungskonstante relevanten Bereichen wurden zusätzliche Messpunkte aufgenommen.

### Terbutryn

In Abbildung 5.3B ist die aus den Messungen der prompten Fluoreszenz erhaltene Bindungskurve dargestellt. Abbildung 5.3A zeigt exemplarisch den Verlauf der prompten Fluoreszenz für ausgewählte Konzentrationen. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass bei niedriger Terbutrynkonzentration ( $10^{-12}$  M) die schnelle Phase klar ausgebildet ist, während sie bei hoher Terbutrynkonzentration ( $10^{-5}$  M) nahezu verschwunden ist. Die Abbildungen 5.3D und F zeigen die Bindungskurven aus den Messungen der verzögerten Fluoreszenz. Bei zunehmender Terbutrynkonzentration verschwindet zum einen das mit der verzögerten Fluoreszenz gemessene Blitzmuster (Abb. 5.3C), zum anderen nimmt die Amplitude im Zeitbereich des  $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfers deutlich ab (Abb. 5.3E).

Aus der Simulation der Bindungskurven mit der Hill-Gleichung (2.19) ergeben sich für die Bindungskonstanten Werte von  $(2,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-7}$  M (Hill-Koeffizient  $n = 1,1 \pm 0,1$ ) aus der prompten Fluoreszenz. Aus der verzögerten Fluoreszenz erhält man aus dem Sauerstoff-Blitzmuster einen Wert von  $(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$  M ( $n = 2,2 \pm 0,8$ ) und  $(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$  M ( $n = 1,9 \pm 0,4$ ) aus den DF-Amplituden. Die an den gleichen PSII-Dimerproben von *T. elongatus* erhaltenen ITC-Ergebnisse [Zimmermann et al., 2006] ergaben einen Wert von  $(5,4 \pm 3,4) \cdot 10^{-7}$  M und befinden sich damit in Übereinstimmung. In derselben Veröffentlichung wurde zusätzlich mit Steady-State-Sauerstoffmessungen die Inhibierung der Sauerstoffentwicklung bei einer Bindungskonstante von  $(1,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$  M bestimmt.

Beim Vergleich der aus der prompten und der verzögerten Fluoreszenz ermittelten Bindungskurven fällt auf, dass teilweise ein Unterschied zwischen den Hill-Koeffizienten besteht. Möglicherweise reflektieren die Parameter der verzögerten Fluoreszenz ( $n \approx 2$ ) nicht direkt die Herbizid-Inhibition, sondern zeigen eine quadratische Abhängigkeit, da sie sowohl von der Amplitude der Sauerstoffentwicklung als auch durch das  $Q_A$ -Redoxpotential beeinflusst werden. Diese Betrachtung gilt ebenso für die im folgenden Abschnitt betrachtete Abhängigkeit vom Antibiotikum Stigmatellin.

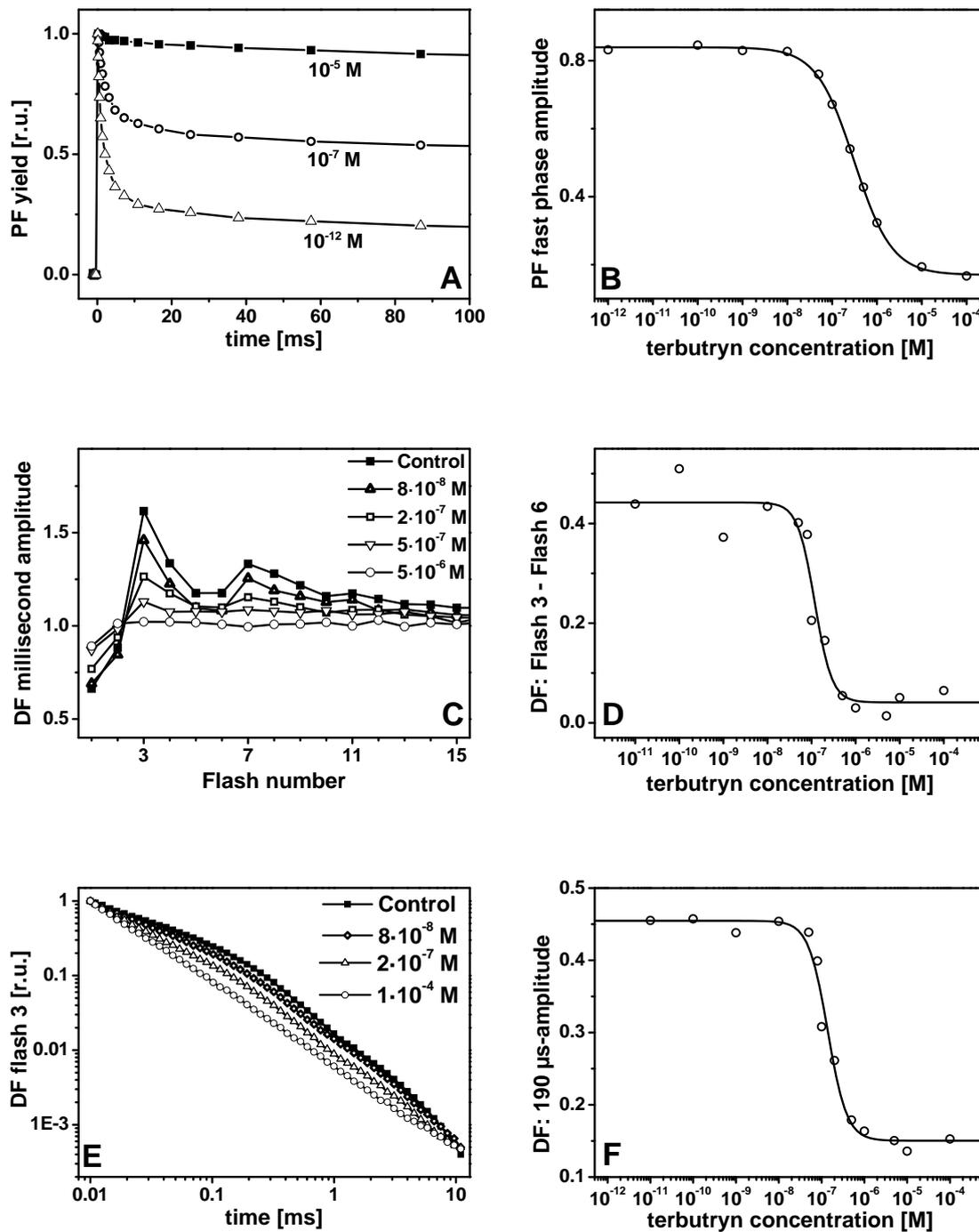


Abb. 5.3: Abhängigkeit der prompten und verzögerten Fluoreszenz von der Terbutryn-Konzentration. Auf der linken Seite sind jeweils exemplarische die gemessenen Kurven gezeigt, auf der rechten Seite die daraus abgeleiteten Bindungskurven in Abhängigkeit von der Terbutryn-Konzentration. A: Zeitverläufe der prompten Fluoreszenz. B: Die Amplitude der schnellen Phase der prompten Fluoreszenz (siehe Gleichung 5.1). Die Kurvenanpassung ergibt eine Bindungskonstante von  $k_B = (2,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-7}$  M und einen Hill-Koeffizienten  $n = 1,1 \pm 0,1$ . C: Blitzabhängige DF-Sauerstoffmuster normiert auf die Blitze 28–32. D: Differenz der Amplituden nach Blitz 3 und Blitz 6. Die Kurvenanpassung ergibt eine Bindungskonstante von  $k_B = (1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$  M und einen Hill-Koeffizienten  $n = 2,2 \pm 0,8$ . E: Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz nach Blitz 3. F: Die Amplitude der 190  $\mu$ s-Phase der verzögerten Fluoreszenz (Blitz 3). Die Kurvenanpassung ergibt eine Bindungskonstante von  $k_B = (1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$  M und einen Hill-Koeffizienten  $n = 1,9 \pm 0,4$ .

Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse konnte die Konzentration ermittelt werden, die notwendig ist, um eine vollständige Sättigung der  $Q_B$ -Bindungsstellen mit Terbutryn zu sichern. Die Amplitude der schnellen Phase der prompten Fluoreszenz ist oberhalb  $10\ \mu\text{M}$  Terbutryn nahezu verschwunden, damit ist eine vollständige Unterbrechung des  $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfers gegeben. Folglich sollte eine Terbutrynkonzentration von  $1\ \text{mM}$ , wie sie für die Kristallisation verwendet wurde, für eine vollständige Sättigung der Herbizidbindung ausreichen.

## Stigmatellin

Abbildung 5.4 zeigt die Bindungskurven aus den Messungen mit dem Antibiotikum Stigmatellin. In Abb. 5.4B ist die Abhängigkeit der schnellen Phase der prompten Fluoreszenz dargestellt, in Abb. 5.4A exemplarische Zeitverläufe. Sie verhält sich analog wie bei der Inhibierung durch Terbutryn (s. o.). Aus den Messungen der verzögerten Fluoreszenz wurde die Bindungskurve wie folgt bestimmt (rechte Seite der Abbildung). Die Differenz zwischen den Werten nach Blitz 3 und Blitz 6 ist ein Gradmesser für die Qualität des Sauerstoffmusters. In Abb. 5.4C ist zu erkennen, wie das Sauerstoffmuster bei höheren Stigmatellinkonzentrationen zunehmend verschwindet, die Sauerstofferzeugung also aufgrund der Inhibierung gestoppt wird. Alternativ dazu wurde eine Bindungskurve aus der Differenz der Werte nach Blitz 3 und Blitz 1 bestimmt, die dieselbe Abhängigkeit aufweist (Kurve nicht gezeigt). In den Abb. 5.4E und F ist die Abhängigkeit des DF-Zerfalls nach dem dritten Blitz von der Stigmatellin-Konzentration gezeigt.

Aus den Kurvenanpassungen mit der Hill-Gleichung ergeben sich folgende Bindungskonstanten: Für die prompte Fluoreszenz erhält man einen Wert von  $(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}\ \text{M}$  ( $n = 0,85 \pm 0,07$ ), für das Blitzmuster der verzögerten Fluoreszenz  $(3,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}\ \text{M}$  bzw. für die alternative Bestimmung  $(4,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-7}\ \text{M}$ . Die Abhängigkeit der DF-Amplitude bei  $190\ \mu\text{s}$  ergibt  $k_B = (2,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}\ \text{M}$  ( $n = 1,5 \pm 0,2$ ). Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit dem aus Absorptionmessungen an den Purpurbakterien *Rhodobacter sphaeroides* erhaltenen Wert  $4 \cdot 10^{-7}\ \text{M}$  (pH 8,5) [Gerencser et al., 2004]. Einen vergleichbaren Wert von  $3,7 \cdot 10^{-7}\ \text{M}$  ergaben ebenfalls Absorptionmessungen an *Rhodobacter capsulatus*-Proben [Ginet and Lavergne, 2001]. Der aus photospektrometrischen Messungen an Spinatchloroplasten erhaltene Wert von  $0,52 \cdot 10^{-7}\ \text{M}$  [Oettmeier et al., 1985] liegt dagegen annähernd eine Größenordnung darunter, was zur Zeit nicht erklärt werden kann.

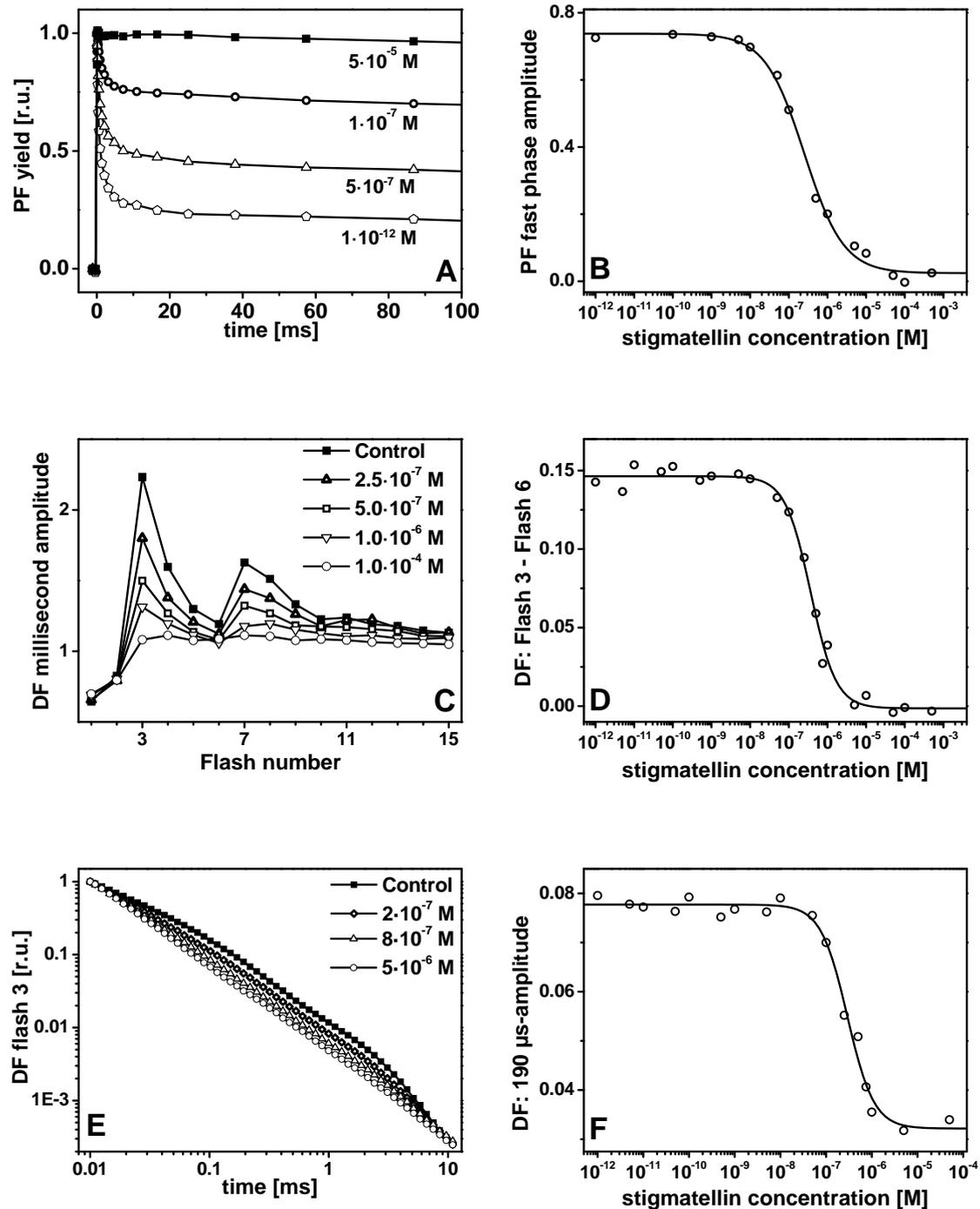


Abb. 5.4: Abhängigkeit der prompten und verzögerten Fluoreszenz von der Stigmatellin-Konzentration. Auf der linken Seite sind jeweils exemplarische die gemessenen Kurven gezeigt, auf der rechten Seite die daraus abgeleiteten Bindungskurven in Abhängigkeit von der Stigmatellin-Konzentration. A: Zeitverläufe der prompten Fluoreszenz. B: Die Amplitude der schnellen Phase der prompten Fluoreszenz (siehe Gleichung 5.1). Die Kurvenanpassung ergibt eine Bindungskonstante von  $k_B = (2,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-7} \text{ M}$  und einen Hill-Koeffizienten  $n = 0,85 \pm 0,07$ . C: Blitzabhängige DF-Sauerstoffmuster normiert auf die Blitze 28–32. D: Differenz der Amplituden nach Blitz 3 und Blitz 6. Die Kurvenanpassung ergibt eine Bindungskonstante von  $k_B = (3,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-7} \text{ M}$  und einen Hill-Koeffizienten  $n = 1,3 \pm 0,1$ . E: Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz nach Blitz 3. F: Die Amplitude der 190  $\mu\text{s}$ -Phase der verzögerten Fluoreszenz (Blitz 3). Die Kurvenanpassung ergibt eine Bindungskonstante von  $k_B = (2,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-7} \text{ M}$  und einen Hill-Koeffizienten  $n = 1,5 \pm 0,2$ .

## 5.4 Kristallstruktur mit gebundenem Herbizid

Die Kristallstruktur des Reaktionszentrums des Purpurbakteriums (pbRC) *Blastochloris viridis* wurde 1984 veröffentlicht [Deisenhofer et al., 1984] und ihre Entdecker 1988 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Der funktionelle Kern des pbRCs ist ein Heterodimer der L- und M-Unterheiten, die alle aktiven Kofaktoren (Chlorophylle, Pheophytine, Chinone, Non-Häm-Eisen) binden. Aufgrund von Übereinstimmungen in den jeweiligen Sequenzen wurde vermutet, dass die L- und M-Unterheiten des pbRCs den PSII-Unterheiten D1 bzw. D2 entsprechen (siehe 1.3).

Im Jahr 2001 bestätigten Zouni et al. diese Annahmen mit der ersten dreidimensionalen Kristallstruktur von cyanobakteriellen PSII-Core-Komplexen [Zouni et al., 2001]. Trotz großer Gemeinsamkeiten zwischen beiden System bestehen Unterschiede auf der Akzeptorseite. In pbRCs kommen verschiedene Arten von Chinonen als Elektronenakzeptor vor, und teilweise sind  $Q_A$  und  $Q_B$  aus chemischer Sicht nicht identisch. Die Bildung des Plastohydrochinols durch lichtinduzierten Elektronentransfer erfolgt anschließend dagegen wieder auf analoge Weise [Petrouleas and Crofts, 2005; Lancaster, 2007; Parson, 2007]. Eine auf zeitaufgelösten Röntgenabsorptionsmessungen und Dichtefunktionaltheorie-Berechnungen basierende Studie [Chernev et al., 2011] legt nahe, dass in beiden Arten von Reaktionszentren der Carboxyligand des Non-Häm-Eisens (Hydrogencarbonat bei PSII, Glutamat in bakteriellen Reaktionszentren) einen Koordinationswechsel vollzieht.

Die erste strukturelle Information eines pbRCs mit einem gebundenen Herbizid (Terbutryn) wurde mit einer Auflösung von 2,9 Å erhalten [Michel et al., 1986]. Höhere Auflösungen erlaubten später genauere Beschreibungen der Herbizidbindung an der  $Q_B$ -Bindungsstelle [Lancaster and Michel, 1999; Lancaster et al., 2000]. Da eine direkte strukturelle Information für die Bindung eines Herbizids ans PSII bislang fehlte, dienten die pbRC/Herbizid-Strukturen bislang als Modelle für die Inhibierung von PSII und waren Ausgangspunkt für theoretische Studien [Sobolev and Edelman, 1995; Xiong et al., 1996]. Neben der experimentellen Bestätigung dieser theoretischen Modelle, ist eine Kristallstruktur des PSII/Herbizidkomplexes notwendig, um die beobachtete Verschiebung im Redoxpotential aufgrund des Herbizideinflusses verstehen zu können.

Für phenolische Herbizide wird vermutet, dass sie aufgrund ihrer Hydroxylgruppe direkt an His215A anstatt an das gegenüberliegende Ser264A binden (siehe Abb. 5.5 und 5.6A) [Trebst, 1987; Oettmeier, 1999; Takahashi et al., 2010]. Diese starke Wasserstoffbindung könnte sich über das Non-Häm-Eisen hinweg schwächend auf eine Wasserstoffbindung zum  $Q_A$  auswirken und damit das  $Q_A$ -Redoxpotential herabsetzen. Das mögliche Fehlen der o. g.

Bindung bei Urea- und Triazinherbiziden würde konsequenterweise eine entgegengesetzte Verschiebung bedeuten.

## Akzeptorseite

Die ermittelte Kristallstruktur bei einer Auflösung von 3,2 Å zeigt die Bindung von Terbutryn an das Reaktionszentrum von PSII [Broser et al., 2011]. Diese wird hauptsächlich über vier Wasserstoffbrücken zu angrenzenden Aminosäuren (u. a. Ser264A) bewerkstelligt (siehe Abb. 5.5A). Zusätzlich wird die Terbutrynbindung noch durch nichtpolare Bindungen stabilisiert. In Abb. 5.5 zeigt der Vergleich der Terbutrynbindung an PSII mit der an ein pbRC eine weitgehende Übereinstimmung. Unterschiede wurden in der Anzahl der Wasserstoffbrücken und in bestimmten Atomdistanzen festgestellt. An der überlagerten Darstellung von Terbutryn und Plastochinon in Abb. 5.6A ist zu erkennen, wie das Herbizid das Chinon von dessen Bindungsstelle verdrängt hat und somit den weiteren Elektronenfluss verhindert.

Wie in derselben Abbildung zu erkennen ist, kann das grün gezeichnete Terbutryn im Gegensatz zum violett gezeichneten Plastochinon weniger mit His215A wechselwirken. Dies bestätigt damit die vorgeschlagenen Modelle bzgl. der Auswirkungen auf das  $Q_A$ -Redoxpotential.

## Donorseite

Aus der im Jahr 2009 veröffentlichten Kristallstruktur von PSII-Core-Komplexen (*Thermosynechococcus elongatus*) mit der Auflösung von 2,9 Å [Guskov et al., 2009] ging eine Position  $Cl_{1A}$  des mit dem Mangankomplex assoziierten Chloridions hervor. In der Kristallstruktur mit gebundenem Terbutryn wurde für  $Cl_{1A}$  nur eine Besetzung von 30 % festgestellt. Interessanterweise ist aber eine zusätzliche Elektronendichte in der näheren Umgebung (6,7 Å) von  $Cl_{1A}$  vorhanden. Dieser wird eine zweite Chloridposition  $Cl_{1B}$  mit einer Besetzung von 70 % zugeschrieben (siehe Abb. 5.6). An dieser Stelle ist das Chloridion von positiv geladenen Seitenketten verschiedener Aminosäuren umgeben. Es wird daher vorgeschlagen, dass es zwei verschiedene Positionen gibt, die das Chloridion einnehmen kann. Für die zusätzlich gefundene Position kommen zwei mögliche Ursachen infrage: 1. Die Belichtung der PSII-Proben vor der Herbizidzugabe oder 2. die Inkubierung der Proben mit Terbutryn im Dunkeln. Aus den Fluoreszenzmessungen geht hervor, dass die meisten Reaktionszentren ein reduzierbares  $Q_B$  enthalten und die Belichtung vor der Herbizidbehandlung zu mindestens einem Vorschreiten (*Turnover*) im Mangankomplex führt. In der darauffolgenden Dunkeladaptionszeit relaxiert das System vermutlich wieder in den  $S_1$ -Zustand, auch in Anwesenheit von Terbutryn. Dies schließt die Möglichkeit aus, dass die beobachtete Änderung der Chloridposition durch eine Verschiebung des Redoxzustands des Mangankomplexes verursacht wird. Daher

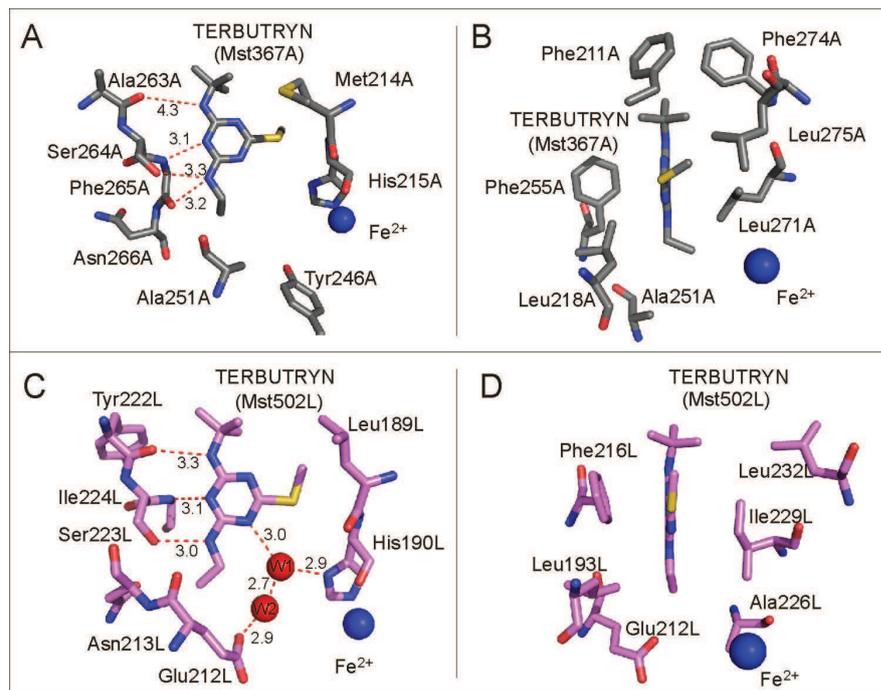


Abb. 5.5: Gebundenes Terbutryn an der  $Q_B$ -Bindungsstelle des PSII-Reaktionszentrums von *T. elongatus* (A, B: grau) und des pbRCs von *Blc. viridis* (C, D: violett) anhand der Kristallstrukturen mit den Auflösungen 3,2 Å bzw. 2,0 Å. Für jedes Reaktionszentrum sind zwei Orientierungen bzgl. der Ringebene des Terbutryns gezeigt (Aufsicht A, C und Seitenansicht B, D). Terbutryn und die umgebenden Aminosäurereste der Untereinheiten D1 bzw. L sind angedeutet und mögliche Wasserstoffbrücken zwischen dem Herbizid und dem Protein sind als rot gestrichelte Linien eingezeichnet (Abstände in Å). Der Non-Häm-Eisen-Kofaktor und zwei Wassermoleküle (W1, W2) sind als blaue bzw. rote Kugeln dargestellt. Entnommen aus [Broser et al., 2011].

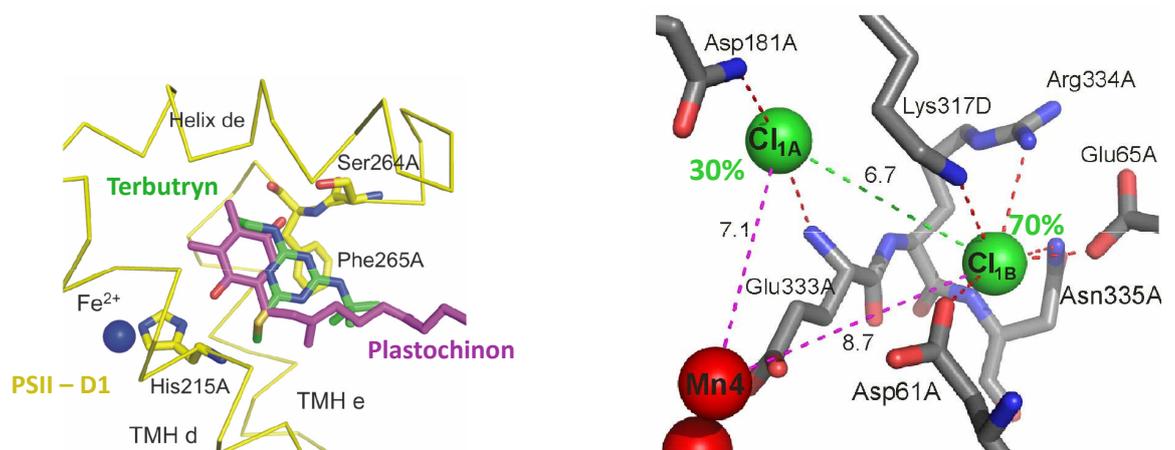


Abb. 5.6: Links: Überlagerung der Strukturmodelle mit gebundenem Plastocinon und Terbutryn an die PSII-Akzeptorseite. Rechts: Ermittelte Chlorid-Positionen an der PSII-Donorseite. Die Chloridionen sind als grüne Kugeln dargestellt. Entnommen aus [Broser et al., 2011].

Inhibitor	Methode	Bindungskonstante
Terbutryn	PF: Schnelle Phase	$(2,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-7} \text{ M}$
Terbutryn	VF: Blitz 3 - Blitz 6	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-7} \text{ M}$
Terbutryn	VF: Amplitude bei 190 $\mu\text{s}$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-7} \text{ M}$
Stigmatellin	PF: Schnelle Phase	$(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-7} \text{ M}$
Stigmatellin	VF: Blitz 3 - Blitz 6	$(3,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-7} \text{ M}$
Stigmatellin	VF: Amplitude bei 190 $\mu\text{s}$	$(2,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-7} \text{ M}$

Tab. 5.1: Die in dieser Arbeit aus den Fluoreszenzmessungen ermittelten Bindungskonstanten für Stigmatellin und Terbutryn. Die Fehlergrenzen stammen aus der Kurvenanpassung mit Origin.

scheint es, dass die Bindung von Terbutryn an die  $Q_B$ -Bindungsstelle die Chloridposition auf der Donorseite beeinflusst. Eine gegenseitige Wechselwirkung zwischen Akzeptor- und Donorseite wurde bereits anhand der Verschiebung des  $Q_A$ -Redoxpotentials nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Entfernung vom Mangankomplex festgestellt und dies auf eine strukturelle Verbindung dieser beiden funktionellen Bereiche im PSII zurückgeführt [Krieger-Liszkay et al., 2008].

## 5.5 Zusammenfassung

Aus den Messungen der prompten und verzögerten Fluoreszenz lassen sich folgende Punkte zusammenfassen:

- Der optimale pH-Bereich (siehe Abb. 5.2) für die Messungen an PSII-Dimeren von *Thermosynechococcus elongatus* liegt im Bereich pH 5,6 bis 6,4. Für die PSII-Monomere ist dieser Bereich geringfügig in Richtung niedrigere Werte verschoben (pH 5,4 bis 6,3).
- Mit Hilfe verzögerter Fluoreszenzmessungen ist die Bestimmung von Bindungskurven sowohl über das Sauerstoffmuster als auch über die Zeitverläufe selbst möglich (Abb. 5.3 und 5.4). Teilweise ergeben sich jedoch Hill-Koeffizienten von  $n \approx 2$ , was mit einer quadratischen Abhängigkeit von sowohl Akzeptor- als auch Donorseiteneinflüssen zusammenhängen könnte.
- Die ermittelten Dissoziationskonstanten  $k_B \approx 2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  (Terbutryn) und  $k_B \approx 3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  (Stigmatellin) stimmen gut mit Werten aus der Literatur überein. Eine Übersicht über die einzelnen Ergebnisse findet sich in Tabelle 5.1. Die aus den Kurvenanpassungen mit Origin erhaltenen statistischen Fehlergrenzen sind teilweise unrealistisch klein. Es ist davon auszugehen, dass sich die Ergebnisse bei Annahme größerer Fehler in Einklang bringen lassen.

Um eine vollständige Besetzung der  $Q_B$ -Bindungsstelle durch Terbutryn zu erreichen, war es erforderlich, die PSII-Proben vor der Herbizidinkubation und der Kristallisation zu belichten

und das natürliche Plastochinon zu entfernen. Dies steht nicht im Einklang mit den Messungen der prompten und verzögerten Fluoreszenz, bei denen eine vollständige Inhibierung bei dunkeladaptierten Proben festgestellt werden konnte. Dies könnte damit zusammenhängen, dass während des langen Kristallisationsprozesses (Dauer: 3–5 Tage) ein langsamer Austausch des bereits gebundenen Terbutryns durch Plastochinon stattfinden könnte. Das zu Plastohydrochinol  $\text{PQH}_2$  reduzierte Plastochinon zeigt dagegen eine niedrigere Affinität zur  $\text{Q}_\text{B}$ -Bindungsstelle [Broser et al., 2011].

Aus der ersten Kristallstruktur eines PSII-Reaktionszentrums [Broser et al., 2011] mit gebundenem Herbizid erhält man schließlich folgende Erkenntnisse:

- Terbutryn bindet über mindestens zwei Wasserstoffbindungen an die  $\text{Q}_\text{B}$ -Stelle. Dies stimmt sowohl mit dem pbRC als auch früheren theoretischen Modellen überein. Im Wesentlichen nimmt Terbutryn die Position des natürlichen Plastochinons ein und unterbricht daher den  $\text{Q}_\text{A} \rightarrow \text{Q}_\text{B}$ -Elektronentransfer (Abb. 5.6A).
- Es besteht keine direkte Bindung zwischen Terbutryn und His215A, dem Liganden des Non-Häm-Eisen. Dies könnte die Ursache für das erhöhte  $\text{Q}_\text{A}^-/\text{Q}_\text{A}$ -Redoxpotential sein. Damit werden Modelle bestätigt, die einen Einfluss der An- bzw. Abwesenheit dieser Bindung auf dieses Redoxpotential vorhersagen. Eine weitere Klärung sollte sich bei Kristallisation von PSII mit einem gebundenen phenolischen Herbizid ergeben.
- Eine zweite und neue Chloridposition in der Nähe des wasserspaltenden Komplex und in der Nähe der bereits bekannten Chloridion-Position [Guskov et al., 2009] wurde identifiziert. Der  $\text{Cl}^-$ -Kofaktor scheint daher einen gewissen „Bewegungsspielraum“ zu besitzen.

---

### Funktionelle Untersuchung zur *psbA*-Genfamilie von *Thermosynechococcus elongatus*

---

Die Ergebnisse dieses Kapitels sind in Zusammenarbeit mit Julia Sander von der AG Rögner (Ruhr-Universität Bochum) und weiteren Kooperationspartnern entstanden. Ausgangspunkt der Kooperation war die erfolgreiche Isolierung einzelner Kopien des D1-Proteins der thermophilen Cyanobakterien *Thermosynechococcus elongatus*. Mit Hilfe der in der AG Dau durchgeführten Messungen der prompten und verzögerten Fluoreszenz konnte ein wichtiger Beitrag zur funktionellen Charakterisierung dieser Kopien geleistet werden. Zusammen mit den in der AG Rögner und AG Vass (Szeged, Ungarn) aufgenommenen lichtabhängigen Wachstumskurven sowie Thermolumineszenzmessungen konnte ein Modell für einen möglichen Schutzmechanismus, der in Zusammenhang mit dem Austausch dieser D1-Kopien steht, erstellt werden und 2010 in einer gemeinsamen Publikation im *Journal of Biological Chemistry* vorgestellt werden [Sander et al., 2010].

Im folgenden Abschnitt wird einleitend die in Cyanobakterien vorkommende *psbA*-Genfamilie vorgestellt. Anschließend werden die Ergebnisse, die zur funktionellen Charakterisierung einzelner Mitglieder der Genfamilie beigetragen haben sowie das daraus erhaltene Modell präsentiert.

## 6.1 Die *psbA*-Genfamilie

Im Unterschied zu höheren Pflanzen und Grünalgen wird das cyanobakterielle D1-Protein nicht von einem einzelnen *psbA*-Gen kodiert, sondern von einer *psbA*-Genfamilie. Sowohl die Anzahl der Mitglieder dieser *psbA*-Genfamilie als auch die tatsächlich gebildeten Genprodukte unterscheiden sich jeweils für verschiedene Cyanobakterien-Arten. Welches Protein schließlich ausgebildet wird, hängt von den äußeren Bedingungen ab, denen der Organismus ausgesetzt ist. Liegen Stressbedingungen wie z.B. Starklicht [Kulkarni and Golden, 1994], UV-Licht [Campbell et al., 1998] oder niedrige Temperaturen [Sane et al., 2002] vor, werden andere Genprodukte ausgebildet als unter Standardbedingungen. Obwohl es Genfamilien gibt, die aus bis zu fünf Mitgliedern bestehen, existieren insgesamt nur vier verschiedene D1-Proteine [Mulo et al., 2009]:

- D1:1 wird unter Standardbedingungen ausgebildet (exprimiert) und unter Stressbedingungen unterdrückt.
- D1:2 wird unter Stressbedingungen ausgebildet.
- D1m ist eine Standardform von D1, die unabhängig von Stressbedingungen gebildet wird.
- D1' ist eine divergente D1-Form, die erst vor kurzem in wenigen Arten unter mikroaerobischen Bedingungen gefunden werden konnte.

In allen bekannten cyanobakteriellen Aminosäure-Sequenzen besteht der einzig konservierte Unterschied zwischen D1:1 und D1:2 in der Aminosäure an Position 130. Alle D1:1-Proteine besitzen hier ein Glutamin (Q130), während D1:2-Proteine dort ein Glutamat (E130) aufweisen. Aus Resonanz-Raman-Messungen [Moenne-Loccoz et al., 1989] sowie Faltungs- und Strukturmodellen [Diner et al., 1991; Ruffle et al., 1992; Svensson et al., 1996] ist bekannt, dass die Aminosäure 130 in dem Bereich des D1-Proteins liegt, in dem der Elektronentransfer verläuft und eine Wasserstoffbrücke zum Pheophytin ausbilden könnte (siehe Abb. 6.1). Wird Glutamin durch Glutamat ausgetauscht, kann diese Wasserstoffbrücke nicht mehr ausgebildet werden. Daher scheint sie eine wichtige Rolle für den Elektronentransfer zu spielen.

Die *psbA*-Genfamilie von *T. elongatus* besitzt drei Mitglieder (*psbA1*, *psbA2* und *psbA3*). Von diesen kodiert *psbA1* die Standardform D1:1, während *psbA3* hauptsächlich unter Starklichtbedingungen gebildet wird, also D1:2 entspricht. Das Gen *psbA2* wird als divergentes D1' nur sehr selten ausgebildet. Die Gene werden in diesem Kapitel in kursiver Schrift bezeichnet, die daraus entstandenen Proteine in Normalschrift. Um die verschiedenen *psbA*-Formen auf ihre funktionellen Eigenschaften zu untersuchen, wurden für die im weiteren Verlauf dieses Kapitels beschriebenen Messungen Knock-Out-Mutanten erzeugt, bei welchen jeweils nur eine der drei Kopien ausgebildet wird.

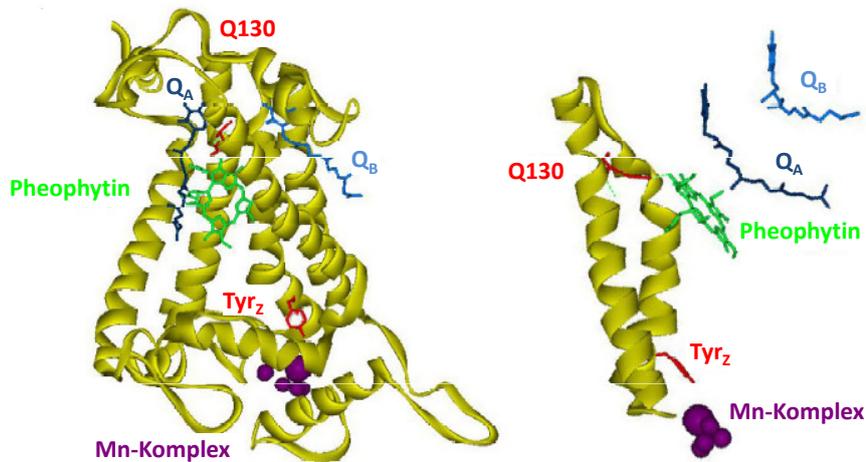


Abb. 6.1: Strukturmodell des D1-Proteins. Links: Dargestellt ist das D1-Protein mit den am Elektronentransport beteiligten Kofaktoren. Glutamin 130 (Q130, rot) bildet eine Wasserstoffbrücke zum Pheophytin aus. Rechts: Der Bereich der Helices B und C wurde zur besseren Übersicht vergrößert dargestellt. Die Grafik ist entnommen aus [Sander, 2009] (Struktur gemäß PDB-Code: 2axt [Loll et al., 2005]).

## 6.2 Messungen

Für die Messungen der prompten und verzögerten Fluoreszenz standen folgende Proben zur Verfügung:

- Wildtyp (WT): Alle drei *psbA*-Varianten sind vorhanden. Unter Normalbedingungen wird *psbA1* ausgebildet.
- $\Delta psbA1, A2$  bzw. *PsbA3*: *psbA1* und *psbA2* wurden entfernt, somit ist nur noch *psbA3* vorhanden.
- $\Delta psbA3$  bzw. *PsbA1, A2*: *psbA3* wurde entfernt, somit sind noch *psbA1* und *psbA2* vorhanden. Jedoch wird fast ausschließlich *PsbA1* exprimiert [Sander, 2009].

Diese Mutanten erlaubten zum ersten Mal nicht nur eine Charakterisierung ganzer Zellen, sondern auch von isolierten, aktiven PSII-Komplexen. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Messungen in Puffer D bei einem pH-Wert 6,2 durchgeführt.

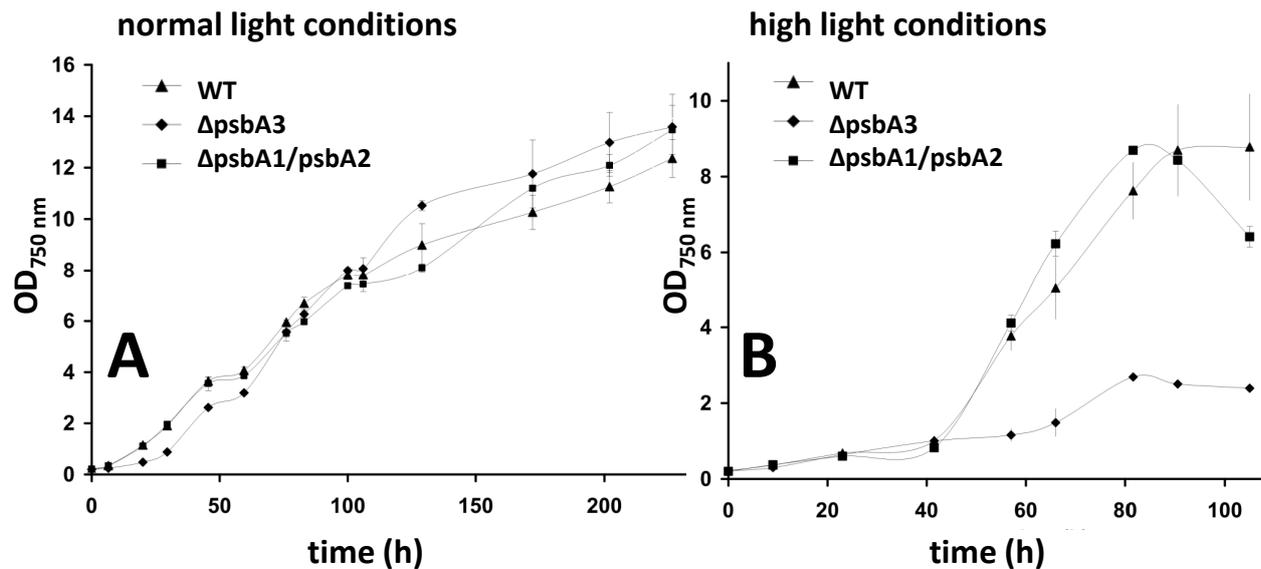


Abb. 6.2: Wachstumsverhalten der beiden Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp unter normalen Bedingungen (A) und Starklichtbedingungen (B). Unter normalen Lichtbedingungen zeigen beide Mutanten dasselbe Wachstumsverhalten wie der Wildtyp, während das Wachstum von  $\Delta psbA3$  unter Starklicht (Beginn bei  $OD_{750} = 1$ ) deutlich eingeschränkt ist. Diese Messungen wurden von der AG Rögner an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Entnommen aus [Sander et al., 2010].

## Wachstumsverhalten unter Normal- und Starklichtbedingungen

In Abbildung 6.2 wird das Wachstumsverhalten des Wildtyps und beider Mutanten unter normalen Licht- ( $50 \frac{\mu E}{m^2 s}$ ) und unter Starklichtbedingungen ( $500 \frac{\mu E}{m^2 s}$ ) dargestellt. Dazu wird die optische Dichte  $OD_{750}$ , gemessen bei einer Wellenlänge von 750 nm, in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Je stärker das Algenwachstum erfolgt ist, desto höher ist der Wert  $OD_{750}$ . Innerhalb des Fehlerbereichs zeigen alle Proben ein identisches Wachstumsverhalten, wenn sie normalem Licht ausgesetzt sind. Weder der Verlust von *psbA1* noch *psbA3* wirkt sich schwerwiegend auf das Wachstum aus. Unter Starklichtbedingungen zeigt sich im Gegensatz dazu ein anderes Bild. Das Wachstum der  $\Delta psbA3$ -Mutante ist drastisch eingeschränkt im Vergleich zum WT und der  $\Delta psbA1/psbA2$ -Mutante. Das bedeutet, dass das *psbA3*-Gen für das Wachstum unter Starklicht förderlich ist und in dieser Beziehung nicht durch *psbA1* ersetzt werden kann. Die Wachstumskurven für sich erklären allerdings nicht, ob ein genereller funktioneller Nachteil von PsbA1 gegenüber PsbA3 besteht oder ob das eingeschränkte Wachstum der Mutante auf eine verringerte Ausbildung von D1-Protein insgesamt zurückzuführen ist [Sander, 2009].

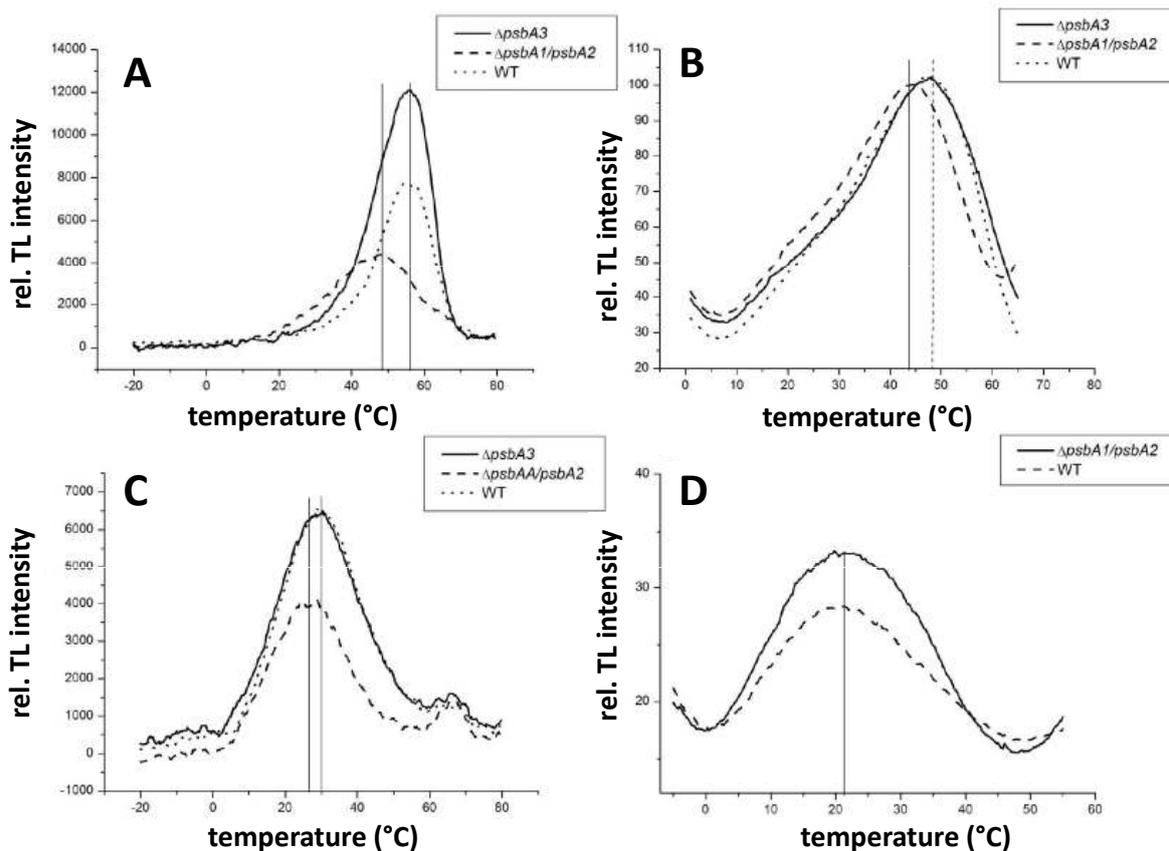


Abb. 6.3: Thermolumineszenz-Messungen an ganzen Zellen und isolierten PSII-Komplexen. Bei Zugabe von DCMU ist das Q-Band ( $S_2Q_A^-$ -Rekombination) zu sehen, ansonsten beobachtet man das B-Band ( $S_2Q_B^-$ -Rekombination). A: B-Band/ganze Zellen (PsbA1: 56°C, PsbA3: 48°C), B: B-Band/isolierte PSII-Komplexe (PsbA1: 47,3°C, PsbA3: 43,5°C), C: Q-Band/ganze Zellen (PsbA1: 29°C, PsbA3: 26°C) und D: Q-Band/isolierte PSII-Komplexe (PsbA1: 20°C, PsbA3: 21,3°C). Diese Messungen wurden von der AG Vass (Szeged, Ungarn) durchgeführt. Entnommen aus [Sander et al., 2010].

## Thermolumineszenz

Bei Thermolumineszenzmessungen wird das Phänomen genutzt, dass Materialien einen durch Anregungslicht erzeugten ladungsseparierten Zustand bei Abkühlung stabilisieren können. Werden sie anschließend graduell wieder erwärmt, so emittieren sie bei bestimmten Temperaturen Lumineszenzlicht [Chen and Kirsh, 1981; Vass, 2003]. Die zuvor in metastabilen Zuständen gespeicherte Strahlungsenergie wird dann thermisch stimuliert wieder freigesetzt. Anhand der bei bestimmten Temperaturen zu messenden Emissionsbanden und deren Intensitäten lassen sich Rückschlüsse auf die Redox Eigenschaften des zu untersuchenden Systems ziehen. So steht die jeweilige Peaktemperatur in einer engen Beziehung zu den Redoxpotentialen. Für Details der hier nur angedeuteten Zusammenhänge, siehe [Rutherford et al., 1984; Vass and Govindjee, 1996; Rappaport et al., 2005]

Bei den hier vorgestellten Proben, sowohl ganze Zellen als auch isolierte PSII-Komplexe, wurde jeweils die Thermolumineszenz nach einem sättigenden Lichtblitz untersucht. Bei Messungen an unbehandelten Proben ist das B-Band zu beobachten, welches die  $S_2Q_B^-$ -Rekombination angibt. In Anwesenheit von  $10\ \mu\text{M}$  DCMU sieht man das Q-Band, und das gemessene Emissionsmaximum entspricht der  $S_2Q_A^-$ -Rekombination, da durch das Herbizid der  $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronenübergang blockiert ist. Das B-Band ist bei beiden PsbA3-Präparationen deutlich zu niedrigeren Temperaturen verschoben (Abb. 6.3 oben). Die gleiche Auswirkung ist in der Tendenz auch beim Q-Band zu beobachten, allerdings wesentlich schwächer ausgeprägt (Abb. 6.3 unten).

Entsprechende Ergebnisse konnten auch bei Messungen erzielt werden, bei denen die Dominanz der PsbA3-Variante nicht durch Mutation, sondern durch Starklicht-Einfluss generiert wurde [Kós et al., 2008]. Des Weiteren gibt es umfassende Untersuchungen an punktmutierten Proben von *Synechodystis PCC 6803*, bei denen wie im hier vorliegenden Fall Glutamin 130 durch Glutamat ersetzt wurde [Rappaport et al., 2002; Cser and Vass, 2007].

Die Beschleunigung der  $S_2Q_A^-$ -Rekombination kann daher dem Q130E-Austausch in PsbA3 zugeordnet werden. Da diese Aminosäure vermutlich über eine Wasserstoffbrücke mit dem Pheophytinmolekül verbunden ist (siehe Abb. 6.1), könnte der Austausch eine Absenkung des Redoxpotentials  $P680^+Phe^-$  bei PsbA3 bewirken. Dadurch wird die Differenz  $\Delta G(P680^+Phe^- - S_2Q_A^-)$  verringert, während  $\Delta G(P680^* - P680^+Phe^-)$  vergrößert wird [Kós et al., 2008]. Allerdings könnte auch eine Verschiebung des Redoxpotentials der Chinone ( $Q_A$ ,  $Q_B$ ) oder des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs die Absenkung der TL-Peaktemperatur der PsbA3-Mutante erklären. Um diesen Punkt zu klären, wurden von mir weitergehende Messungen durchgeführt, die im Folgenden beschrieben sind.

## Untersuchung der Akzeptorseite

Bei den Messungen der Quantenausbeute der prompten Fluoreszenz an isolierten PSII-Komplexen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und den beiden Mutanten festgestellt werden (siehe Abb. 6.4). Der  $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer im WT scheint etwas langsamer zu sein, was durch einen leicht erhöhten Anteil an inaktiven PSII-Komplexen erklärt werden könnte. In diesen PSII-Zentren kann kein  $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer stattfinden, was zu einer Verlangsamung der  $Q_A^-$ -Reoxidation führt. Einen Anteil an inaktiven PSII-Komplexen suggerieren auch die blitzabhängigen Sauerstoffoszillationsmuster (Abb. 6.5) der im folgenden Abschnitt vorgestellten Messungen der verzögerten Fluoreszenz.

Auch bei den parallel durchgeführten Messungen an ganzen Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem WT und den Mutanten [Sander et al., 2010], so dass

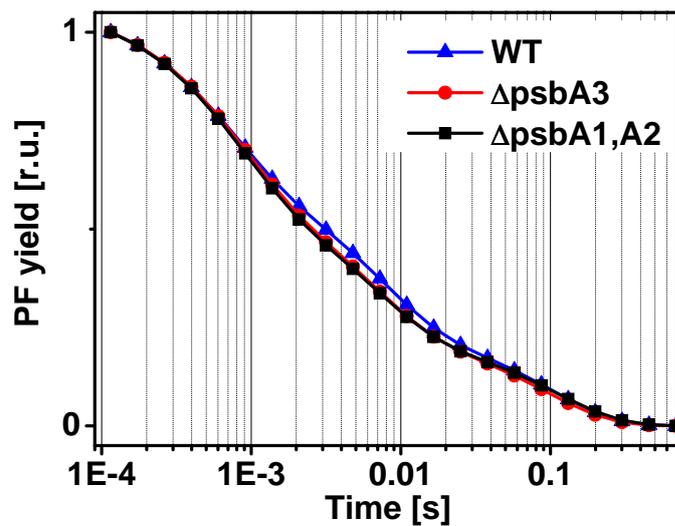


Abb. 6.4: Untersuchung der Akzeptorseite anhand von Messungen der prompten Fluoreszenz nach Laseranregung. Dargestellt sind die Messungen an isolierten PSII-Komplexen des Wildtyps (blaue Dreiecke), der  $\Delta psbA3$ -Mutanten (rote Kreise) und der  $\Delta psbA1/psbA2$ -Mutanten (schwarze Quadrate) nach dem ersten Laserblitz. Die Kurven sind jeweils zu den Zeitpunkten  $115 \mu s$  und  $700 ms$  normiert.

davon ausgegangen werden kann, dass sich die Variation Q130E nicht auf den  $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer auf der Akzeptorseite auswirkt. Dieses Ergebnis legt wiederum nahe, dass weder das  $Q_A/Q_A^-$ - noch das  $Q_B/Q_B^-$ -Redoxpotential durch die jeweiligen Sequenzunterschiede beeinflusst werden.

## Untersuchung der Donorseite

Zur Untersuchung der Donorseite wurden Messungen der verzögerten Fluoreszenz an den isolierten Core-Komplexen (WT,  $\Delta psbA1,A2$ ,  $\Delta psbA3$ ) durchgeführt. Pro Messung wurden jeweils die Zeitverläufe nach 32 anregenden Nanosekunden-Laserblitze bei einem Blitzabstand von 700 ms aufgenommen (siehe Kapitel 2.3).

Die blitzabhängigen Sauerstoffmuster aller Proben zeigen die typischen viererperiodischen Oszillationen (siehe Abb. 6.5). Die Oszillationen sind selbst für die letzten Blitze, bei denen die Amplitude durch die zunehmende Durchmischung der S-Zustände bereits stark gedämpft ist, noch zu erkennen (siehe auch Abschnitt 1.2). Der Miss-Parameter ist in allen Proben ähnlich groß und liegt bei etwa 9%. Auffallend ist, dass die Amplituden der WT-Probe wesentlich höher sind als bei den beiden Mutanten. Dies deutet darauf hin, dass die WT-Probe einen Anteil an inaktiven PSII-Zentren enthält, bei dem nur beim ersten Mal der  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang stattfindet. Anschließend macht er sich durch ein konstantes Untergrundniveau bemerkbar.

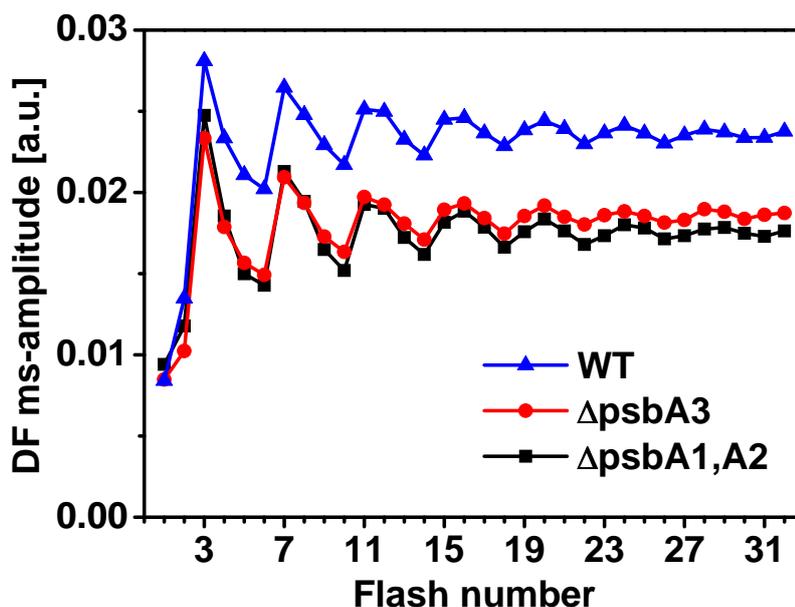


Abb. 6.5: Mit Hilfe der verzögerten Fluoreszenz (DF) gewonnenes, blitzabhängiges Sauerstoffmuster. Dargestellt sind die ms-Amplituden der DF-Messungen an isolierten PSII-Komplexen des Wildtyps (blaue Dreiecke), der  $\Delta psbA3$ -Mutanten (rote Kreise) und der  $\Delta psbA1/psbA2$ -Mutanten (schwarze Quadrate).

Deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp und der  $\Delta psbA1/psbA2$ -Mutanten sind in den Zeitverläufen der verzögerten Fluoreszenz zu erkennen. In Abbildung 6.6 sind die Zeitverläufe nach den ersten drei Blitzen dargestellt. Die Anfangsamplitude ist in den  $\Delta psbA1,A2$ -Mutanten für alle Blitze deutlich erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Betrachtet man die Simulationsergebnisse für die Zeitverläufe nach dem dritten Blitz (siehe Tab. 6.1), bestätigen sich die beschriebenen Auswirkungen der Mutation. Die Sauerstoffentwicklungszeit  $t_3$  ist im Rahmen der Messgenauigkeit identisch und beträgt 1,6–1,7 ms. Die Anfangsamplitude (bei  $t = 10 \mu s$ ) ist bei  $\Delta psbA3$  ca. doppelt so hoch wie im WT. Der sich daraus ergebende Anstieg der Differenz  $\Delta G$  beträgt ca. 20 meV. Dies deutet auf einen Anstieg des Gibbs-Energieniveaus des  $Y_Z^+Q_A^-$ -Radikalpaars um ungefähr 20 meV hin und lässt sich nicht auf eine Veränderung der Redoxlücke zwischen Pheophytin und  $Q_A$  zurückzuführen, da die Differenz der Gibbs'schen freien Energie zwischen dem  $Y_Z^+Q_A^-$ -Zustand und den  $Chl^*$ -Zustand die Intensität der verzögerten Fluoreszenz bestimmt.

Die Ergebnisse zum  $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer lassen eine Verschiebung des  $Q_A^-/Q_A$ -Redoxpotentials als äußerst unwahrscheinlich erscheinen. Somit ist die Erhöhung des  $Y_Z^+Q_A^-$ -Niveaus vermutlich auf eine Erhöhung des  $Y_Z/Y_Z^+$ -Redoxpotentials zurückzuführen.

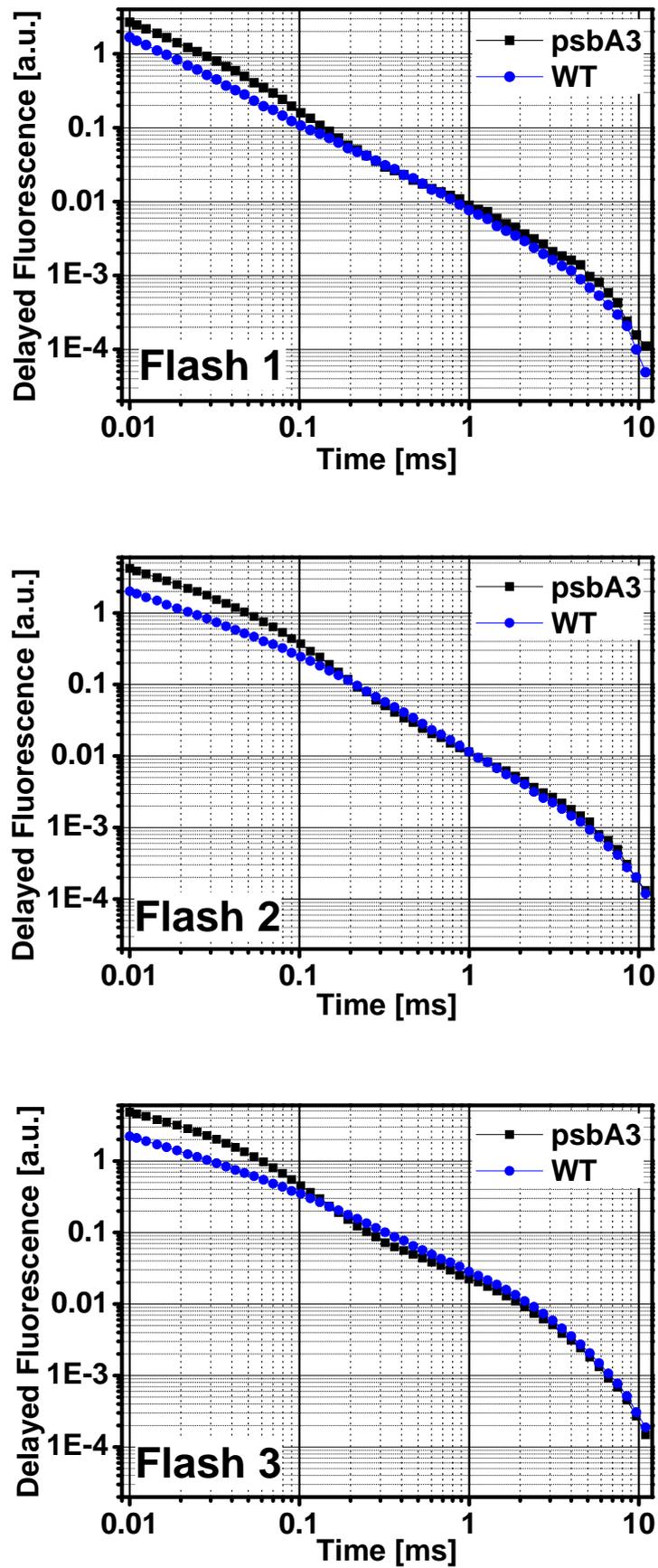


Abb. 6.6: Zeitverlauf der verzögerten Fluoreszenz nach den ersten drei Blitzen. In blau ist der WT dargestellt, in schwarz die  $\Delta psbA1/psbA2$ -Mutante.

Parameter	Wildtyp	$\Delta$ PsbA1, A2
$A_1$	$2,82 \pm 0,16$	$5,93 \pm 0,27$
$t_1$ [ $\mu$ s]	$18,6 \pm 0,6$	$26,7 \pm 0,6$
$A_2$	$0,51 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,05$
$t_2$ [ $\mu$ s]	$164 \pm 8$	$143 \pm 9$
$A_3$	$0,044 \pm 0,002$	$0,036 \pm 0,002$
$t_3$ [ms]	$1,64 \pm 0,04$	$1,69 \pm 0,03$
$\Delta G$ [meV]	$109,4 \pm 2,8$	$131,2 \pm 2,7$

Tab. 6.1: Ergebnisse der Simulationen. Die Fluoreszenzzerfälle nach dem dritten Blitz wurden mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen angepasst.

### 6.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Mit Hilfe der in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurden bestimmte funktionelle Eigenschaften des PsbA3-Proteins ermittelt:

- Das *psbA3*-Gen ist für das Wachstum unter Starklicht erforderlich und kann durch *psbA1* nicht ersetzt werden.
- Die Thermolumineszenz-Messungen deuten darauf hin, dass das  $P680^+Phe^-$ -Potential bei PsbA3 abgesenkt ist. Dies würde bedeuten, dass sich  $\Delta G(P680^* - P680^+Phe^-)$  erhöht, während  $\Delta G(P680^+Phe^- - P680^+Q_A^-)$  geringer wird (siehe Abb. 6.7).
- Es wurde kein Unterschied im  $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer zwischen PsbA1 und PsbA3 festgestellt.
- Erhöhte Anfangsamplituden nach allen Blitzen der verzögerten Fluoreszenz lassen auf einen um ca. 20 meV erhöhten Wert von  $\Delta G(Chl^* - Y_Z^+Q_A^-)$  schließen (siehe Abb. 6.7). Da auf der Akzeptorseite keine Veränderungen erkennbar sind, könnte die Erhöhung des  $Y_Z^+Q_A^-$ -Niveaus auf eine Erhöhung des  $Y_Z/Y_Z^+$ -Redoxpotentials zurückzuführen sein.
- Die Zeitkonstante der Sauerstoffentwicklung,  $t_3$ , wird durch die Mutation nicht beeinflusst. Des Weiteren besteht kein Unterschied im Miss-Parameter zwischen WT und Mutante.

Die Ergebnisse können einen Anhaltspunkt geben, wie sich Cyanobakterien vor zu großem Lichteinfluss schützen (Photoprotektion). In Abb. 6.8 sind jeweils schematische Modelle für sowohl die PsbA1- als auch die PsbA3-Variante zu sehen. Das veränderte Redoxpotential des  $P680^+Phe^-$ -Radikalpaars bei PsbA3 führt dazu, dass der angeregte Zustand  $P680^*$  mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit erneut erreicht wird und es stattdessen zu einer direkten Rekombination kommt. Somit wäre die Gefahr verringert, dass der langlebige Triplettzustand von  $P680^*$  und daraufhin schädlicher Singulett-Sauerstoff gebildet wird.

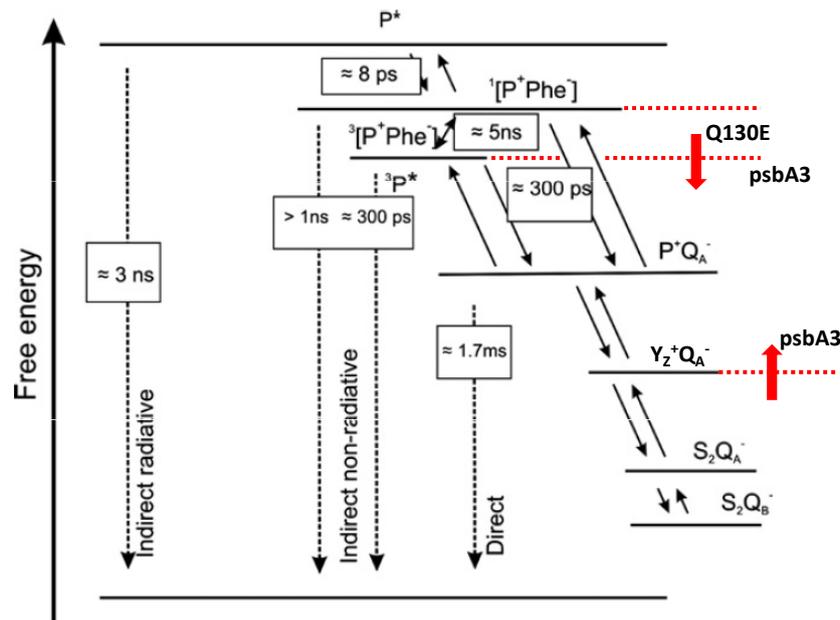


Abb. 6.7: Wege der PSII-Ladungstrennung bzw. Ladungsrekombination. Die durchgezogenen Pfeile deuten Elektronentransportprozesse an, die gestrichelten Pfeile zeigen verschiedene Ladungsrekombinationspfade mit den zugehörigen Zeitkonstanten für die Rekombinations- bzw. Dissipationschritte. Die Q130E-Mutation könnte eine Absenkung des freien Energieniveaus des  $P680^+Phe^-$ -Zustands sowie eine Anhebung des  $Y_2^+Q_A^-$ -Zustands zur Folge haben. Editiert nach [Cser and Vass, 2007].

Des Weiteren scheint die über alternative Wege verlaufende Ladungsrekombination in den PsbA3-Proben zu Lasten des Vorwärtselektronentransfers zu gehen. Überschüssige Anregungsenergie kann somit bei starkem Lichteinfluss durch harmlose Dissipation abgeleitet werden und eine Schädigung des D1-Proteins verringern.

Allerdings ist die psbA3-Kopie alleine nicht ausreichend, um einen optimalen Photoschutz zu gewährleisten, da die  $\Delta psbA1/psbA2$ -Mutante, die nur PsbA3 enthält, einen schwächeren Schutz gegenüber Photoinhibition (siehe [Aro et al., 1993]) zeigt als der Wildtyp. Dies könnte auch erklären, warum selbst längerfristige Belichtung des Wildtyps nicht zu einem kompletten PsbA1/PsbA3-Austausch führt, sondern bei einem Anteil von 70 % PsbA3 aufhört [Sander et al., 2010].

In demselben Zeitraum zu der hier vorgestellten Arbeit erfolgten weitere Untersuchungen bezüglich des funktionellen Unterschieds zwischen den Varianten PsbA1 und PsbA3 in denselben Organismen [Sugiura et al., 2010]. Bei Bindung des phenolischen Herbizids Bromoxynil (siehe auch Abschnitt 5.1), welches das  $Q_A^-/Q_A$ -Redoxpotential absenkt, wird ein nicht-lineares Temperaturverhalten der  $S_2Q_A^-$ -Rekombination bei den PsbA3-Proben,

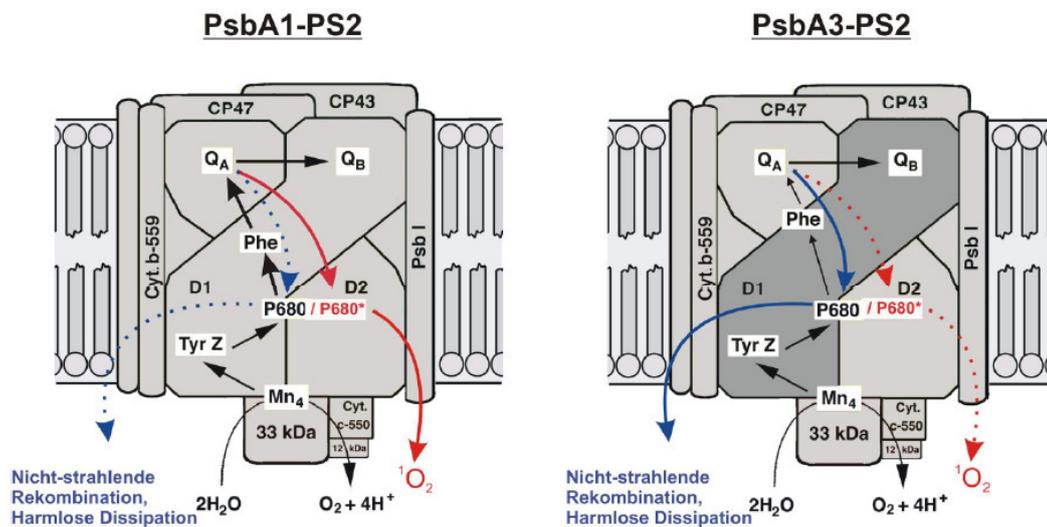


Abb. 6.8: Möglicher photoprotektiver Mechanismus eines *psbA1/psbA3*-Austausches. Die Ladungsrekombination im *psbA1*-PSII führt zu einer erhöhten Repopulation des P680<sup>+</sup>-Zustands und daher zu einer höheren Produktion von schädlichen Singulett-Sauerstoff. Dies wird im *psbA3*-PSII durch eine höhere non-radiative Rekombination und daher harmlosen Dissipation der Überschussenergie vermieden. Entnommen aus [Sander, 2009]

nicht jedoch bei PsbA1, festgestellt. Dies lässt auf ein verändertes Bindungsverhalten zwischen Bromoxynil und der Q<sub>B</sub>-Bindungsstelle schließen. Die Unterschiede auf der PSII-Akzeptorseite gehen demnach über die veränderte Wasserstoffbrücke zum Pheophytin hinaus und könnten durchaus auch das Q<sub>A</sub><sup>-</sup>/Q<sub>A</sub>-Redoxpotential beeinflussen. Darüber hinaus wurde durch Absorptionsmessungen festgestellt, dass bei Mn-befreiten PsbA3-Proben eine schnellere P680<sup>+</sup>-Reduktion durch Y<sub>Z</sub> stattfindet, was auf ein verschobenes Redoxpotential einer der beiden Komponenten zurückzuführen ist. Die Autoren favorisieren dabei ein verändertes P680/P680<sup>+</sup>-Redoxpotential [Sugiura et al., 2010]. In Übereinstimmung mit den Messungen der verzögerten Fluoreszenz aus dieser Arbeit ist eine Erhöhung des Y<sub>Z</sub>/Y<sub>Z</sub><sup>+</sup>-Redoxpotential ebenso denkbar. Genauere Informationen der noch zahlreichen offenen Fragen müssen in kommenden Studien gewonnen werden.

---

## Ladungsrekombination in PSII-Proben ohne Mn-Komplex

---

In Kapitel 2 wird die Vorgehensweise beschrieben, wie bei den Spinat-Membranpartikeln der Mangankomplex entfernt werden kann. Im Englischen wird dies als *Depletion* (Verarmung) bezeichnet. Da der komplexe und zudem viererperiodische Mechanismus der Wasserspaltung bei diesen Proben nicht mehr vorhanden ist, eignen sie sich besonders, um die ersten Schritte der Ladungstrennung und der damit zusammenhängenden Umkehrreaktion, der Ladungsrekombination, zu untersuchen. Allerdings muss beachtet werden, dass sich das Fehlen des Mangankomplexes auch auf diese Schritte auswirken kann.

Im System ohne Mangankomplex ist die Oxidationsrate von  $Y_Z$  je nach pH-Wert um den Faktor 50–5000 langsamer als im sauerstoffentwickelnden System [Conjeaud and Mathis, 1980; Rappaport and Lavergne, 2001]. Dies zeigt, dass eine vermutlich nur kleine strukturelle Änderung große Auswirkungen auf die Kinetik hat. Aufgrund der Abwesenheit des natürlichen Reduktionsmittels ist die Lebensdauer von  $Y_Z^+$  deutlich verlängert, was einerseits die Untersuchung erleichtert, aber andererseits die Übertragung auf den intakten Organismus erschwert.

### 7.1 Untersuchung der $P680^+Q_A^-$ -Rekombination

Nach der ersten Blitzanregung dunkeladaptierter PSII-Proben wird auf der Donorseite das innerhalb von weniger als einer Nanosekunde gebildete  $P680^+$  von  $Y_Z$  reduziert. Wie in

Abschnitt 1.2 beschrieben, enthält dieser Reduktionsvorgang sowohl schnelle Phasen im Nanosekundenbereich als auch langsame Phasen im Bereich von Mikrosekunden. In den Zeitverläufen der verzögerten Fluoreszenz (siehe Abb. 7.1 oben) sind davon messtechnisch bedingt nur noch die langsamen Phasen zu erkennen. Erfolgt nach der ersten Anregung innerhalb eines kurzen Zeitabstands (z. B. 100 ms) eine zweite Anregung, also bevor  $Y_Z^+$  rereduziert werden kann, so führt das bereits vorhandene  $Y_Z^+$  dazu, dass erneut oxidiertes P680<sup>+</sup> nicht mehr durch Vorwärtselektronentransfer reduziert werden kann und somit die Rekombination  $P680^+Q_A^- \rightarrow P680^0Q_A^0$  zu beobachten ist (siehe Abb. 7.1 unten).

Vergleicht man die jeweiligen Zerfälle miteinander (siehe Abb. 7.1), so fällt auf, dass der Fluoreszenzpegel bei vorhandenem  $Y_Z^+$  im Mikrosekundenbereich wesentlich höher ist als nach dem ersten Blitz und sich eine Art Plateaupegel gebildet hat, der bis etwa 100  $\mu$ s anhält. Dieses Verhalten ist v.a. bei höheren pH-Werten zu beobachten. Die Zerfälle bei niedrigen pH-Werten unterscheiden sich dagegen kaum voneinander.

Das Verhalten bei niedrigen pH-Werten ist dadurch zu erklären, dass bei einem Teil der Zentren bereits eine Rekombination stattgefunden hat und wieder der Grundzustand vorliegt, bevor die nächste Anregung erfolgen kann. Um dies zu vermeiden, ist es daher wichtig, das Blitzintervall hinreichend kurz zu wählen. Bei den in diesem Abschnitt vorgestellten Messungen betrug es 100 ms. Ein wesentlich kürzeres Intervall ist bei dem verwendeten Laser (technische Merkmale siehe Anhang B.2) nicht möglich. Da trotz des kurzen Blitzintervalls ein Teil der Zentren bereits wieder in den Grundzustand übergegangen ist, beobachtet man bei den Signalen im unteren Teil der Abb. 7.1 eine Überlagerung zweier verschiedener Prozesse, zum einem die Zerfälle nach Blitz 1 ( $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination), zum anderen die  $P680^+Q_A^-$ -Rekombination. Schematisch ist das Zustandekommen dieser Überlagerung in Abb. 7.2 dargestellt. Um den Anteil  $n$  der Zentren zu bestimmen, der sich bereits wieder im Grundzustand befindet, wurde folgender Ansatz zur Simulation der Zerfallskurven  $F(t)$  gewählt ( $0 < q < 1$ ):

$$F(t) = q \cdot F_1(t) + \sum_{i=1}^3 \left( a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \right) + y_0 \quad (7.1)$$

$F_1(t)$  bezeichnet den im oberen Teil der Abb. 7.1 dargestellte Fluoreszenzzerfall nach dem ersten Blitz.  $F(t)$  sollte theoretisch für alle Zerfälle nach dem zweiten Blitz stehen. Es hat sich aber gezeigt, dass die Zerfälle in der Praxis erst ab dem vierten Blitz einen gleich bleibenden Verlauf annehmen. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits bei Messungen der prompten Fluoreszenz in Mn-freien PSII-Proben festgestellt, bei denen sich der  $F_M$ -Wert der höchsten Fluoreszenz ebenfalls erst nach einigen Blitzen einstellt [Mamedov et al., 1998]. In Abb. 7.3 sind für Raumtemperatur und pH 6,2 sowohl die Zerfälle nach Blitz 1, nach Blitz 4 sowie der ermittelte korrigierte Zerfall dargestellt.

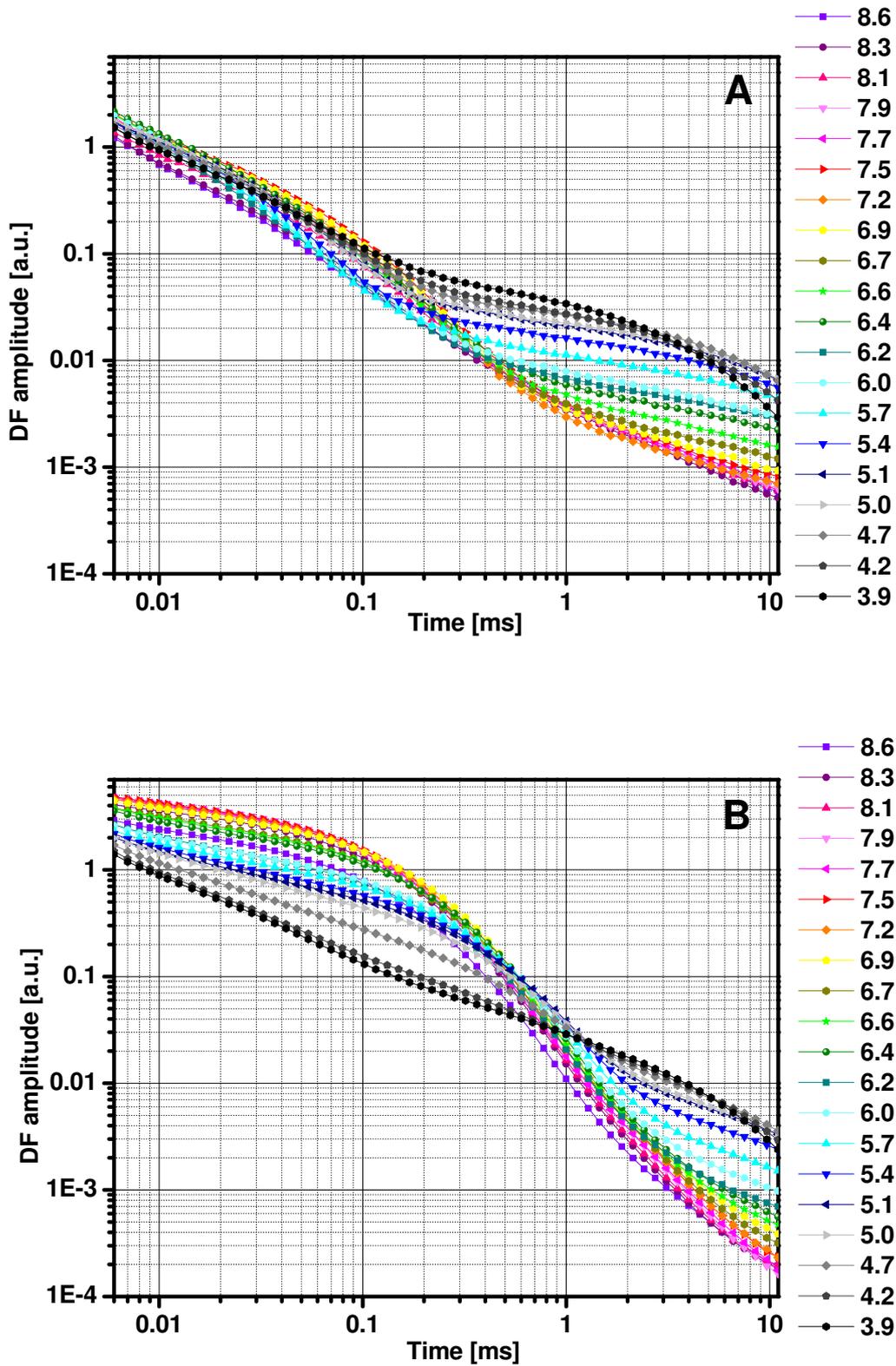


Abb. 7.1: A: Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz in Photosystemen ohne Mn-Komplex nach dem ersten Blitz in Abhängigkeit vom pH-Wert. Nach ca. 1 ms stellt sich eine Plateauphase ein, die dem  $Y_Z^+Q_A^-$ -Zustand entspricht. B: Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz in PSII-Proben ohne Mn-Komplex nach dem vierten Blitz (in Anwesenheit von  $Y_Z^+$ ) in Abhängigkeit vom pH-Wert (Blitzintervall 100 ms, 22°C).

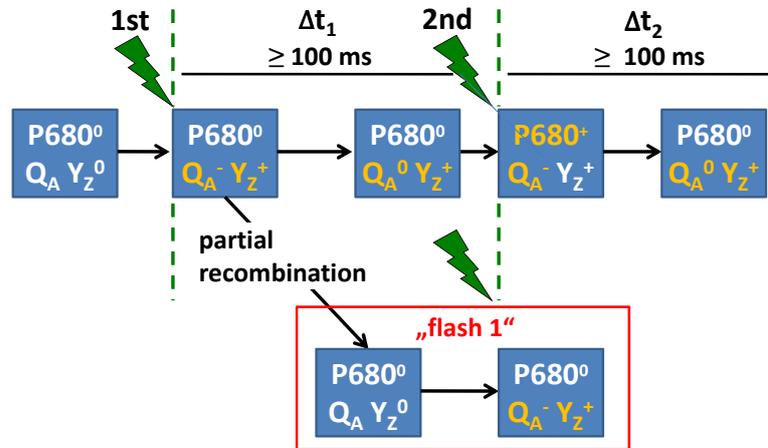


Abb. 7.2: Blitzprotokoll zur Messung der  $P680^+Q_A^-$ -Rekombination. Nach dem ersten anregenden Laserblitz gehen die PSII-Zentren ohne Mangankomplex vom Zustand  $P680^0Q_A^-Y_Z^0$  in den Zustand  $P680^0Q_A^-Y_Z^+$  über. Bei erneuter Blitzanregung wird der Zustand  $P680^+Q_A^-Y_Z^+$  erreicht und es kommt anschließend zur  $P680^+Q_A^-$ -Rekombination (oberer Zweig). Ein Teil der Zentren ist bereits vor der nächsten Anregung in den Grundzustand rekombiniert. Der zweite Blitz wirkt in diesem Fall wie der erste (unterer Zweig).

Trägt man  $q$  über dem pH-Wert auf, so bestätigt sich der Eindruck, der aus der visuellen Inspektion der Graphen gewonnen wurde (Abb. 7.3B). Die *partielle Rekombination* findet verstärkt bei niedrigen pH-Werten statt: Bei pH 4 befinden sich nach 100 ms ca. 80 % der Zentren bereits wieder im Grundzustand. Dieser Anteil sinkt bei steigendem pH-Wert und pendelt sich ab pH 6 auf einen Wert von knapp unter 40 % ein.

Neben der pH-Abhängigkeit des Ausmaßes der partiellen Rekombination wurden anhand der Simulation nach Gleichung 7.1 auch Zeitkonstanten ermittelt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die  $P680^+Q_A^-$ -Rekombination kaum bzw. überhaupt keine pH-Abhängigkeit zeigt [Conjeaud and Mathis, 1980]. Eine Übersicht über die veröffentlichten Ergebnisse ist in Tab. 7.1 aufgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Zeitkonstanten sind in Abb. C.6 im Anhang dargestellt und bewegten sich für  $\tau_1$  im Bereich zwischen 70–100  $\mu$ s (pH > 6,5) und für  $\tau_2$  zwischen 195 und 270  $\mu$ s (pH 5,0–8,6). Die mittlere Zeitkonstante  $\tau_{12}$  aus  $\tau_1$  und  $\tau_2$  (siehe Gleichung 2.10) liegt im pH-Bereich 5,0–8,6 zwischen 80 und 155  $\mu$ s. Für pH-Werte unterhalb davon wurde bereits bei früheren Messungen eine deutliche Abweichung festgestellt [Haveman and Lavorel, 1975]. Im Wesentlichen liegen die ermittelten Werte damit im Rahmen der bisher

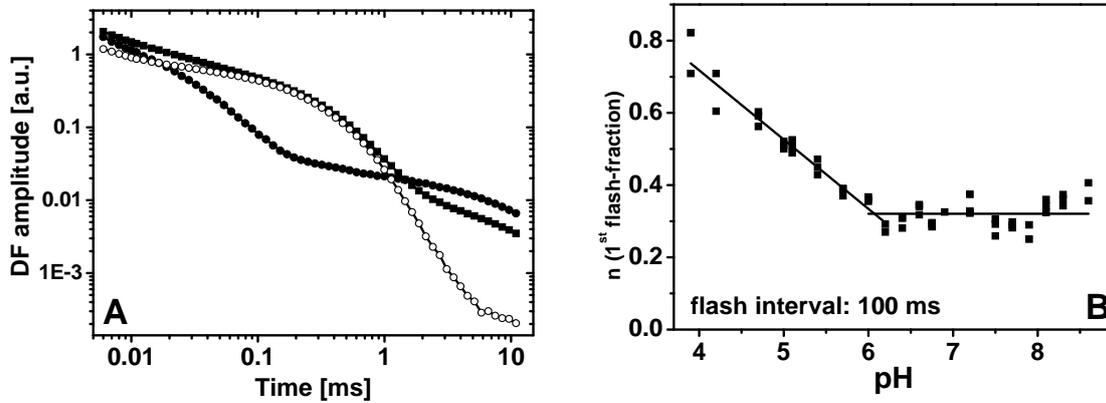


Abb. 7.3: A: Zeitverlauf der verzögerten Fluoreszenz bei pH 5,1 und Raumtemperatur nach Blitz 1 (schwarze Kreise), nach Blitz 4 (schwarze Quadrate) und der nach Gleichung 7.1 korrigierte Verlauf (weiße Kreise). B: pH-Abhängigkeit des Anteils  $n$  der PSII-Zentren, der innerhalb von 100 ms bereits rekombiniert ist und daher ein „Blitz 1“-Signal hervorruft (partielle Rekombination).

$\tau$ [ $\mu$ s]	Technik	Probe	Literatur
170	Verz. Fluoreszenz	Chloroplasten <sup>1</sup>	[Haveman and Lavorel, 1975]
100–200	Absorption (334 nm)	Chloroplasten <sup>1</sup>	[Renger and Wolff, 1976]
195	Absorption (820 nm)	Chloroplasten <sup>1</sup>	[Conjeaud et al., 1979]
135	Absorption (520 nm)	Chloroplasten <sup>1</sup>	[Renger, 1979]
200	Absorption (820 nm)	Chloroplasten <sup>1</sup>	[Conjeaud and Mathis, 1980]
115–290	Absorption	diverse	[Reinman and Mathis, 1981]
260	Absorption	<i>Synechococcus</i> sp.	[Gerken et al., 1989]
<500	Fluoreszenz	Thylakoide <sup>1</sup>	[de Wijn and van Gorkom, 2002]
90, 250	Verz. Fluoreszenz	Membranpartikel <sup>1</sup>	diese Arbeit

Tab. 7.1: Ermittelte Zeitkonstanten für die  $P680^+Q_A^-$ -Rekombination. Die mit <sup>1</sup> gekennzeichneten Proben wurden jeweils aus Spinat hergestellt.

veröffentlichten Werte. Bei pH-Wert 8,0, bei dem die partielle Rekombination eine relativ geringe Auswirkung zeigt, wurde für  $\tau_1$  ein Wert von 90  $\mu\text{s}$  und für  $\tau_2$  ein Wert von 250  $\mu\text{s}$  ermittelt. Die aus beiden Werten gemittelte Zeitkonstante liegt bei ca. 112  $\mu\text{s}$ .

Die Amplitude der langsamen Zeitkonstante  $\tau_3$  ( $\approx 1$  ms) beträgt für pH-Werte kleiner als 5 ca. 10 % der Gesamtamplitude, für  $\text{pH} > 6$  fällt dieser Anteil auf unter 1 % (siehe Abb. C.6A). Sie wurde in der weiteren Betrachtung nicht weiter berücksichtigt.

### Abschätzung von $\Delta\Delta G(\text{Chl}^* - \text{P680}^+\text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-)$

Mit Hilfe der Messungen der verzögerten Fluoreszenz lässt sich der Wert für  $\Delta\Delta G(\text{Chl}^* - \text{P680}^+\text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-)$  abschätzen. Die Vorgehensweise ist im Abschnitt 2.3.2 erläutert. Dazu werden folgende Annahmen gemacht: Wenn man ihn um den Anteil der Zentren korrigiert, in denen die Rekombination bereits stattgefunden hat, entspricht der 10  $\mu\text{s}$ -Pegel der verzögerten Fluoreszenz in Anwesenheit von  $\text{Y}_Z^+$  dem Zustand  $\text{P680}^+\text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-$  (siehe Abb. 7.4).

Für den pH-Wert 8,0 wurde anhand von Abb. 7.3 ein Anteil von  $q \approx 0,33$  ermittelt, bei denen diese Rekombination bereits stattgefunden hat. Dieser Anteil an Blitz 1-Signal wurde vom betrachteten Signal abgezogen und die Kurve anschließend mit dem Faktor  $\frac{1}{1-q}$  renormiert. Aus dem Vergleich mit dem 10  $\mu\text{s}$ -Pegel nach dem dritten Blitz in intakten Proben, der dem Zustand  $\text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-$  entspricht, erhält man ein um ca. 20 meV erhöhtes Energieniveau. Der Wert für  $\Delta\Delta G(\text{Chl}^* - \text{P680}^+\text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-)$  beträgt damit  $(-410 \pm 25)$  meV.

### Temperaturabhängigkeit

In Abbildung 7.5 werden die Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz nach dem vierten Blitz im Temperaturbereich zwischen 6 und 30 °C dargestellt. Anhand dieser Zeitverläufe wurde die Abhängigkeit der  $\text{P680}^+\text{Q}_A^-$ -Rekombination von der Temperatur untersucht. Die Messungen wurden bei pH 8,0 durchgeführt, um eine möglichst geringe Abhängigkeit von der partiellen Rekombination zu erhalten (siehe Abb. 7.3). Im Arrheniusplot wurden die nach Gleichung 7.1 ermittelten Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  bzw. die daraus ermittelten reziproken Ratenkonstanten  $k_1$  und  $k_2$  aufgetragen (siehe Abb. 7.6A). In Abb. 7.6B ist die Temperaturabhängigkeit der zugehörigen Amplitudenwerte gezeigt. Während die Amplitude der langsameren Zeitkonstante  $\tau_2$  über den untersuchten Temperaturbereich nahezu konstant bleibt, steigt die Amplitude der schnellen Zeitkonstante  $\tau_1$  um den Faktor drei.

Für die Aktivierungsenergien ergeben sich Werte von  $E_{A1} = (169 \pm 16)$  meV für  $k_1$  bzw.  $E_{A2} = (98 \pm 9)$  meV für  $k_2$ . Diese niedrigen Werte für die Aktivierungsenergien sprechen

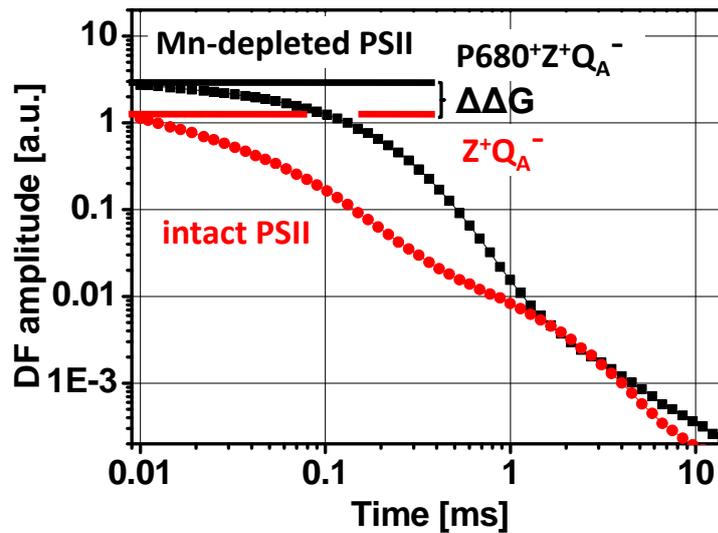


Abb. 7.4: Bestimmung des  $\Delta G(Chl^* - P680^+Y_Z^+Q_A^-)$ -Wertes. Die rote Kurve zeigt den Fluoreszenzzerfall nach dem dritten Blitz in intakten PSII-Proben; der Fluoreszenzpegel bei  $10 \mu s$  reflektiert das Energieniveau des  $Y_Z^+Q_A^-$ -Zustands relativ zum angeregten Zustand. Hierfür wurde ein Wert von  $-429 \text{ meV}$  ermittelt [Grabolle and Dau, 2005]. Bei der unter denselben apparativen Bedingungen gemessenen schwarzen Kurve an PSII-Proben ohne Mangankomplex spiegelt der  $10 \mu s$ -Pegel den Zustand  $P680^+Y_Z^+Q_A^-$  wider. Aus dem Unterschied der beiden Kurven wurde eine Differenz in der Gibbs'schen freien Energie von ca.  $20 \text{ meV}$  ermittelt. Somit beträgt die Differenz der Gibbs'schen freien Energie zwischen angeregtem Zustand der Antennen-Chlorophyll und dem  $P680^+Y_Z^+Q_A^-$ -Zustand  $-410 \text{ meV}$  ( $22^\circ \text{C}$ ).

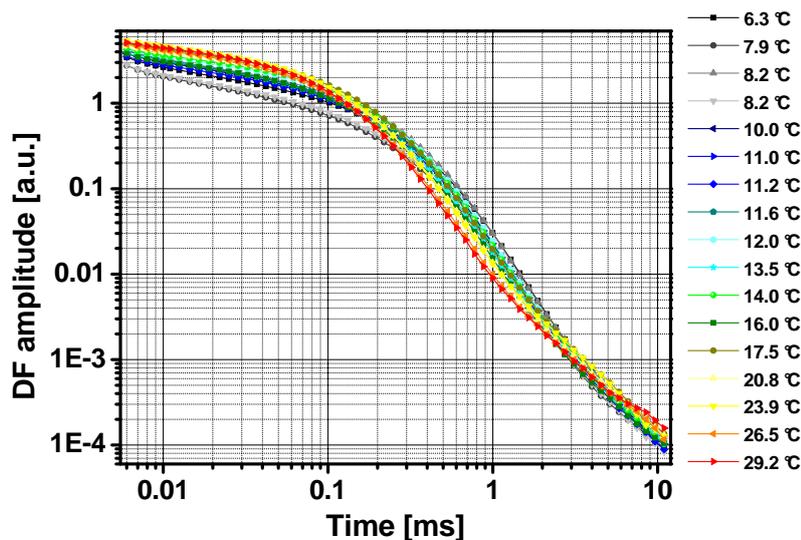


Abb. 7.5: Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz in PSII-Proben ohne Mangankomplex nach dem vierten Blitz in Abhängigkeit von der Temperatur bei  $\text{pH } 8,0$ .

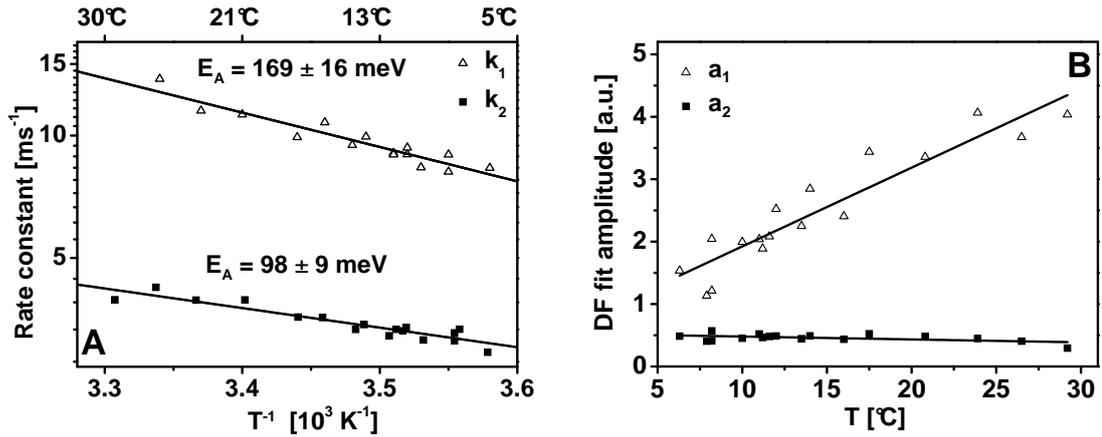


Abb. 7.6: Temperaturabhängigkeit der  $P680^+Q_A^-$ -Rekombination (Ratenkonstanten  $k_1$  und  $k_2$  und die zugehörigen Amplituden  $a_1$  und  $a_2$ ) in Mn-befreiten PSII-Proben bei pH 8,0 mittels Messungen der verzögerten Fluoreszenz. A: Die aus den Arrheniusplots erhaltenen Aktivierungsenergien betragen für  $E_{A,1} = (169 \pm 16) \text{ meV}$  mit dem Frequenzfaktor  $\nu_1 = 9,0 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $E_{A,2} = (98 \pm 9) \text{ meV}$  und  $\nu_2 = 1,9 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ . B: Die zugehörigen Amplituden  $a_1$  und  $a_2$ .

$E_A$ [meV]	pH	Probe	Technik	Literatur
325	7,2	Spinat-Chloroplasten	Absorption	[Döring, 1975]
150	7,6	Spinat-Chloroplasten	Absorption	[Reinman and Mathis, 1981]
160	6,6	Spinat-Chloroplasten	Elektro- lumineszenz	[Gorkom et al., 1986]
$k_1$ : 170 $k_2$ : 100	8,0	Spinat-Membranpartikel	Verzögerte Fluoreszenz	diese Arbeit

Tab. 7.2: Vergleich der Aktivierungsenergien für die  $P680^+Q_A^-$ -Rekombination.

dafür, dass es sich bei diesem Rekombinationsprozess um die direkte Rekombination von  $P680^+$  und  $Q_A^-$  handelt und sie nicht über den Zustand  $P680^+Phe^-$  verläuft, wie im weiteren Verlauf ausführlicher diskutiert wird.

Angaben aus der Literatur sind in Tabelle 7.2 dargestellt und in guter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten. Eine Ausnahme bildet die Veröffentlichung von [Döring, 1975] mit deutlich höherer Aktivierungsenergie, allerdings bestehen Unterschiede in der Probenherstellung und die Zuordnung der Messwerte zu ihrer zugrunde liegenden Reaktion ist nicht eindeutig [Gorkom et al., 1986].

## 7.2 Untersuchung der $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination

Wird der Elektronentransfer zum sekundären Chinonakzeptor  $Q_B$  von einem Inhibitor blockiert (siehe auch Abschnitt 5.1), kommt es zu einer Rekombination des primären Chinonakzeptors  $Q_A^-$  mit einer Redoxkomponente der PSII-Donorseite. Dies ist bei intakten Proben nach dem ersten Blitz der  $S_2$ -Zustand, in Proben ohne Mangankomplex rekombiniert  $Q_A^-$  mit  $Y_Z^+$ . Für diese Messungen wurde die Inhibierung des Elektronentransfers  $Q_A^- \rightarrow Q_B$  durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  DCMU erreicht. Dieser Wert liegt deutlich über der Bindungskonstanten von DCMU, die etwa 1  $\mu\text{M}$  beträgt (siehe Abb. C.2 im Anhang).

Aus Messungen von Absorptionsänderungen des  $Y_Z^+$ -Signals von *Synechocystis* 6803-Proben bei pH 7,5 wurde die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  für die  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination zu 80 ms bestimmt [Metz et al., 1989]. Gleichzeitig verschwindet 75 % des  $Q_A^-$ -Signals. In den verbleibenden 25 % der Reaktionszentren wurde  $Y_Z^+$  daher von einem alternativen und weiter entfernten Elektronendonator reduziert oder es wurde überhaupt nicht gebildet, da  $P680^+$  auf anderem Wege rereduziert wurde. Die restlichen 25 % des  $Q_A^-$ -Signals werden schließlich aufgrund langsamer Prozesse abgebaut, die hier nicht näher betrachtet werden sollen.

Ähnliche Ergebnisse erbrachten Absorptionsmessungen bei den Wellenlängen 315 nm ( $Q_A^-$ ) bzw. 292 nm ( $Y_Z^+$ ) in *Chlamydomonas*-Core-Partikeln [Rappaport and Lavergne, 1997]. Sie zeigten einen biphasischen Zerfall des  $Q_A^-$ -Signals, während der  $Y_Z^+$ -Zerfall mit nur einer Phase beschreibbar war, die der schnellen Phase des  $Q_A^-$ -Zerfalls entsprach. Daraus wurde geschlossen, dass ein Teil des  $Q_A^-$  nicht aufgrund Rekombination mit  $Y_Z^+$  zerfällt, da  $Y_Z^+$  vermutlich noch auf einem anderen Weg reduziert wird, der mit der Rekombination konkurriert. Auf der Suche nach diesem konkurrierenden Donor für  $Y_Z^+$  konnten die Autoren ausschließen, dass es sich um reduzierte Formen von exogenen Akzeptoren oder Cytochrom  $b_{559}$  handelt. Möglich sei, dass ein Chlorophyll (Chl-z) oder bei der Entfernungszurück übriggeliebene Manganionen oxidiert werden.

### Abhängigkeit vom pH-Wert

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination wurden Messungen der prompten Fluoreszenz in Anwesenheit von DCMU durchgeführt. In Abbildung 7.7 sind die normierten Zerfälle im pH-Bereich von 4,0 bis 8,0 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass  $Q_A^-$  im alkalischen Bereich eine erhöhte Stabilität aufweist. Dies lässt sich anhand des Verschwindens von  $Y_Z^+$  in diesem pH-Bereich erklären.  $Y_Z^+$  steht somit nur noch partiell für eine Rekombination mit  $Q_A^-$  zur Verfügung (siehe kompetitives Modell von [Rappaport and

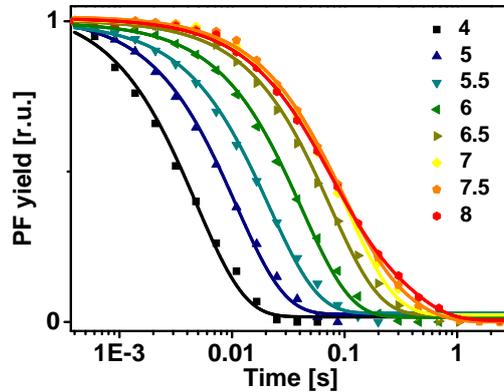


Abb. 7.7:  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination. Prompte Fluoreszenz-Messungen in Anwesenheit von  $100\ \mu\text{M}$  DCMU bei Raumtemperatur. Normierte Zeitverläufe im pH-Bereich von 4,0 bis 8,0. Die Symbole zeigen die gemessenen Werte, die Linien Kurvenanpassungen mit einer Exponentialfunktion. Für pH-Werte oberhalb 7,5 wurde eine biexponentielle Funktion verwendet.

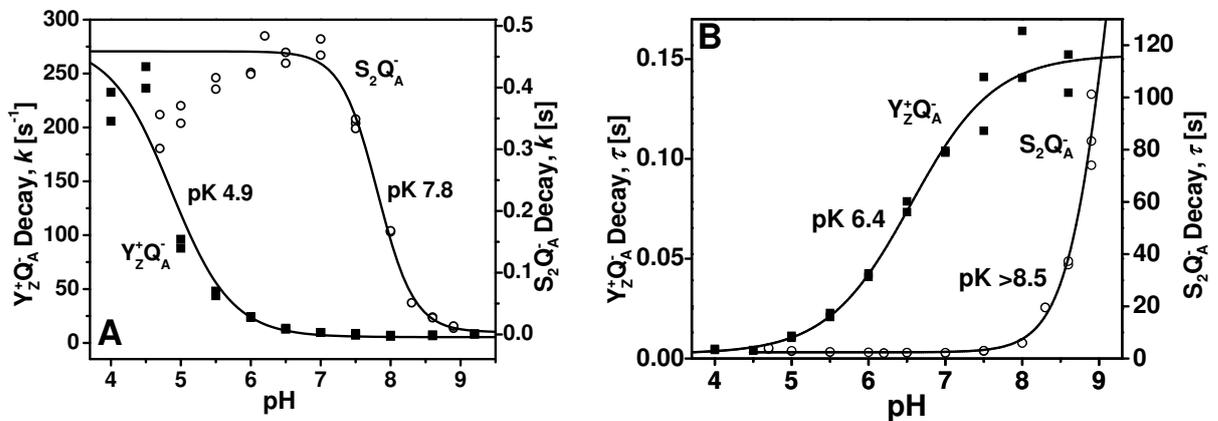


Abb. 7.8:  $Y_Z^+Q_A^-$ - und  $S_2Q_A^-$ -Rekombination. Die Symbole geben jeweils die aus den Kurvenanpassungen der Messungen der Quantenausbeute der prompten Fluoreszenz ermittelten Werte an, die durchgezogenen Linien die Bestimmung der pH-Abhängigkeit mit einer Henderson-Hasselbalch-Gleichung. A) Die aus der Simulation erhaltene Ratenkonstanten für die  $Y_Z^+Q_A^-$ - sowie die  $S_2Q_A^-$ -Rekombination (mittlere Ratenkonstante, siehe Gleichung 2.10) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Zur Ermittlung des pK-Werts der  $S_2Q_A^-$ -Rekombination wurde die Ratenkonstanten für  $\text{pH} < 6,5$  nicht berücksichtigt. B) Die aus der Simulation erhaltene Zeitkonstanten für die  $Y_Z^+Q_A^-$ - sowie die  $S_2Q_A^-$ -Rekombination (mittlere Zeitkonstante, siehe Gleichung 2.10) in Abhängigkeit vom pH-Wert (reziproke Werte zu A).

Lavergne, 1997]). In Abb. 7.8A (schwarze Quadrate) wurde bei Auftragung der Ratenkonstanten  $k$  ermittelt, dass dieser Stabilisierungseffekt mit einem pK-Wert von 4,9 zusammenhängt. Trägt man dagegen die Zeitkonstanten  $\tau$  über dem pH-Wert auf, wie es in manchen Literaturveröffentlichungen ebenfalls gehandhabt wird, so ergibt sich jedoch ein pK-Wert von  $6,4 \pm 0,1$  (Abb. 7.8B). Diese beiden aus demselben Datensatz gewonnenen Werte stehen im (scheinbaren) Widerspruch zueinander, dessen Ursache in der Bildung der Kehrwerte der Raten- bzw. Zeitkonstanten liegt. Mathematisch nachvollziehen lässt sich folgende Betrachtung der Ratenkonstanten:

$$k = k_0^{BH} \cdot \frac{[BH]}{[B]_{\text{gesamt}}} + k_0^{B-} \cdot \frac{[B-]}{[B]_{\text{gesamt}}} \quad (7.2)$$

mit  $k_0^{BH} \gg k_0^{B-}$ , wobei die Brüche das Verhältnis der protonierten Basen (BH) bzw. der unprotonierten Basen (B-) zu allen Basen (B) und  $k_0^{BH}$  und  $k_0^{B-}$  die jeweiligen Gleichgewichtskonstanten angeben. Die Auftragung der Zeitkonstanten über den pH-Wert ist daher zu verwerfen. In dieser Arbeit wurden pK-Werte dennoch auf beide Weisen ermittelt, um einen Vergleich mit den in der Literatur genannten Werten zu ermöglichen.

Bei der im Anschluss an die  $Y_Z$ -Oxidation stattfindenden Protonenfreisetzung ist sowohl die zugehörige Zeitkonstante als auch der Anteil der pro PSII-Reaktionszentrum freigesetzten Protonen vom pH-Wert abhängig [Rappaport and Lavergne, 1997; Renger and Voelker, 1982]. Die Protonenfreisetzung hat wiederum einen direkten Zusammenhang mit der pH-Abhängigkeit der Zeitkonstante der  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination. Vermutlich senkt die  $Y_Z$ -Oxidation den pK-Wert einer in der Nähe des Tyrosins liegenden, protonierten Gruppe ab und löst damit die Deprotonierung dieser Gruppe aus. Durch die Deprotonierung wird aufgrund der Coulombwechselwirkung die Energielücke der Gibbs'schen freien Energie  $\Delta G(Y_Z^+P680 - Y_ZP680^+)$  beeinflusst, was sich dann auf die  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination auswirkt. Mit zunehmendem pH-Wert steigt der Deprotonierungsgrad der Gruppe.

Mit der  $Y_Z$ -Oxidation ist vermutlich auch eine Deprotonierung von  $Y_Z$  selbst verbunden, wobei das Proton über eine Wasserstoffbrücke in der Nähe des Tyrosins gebunden bleibt und nach der Reduktion des Tyrosins wieder daran bindet. Als Protonenakzeptor wird ein Stickstoff des Histidins 190 (D1) vermutet, so dass nach der  $Y_Z$ -Oxidation der Komplex  $[Y_Z^\bullet - O \cdots H - N - \text{His190}]$  gebildet wird [Mamedov et al., 1998; Hays et al., 1998; Ahlbrink et al., 1998; Rappaport and Lavergne, 2001; Junge et al., 2002]. Bei Re-Reduktion von  $Y_Z$  bewegt sich das Proton dann zum phenolischen Sauerstoff des  $Y_Z$  zurück. Ob dieser Prozess bei jedem pH-Wert in gleicher Weise abläuft, ist noch ungeklärt. Eine Freisetzung des phenolischen Protons in Mn-veramtem PSII kann zurzeit nicht ausgeschlossen werden.

Aus einer Studie an *Chlamydomonas reinhardtii*-Proben wurden Rekombinationszeiten in

derselben Größenordnung wie in dieser Arbeit ermittelt ( $\tau_{\text{pH}5,5} = 13 \text{ ms}$ ;  $\tau_{\text{pH}8,5} = 150 \text{ ms}$ ) [Mamedov et al., 1998]. Der in dieser Veröffentlichung anhand Auftragung der Zeitkonstanten ermittelte pK-Wert ist im Vergleich zum hier vorgestellten Ergebnis jedoch um ca. eine Einheit nach oben verschoben und beträgt 7,6. Dieser Unterschied könnte sich zum einen dadurch erklären lassen, dass ein anderer Organismus untersucht wurde. Zum anderen wurde bei den Untersuchungen ein Messpuffer ohne  $\text{MgCl}_2$  verwendet (5 mM bei den hier vorgestellten Messungen, siehe Anhang A). Aus Absorptionsmessungen an sowohl Membran- als auch Core-Partikelproben (ebenfalls *C. reinhardtii*) ist bekannt, dass die Anwesenheit von  $\text{MgCl}_2$  den pK-Wert um genau eine Einheit zu niedrigeren Werten verschiebt [Rappaport and Lavergne, 1997]. Diese Autoren ermittelten für die Membranpartikelproben einen pK-Wert von 5,1 (Auftragung der Ratenkonstanten), der - im Rahmen der Genauigkeit der Messungen - ebenfalls in Übereinstimmung mit dem hier ermittelten Wert von 4,9 liegt.

## $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ -Rekombination

Zum Vergleich wurde auch die prompte Fluoreszenz in Anwesenheit von DCMU an intakten Proben gemessen (siehe Abb. C.3). Der beobachtete Fluoreszenzzerfall entspricht dabei der  $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ -Rekombination und kann mit einer Summe aus zwei Exponentialfunktionen angepasst werden [Cuni et al., 2004]. Die Zeitkonstante  $\tau_1$  der schnellen Phase beträgt im pH-Bereich 5,0–7,5 ca. 0,6–1,0 s und die Zeitkonstante der langsamen Phase  $\tau_2$  liegt zwischen 3,1–4,7 s (siehe Abb. C.4A). Die langsamere Phase dominiert dabei mit ca.  $60 \pm 5 \%$  anteilmäßig die schnellere Phase über einen weiten pH-Bereich (siehe Abb. C.4B).

Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit einer Studie an *Chlamydomonas reinhardtii*-Proben bei einem pH-Wert 7,2, bei der die schnelle Phase mit 1 s und die langsame Phase mit ca. 5 s ermittelt sowie der Anteil der schnellen Phase auf ca. 35 % beziffert wurde [Cuni et al., 2004]. Die Autoren gehen dabei nicht von einer fortschreitenden Stabilisierung der Ladungsseparierung im Wettbewerb mit der Rekombination aus, sondern eher von einem heterogenen Zustand aus zwei oder mehreren Konformationen mit unterschiedlichen Rekombinationszeiten.

Vergleicht man die beiden Zustände  $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$  und  $\text{Y}_\text{Z}^+\text{Q}_\text{A}^-$  miteinander, so lässt sich feststellen, dass der Zustand  $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$  erwartungsgemäß wesentlich stabiler ist als  $\text{Y}_\text{Z}^+\text{Q}_\text{A}^-$ . Betrachtet man explizit die pH-Abhängigkeit, so fällt auf, dass die mittlere Zeitkonstante der  $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ -Rekombination im Gegensatz zur  $\text{Y}_\text{Z}^+\text{Q}_\text{A}^-$ -Rekombination in einem breiten pH-Bereich konstant bleibt und sich erst bei höheren pH-Werten (ab ca. pH 8,0) deutlich verlangsamt (siehe Abb. 7.7 und 7.8). Dies entspricht den Ergebnissen von Thermolumineszenz- [Vass and Inoue, 1986] und Absorptionsmessungen [Buser et al., 1992].

## Abschätzung von $\Delta\Delta G(\text{Chl}^* - Y_Z^+Q_A^-)$

Betrachtet man den Zerfall der verzögerten Fluoreszenz nach dem ersten Blitz in PSII-Proben ohne Mangankomplex in Anwesenheit von DCMU bei einem pH-Wert von 6,2, so erreicht die Fluoreszenzintensität nach ca. 1 ms ein Plateauniveau, welches dem Zustand  $Y_Z^+Q_A^-$  entspricht. Bei den pH-Werten 4,5 und 8,0 werden diese Plateaus etwas früher bzw. etwas später erreicht (siehe Abb. 7.9). Aus dem jeweiligen Vergleich mit dem 10  $\mu\text{s}$ -Pegel nach dem dritten Blitz in intakten PSII-Proben lässt sich die Differenz der freien Gibbs'schen Energie bestimmen (siehe Abschnitt 2.3.2).

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, liegt der Zustand  $Y_Z^+Q_A^-$  in den Mn-befreiten PSII-Proben bei allen pH-Werten deutlich unter dem in intakten PSII-Proben. Für pH 8,0 ist die Absenkung am stärksten (ca. 180 meV), für pH 4,5 mit  $\Delta\Delta G = 100$  meV weniger stark ausgeprägt. Bei pH 6,2 beträgt  $\Delta\Delta G$  zwischen beiden Zuständen 150 meV. Dieser Wert liegt in guter Übereinstimmung mit dem durch Redoxtitration ermittelten Potentialunterschied von 145 mV für das  $Q_A/Q_A^-$ -Redoxpotential in Spinatproben (intakte Proben:  $E_A = -80$  mV; Proben ohne Mangankomplex: +65 mV) [Krieger et al., 1995]. Neuere Messungen an PSII-Proben der Cyanobakterien *Thermosynechococcus elongatus* ergaben einen Potentialunterschied von 120 mV (intakte Proben:  $E_A = -60$  mV; Proben ohne Mangankomplex: +60 mV) [Ido et al., 2011]. Die Absenkung des  $Y_Z^+Q_A^-$ -Energieniveaus ist somit in erster Linie durch eine Verschiebung des Redoxpotentials des Akzeptors  $Q_A$  erklärbar.

Betrachtet man die Differenz der Gibbs'schen freien Energie zum angeregten Antennenzustand  $\text{Chl}^*$ , so ergeben sich unter Anwendung des in 2.3.2 beschriebenen Rationals für die Mn-befreiten PSII-Proben die Werte

- $\Delta\Delta G(\text{Chl}^* - Y_Z^+Q_A^-)(\text{pH } 4,5) = -530$  meV,
- $\Delta\Delta G(\text{Chl}^* - Y_Z^+Q_A^-)(\text{pH } 6,2) = -580$  meV,
- $\Delta\Delta G(\text{Chl}^* - Y_Z^+Q_A^-)(\text{pH } 8,0) = -610$  meV.

## Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeit der  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination wurde sowohl für pH 4,5 als auch für pH 8,0 im Bereich von 4 bis 31 °C gemessen (siehe Abb. 7.10). Die aus der Arrheniusauftragung für pH 4,5 ermittelte Aktivierungsenergie  $E_A$  von  $(372 \pm 36)$  meV liegt deutlich unter den bei pH 8,0 ermittelten Wert von  $(565 \pm 26)$  meV (siehe Abb. 7.11). Dieses Resultat ist kompatibel mit einer Studie zeitaufgelöster EPR-Messungen [Shigemori et al., 1997], welche zum Ergebnis hatte, dass die Aktivierungsenergien pH-abhängig sind und sich in zwei

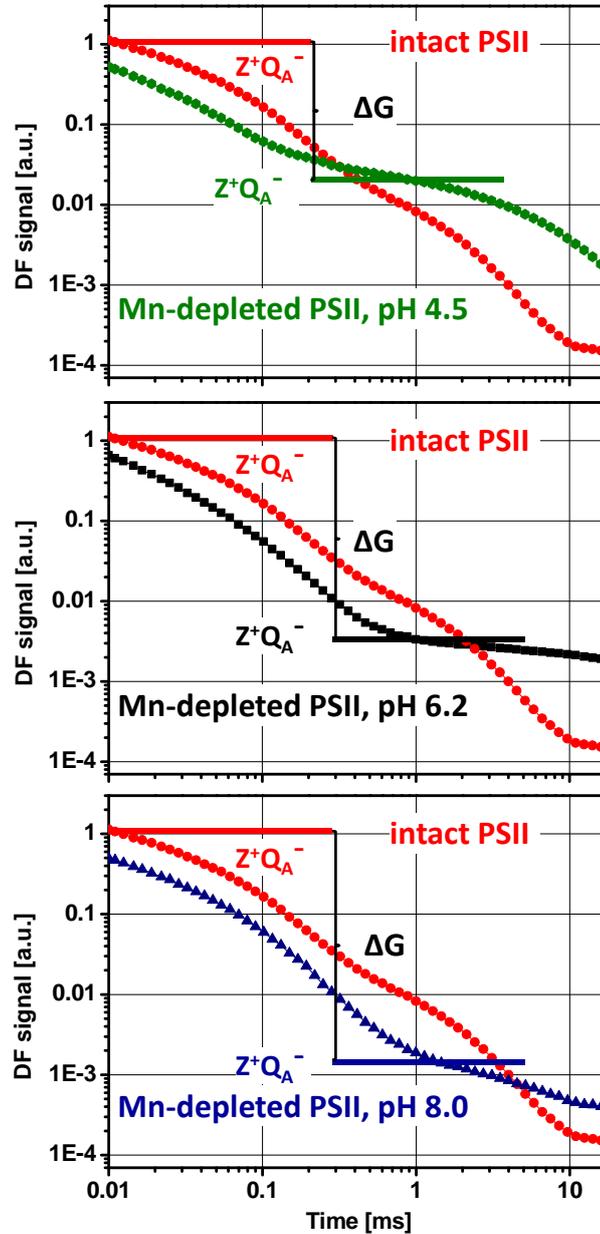


Abb. 7.9: Ermittlung von  $\Delta G(\text{Chl}^* - Y_Z^+ Q_A^-)$  mit Hilfe von Messungen der verzögerten Fluoreszenz. Die roten Kurven zeigen jeweils den Zerfall der verzögerten Fluoreszenz nach dem dritten Blitz in intakten PSII-Proben bei pH 6,2. Der Fluoreszenzpegel bei  $10 \mu\text{s}$  entspricht dabei dem  $Y_Z^+ Q_A^-$ -Zustand. Der  $Y_Z^+ Q_A^-$ -Zustand in PSII-Proben ohne Mangankomplex ist für verschiedene pH-Werte dargestellt. Die Plateauwerte wurden als Wendepunkte unter Zuhilfenahme der Differenzierungsfunktion in Origin ermittelt. Oben: pH 4,5 (Plateau bei ca.  $610 \mu\text{s}$ ), Mitte: pH 6,2 (Plateau bei ca. 1 ms), unten: pH 8,0 (Plateau bei ca. 1,4 ms). Alle gezeigten Kurven sind unter denselben Bedingungen (identische Messapparatur, 10 mg Chl/ml,  $22^\circ \text{C}$ ) aufgenommen worden.

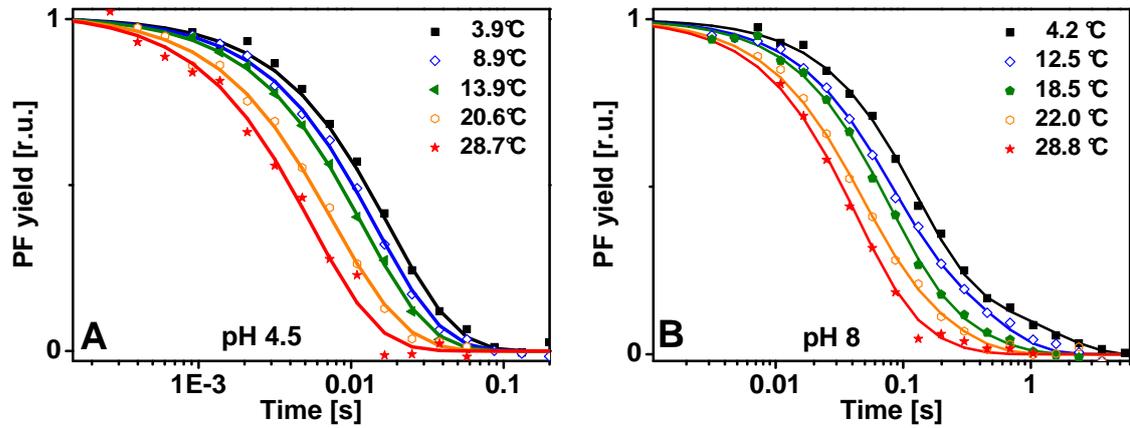


Abb. 7.10:  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination in Mn-freien PSII. Die gezeigten Zeitverläufe der prompten Fluoreszenz wurden für DCMU-inhibierte PSII nach Anregung mit einem Laserblitz aufgenommen. A) Die Symbole zeigen die gemessenen Werte bei pH 4,5, die Linien Kurvenanpassungen mit einer Exponentialfunktion. B) Die Symbole zeigen die gemessenen Werte bei pH 8, die Linien Kurvenanpassungen mit zwei Exponentialfunktionen.

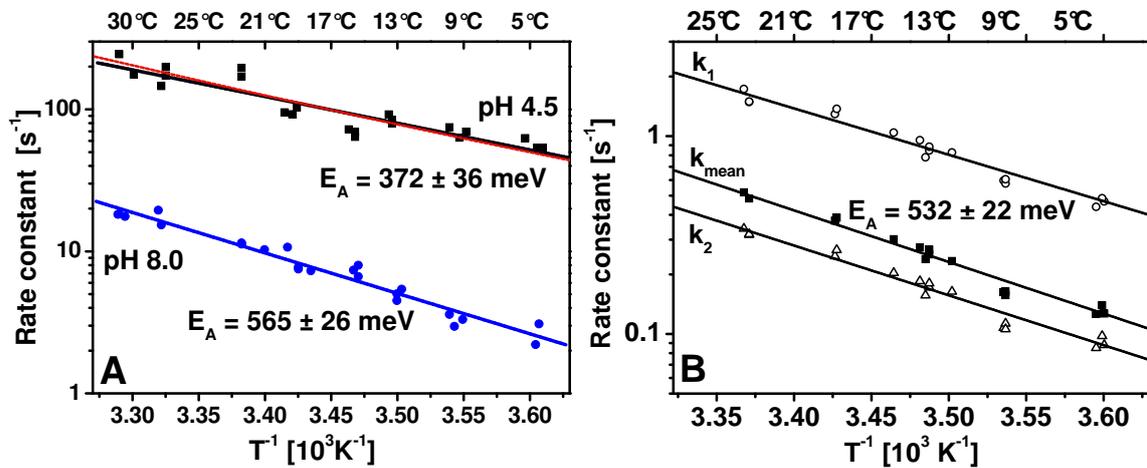


Abb. 7.11: A) Arrheniusplots für die  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination in Mn-freien PSII bei den pH-Werten 4,5 (schwarz) und 8 (blau). Die ermittelten Aktivierungsenergien für pH 4,5 betragen  $372 \pm 36$  meV (Frequenzfaktor:  $3,0 \cdot 10^8$  s $^{-1}$ ) und für pH 8,0  $565 \pm 26$  meV (Frequenzfaktor:  $4,7 \cdot 10^{10}$  s $^{-1}$ ). Alternativ ist für pH 4,5 noch eine Kombination ( $k = \nu_1 \cdot e^{-E_{A1}/k_B T} + \nu_2 \cdot e^{-E_{A2}/k_B T}$ ) aus zwei verschiedenen Aktivierungsenergien  $E_{A1} = 480$  meV und  $E_{A2} = 220$  meV eingezeichnet (rot gestrichelt). Die damit verbundenen Frequenzfaktoren sind  $\nu_1 = 1,6 \cdot 10^{10}$  s $^{-1}$  und  $\nu_2 = 1,9 \cdot 10^5$  s $^{-1}$ . B) Arrheniusplots für die  $S_2Q_A^-$ -Rekombination in intakten PSII bei pH 6,2. Es ergibt sich eine Aktivierungsenergie von  $E_A = 532 \pm 22$  meV (Frequenzfaktor:  $5,7 \cdot 10^8$  s $^{-1}$ ).

$E_A$ (meV)	pH	Proben	Literatur
578	7,6	Spinat-Thylakoide	[Kanazawa et al., 1992]
610	7,2	Synechocystis 6803	[Rappaport et al., 2002]
625	7,2	Chlamydomonas reinhardtii	[Cuni et al., 2004]
532	6,2	Spinat-BBY	diese Arbeit

Tab. 7.3: Vergleich der Aktivierungsenergien für die  $S_2Q_A^-$ -Rekombination.

Bereiche einteilen lassen: Zwischen pH 5,5 und 6,2 liegen sie im Bereich von 310 bis 341 meV, zwischen pH 6,5 und 7,5 im Bereich von 402 bis 446 meV. Dazwischen erfolgt ein Sprung von ca. 50 meV, der laut der Autoren mit Histidin 190 zusammenhängen könnte.

Zum Vergleich wurde auch die Temperaturabhängigkeit für die  $S_2Q_A^-$ -Rekombination in intakten Proben bei pH 6,2 untersucht. Dazu wurde die variable Quantenausbeute der prompten Fluoreszenz gemessen und die Zerfallskurven (Abb. C.5A) wie im vorherigen Abschnitt erläutert biexponentiell angepasst. Der Anteil der Amplitude der schnellen Phase steigt dabei bei höherer Temperatur an (siehe Abb. C.5B). In Abb. 7.11B sind beide Ratenkonstanten sowie die daraus ermittelte mittlere Ratenkonstante  $k_{\text{mean}}$  dargestellt. Die berechnete Aktivierungsenergie liegt bei ca. 530 meV und der Frequenzfaktor bei  $5,7 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ .

Die in der Literatur berichteten Werte für die Aktivierungsenergie der  $S_2Q_A^-$ -Rekombination beruhen ebenfalls auf Messungen der prompten Fluoreszenz und liegen bei etwas höheren Werten als der in dieser Arbeit ermittelte Wert (siehe Tabelle 7.3). Die Ursache dafür könnte zum einen an den untersuchten Organismen liegen, zum anderen könnte auch der pH-Wert (hier pH 6,2, ca. 7,2 bei den anderen Untersuchungen) einen Einfluss haben.

### 7.3 Langsamer $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$ -Rekombinationsprozess

Betrachtet man die Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz nach zwei kurz aufeinanderfolgenden Blitzen (Blitzabstand 100 ms), so ist ersichtlich, dass der Zerfall nach dem zweiten und den folgenden Blitzen ein viel höheres Fluoreszenzniveau zeigt (siehe Abb. 7.1B) im Vergleich zum Zerfall nach Blitz 1 (Abb. 7.1A). Dies liegt an dem sich nach dem ersten Blitz gebildeten  $Y_Z^+$ , das den Elektronentransport auf der Donorseite verhindert. Je größer man den Blitzabstand zwischen beiden Blitzen wählt, desto weniger  $Y_Z^+$  ist vorhanden und desto mehr gleicht sich der Zerfall nach dem zweiten Blitz dem Zerfall nach dem ersten Blitz an (siehe Abb. 7.12A).

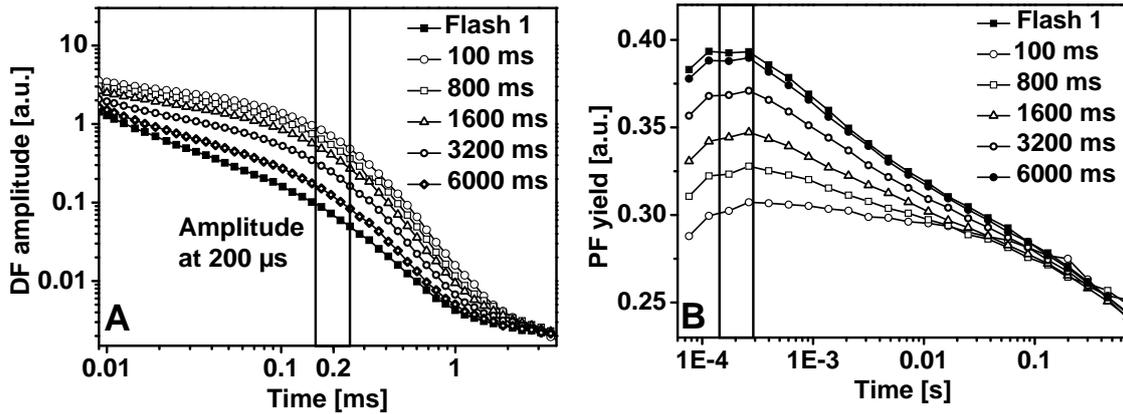


Abb. 7.12: Untersuchung des langsamen  $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$ -Rekombinationsprozesses mit Hilfe des Doppelblitzprotokolls (siehe Text). A) Dargestellt sind die Zerfälle der verzögerten Fluoreszenz nach dem ersten Blitz sowie nach dem zweiten Blitz, der nach dem in der Abbildung angegebenen Blitzabstand erfolgte. B) Messungen der prompten Fluoreszenz an PSII-Proben ohne Mangankomplex bei pH-Wert 8,0. Der jeweilige Blitzabstand zweier aufeinanderfolgender Blitze wurde dabei variiert und ist in der Abb. angegeben. Je enger zwei Blitze aufeinander folgen, desto mehr  $P680^+$  ist noch vorhanden, das das Fluoreszenzsignal auslöscht.

Mit Hilfe eines speziell entwickelten Blitzprotokolls (Doppelblitzprotokoll) kann diese langsame  $Y_Z^+$ -Reduktion untersucht werden. Dazu wird der Blitzabstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Blitzen sukzessive erhöht. Eine Wartezeit von 10 s jeweils vor dem ersten der beiden Blitze garantiert eine vollständige Relaxation des Systems. Es wurden bei allen Messungen folgende Blitzabstände gewählt: 100 ms, 140 ms, 200 ms, 280 ms, 400 ms, 550 ms, 800 ms, 1,1 s, 1,6 s, 2,2 s, 3,2 s, 4,4 s, 6,0 s, 7,0 s und 10 s. Zur Auswertung wurde schließlich das Fluoreszenzsignal bei  $200 \mu\text{s}$  nach dem jeweils zweiten Blitz über dem Blitzabstand aufgetragen. Mit demselben Blitzprotokoll wurden auch Messungen der prompten Fluoreszenz durchgeführt. Betrachtet man die PF-Kurven in Abb. 7.12B bei pH 8,0, so sieht man ein Ansteigen des PF-Pegels mit größer werdendem Blitzabstand. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die fluoreszenzlöschende Wirkung von  $P680^+$  (Quenching) bei zunehmendem Blitzabstand abnimmt.

## pH-Abhängigkeit der $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$ -Rekombination

Mit Hilfe des im vorherigen Abschnitt beschriebenen Blitzprotokolls wurde die pH-Abhängigkeit des langsamen Rekombinationsprozesses sowohl für die verzögerte als auch die prompte Fluoreszenz untersucht. In Abbildung 7.13 sind die normierten Zerfälle (Symbole) sowie deren Simulation mit einer Exponentialfunktion als durchgezogene Linie dargestellt. Da bei niedrigen pH-Werten bei einem Großteil der PSII-Proben bereits eine schnelle Rekombination stattgefunden hat, nehmen die Amplituden des langsamen Rekombinationsprozesses

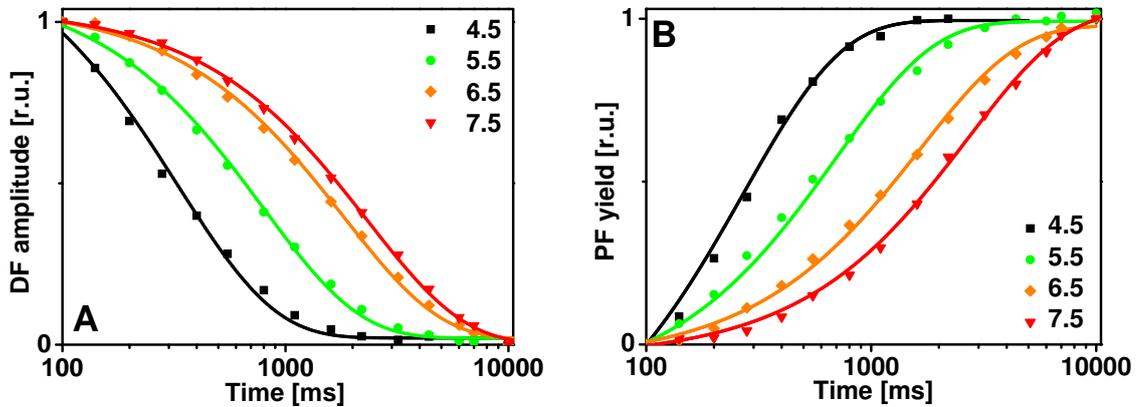


Abb. 7.13: Normierte DF-Kurven (A) und PF-Kurven (B), die die pH-Abhängigkeit der langsamen  $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$ -Rekombination in Mn-freien PSII bei Raumtemperatur zeigen. Die Symbole geben die gemessenen Werte (Amplitude bei  $200\mu\text{s}$  nach Blitzanregung) an, die durchgezogenen Linien entsprechen der Anpassung mit einer Exponentialfunktion.

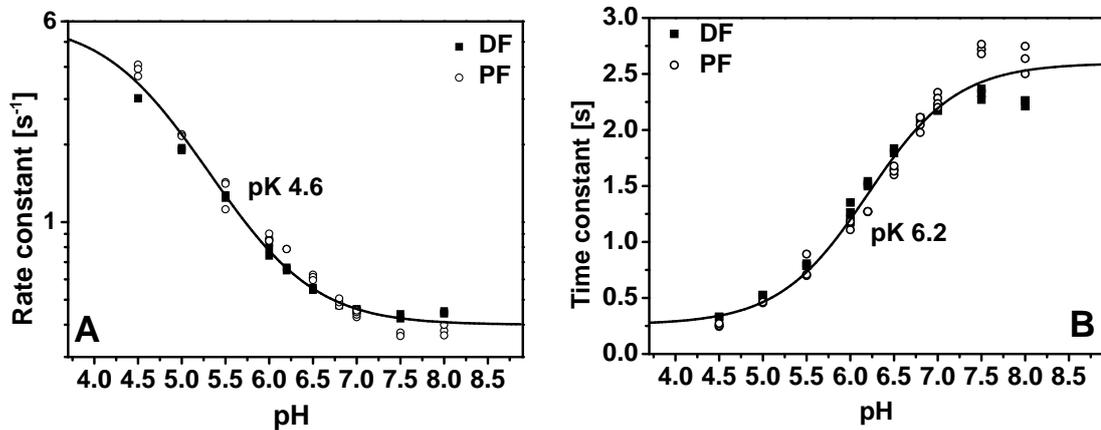


Abb. 7.14: pH-Abhängigkeit der langsamen  $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$ -Rekombination in Mn-freien PSII. Dargestellt sind die Ratenkonstanten (A) bzw. Zeitkonstanten (B), die aus der Anpassung der Zerfallskurven (Abb. 7.13) mit einer Exponentialfunktion sowohl für die Messungen der verzögerten als auch der prompten Fluoreszenz gewonnen wurden. Aus der Anpassung der pH-Abhängigkeit der Fit-Konstanten mit einer Henderson-Hasselbalch-Gleichung ergeben sich pK-Werte von 4,6 für die Ratenkonstanten und 6,2 für die Zeitkonstanten.

sowohl bei den Messungen der verzögerten als auch der prompten Fluoreszenz in diesem pH-Bereich ab, während sie im übrigen pH-Bereich nahezu konstant bleiben (siehe Abb. C.7). Dieses Ergebnis ist somit in Übereinstimmung mit dem in Abb. 7.3 dargestellten Ergebnis.

Die Abbildung 7.14 zeigt die Abhängigkeit der sowohl aus der verzögerten als auch der prompten Fluoreszenz ermittelten Raten- und Zeitkonstanten vom pH-Wert. Ähnlich wie bei der  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination ergibt die Simulation mit einer Henderson-Hasselbalch-Gleichung einen pK-Wert von  $4,6 \pm 0,3$  für die Ratenkonstanten und  $6,2 \pm 0,1$  für die Zeitkonstanten. Dies lässt vermuten, dass in beiden Fällen, also bei der  $Y_Z^+Q_A^-$ - und der  $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$ -Rekombination, dieselbe protonierbare Gruppe an der Rekombination beteiligt ist.

Die Gleichgewichtskonstante zwischen  $Q_A$  und  $Q_B$  stellt sich in den Mn-freien PSII-Proben vermutlich so ein, dass nach dem Elektronentransfer in einem ähnlichen Prozentsatz der PSII  $Q_A^-$  und  $Q_B^-$  vorhanden sind. Die Rekombination dieser beiden Ladungen mit der Donorseite lässt sich mit den hier vorgestellten Messungen beobachten. In den Zerfällen der prompten Fluoreszenz bei einer Temperatur von  $10^\circ\text{C}$  in Abb. 7.15 spiegelt sich dieser Rekombinationsprozess ebenfalls wider. Im Vergleich zur  $Q_A^-$ -Reoxidation in intakten PSII-Proben ist dieser Vorgang in den Mn-befreiten PSII-Proben deutlich verlangsamt, wobei eine Erhöhung des pH-Werts diesen Effekt noch verstärkt.

### Abschätzung von $\Delta\Delta G(\text{Chl}^* - Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-)$

Um eine Abschätzung für den Wert  $\Delta\Delta G(\text{Chl}^* - Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-)$  zu erreichen, wird die Annahme getroffen, dass sich der entsprechende Zustand ca. 10 ms nach der Blitzanregung eingestellt hat (siehe Abschnitt 2.3.2). Wie aus den Fluoreszenzzerfällen in Abb. 7.16 zu erkennen ist, hat sich bei allen schwarz dargestellten Fluoreszenzzerfällen (PSII ohne Mangankomplex) nach ca. 10 ms ein Plateauniveau eingestellt. Dieses Plateauniveau wurde unter Zuhilfenahme der Differenzierungsfunktion in Origin als Minimum der ersten Ableitung ermittelt. Aus dem Vergleich mit dem 10  $\mu\text{s}$ -Pegel nach dem dritten Blitz in intakten PSII-Proben (rote Kurve) lässt sich die Differenz der Gibbs'schen freien Energie berechnen und anschließend auf den angeregten Chlorophyllzustand beziehen. Für pH 6,2 beträgt  $\Delta\Delta G(\text{Chl}^* - Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-) = -625 \text{ meV}$  (Abb. 7.16). Für pH 8,0 beträgt der entsprechende Wert  $-660 \text{ meV}$  (ohne Abbildung).

### Temperaturabhängigkeit der $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$ Rekombination

Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der langsamen  $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$ -Rekombination wurde für die pH-Werte 6,2 und 8,0 durchgeführt und ergab jeweils relativ hohe Werte für

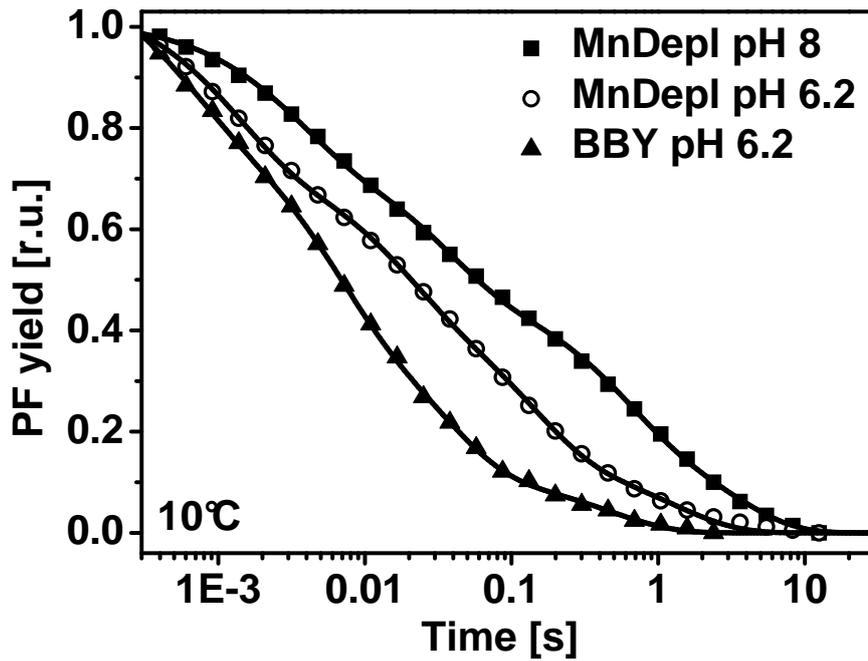


Abb. 7.15:  $Q_A^-$ -Zerfall bei  $T = 10^\circ\text{C}$ , bestimmt durch Messung der Ausbeute der prompten Fluoreszenz an Mn-befreiten PSII-Proben bei pH 8 (schwarze Quadrate), pH 6,2 (offene Kreise) sowie für intakte PSII-Proben bei pH 6,2 (schwarze Dreiecke). Der Zerfall in den PSII-Proben ohne Mangankomplex ist deutlich langsamer als in den intakten Proben. Die Ergebnisse der Simulationen mit jeweils einer Summe aus vier Exponentialfunktionen (durchgezogene Linien): "MnDepl pH 8":  $a_1 = 0,25, a_2 = 0,28, a_3 = 0,27, a_4 = 0,21, \tau_1 = 3,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}, \tau_2 = 3,4 \cdot 10^{-2} \text{ s}, \tau_3 = 5,3 \cdot 10^{-1} \text{ s}$  und  $\tau_4 = 3,1 \text{ s}$ ; "MnDepl pH 6,2":  $a_1 = 0,32, a_2 = 0,26, a_3 = 0,33, a_4 = 0,15, \tau_1 = 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}, \tau_2 = 1,6 \cdot 10^{-2} \text{ s}, \tau_3 = 1,3 \cdot 10^{-1} \text{ s}$  und  $\tau_4 = 1,27 \text{ s}$ ; "BBY pH 6,2":  $a_1 = 0,28, a_2 = 0,39, a_3 = 0,34, a_4 = 0,12, \tau_1 = 5,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}, \tau_2 = 5,3 \cdot 10^{-3} \text{ s}, \tau_3 = 3,3 \cdot 10^{-2} \text{ s}$  und  $\tau_4 = 0,46 \text{ s}$ .

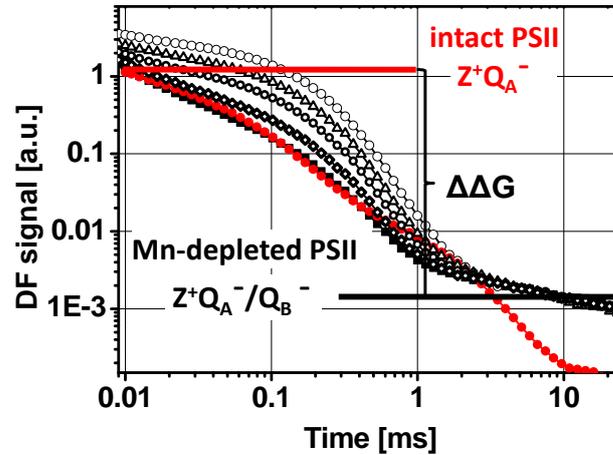


Abb. 7.16: Ermittlung von  $\Delta G(\text{Chl}^* - Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-)$  mittels verzögerter Fluoreszenz (bei pH 6,2). Die rote Kurve zeigt den Zerfall nach dem dritten Blitz in intakten PSII-Proben. Der Fluoreszenzpegel bei  $10 \mu\text{s}$  entspricht dabei dem  $Y_Z^+Q_A^-$ -Zustand. Die schwarzen Kurven zeigen Fluoreszenzzerfälle in PSII-Proben ohne Mangankomplex bei variierendem Blitzabstand (vgl. Abb. 7.12). Nach ca. 10 ms hat sich der Zustand  $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$  eingestellt.

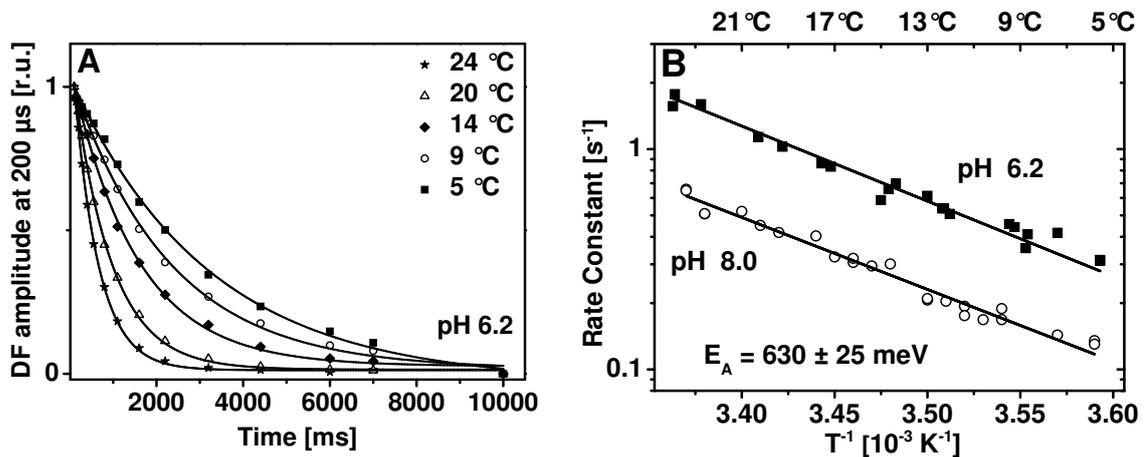


Abb. 7.17: Temperaturabhängigkeit der langsamen Rekombination. A) Anhand von Messungen der verzögerten Fluoreszenz ermittelte Zerfallskurven (Doppelblitz-Protokoll) in Mn-befreiten PSII-Proben in Abhängigkeit von der Temperatur bei pH 6,2. B) Arrheniusplots des langsamen Rekombinationsprozesses für die pH-Werte 6,2 und 8,0. Für pH 6,2 ergibt sich eine Aktivierungsenergie von  $632 \text{ meV}$  bei einem Frequenzfaktor von  $8,4 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$ , für pH 8 dieselbe Aktivierungsenergie bei  $2,7 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$ .

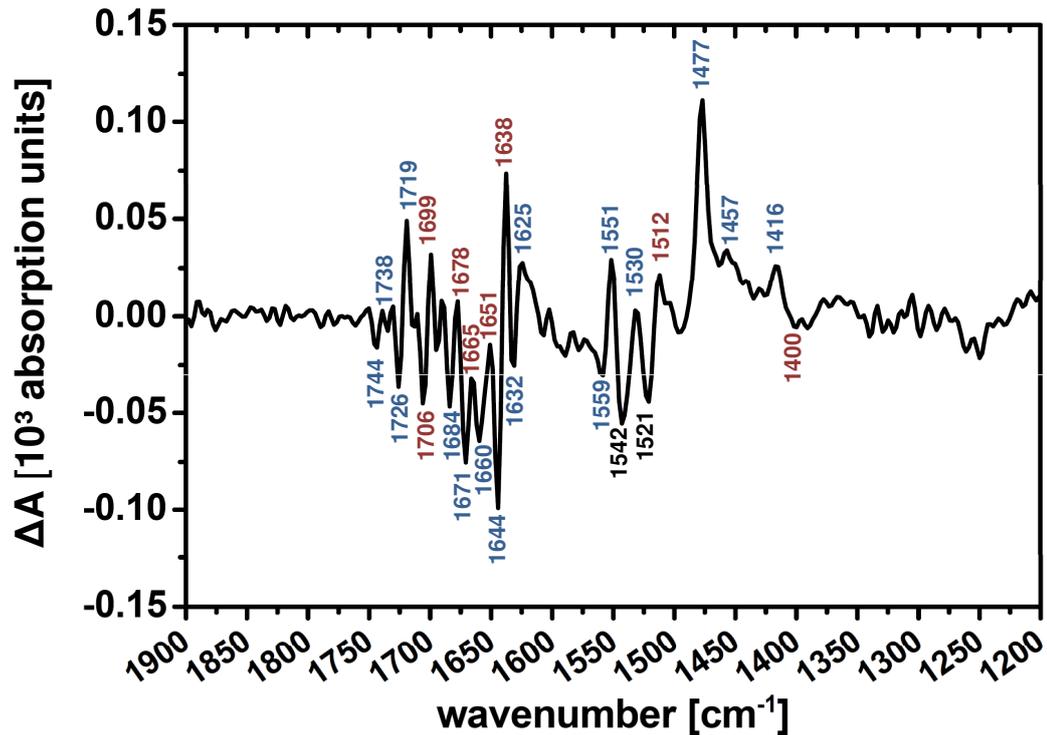


Abb. 7.18: FTIR-Differenzspektrum nach 77 ms bei pH 6,2 und 10°C. Die in die Abbildung eingefügten Wellenzahlen geben in Abstimmung mit den im Anhang 7.4 aufgelisteten Literaturangaben die Differenzsignale für  $Q_A^-/Q_A$  (in blau) und  $Y_Z^+/Y_Z$  (in rot) wieder. Bei den in schwarz eingezeichneten Wellenzahlen war keine eindeutige Zuordnung möglich.

die Aktivierungsenergien. Die Ergebnisse der Zerfallskurven für pH 6,2 sind in Abb. 7.17A in einer linearen Auftragung dargestellt.

Innerhalb des Fehlerbereichs ergab sich für beide pH-Werte dieselbe Aktivierungsenergie von 630 meV. Dieser Wert entspricht dem Wert, der für  $\Delta G(\text{Chl}^* - Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-)$  ermittelt wurde und ist höher als die bislang ermittelten Werte der anderen untersuchten Prozesse.

## 7.4 Verfolgung der langsamen Rekombination mit FT-Infrarot-Spektroskopie

Mit Hilfe der Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometrie (FTIR) lassen sich charakteristische Vibrationseigenschaften von Aminosäuren und Kofaktoren untersuchen, auf die bereits kleinste strukturelle Änderungen einen Einfluss haben. Reaktionsausgelöste FTIR-Differenzspektren, also die Differenz zwischen den Spektren nach und vor der jeweiligen

WZ	VZ	Merkmal	Organismus	Referenz
1107	–	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1157	+	$Y_D^\bullet/Y_D$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1252	–	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1365	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Noguchi et al., 1992] [Hienerwadel et al., 1996]
1399	–	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1417	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Noguchi et al., 1992] [Hienerwadel et al., 1996]
			Th. Elong.	[Suzuki et al., 2005]
1432	+	$Q_B^-/Q_B$	Th. Elong.	[Suzuki et al., 2005]
1446	+	$Q_B^-/Q_B$	Th. Elong.	[Suzuki et al., 2005]
1455	+	$Q_A^-/Q_A$	Th. Elong.	[Suzuki et al., 2005]
		$Q_B^-/Q_B$		
1456	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996] [Remy et al., 2004]
1458	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Berthomieu et al., 1990] [Noguchi et al., 1992]
1477	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Zhang et al., 1997]
1478	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Berthomieu et al., 1990] [Noguchi et al., 1992] [Hienerwadel et al., 1996] [Remy et al., 2004]
1480	+	$Q_B^-/Q_B$	Th. Elong.	[Suzuki et al., 2005]
1513	+	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1519	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996] [Remy et al., 2004]
1523	–	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1530	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1542	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1542	–	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1550	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Berthomieu et al., 1990] [Hienerwadel et al., 1996] [Remy et al., 2004]
1552	+	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1553	+	$Y_D^\bullet/Y_D$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1560	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Berthomieu et al., 1990] [Hienerwadel et al., 1996] [Remy et al., 2004]
1625	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1626	–	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1630	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Berthomieu et al., 1990] [Hienerwadel et al., 1996]
1630	+	$Y_D^\bullet/Y_D$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]

Tab. 7.4: Literaturübersicht der aus FTIR-Differenzspektren ermittelten Wellenzahlen in Mn-befreiten PSII-Proben. WZ: Wellenzahl in  $\text{cm}^{-1}$ , VZ: Vorzeichen

WZ	VZ	Merkmal	Organismus	Referenz
1632	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Remy et al., 2004]
1639	+	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1643	–	$Y_D^\bullet/Y_D$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1644	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996] [Remy et al., 2004]
1645	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Berthomieu et al., 1990]
1646	–	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1652	+	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1656	+	$Y_D^\bullet/Y_D$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1657	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996] [Remy et al., 2004]
1658	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Berthomieu et al., 1990]
1660	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1664	–	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1672	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Berthomieu et al., 1990] [Hienerwadel et al., 1996]
1673	–	$Q_A^-/Q_A$	Th. Elong	[Suzuki et al., 2005]
1679	+	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1682	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1697	+	$Y_D^\bullet/Y_D$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1699	+	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Zhang et al., 1997]
1700	+	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998]
1704	–	$Y_D^\bullet/Y_D$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1706	–	$Y_Z^\bullet/Y_Z$	Spinat	[Berthomieu et al., 1998] [Zhang et al., 1997]
1719	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Berthomieu et al., 1990] [Hienerwadel et al., 1996] [Remy et al., 2004]
1721	+	$Q_A^-/Q_A$	Th. Elong	[Suzuki et al., 2005]
1724	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Berthomieu et al., 1990] [Hienerwadel et al., 1996]
1733	+	$Y_D^\bullet/Y_D$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1738	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1740	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Noguchi et al., 1992]
	–		Th. Elong	[Suzuki et al., 2005]
1744	–	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]
1745	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Berthomieu et al., 1990]
1745	+	$Q_B^-/Q_B$	Th. Elong	[Suzuki et al., 2005]
1748	+	$Q_A^-/Q_A$	Th. Elong	[Suzuki et al., 2005]
1749	+	$Q_A^-/Q_A$	Spinat	[Noguchi et al., 1992]
1750	+	$Y_D^\bullet/Y_D$	Spinat	[Hienerwadel et al., 1996]

Tab. 7.5: Fortsetzung: Literaturübersicht der aus FTIR-Differenzspektren ermittelten Wellenzahlen in Mn-befreiten PSII-Proben. WZ: Wellenzahl in  $\text{cm}^{-1}$ , VZ: Vorzeichen.

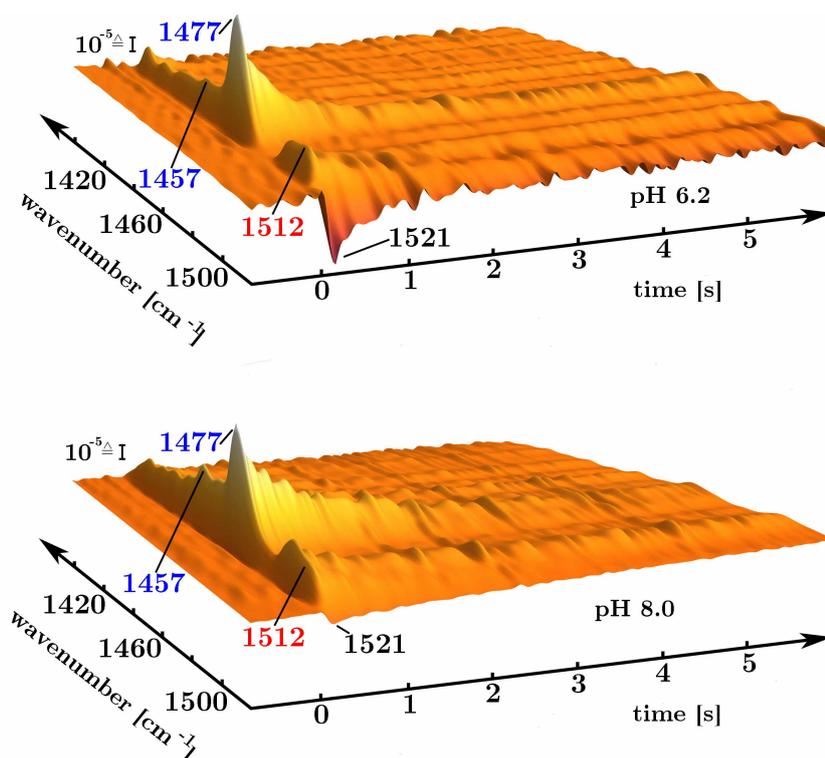


Abb. 7.19: Zeitabhängige FTIR-Differenzsignale in einer dreidimensionalen Darstellung für pH 6,2 (oben) und pH 8,0 (unten). Für jeden pH-Wert wurden ca. 500 Einzelspektren gemittelt, die Zeitauflösung betrug 77 ms. Klar zu erkennen ist der langsamere Zerfall des  $Q_A^-/Q_A$ -Signals (bei  $1477 \text{ cm}^{-1}$ ) bei höherem pH-Wert.

Reaktion, ermöglichen es Vibrationen einzelner chemischer Gruppen, die an der spezifischen Reaktion beteiligt sind, zu untersuchen [Berthomieu and Hienerwadel, 2009]. Die hier vorgestellten zeitabhängigen Messungen zur Untersuchung von PSII-Proben ohne Mangan-komplex wurden in Zusammenarbeit mit Björn Süss aus der AG Dau durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4 und [Süss, 2011]). Die Zeitabhängigkeit wurde dabei mit der sogenannten *Rapid-Scan-Technik* [Thibodeau et al., 1990] bei einer Zeitauflösung von 77 ms gemessen. Wie schon in den vorherigen Abschnitten erläutert, entsteht in diesen Proben nach der Laser-Blitzanregung und der primären Ladungstrennung schließlich das Radikalpaar  $Y_Z^+ Q_A^-$ , dem aufgrund des fehlenden Mn-Komplexes eine weitere Elektronenquelle fehlt und das daher wieder rekombiniert.

In der Abbildung 7.18 ist ein Differenzspektrum Mn-befreiter PSII-Proben 77 ms nach Anregung mit einem sättigenden Laserblitz dargestellt. Der Bereich zwischen den höheren Wellenzahlen  $1750$  und  $1900 \text{ cm}^{-1}$ , in dem keine reaktionsbedingten Signale zu erwarten sind, lässt eine Einschätzung über das Rauschverhältnis zu. Die charakteristischen Maxima und Minima im Wellenzahlbereich zwischen  $1400$  und  $1750 \text{ cm}^{-1}$  sind zum überwiegenden Teil den Differenzsignalen  $Q_A^-/Q_A$  (blaue Beschriftung) bzw.  $Y_Z^\bullet/Y_Z$  (rote Beschriftung) zuzuordnen und wurden durch Vergleich mit Literaturspektren ermittelt. In der Tabelle 7.4 befindet

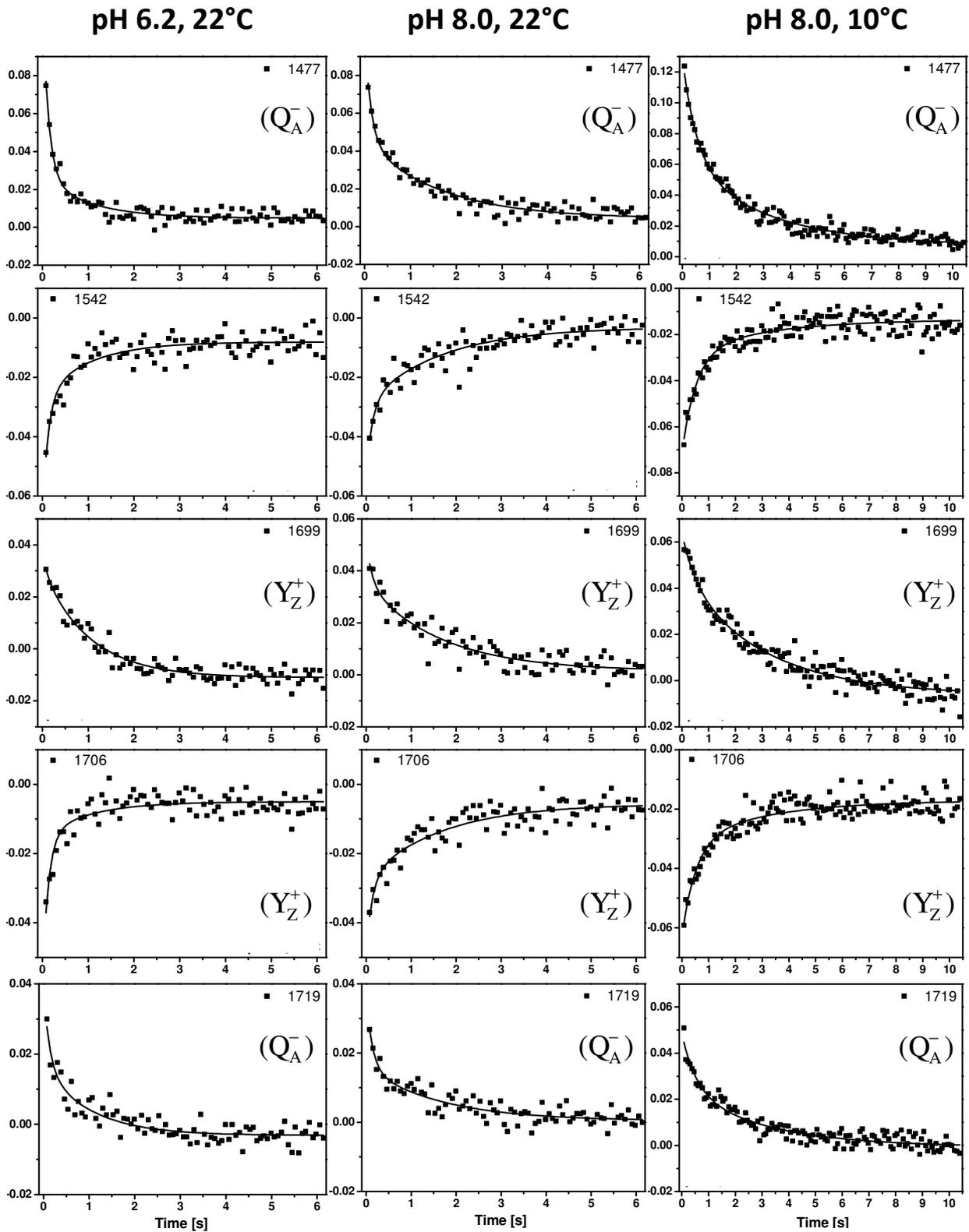


Abb. 7.20: Zeitverläufe des FTIR-Differenzsignals in Mn-befreiten PSII-Proben für verschiedene Wellenzahlen (von oben nach unten:  $1477\text{ cm}^{-1}$ ,  $1542\text{ cm}^{-1}$ ,  $1699\text{ cm}^{-1}$ ,  $1706\text{ cm}^{-1}$ ,  $1719\text{ cm}^{-1}$ ). Linke Spalte: pH 6,2,  $22^\circ\text{C}$ ,  $\tau_1 = 129\text{ ms}$ ,  $\tau_2 = 1,03\text{ s}$ ; mittlere Spalte: pH 8,0,  $22^\circ\text{C}$ ,  $\tau_1 = 136\text{ ms}$ ,  $\tau_2 = 1,66\text{ s}$ ; rechte Spalte: pH 8,0,  $10^\circ\text{C}$ ,  $\tau_1 = 526\text{ ms}$ ,  $\tau_2 = 3,07\text{ s}$ .

sich eine Übersicht über die in der Literatur berichteten Wellenzahlen, bei denen in Mn-befreiten PSII-Proben die Differenzsignale  $Q_A^-/Q_A$ ,  $Y_Z^\bullet/Y_Z$ ,  $Q_B^-/Q_B$  und  $Y_D^\bullet/Y_D$  gefunden wurden. Beim Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Peaks mit den Literaturangaben wurden die jeweiligen Wellenzahlen berücksichtigt, sofern sie innerhalb eines Fehlerbereichs von  $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$  lagen. Die Vorzeichen in den Indizes geben jeweils an, ob es sich um einen positiven oder einen negativen Peak im Differenzspektrum handelt.

Die Abbildung 7.19 zeigt die zeitabhängigen Messung der FTIR-Differenzspektren in einer dreidimensionalen Darstellung sowohl für pH 6,2 (linke Seite) als auch für pH 8,0 (rechte Seite) und erlaubt damit eine Übersicht über den gesamten Reaktionsverlauf einschließlich der Dunkelzeit vor der Blitzanregung. Wie in den Abb. 7.18 und 7.19 zu erkennen ist, nimmt das ausgeprägte Maximum bei ca.  $1477_+ \text{ cm}^{-1}$  eine besondere Stellung ein, da es verhältnismäßig wenig vom Rauschen beeinträchtigt ist.

Wählt man aus den Spektren gemäß Tabelle 7.4 diejenigen Wellenzahlen aus, die den  $Q_A^-/Q_A$ - und  $Y_Z^\bullet/Y_Z$ -Signalen entsprechen und trägt sie über der Zeit auf, so lassen sich Rückschlüsse über die jeweiligen Zerfälle und den Verlauf der  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination ziehen. Abbildung 7.20 zeigt die Zeitverläufe der FTIR-Differenzsignale für fünf solcher Wellenzahlen bei jeweils zwei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen. Ebenfalls sind in dieser Abbildung bereits die Ergebnisse des im weiteren Verlauf des Kapitels beschriebenen *globalen Fits* eingezeichnet. Wie zu erkennen ist, sind die FTIR-Signale sowohl vom pH-Wert als auch von der Temperatur abhängig. Die bereits aus den Fluoreszenzmessungen erhaltenen Ergebnisse bzgl. der Zeitkonstanten der Rekombination des Radikalpaars  $Y_Z^+Q_A^-$  werden durch die FTIR-Ergebnisse bestätigt.

Eine weitere Herangehensweise, einen Eindruck über den Reaktionsverlauf bei den jeweiligen Bedingungen zu erhalten, zeigen die Abbildungen 7.21, 7.22 und 7.23, in denen jeweils die FTIR-Differenzspektren der Mn-befreiten PSII-Proben zu bestimmten Zeitpunkten vor bzw. nach Anregung mit dem sättigenden Laserblitz für verschiedene Temperaturen bzw. pH-Werte dargestellt sind. Wie anhand dieser Abbildungen zu erkennen ist, weisen die Spektren im Wesentlichen dieselben Merkmale auf. Größere Unterschiede bestehen v.a. im Wellenzahlbereich  $1680\text{--}1620 \text{ cm}^{-1}$ , der sogenannten Amid-I-Region [Berthomieu and Hienerwadel, 2009]. Da in diesem Bereich u.a. eine Absorptionsbande des Wassers liegt, ist sie stark von der jeweiligen Präparation und dem Trocknungszustand abhängig [Noguchi, 2007; Menzel, 2009].

Die Spektren (A) sind direkt vor der Laseranregung aufgenommene Differenzspektren (Dunkelspektren) und dienen als Referenz. Bis auf ein kleines Signal in der Amid-I-Region bei pH 8,0 und Raumtemperatur (Abb. 7.21) zeigen diese Spektren kaum Rauschbeiträge.

Die ersten, 77 ms nach der Laseranregung aufgenommenen Spektren (B) werden vor allem von den Signalen  $Q_A^-/Q_A$  und  $Y_Z^\bullet/Y_Z$  dominiert. Bei pH 8,0 und Raumtemperatur (Abb. 7.21) können folgende Wellenzahlen (alle in  $\text{cm}^{-1}$ ) entsprechen der Tabelle 7.4 zugeordnet werden:

$Q_A^-/Q_A$ : 1749<sub>+</sub>, 1739<sub>+</sub>, 1726<sub>-</sub>, 1719<sub>+</sub>, 1684<sub>-</sub>, 1671<sub>-</sub>, 1644<sub>-</sub>, 1631<sub>-</sub>, 1560<sub>-</sub>, 1552<sub>-</sub>, 1543<sub>-</sub>  
1530<sub>+</sub>, 1477<sub>+</sub>, 1457<sub>+</sub>, 1419<sub>+</sub> und 1364<sub>+</sub>

$Y_Z^\bullet/Y_Z$ : 1706<sub>-</sub>, 1699<sub>+</sub>, 1678<sub>+</sub>, 1662<sub>-</sub>, 1651<sub>+</sub>, 1644<sub>-</sub>, 1638<sub>+</sub>, 1552<sub>+</sub>, 1543<sub>-</sub>, 1523<sub>-</sub>, 1512<sub>+</sub>.

Bei pH 6,2 und Raumtemperatur (Abb. 7.22) entsprechen folgende Wellenzahlen (alle in  $\text{cm}^{-1}$ ) den  $Q_A^-/Q_A$ - und  $Y_Z^\bullet/Y_Z$ -Differenzsignalen:

$Q_A^-/Q_A$ : 1744<sub>-</sub>, 1739<sub>+</sub>, 1726<sub>-</sub>, 1719<sub>+</sub>, 1682<sub>-</sub>, 1671<sub>-</sub>, 1644<sub>-</sub>, 1631<sub>-</sub>, 1558<sub>-</sub>, 1551<sub>+</sub>, 1543<sub>-</sub>  
1530<sub>+</sub>, 1521<sub>-</sub>, 1477<sub>+</sub>, 1457<sub>+</sub>, 1417<sub>+</sub>, 1367<sub>+</sub>

$Y_Z^\bullet/Y_Z$ : 1706<sub>-</sub>, 1699<sub>+</sub>, 1677<sub>+</sub>, 1652<sub>+</sub>, (1644<sub>-</sub>), 1638<sub>+</sub>, 1552<sub>+</sub>, 1543<sub>-</sub>, 1521<sub>-</sub>, 1512<sub>+</sub>, 1398<sub>-</sub>.

Bei pH 8,0 und 10 °C (Abb. 7.23) lassen sich folgende Wellenzahlen (alle in  $\text{cm}^{-1}$ ) den gefundenen Peaks zuordnen:

$Q_A^-/Q_A$ : 1750<sub>+</sub>, 1744<sub>-</sub>, 1726<sub>-</sub>, 1719<sub>+</sub>, 1684<sub>-</sub>, 1671<sub>-</sub>, 1644<sub>-</sub>, 1631<sub>-</sub>, 1559<sub>-</sub>, 1543<sub>-</sub>, 1531<sub>+</sub>  
1521<sub>-</sub>, 1477<sub>+</sub>, 1457<sub>+</sub>, 1417<sub>+</sub>, 1364<sub>+</sub>

$Y_Z^\bullet/Y_Z$ : 1706<sub>-</sub>, 1699<sub>+</sub>, 1678<sub>+</sub>, 1651<sub>+</sub>, (1644<sub>-</sub>), 1638<sub>+</sub>, 1552<sub>+</sub>, 1543<sub>-</sub>, 1512<sub>+</sub>, 1398<sub>-</sub>, 1250<sub>-</sub>

## Tyrosin D

Aus den jeweiligen Spektren (D), die am Ende der aufgenommenen Zeitabhängigkeit ermittelt wurden und gewissermaßen eine Art *Offset* darstellen, lässt sich das Vorhandensein von oxidiertem Tyrosin D erkennen. Die  $Y_D^\bullet/Y_D$ -Differenzsignale werden aufgrund ihrer langen Lebensdauer sichtbar, sobald die Signale der anderen Komponenten ( $Y_Z^\bullet/Y_Z$  und  $Q_A^-/Q_A$ ) durch Rekombination verschwunden sind. Bei pH 8,0 und Raumtemperatur sind dies die Peaks bei den Wellenzahlen 1751<sub>+</sub>, 1733<sub>+</sub>, 1697<sub>+</sub>, 1642<sub>-</sub> und 1629<sub>+</sub> (alle in  $\text{cm}^{-1}$ ). Bei pH 8,0 und 10 °C lassen sich die Wellenzahlen 1704<sub>-</sub>, 1697<sub>+</sub>, 1657<sub>+</sub>, 1644<sub>-</sub>, 1631<sub>+</sub> und 1551<sub>+</sub>  $Y_D$  zuordnen. Bei pH 6,2 und Raumtemperatur sind dagegen kaum  $Y_D$ -Merkmale sichtbar (1553<sub>+</sub>, 1630<sub>+</sub> und 1644<sub>-</sub>). Diese pH-Abhängigkeit entspricht Angaben aus der Literatur. Aus Absorptionsmessungen an Cyanobakterien, denen Tyrosin Z und der Mangankomplex entfernt wurde, ist bekannt, dass die  $Y_D$ -Oxidation durch P680<sup>+</sup> bei hohen pH-Werten (pK 7,7) wesentlich schneller abläuft [Faller et al., 2001].

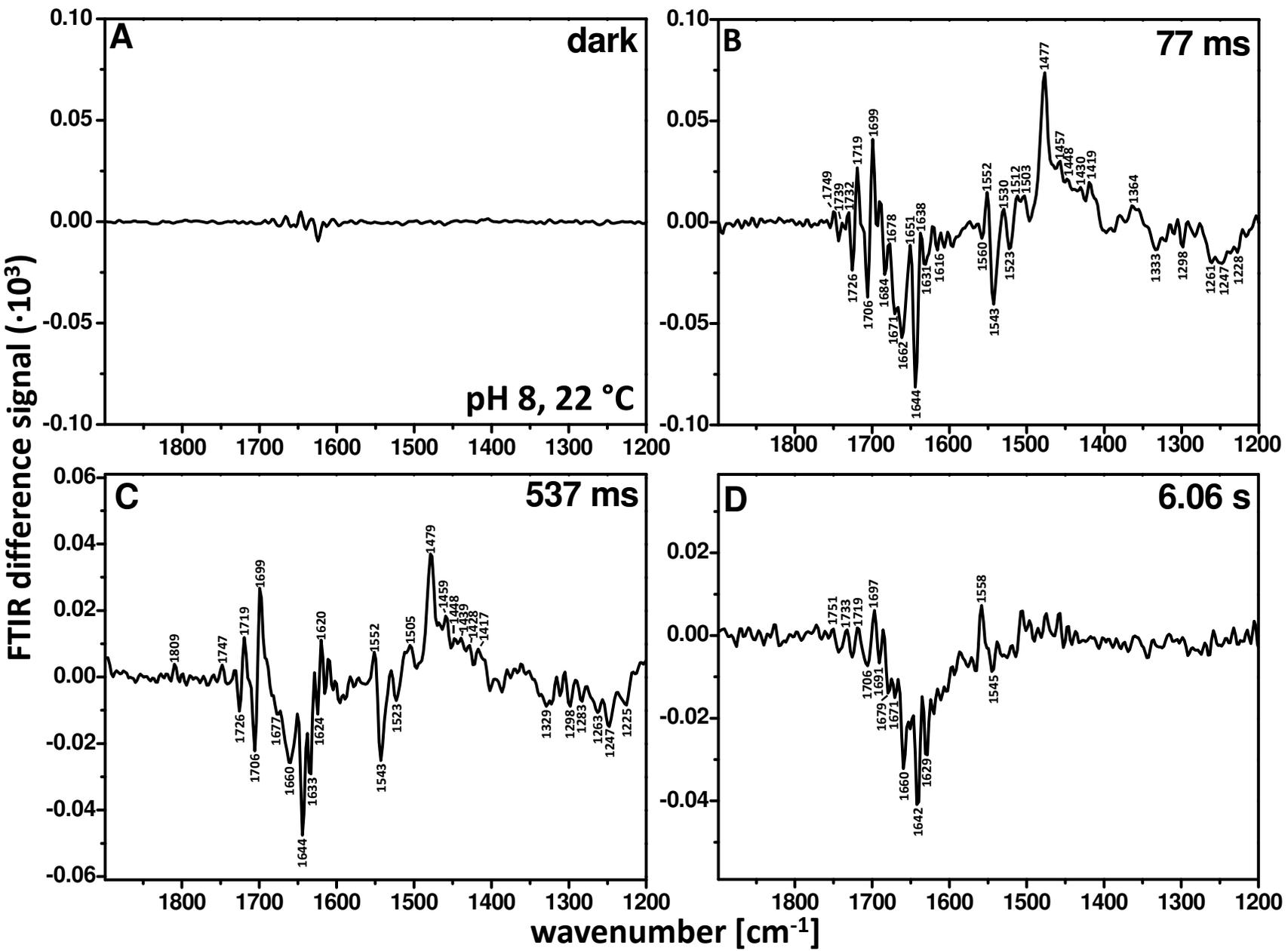


Abb. 7.21: FTIR-Spektren von Mn-befreiten PSII-Proben zu verschiedenen Zeitpunkten vor bzw. nach der Anregung mit einem sättigenden Laserblitz bei pH 8,0 und Raumtemperatur. A) Spektrum vor der Anregung; B) 77 ms, C) 460 ms und D) 6,06 s nach der Anregung.

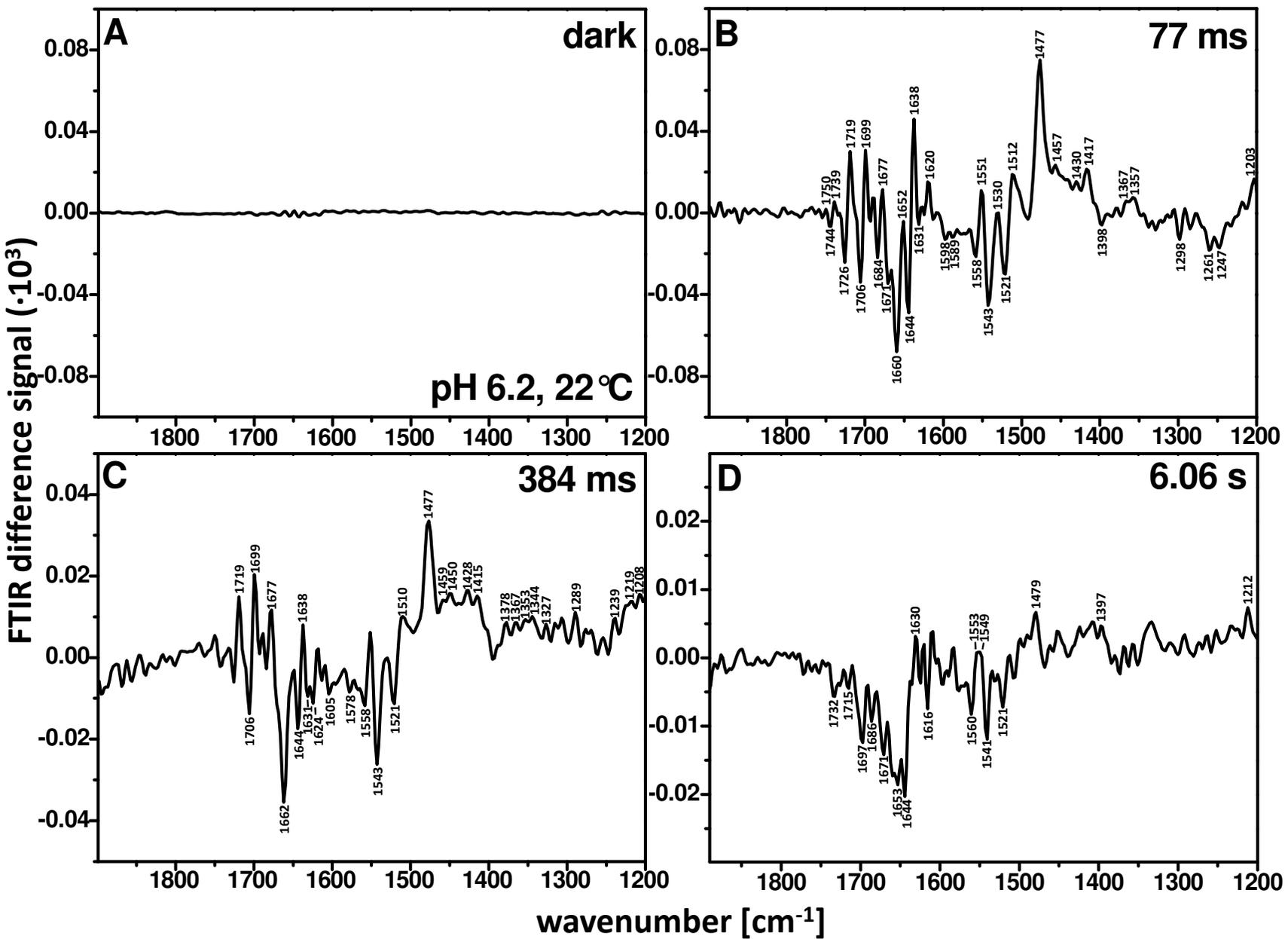


Abb. 7.22: FTIR-Spektren von Mn-befreiten PSII-Proben zu verschiedenen Zeitpunkten vor bzw. nach der Anregung mit einem sättigenden Laserblitz bei pH 6,2 und Raumtemperatur. A) Spektrum vor der Anregung, B) 77 ms, C) 384 ms und D) 6,06 s nach der Anregung.

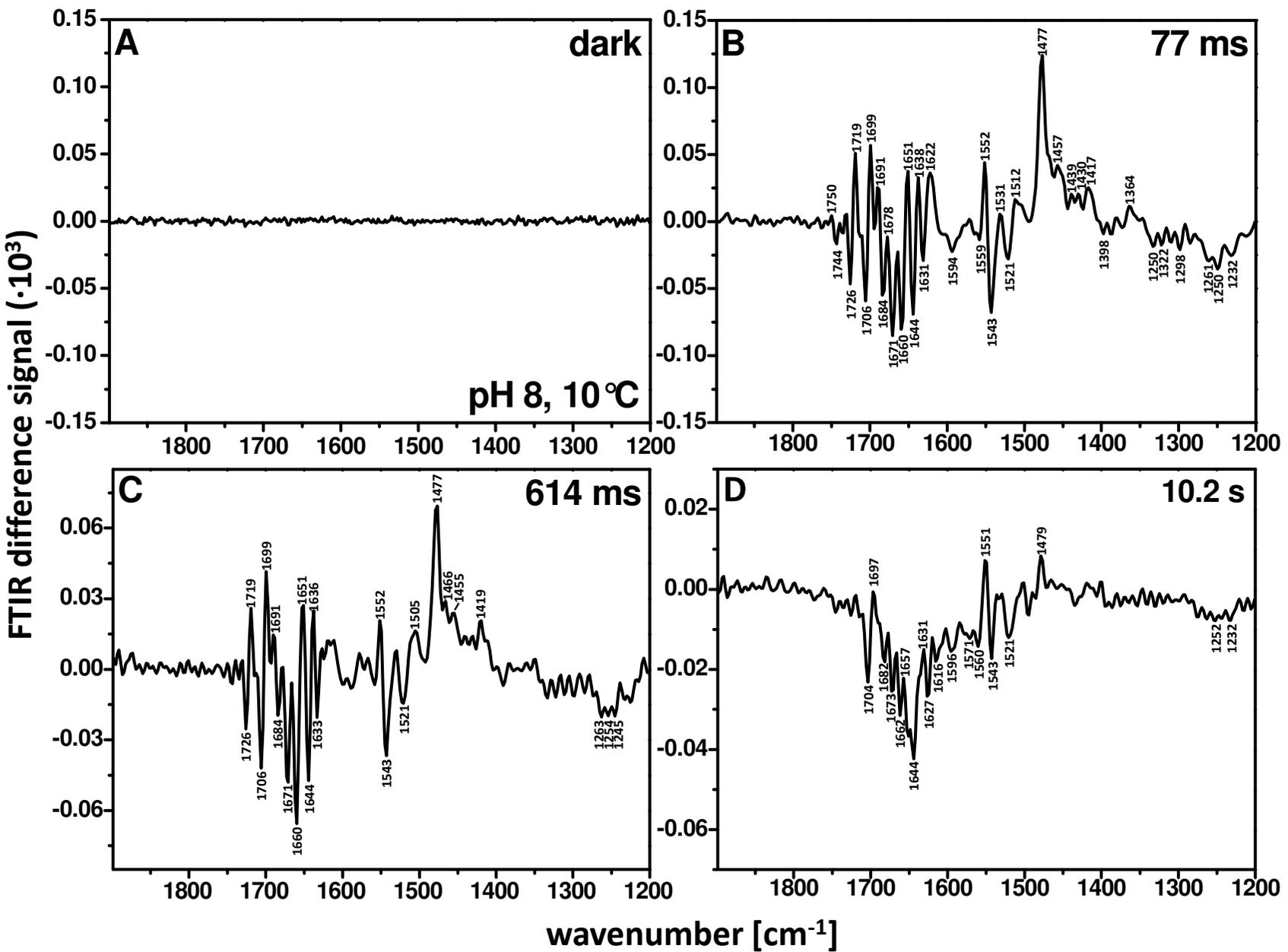


Abb. 7.23: FTIR-Spektren von Mn-befreiten PSII-Proben zu verschiedenen Zeitpunkten vor bzw. nach der Anregung mit einem sättigenden Laserblitz bei pH 8,0 und 10°C. A) Spektrum vor der Anregung, B) 77 ms, C) 1,61 s und D) 10,2 s nach der Anregung.

## Globaler Fit der zeitabhängigen FTIR-Spektren

Die aus den jeweiligen Messungen erhaltenen zeitabhängigen Spektren wurden mit dem in Abschnitt 2.4 beschriebenen *globalen Fit* mit einer Summe aus zwei Zeitkonstanten angepasst. Damit konnten die Zeitkonstanten  $\tau_i$  und die Spektren der zugehörigen, wellenzahlabhängigen Amplituden  $A_i(\nu)$  ermittelt werden.

Um die Qualität des globalen Fits zu überprüfen, wurden jeweils die aus dem Fit-Vorgang erhaltenen Amplitudenspektren  $A_i(\nu)$  mit den gemessenen Spektren  $A_{\text{mess}}(t, \nu)$  verglichen. Dafür wurden jeweils die  $A_{\text{mess}}(t, \nu)$  gewählt, die in dem der Zeitkonstante  $\tau_i$  entsprechenden Zeitbereich (ca.  $0,3 \cdot \tau_i - 3 \cdot \tau_i$ ) lagen. Der Anteil des mit der anderen Zeitkonstante verbundenen Signals von  $A_{\text{mess}}(t, \nu)$  wurde daher abgezogen. Die Ergebnisse in den Abbildungen 7.24, 7.25 und 7.26 zeigen, dass für alle Temperaturen und pH-Werte eine große Übereinstimmung zwischen den gemessenen und den angepassten Amplitudenspektren besteht. Das Fitmodell mit nur zwei Zeitkonstanten stellt eine gute Näherung für das komplexe Zeitverhalten der ca. 100 berücksichtigten Wellenzahlen dar.

Für alle Messbedingungen lässt sich feststellen, dass  $Q_A^-$  und  $Q_B^-$  nahezu vollständig zerfallen. In den Offset-Spektren sind daher hauptsächlich noch Signale von langlebigem, oxidiertem  $Y_D$  zu sehen. Ein kleiner Anteil von  $Q_A^-$  bzw.  $Q_B^-$ , der anhand der Peaks bei 1477 bzw. 1479  $\text{cm}^{-1}$  zu erkennen ist, verbleibt dann, wenn  $Y_Z$  durch einen anderen Elektronendonator reduziert wurde und damit nicht mehr für die Rekombination zur Verfügung steht [Babcock and Sauer, 1975; Yerkes et al., 1983; Dekker et al., 1984; Rappaport and Lavergne, 1997]. Eine Möglichkeit für einen solchen Elektronendonator für  $Y_Z$  könnte ein verbliebenes Manganatom sein [Rappaport and Lavergne, 1997].

Die zweiphasigen Zerfälle der FTIR-Differenzsignale lassen sich jeweils durch eine schnelle und eine langsame Phase beschreiben. Die Amplitudenspektren  $A_1(\nu)$  der schnellen Zeitkonstante spiegeln hauptsächlich die unmittelbar nach der Laseranregung erhaltenen Anfangsspektren wider. Für pH 8,0 und Raumtemperatur (siehe Abb. 7.24) konnten folgende Wellenzahlen dem  $Q_A^-/Q_A$ -Signal (alle in  $\text{cm}^{-1}$ ) zugeordnet werden:

$Q_A^-/Q_A$ : 1790<sub>+</sub>, 1743<sub>-</sub>, 1724<sub>-</sub>, 1719<sub>+</sub>, 1682<sub>-</sub>, 1673<sub>-</sub>, 1644<sub>-</sub>, 1631<sub>-</sub>, 1623<sub>+</sub>, 1543<sub>-</sub>, 1530<sub>+</sub>,  
1519<sub>-</sub>, 1477<sub>+</sub>, 1457<sub>+</sub>, 1419<sub>+</sub> und 1364<sub>+</sub>

$Y_Z^*/Y_Z$ : 1706<sub>-</sub>, 1699<sub>+</sub>, 1677<sub>+</sub>, 1664<sub>-</sub>, 1650<sub>+</sub>, (1644<sub>-</sub>), 1637<sub>+</sub>, 1552<sub>+</sub>, 1543<sub>-</sub>, 1513<sub>+</sub>, 1252<sub>-</sub>

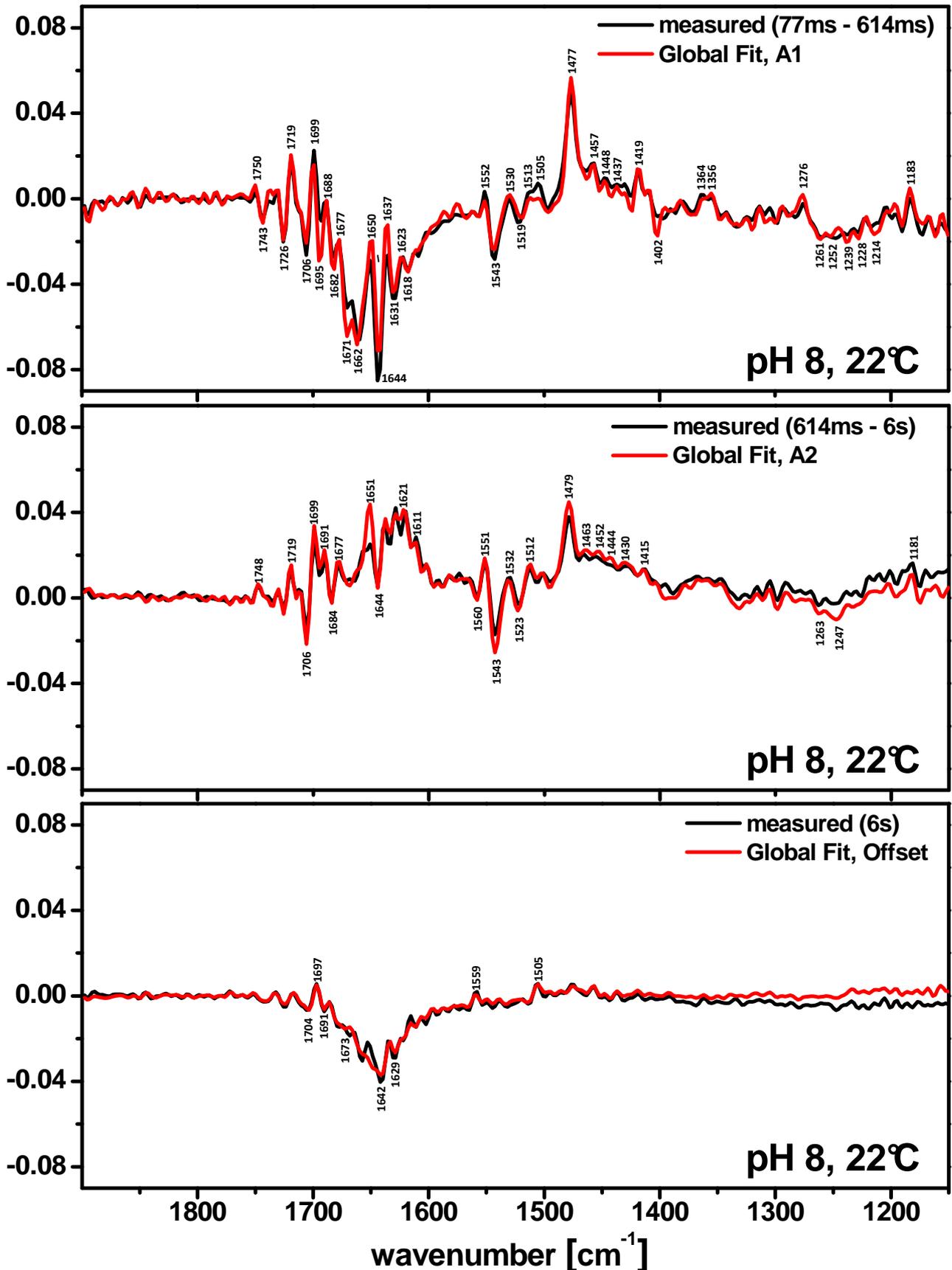


Abb. 7.24: Vergleich der Ergebnisse des globalen Fits mit den gemessenen Spektren bei pH 8,0 und Raumtemperatur. Die erste Zahl in der Klammer gibt dabei den jeweils betrachteten Zeitbereich des Spektrums an, die folgenden Zahlen die davon abgezogenen Anteile der anderen Zeitbereiche, s.a. Text. Siehe auch Abb. 7.21. Die den wellenzahlabhängigen Amplituden zugehörigen Zeitkonstanten sind  $\tau_1 = 136 \text{ ms}$  und  $\tau_2 = 1,66 \text{ s}$ .

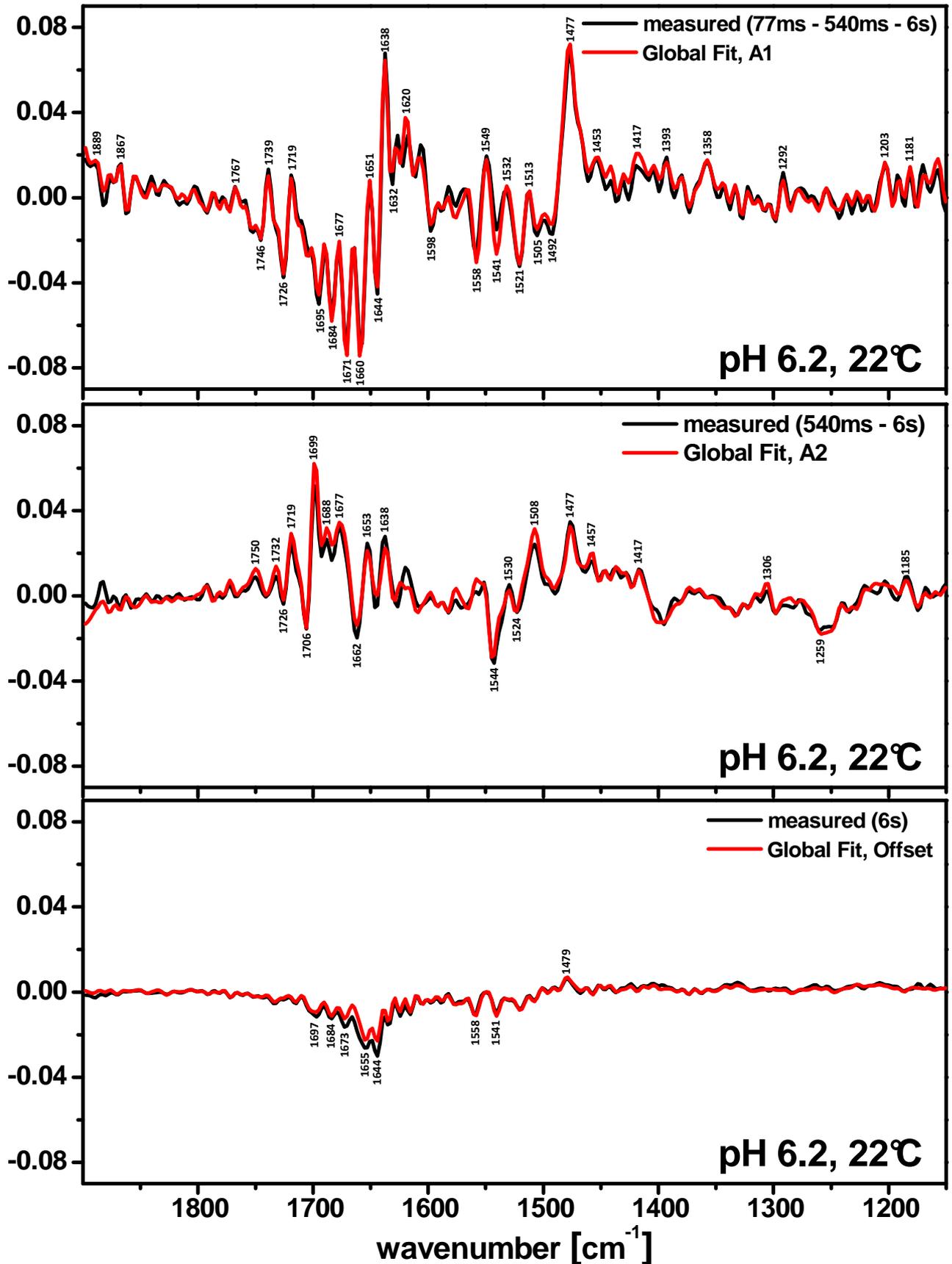


Abb. 7.25: Vergleich der Ergebnisse des globalen Fits mit den gemessenen Spektren bei pH 6,2 und Raumtemperatur. Die erste Zahl in der Klammer gibt dabei den jeweils betrachteten Zeitbereich des Spektrums an, die folgenden Zahlen die davon abgezogenen Anteile der anderen Zeitbereiche, s.a. Text. Siehe auch Abb. 7.22. Die den wellenzahlabhängigen Amplituden zugehörigen Zeitkonstanten sind  $\tau_1 = 129 \text{ ms}$  und  $\tau_2 = 1,03 \text{ s}$ .

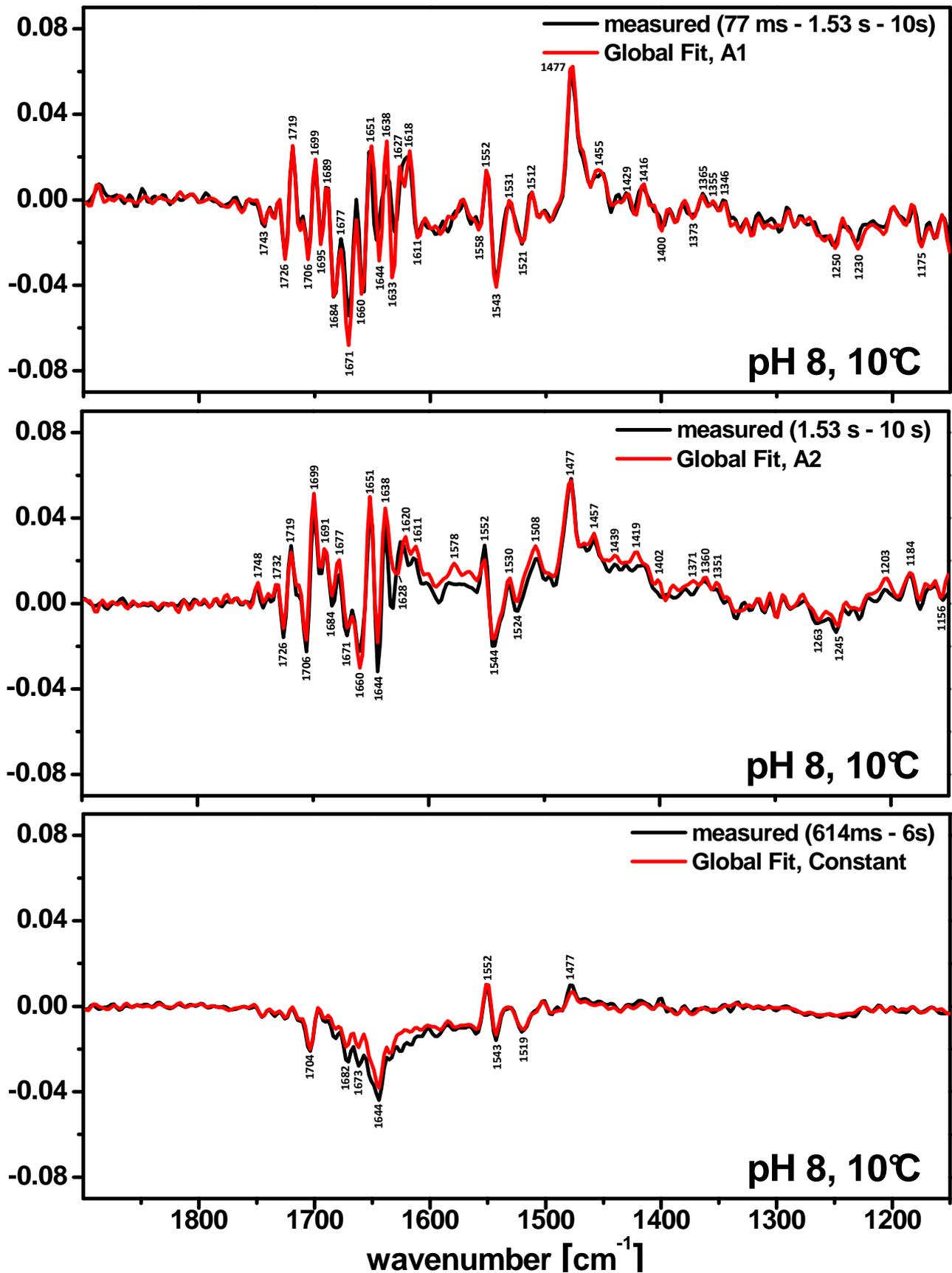


Abb. 7.26: Vergleich der Ergebnisse des globalen Fits mit den gemessenen Spektren bei pH 6,2 und 10°C. Die erste Zahl in der Klammer gibt dabei den jeweils betrachteten Zeitbereich des Spektrums an, die folgenden Zahlen die davon abgezogenen Anteile der anderen Zeitbereiche, s.a. Text. Siehe auch Abb. 7.23. Die den wellenzahlabhängigen Amplituden zugehörigen Zeitkonstanten sind  $\tau_1 = 526 \text{ ms}$  und  $\tau_2 = 3,07 \text{ s}$ .

Für pH 6,2 und Raumtemperatur (siehe Abb. 7.25) ist das  $Y_Z^\bullet/Y_Z$ -Signal schwächer ausgeprägt als bei pH 8,0. In den Spektren finden sich folgende Wellenzahlen wieder:

$$Q_A^-/Q_A: 1739_+, 1726_-, 1719_+, 1684_-, 1671_-, 1644_-, 1632_-, 1558_-, 1549_+, 1541_-, 1530_+, \\ 1521_-, 1477_+, 1453_+, 1417_+.$$

$$Y_Z^\bullet/Y_Z: 1677_+, 1651_+, (1644_-), 1638_+, 1541_-, 1523_- \text{ und } 1513_+.$$

Für pH 8,0 und 10 °C (siehe Abb. 7.26) konnten folgende Wellenzahlen dem  $Q_A^-/Q_A$ -Signal zugeordnet werden:

$$Q_A^-/Q_A: 1743_-, 1726_-, 1719_+, 1684_-, 1671_-, 1644_-, 1632_-, 1625_+, 1558_-, (1550_+), 1543_- \\ 1531_+, 1521_-, 1477_+, 1455_+, 1416_+ \text{ und } 1365_+$$

$$Y_Z^\bullet/Y_Z: 1706_-, 1699_+, 1677_+, 1651_+, (1644_-), 1638_+, 1552_+, 1543_-, 1521_-, 1400_-, 1250_-$$

Auch die Amplituden  $A_2(\nu)$  der langsamen Zeitkonstante geben hauptsächlich  $Q_A^-/Q_A$ - und  $Y_Z^\bullet/Y_Z$ -Signale wieder.

Nach der Blitzanregung könnte sich ein  $Q_A^-/Q_B^-$ -Gleichgewicht eingestellt haben, welches anschließend mit  $Y_Z^+$  rekombiniert. Die schnelle Phase (Amplituden  $A_1$ ) entspricht damit der auch mit der prompten Fluoreszenz gemessenen  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination (siehe Abschnitt 7.2). Für pH 6,2 wurde aus dem globalen Fit bei Raumtemperatur eine Zeitkonstante von 129 ms und für pH 8,0 von 136 ms ermittelt. Damit liegt der Wert von pH 8,0 in guter Übereinstimmung mit dem aus dem Fluoreszenz-Experiment erhaltenen. Die durch FTIR bestimmte Zeitkonstante bei pH 6,2 ist dagegen deutlich langsamer, was allerdings auch der eingeschränkten Zeitaufösung des FTIR-Experiments zugeschrieben werden könnte.

Für die langsame Phase (Amplituden  $A_2$ ) wurden bei Raumtemperatur Zeitkonstanten von 1,03 s (pH 6,2) und 1,66 s (pH 8,0) ermittelt. Sie entspricht dem Zerfall des Gleichgewichtszustandes aus  $Q_A^-$  und  $Q_B^-$ , der mit der  $Y_Z^+$  rekombiniert. Dieser gleichzeitige Zerfall wurde schon durch Fluoreszenzmessungen mit dem Doppelblitzprotokoll (siehe Abschnitt 7.3) suggeriert.

Da zwischen  $Q_A^-$  und  $Q_B^-$ -Signalen kaum Unterschiede bestehen, lässt sich schwer einschätzen, wie stark der vorwärtsgerichtete Elektronentransport  $Q_A \rightarrow Q_B$  stattfindet. Aufgrund des simultanen Zerfalls von  $Q_A^-$  und  $Y_Z^+$  (s.a. Abb. 7.20) ohne Verwendung eines Inhibitors bei den Messungen, könnte bei den Proben ein hoher Anteil sogenannter Non- $Q_B$ -Zentren

Redox-zustand	pH	$\tau$	$\Delta G$ [meV]	$E_A$ [meV]	$\nu$ [s <sup>-1</sup> ]	Fehlerbereich $\nu$ [s <sup>-1</sup> ]
Z <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>	8,0	~ 140 ms	-610	565 ± 26	4,7 · 10 <sup>10</sup>	5,6 · 10 <sup>9</sup> – 4,0 · 10 <sup>11</sup>
(H <sup>+</sup> )Z <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>	4,5	~ 10 ms	-530	372 ± 36	3,0 · 10 <sup>8</sup>	1,6 · 10 <sup>7</sup> – 5,8 · 10 <sup>9</sup>
				480	1,6 · 10 <sup>10</sup>	
				220	1,9 · 10 <sup>5</sup>	
Z <sup>+</sup> P680 <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>	8,0	~100 μs	-410	169 ± 16	9,0 · 10 <sup>6</sup>	2,4 · 10 <sup>6</sup> – 3,3 · 10 <sup>7</sup>
	8,0	~250 μs		98 ± 9	1,9 · 10 <sup>5</sup>	9,1 · 10 <sup>4</sup> – 4,0 · 10 <sup>5</sup>
Z <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> /Q <sub>B</sub> <sup>-</sup>	8,0	~ 2,5 s	-660	630 ± 25	2,7 · 10 <sup>10</sup>	3,5 · 10 <sup>9</sup> – 2,1 · 10 <sup>11</sup>
	6,2	~ 1,2 s	-625	630 ± 25	8,4 · 10 <sup>10</sup>	1,1 · 10 <sup>10</sup> – 6,5 · 10 <sup>11</sup>
S <sub>2</sub> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>	6,2	~ 2,5 s		532 ± 22	5,7 · 10 <sup>8</sup>	9,4 · 10 <sup>7</sup> – 3,5 · 10 <sup>9</sup>

Tab. 7.6: Übersicht über die erhaltenen Energieniveaus und Aktivierungsenergien.  $\tau$  ist die Zeitkonstante bei Zimmertemperatur. Der  $\Delta G$ -Wert bezieht sich jeweils auf den angeregten Chlorophyll-Zustand.

vorhanden ist. Darunter versteht man diejenigen PSII-Zentren, bei denen der Elektronentransfer von Q<sub>A</sub> nach Q<sub>B</sub> dauerhaft blockiert [Melis, 1985; Graan and Ort, 1986] oder stark verlangsamt [Chylla and Whitmarsh, 1989; Lazar, 1999] ist. Der Einfluss der Temperatur auf den Zerfallsprozess entspricht den Erwartungen aus der Arrhenius-Gleichung. Sowohl die schnelle als auch die langsame Zeitkonstante sind bei tiefer Temperatur deutlich verlangsamt.

Insgesamt lässt sich aus den FTIR-Messungen an den Mn-freien Photosystemen schlussfolgern:

1. Die Rekombination von Q<sub>A</sub><sup>-</sup>/Q<sub>B</sub><sup>-</sup> mit Y<sub>Z</sub><sup>+</sup> konnte als dominierender Prozess klar identifiziert werden.
2. Das Q<sub>A</sub><sup>-</sup>/Q<sub>B</sub><sup>-</sup>-Gleichgewicht zerfällt bei allen untersuchten Bedingungen mit zwei Zeitkonstanten (22 °C, pH 6,2:  $\tau_1 = 129$  ms und  $\tau_2 = 1,03$  s; 22 °C, pH 8,0:  $\tau_1 = 136$  ms und  $\tau_2 = 1,66$  s; 10 °C, pH 8,0:  $\tau_1 = 526$  ms und  $\tau_2 = 3,07$  s).
3. Die schnellen Zeitkonstanten entsprechen den aus Chlorophyllfluoreszenz-Messungen erhaltenen Werten der Y<sub>Z</sub><sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup>-Rekombination.

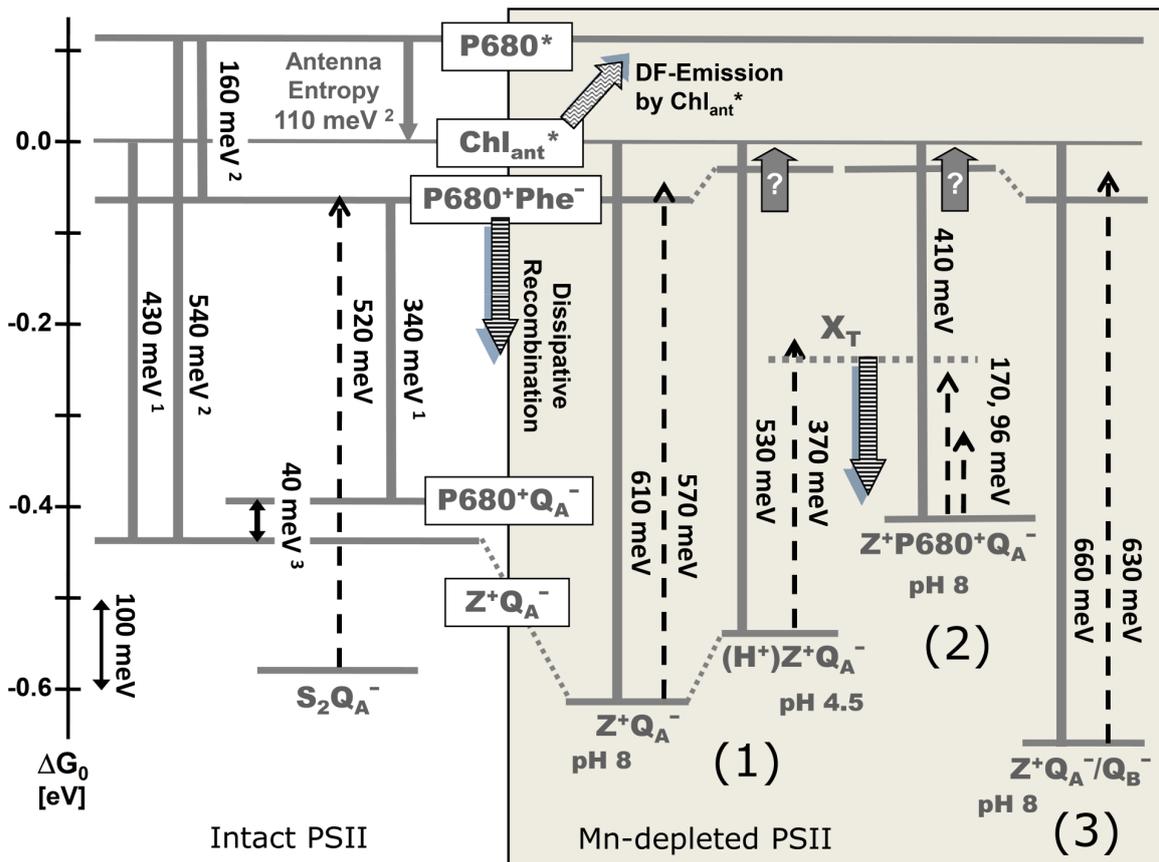


Abb. 7.27: Energieschema für intaktes (linke Seite) und Mn-befreites PSII (rechte Seite). Die vertikalen Balken geben die Differenzen zwischen den jeweiligen Energieniveaus an, die gestrichelten Pfeile die Werte der ermittelten Aktivierungsenergien. Untersuchte Rekombinationsprozesse für Mn-befreites PSII: (1)  $Y_Z^+ Q_A^-$ , (2)  $Y_Z^+ P680^+ Q_A^-$ , (3)  $Y_Z^+ [Q_A/Q_B]^-$ . Quellen für die im Diagramm angegebenen Zahlenwerte: <sup>1</sup> [Grabolle and Dau, 2005]; <sup>2</sup> [Dau and Sauer, 1996]; <sup>3</sup> [Jeans et al., 2002]. Alle anderen angegebenen Werte (ohne Hochzahl) wurden in dieser Arbeit ermittelt.

## 7.5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Mit Hilfe von zeitaufgelösten Messungen der verzögerten Chlorophyllfluoreszenz, der relativen Quantenausbeute der prompten Chlorophyllfluoreszenz sowie Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie wurden PSII-Membranpartikel-Proben ohne Mangankomplex unter verschiedenen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Blitzabstand, Inhibitoren) untersucht und kinetische und energetische Parameter bestimmt. Die in dieser Arbeit ermittelten Differenzen der Gibbs'schen freien Energie sowie die Aktivierungsenergien sind in der Tabelle 7.6 zusammengefasst. Aufbauend auf diese Ergebnisse konnte ein Energieschema erstellt werden, welches in der Abb. 7.27 dargestellt ist und Rückschlüsse über mögliche Rekombinationswege sowie einen direkten Vergleich mit den Energieniveaus im intakten PSII erlaubt.

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse der untersuchten Rekombinationen zusammengefasst werden:

### $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination

Eine wichtige Rolle bei der Untersuchung der Mn-freien PSII-Proben nimmt der Zustand  $Y_Z^+Q_A^-$  ein. Wie in Abb. 7.27 dargestellt ist, liegt das  $Y_Z^+Q_A^-$ -Niveau in den PSII-Proben ohne Mangankomplex sowohl für hohe als auch niedrige pH-Werte energetisch günstiger als in den intakten PSII-Proben. Diese Absenkung kann durch das um ca. 150 mV in Richtung zu positiveren Werten verschobene Redoxpotential erklärt werden [Krieger et al., 1995]. Der Zustand  $Y_Z^+Q_A^-$  wird dadurch um 150 meV stabilisiert. Dieser Effekt wird bei niedrigem pH-Wert durch einen zweiten Einfluss kompensiert. Das Potential des Zustands  $(H^+)Y_Z^+Q_A^-$  wird aufgrund der Protonierung (Coulomb-Wechselwirkung) destabilisiert, liegt also energetisch höher.

Die für den  $Y_Z^+Q_A^-$ -Zustand ermittelte Aktivierungsenergie bei hohen pH-Werten spricht für einen Zerfall durch Repopulation des  $P680^+Phe^-$ -Zustands und dessen nicht-strahlendem Zerfall über Triplet-Zerfälle, wie es auch für intakte PSII vorgeschlagen wurde [Vass and Styring, 1993; Rappaport et al., 2002; Vass and Cser, 2009; Vass, 2011]. Da ein Zerfall über die Repopulation der PSII-Antenne enthalpisch eine Aktivierungsenergie besitzen müsste, bei der der Pfeil in Abb. 7.27 bis zum  $P680^*$ -Niveau reicht, kann dieser Fall hier ausgeschlossen werden. Bei pH 4,5 ist die Aktivierungsenergie für den  $Y_Z^+Q_A^-$ -Zerfall wesentlich geringer. Das deutet daraufhin, dass keine Repopulation des  $P680^+Phe^-$ -Zustands erfolgen kann, sondern stattdessen eine direkte Rekombination des  $P680^+Q_A^-$ -Zustands stattfindet. Dies entspricht dem direkten Elektronentransfer von  $Q_A^-$  zum  $P680^+$  und scheint mit einer (echten) Aktivierungsenergie behaftet zu sein.

Zur Kinetik der  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die bestimmten Zeitkonstanten sowohl in ihrer Größenordnung als auch der pH-Abhängigkeit in Übereinstimmung mit den in der Literatur veröffentlichten Daten sind. Allerdings sind die Literaturdaten oft fragmentarisch und beruhen auf unterschiedlichen, kaum vergleichbaren Messverfahren. Ferner war es meist nicht möglich, die Energieniveaus oder Radikalpaare zu ermitteln, was hier über Analyse der Amplitude der verzögerten Fluoreszenz erreicht wird.

### $Y_Z^+P680^+Q_A^-$ -Rekombination

Die  $Y_Z^+P680^+Q_A^-$ -Rekombination wurde untersucht, indem durch in kurzem Abstand (100 ms) aufeinander folgende Blitze oxidiertes  $Y_Z^+$  erzeugt und damit die Reduktion von  $P680^+$  durch  $Y_Z$  verhindert wurde. Dadurch kommt es zur Rekombination von  $P680^+$  mit  $Q_A^-$ . Da sich ein Teil der Zentren bereits vor der erneuten Blitzanregung wieder im Grundzustand befindet, wurde zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit dieses Prozesses mithilfe von speziellen Kurvenanpassungen der Einfluss dieser partiellen Rekombination korrigiert und dabei eine pH-Abhängigkeit festgestellt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich bei pH 4,0 bereits ungefähr 80 % der Zentren nach 100 ms wieder im Grundzustand befinden, für pH 6,0 und höhere pH-Werte sind es noch ca. ein Drittel.

Beim Zerfall des  $Y_Z^+P680^+Q_A^-$ -Zustands scheint aus energetischer Sicht eine ähnliche Situation wie beim  $Y_Z^+Q_A^-$ -Zustand vorzuliegen. Die Energie des  $Y_Z^+P680^+Q_A^-$ -Zustands ist aufgrund der von der Ladung von  $Y_Z^+$  erzeugten elektrostatischen Wechselwirkungsenergie  $E_{WW}$  deutlich nach oben verschoben. Setzt man für den Abstand  $d(P680 - Y_Z)$  den Wert 12,4 Å [Zouni et al., 2001], so erhält man für  $E_{WW} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \cdot \frac{q}{d(P680 - Y_Z)}$  einen Wert von ca. 250 meV ( $\epsilon_r = 4,7$  [Chamorovsky et al., 2005]).

Die geringe Aktivierungsenergie  $E_A = 170$  meV, die in Übereinstimmung mit Angaben aus der Literatur ist, deutet auf eine direkte Rekombination über den Elektronentransfer von  $Q_A^-$  zum  $P680^+$  hin. Das  $Y_Z^+P680^+Q_A^-$ -Energieniveau scheint auf der Ebene des  $P680^+Q_A^-$ -Niveaus im intakten PSII zu liegen (siehe Abb. 7.27) Da das  $Q_A^-$ -Redoxpotential in Mn-freien PSII-Proben um ca. 150 mV in positiver Richtung verschoben ist, lässt sich daraus folgern, dass sich die Anwesenheit von  $Y_Z^+$  um genau denselben Betrag in entgegengesetzter Richtung auswirkt.

## $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$ -Rekombination

Die  $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$ -Rekombination konnte mit Hilfe des speziell entwickelten Doppelblitzprotokolles sowohl durch Messungen der prompten als auch der verzögerten Chlorophyllfluoreszenz untersucht werden. Darüber hinaus scheint auch die langsame Phase der mittels FTIR gemessenen Zerfallskurven diese Reaktion widerzuspiegeln. Die Gleichgewichtskonstante zwischen  $Q_A$  und  $Q_B$  stellt sich in den manganfreien PSII-Proben so ein, dass nach Abschluss des  $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfers beide Spezies in etwa gleicher Menge vorliegen, bevor beide durch Rekombination mit der Donorseite zerfallen.

Der ermittelte pK-Wert von  $4,6 \pm 0,3$  für diesen Rekombinationsprozess entspricht dem der  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination. Daher ist zu vermuten, dass bei beiden Prozessen dieselbe protonierbare Gruppe beteiligt ist.

Bei der  $Y_Z^+[Q_A/Q_B]^-$ -Rekombination scheint wie bei der  $Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination bei hohen pH-Werten der Zerfall des Zustands über den  $P680^+Phe^-$ -Zustand zu erfolgen (indirekter Pfad).

## Möglicher Schutzmechanismus vor dem Einfluss von schädigendem Singulett-Sauerstoff

Es ist bekannt, dass Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) eine stark schädigende Wirkung auf Pflanzenzellen hat (oxidative Zerstörung) [Krieger-Liszkay et al., 2008].  $^1O_2$  entsteht aus der Wechselwirkung von molekularem Sauerstoff im Grundzustand ( $^3O_2$ ) mit angeregten Chlorophyllen im Triplettzustand ( $^3Chl^*$ ).

Das nach der Ladungstrennung gebildete primäre Ladungspaar  $P680^+Phe^-$  liegt zunächst im Singulett-Zustand  $^1[P680^+Phe^-]$  vor, kann aber durch eine spontane Spin-Umwandlung in den Triplett-Zustand  $^3[P680^+Phe^-]$  übergehen (Intersystem Crossing) [Häder, 1999; Vass, 2011]. Eine weitere Möglichkeit der Bildung des P680-Triplettzustandes ( $^3P680$ ) ist über den Weg der Ladungsrekombination  $P680^+Q_A^- \rightarrow ^3[P680^+Phe^-]$ . Da die Elektronenspins von  $P680^+$  und  $Q_A^-$  nicht mehr miteinander korreliert sind, ist in diesem Fall keine Spinumwandlung notwendig und die Triplett-Bildung daher wesentlich wahrscheinlicher [Vass, 2011].

Die Möglichkeit der direkten Rekombination von  $P680^+$  und  $Q_A^-$  (siehe Abb. 7.27) bietet dem PSII also eine Möglichkeit sich vor der Entstehung von Singulett-Sauerstoff zu schützen [Vass and Cser, 2009; Vass, 2011].



---

## Zusammenfassung

---

Die vorliegende Arbeit stellt die Ergebnisse vor, die aus den Messungen der zeitaufgelösten verzögerten und prompten Chlorophyllfluoreszenz zur Energetik und Kinetik des Photosystems II gewonnen werden konnten. Dabei wurden in der eigenen Arbeitsgruppe mit Spinat eine höhere Pflanze und in Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen Grünalgen (*Chlamydomonas reinhardtii*) sowie die Cyanobakterien (*Thermosynechococcus elongatus*) untersucht.

- Die Frage der Temperaturabhängigkeit des sauerstoffbildenden Schritts, dem  $S_4 \rightarrow S_0$ -Übergang im Kok-Zyklus, wurde im Kapitel 3 untersucht. Nachdem frühere Messungen teilweise widersprüchliche Ergebnisse zeigten, lag das besondere Augenmerk auf dem Auftreten eines Knickpunktes in der Arrhenius-Darstellung, also der Frage, ob dieser Übergang mit zwei verschiedenen Aktivierungsenergien verbunden ist oder eine Aktivierungsenergie für die Beschreibung des gesamten Temperaturbereichs ausreichend ist. Im Temperaturbereich von  $-2,7$  bis  $27^\circ\text{C}$  wurden insgesamt 60 Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz aufgenommen und ausgewertet. Eine Anpassung der Daten mit zwei verschiedenen Aktivierungsenergien kann nicht prinzipiell ausgeschlossen werden und ergibt Werte von  $(182 \pm 12)$  meV für  $T > 15^\circ\text{C}$  und  $(257 \pm 15)$  meV für  $T < 6^\circ\text{C}$ . Die Daten können jedoch in einer guten Näherung auch mit einem einfachen monophasischen Arrhenius-Verhalten beschrieben werden. Der Wert für die Aktivierungsenergie beträgt dabei 231 meV und stimmt sehr gut mit den an denselben hochaktiven PSII-Proben erhaltenen Ergebnissen der photothermischen Strahlableitung überein. Die

Hypothese des Vorliegens unterschiedlicher Aktivierungsenergien in unterschiedlichen Temperaturbereichen konnte also nicht bestätigt werden.

- Auch Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3$ ) spielt eine Rolle in der Wasseroxidation im PSII (Kapitel 4). *Chlamydomonas*-Mutanten, denen die Carboanhydrase Cah3 fehlen, zeigen in Abwesenheit von  $\text{HCO}_3$  eine verminderte Sauerstofferzeugung. Die Messungen der prompten Fluoreszenz ergaben keinen Einfluss auf die PSII-Akzeptorseite. Die Untersuchungen der verzögerten Fluoreszenz offenbarten eine deutlich schnellere Protonenfreisetzung im  $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_4$ -Übergang (Kok-Zyklus), wenn der Cah3-freien Mutanten  $\text{HCO}_3$  hinzugefügt wurde. Der  $\text{S}_4 \rightarrow \text{S}_0$ -Übergang selbst ist davon nicht beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass bei Zugabe von  $\text{HCO}_3$ , Cah3 oder beiden Substanzen zusammen die Sauerstoffentwicklung stimuliert werden konnte. Dies wird dadurch erklärt, dass die Protonenfreisetzung im PSII durch  $\text{HCO}_3$  begünstigt wird. Die Ergebnisse heben dabei die generelle Wichtigkeit der Protonenfreisetzungen an der PSII-Donorseite hervor.
- Im Rahmen der Messungen mit den PSII-Inhibitoren Terbutryn und Stigmatellin konnte zunächst der optimale pH-Bereich für die Messungen an den Dimeren (pH 5,6 bis 6,4) und Monomeren (pH 5,5 bis 6,2) der Core-Partikel von *Thermosynechococcus elongatus* bestimmt werden (siehe Kapitel 5). Bindungskurven wurden für beide Inhibitoren sowohl mit der prompten und verzögerten Fluoreszenz bestimmt. Bei der prompten Fluoreszenz wurde dazu die Amplitude der schnellen Phase betrachtet, die den  $\text{Q}_A \rightarrow \text{Q}_B$ -Elektronentransfer widerspiegelt und mit zunehmender Konzentration des Inhibitors verschwindet. Aus dem Verschwinden des Sauerstoffmusters wurde der Herbizideinfluss auf der Donorseite sichtbar gemacht. Die Bindungskonstante für Terbutryn wurde zu ca.  $2 \cdot 10^{-7}$  M, die für Stigmatellin zu ca.  $3 \cdot 10^{-7}$  M ermittelt. Aufbauend auf diese Untersuchungen konnte in Zusammenarbeit mit der TU Berlin die erste Struktur von gebundenem Herbizid an Photosystem II bei einer Auflösung von  $3,2 \text{ \AA}$  veröffentlicht werden.
- Das cyanobakterielle D1-Protein wird nicht von einem einzelnen *psbA*-Gen kodiert, sondern von einer *psbA*-Genfamilie (siehe Kapitel 6). Abhängig von den äußeren Bedingungen wird die für den Organismus günstigste Kopie ausgebildet. Im Rahmen einer Kooperation mit der Ruhr-Universität Bochum wurden die funktionellen Unterschiede der durch Knock-Out-Mutationen separierten Varianten untersucht. Die Messungen der prompten Fluoreszenz zeigten keinen Unterschied des  $\text{Q}_A \rightarrow \text{Q}_B$ -Elektronentransfers auf der PSII-Akzeptorseite. Anhand der Messungen der verzögerten Fluoreszenz wurde ersichtlich, dass die Sauerstoffentwicklung ebenfalls unverändert ist. Aus den erhöhten Anfangsamplituden der verzögerten Fluoreszenz nach allen Blitzen konnte auf

einen erhöhten Wert von  $\Delta G(\text{Chl}^* - \text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-)$  geschlossen werden. Thermolumineszenz-Messungen zeigten eine Absenkung des  $\text{P680}^+\text{Phe}^-$ -Potentials. Daraus konnte ein Modell abgeleitet werden, das einen möglichen photoprotektiven Mechanismus beschreibt. Die Cyanobakterien verhindern durch Austausch des D1-Proteins die Produktion von schädlichem Singulett-Sauerstoff.

- PSII-Proben ohne Mangankomplex eignen sich dazu, die ersten Schritte der Ladungstrennung und -rekombinationen ohne Überlagerung des viererperiodischen Kok-Zyklus zu untersuchen (siehe Kapitel 7). Neben zahlreichen Fluoreszenzmessungen unter verschiedenen Bedingungen wurden auch Messungen mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie durchgeführt. Den daraus gewonnenen FTIR-Zerfällen wurden mit Hilfe eines globalen Fits jeweils zwei Zeitkonstanten zugeordnet, wobei eine gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen und simulierten Spektren erreicht werden konnte. Für die Radikalpaarzustände  $\text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-$ ,  $\text{Y}_Z^+\text{P680}^+\text{Q}_A^-$  und  $\text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-/\text{Q}_B^-$  konnten kinetische Parameter ermittelt und ein Energieschema für Mn-befreites PSII erstellt werden. Dieses Energieschema lässt schließlich Rückschlüsse zu, auf welche Art und Weise die Rekombinationen der genannten Radikalpaarzustände erfolgen: Während für den Zustand  $\text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-$  bei hohen pH-Werten die erneute Repopulation des  $\text{P680}^+\text{Phe}^-$ -Zustands möglich scheint, was die Bildung von Triplett-Zuständen und damit auch von schädlichem Singulett-Sauerstoff zur Folge hätte, scheint für niedrige pH-Werte eine direkte Rekombination und damit eine für die Pflanze harmlose Rekombinationsvariante vorzuliegen. Der  $\text{Y}_Z^+\text{P680}^+\text{Q}_A^-$ -Zustand scheint ebenfalls direkt und damit auf die unschädliche Weise zu rekombinieren. Beim  $\text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-/\text{Q}_B^-$ -Zustand sprechen die ermittelten Ergebnisse dagegen für einen indirekten Rekombinationsmechanismus über Repopulation des  $\text{P680}^+\text{Phe}^-$ -Zustands. Eine ähnlich umfassende Charakterisierung der Rekombinationsprozesse im PSII ist zuvor noch nicht berichtet worden.



## Fachbeiträge

J. Buchta, M. Grabolle, H. Dau

**Photosynthetic dioxygen formation studied by time-resolved delayed fluorescence measurements - Method, rationale, and results on the activation energy of dioxygen formation**

*BBA* 1767, 565-575 (2007)

T. Shutova, H. Kenneweg, J. Buchta, J. Nikitina, V. Terentyev, S. Chernyshov, B. Andersson, S. Allakhverdiev, V. Klimov, H. Dau, W. Junge, G. Samuelsson

**The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O<sub>2</sub> evolution rate by proton removal**

*EMBO Journal*, 1-10 (2008)

J. Buchta, T. Shutova, G. Samuelsson, H. Dau

**Time-resolved Delayed Chlorophyll Fluorescence to Study the Influence of Bicarbonate on a Green Algae Mutant Photosystem II**

*Photosynthesis. Energy from the Sun. 14th International Congress of Photosynthesis*, ISBN 978-1-4020-6707-5 (2008)

J. Sander, M. Nowaczyk, J. Buchta, H. Dau, I. Vass, Z. Deak, M. Dorogi, M. Iwai,  
M. Rögner

**Functional characterization and quantification of the alternative PsbA copies in *Thermosynechococcus elongatus* and their role in photoprotection**

*Journal of Biological Chemistry* 285(39), 29851-29856 (2010)

M. Broser, C. Glöckner, A. Gabdulkhakov, A. Guskov, J. Buchta, J. Kern, F. Müh, H. Dau, W. Saenger, A. Zouni

**Structural basis of inhibition of cyanobacterial photosystem II by terbutryn**

*Journal of Biological Chemistry* 286(18), 15964-15972 (2011)

## Konferenzbeiträge

J. Buchta, M. Grabolle, M. Haumann, H. Dau

**The oxygen-evolution step of photosystem II studied by time-resolved recombination fluorescence measurements**

International Meeting: „Photosynthesis in the post-genomic era: Structure and function of photosystems“, Pushchino, Russland (2006), Poster

J. Buchta

**Advanced fluorometric approaches to study the function of PSII in various environments - from intact cells to immobilized monolayers of semiartificial systems**

BMBF Meeting „Molecular Function of Catalysts involved in BioH<sub>2</sub> Production“; Berlin (2007), Vortrag

J. Buchta, T. Shutova, G. Samuelsson, H. Dau

**Time-resolved delayed chlorophyll fluorescence to study the donor-side of photosystem II**

Satellite Meeting: „Solar Energy and Artificial Photosynthesis“, London, Großbritannien (2007), Poster

G. Gramse, J. Buchta, A. Badura, W. Schuhmann, M. Rögner, H. Dau

**Semi-artificial systems - Monitoring of electron transfer in photosystems (PSII) immobilized on gold surfaces by time-resolved fluorescence yield measurements**

Satellite Meeting: „Solar Energy and Artificial Photosynthesis“, London, Großbritannien (2007), Poster

J. Buchta, T. Shutova, G. Samuelsson, H. Dau

**Time-resolved delayed chlorophyll fluorescence to study the donor-side of photosystem II**

14th International Congress of Photosynthesis, Glasgow, Großbritannien (2007), Poster

J. Buchta, T. Shutova, G. Samuelsson, H. Dau

**Time-resolved delayed chlorophyll fluorescence to study the donor-side of photosystem II**

SFB 498 International Symposium „Protein-Cofactor Interactions in Biological Processes“, Berlin (2007), Poster

J. Buchta

**Fluorometric Approaches to Study the Electron Transfer in PSII in Wild Type, in Mutants and in Immobilized PSII Particles**

BioH2 Workshop (BMBF); Marburg (2008), Vortrag

J. Buchta, T. Shutova, G. Samuelsson, H. Dau

**Time-resolved delayed chlorophyll fluorescence to study the donor-side of photosystem II**

Solar H2 Workshop, Bochum (2008), Poster

J. Buchta, I. Zaharieva, H. Dau

**Time-resolved Delayed Chlorophyll Fluorescence to Study Mn-Depleted Photosystem II Samples**

Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Biophysik, Berlin (2008), Poster

B. Süß, J. Buchta, P. Chernev, H. Dau

**Time-resolved FTIR to Track Photosynthetic Water Oxidation**

Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Biophysik, Bochum (2010), Poster



---

## Literaturverzeichnis

---

- Ahlbrink, R., Haumann, M., Cherepanov, D., Bögershausen, O., Mulkidjanian, A., and Junge, W. (1998). Function of tyrosine Z in water oxidation by photosystem II: electrostatic promotor instead of hydrogen abstractor. *Biochemistry*, 37(4):1131–1142.
- Allakhverdiev, S. I., Karacan, M. S., Somer, G., Karacan, N., Khan, E. M., Rane, S. Y., Padhye, S., Klimov, V. V., and Renger, G. (1994). Reconstitution of the water-oxidizing complex in manganese-depleted photosystem II complexes by using synthetic binuclear manganese complexes. *Biochemistry*, 33(40):12210–12214.
- Amesz, J. and van Gorkom, H. J. (1978). Delayed fluorescence in photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29:47–66.
- Aro, E. M., Virgin, I., and Andersson, B. (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta*, 1143(2):113–134.
- Auslander, W. and Junge, W. (1975). Neutral red, a rapid indicator for pH-changes in the inner phase of thylakoids. *FEBS Letters*, 59:310–315.
- Babcock, G. T., Barry, B. A., Debus, R. J., Hoganson, C. W., Atamian, M., McIntosh, L., Sithole, I., and Yocum, C. F. (1989). Water oxidation in photosystem II: From radical chemistry to multielectron chemistry. *Biochemistry*, 28(25):9557–9565.
- Babcock, G. T. and Sauer, K. (1975). A rapid, light-induced transient in electron paramagnetic resonance signal II activated upon inhibition of photosynthetic oxygen evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 376(2):315 – 328.
- Barber, J. (2006). Photosystem II: an enzyme of global significance. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 5):619–631.

- Barry, B. A., el Deeb, M. K., Sandusky, P. O., and Babcock, G. T. (1990). Tyrosine radicals in photosystem II and related model compounds. characterization by isotopic labeling and EPR spectroscopy. *J Biol Chem*, 265(33):20139–20143.
- Berthold, D. A., Babcock, G. T., and Yocum, C. F. (1981). A highly resolved, oxygen-evolving Photosystem II probed by FTIR difference spectroscopy. *FEBS Letters*, 134:231–234.
- Berthomieu, C. and Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynth Res*, 101(2-3):157–170.
- Berthomieu, C., Hienerwadel, R., Boussac, A., Breton, J., and Diner, B. A. (1998). Hydrogen bonding of redox-active tyrosine Z of photosystem II probed by FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry*, 37(30):10547–10554.
- Berthomieu, C., Navedryk, E., Mäntele, W., and Breton, J. (1990). Characterization by FTIR spectroscopy of the photoreduction of the primary quinone acceptor Q<sub>A</sub> in photosystem II. *FEBS Lett*, 269(2):363–367.
- Blubaugh, D. J. and Govindjee (1988). The molecular mechanism of the bicarbonate effect at the plastoquinone reductase site of photosynthesis. *Photosynth Res*, 19:85–128.
- Bögershausen, O., Haumann, M., and Junge, W. (1996). Photosynthetic Oxygen Evolution: H/D Isotope effects and the coupling between electron and proton transfer during transitions S<sub>2</sub> → S<sub>3</sub> and S<sub>3</sub> → S<sub>4</sub> → S<sub>0</sub>. *Ber. Bunsenges.*, 100:1987–1992.
- Broser, M. (2010). *Purification, crystallization and structural analysis of the monomeric Photosystem II core complex from Thermosynechococcus elongatus*. PhD thesis, Technische Universität Berlin.
- Broser, M., Glöckner, C., Gabdulkhakov, A., Guskov, A., Buchta, J., Kern, J., Müh, F., Dau, H., Saenger, W., and Zouni, A. (2011). Structural Basis of Cyanobacterial Photosystem II Inhibition by the Herbicide Terbutryn. *J Biol Chem*, 286(18):15964–15972.
- Buchta, J., Grabolle, M., and Dau, H. (2007). Photosynthetic dioxygen formation studied by time-resolved delayed fluorescence measurements - method, rationale, and results on the activation energy of dioxygen formation. *Biochim Biophys Acta*, 1767:565–574.
- Buchta, J., Shutova, T., Samuelsson, G., and Dau, H. (2008). Time-Resolved Delayed Chlorophyll Fluorescence to Study the Influence of Bicarbonate on a Green Algae Mutant Photosystem II. *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*, pages 35–38.
- Buser, C. A., Diner, B. A., and Brudvig, G. W. (1992). Photooxidation of cytochrome b559 in oxygen-evolving photosystem II. *Biochemistry*, 31(46):11449–11459.

- Buser, C. A., Thompson, L. K., Diner, B. A., and Brudvig, G. W. (1990). Electron-transfer reactions in manganese-depleted photosystem II. *Biochemistry*, 29(38):8977–8985.
- Butler, W. L. (1972). On the Primary Nature of Fluorescence Yield Changes Associated with Photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(11):3420–3422.
- Campbell, D., Eriksson, M. J., Oquist, G., Gustafsson, P., and Clarke, A. K. (1998). The cyanobacterium *synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(1):364–369.
- Carrieri, D., Ananyev, G., Brown, T., and Dismukes, G. C. (2007). In vivo bicarbonate requirement for water oxidation by Photosystem II in the hypercarbonate-requiring cyanobacterium *Arthrospira maxima*. *J Inorg Biochem*, 101(11-12):1865–1874.
- Chamorovsky, C. S., Chamorovsky, S. K., and Semenov, A. Y. (2005). Dielectric and Photoelectric Properties of Photosynthetic Reaction Centers. *Biochemistry (Mosc)*, 70(2):257–263.
- Chen, R. and Kirsh, Y. (1981). *Analysis of thermally stimulated processes*, volume 15. Pergamon Press.
- Cheniae, G. M. and Martin, I. F. (1972). Effects of Hydroxylamine on Photosystem II: II. Photoreversal of the  $\text{NH}_2\text{OH}$  Destruction of  $\text{O}_2$  Evolution. *Plant Physiol*, 50(1):87–94.
- Cheniae, G. M. and Martin, I. F. (1978). Studies on the mechanism of Tris-induced inactivation of oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta*, 502(2):321–344.
- Chernev, P., Zaharieva, I., Dau, H., and Haumann, M. (2011). Carboxylate shifts steer interquinone electron transfer in photosynthesis. *J Biol Chem*, 286(7):5368–5374.
- Christen, G., Reifarth, F., and Renger, G. (1998). On the origin of the '35- $\mu\text{s}$  kinetics' of  $\text{P680}^{+\bullet}$  reduction in photosystem II with an intact water oxidising complex. *FEBS Letters*, 429(1):49–52.
- Christen, G. and Renger, G. (1999). The role of hydrogen bonds for the multiphasic  $\text{P680}^{+\bullet}$  reduction by  $\text{Y}_Z$  in photosystem II with intact oxygen evolution capacity. Analysis of kinetic H/D isotope exchange effects. *Biochemistry*, 38(7):2068–2077.
- Chylla, R. A. and Whitmarsh, J. (1989). Inactive Photosystem II Complexes in Leaves: Turnover Rate and Quantitation. *Plant Physiol*, 90(2):765–772.
- Clausen, J., Beckmann, K., Junge, W., and Messinger, J. (2005a). Evidence that bicarbonate is not the substrate in photosynthetic oxygen evolution. *Plant Physiol*, 139(3):1444–1450.
- Clausen, J., Debus, R. J., and Junge, W. (2004). Time-resolved oxygen production by PSII: chasing chemical intermediates. *Biochim Biophys Acta*, 1655(1-3):184–194.

- Clausen, J. and Junge, W. (2004). Detection of an intermediate of photosynthetic water oxidation. *Nature*, 430(6998):480–483.
- Clausen, J., Junge, W., Dau, H., and Haumann, M. (2005b). Photosynthetic water oxidation at high O<sub>2</sub> backpressure monitored by delayed chlorophyll fluorescence. *Biochemistry*, 44(38):12775–12779.
- Conjeaud, H. and Mathis, P. (1980). The effects of pH on the reductions kinetics of P-680 in Tris-treated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 590(3):353–359.
- Conjeaud, H., Mathis, P., and Paillotin, G. (1979). Primary and secondary electron donors in photosystem II of chloroplasts. Rates of electron transfer and location in the membrane. *Biochim Biophys Acta*, 546(2):280–291.
- Cser, K. and Vass, I. (2007). Radiative and non-radiative charge recombination pathways in Photosystem II studied by thermoluminescence and chlorophyll fluorescence in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Biochim Biophys Acta*, 1767(3):233–243.
- Cuni, A., Xiong, L., Sayre, R., Rappaport, F., and Lavergne, J. (2004). Modification of the pheophytin midpoint potential in photosystem II: Modulation of the quantum yield of charge separation and of charge recombination pathways. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6:4825–4831.
- Dau, H. (1994). Molecular Mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochemistry and Photobiology*, 60(1):1–23.
- Dau, H. and Haumann, M. (2007). Eight steps preceding O-O bond formation in oxygenic photosynthesis—a basic reaction cycle of the photosystem II manganese complex. *Biochim Biophys Acta*, 1767(6):472–483.
- Dau, H. and Haumann, M. (2008). The manganese complex of photosystem II in its reaction cycle - basic framework and possible realization at the atomic level. *Coordination Chemistry Review*, 252:273–295.
- Dau, H. and Sauer, K. (1996). Exciton equilibration and photosystem II exciton dynamics - a fluorescence study on photosystem II membrane particles of spinach. *Biochim Biophys Acta*, 1273:175–190.
- Dau, H. and Zaharieva, I. (2009). Principles, efficiency, and blueprint character of solar-energy conversion in photosynthetic water oxidation. *Acc Chem Res*, 42(12):1861–1870.
- de Wijn, R. and van Gorkom, H. J. (2001). Kinetics of electron transfer from Q<sub>A</sub> to Q<sub>B</sub> in photosystem II. *Biochemistry*, 40(39):11912–11922.
- de Wijn, R. and van Gorkom, H. J. (2002). The rate of charge recombination in photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1553(3):302–308.

- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1984). X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J Mol Biol*, 180(2):385–398.
- Dekker, J. P., Gorkom, H. J. V., Brok, M., and Ouwehand, L. (1984). Optical characterization of Photosystem II electron donors. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics*, 764(3):301 – 309.
- Deprez, J., Dobek, N., Geacintov, E., Paillotin, G., and Breton, J. (1983). Probing fluorescence induction in chloroplasts on a nanosecond time scale using picosecond laser pulse pairs. *Biochim Biophys Acta*, 725:444–454.
- Diner, B. A., Nixon, P. J., and Farchaus, J. W. (1991). Site-directed mutagenesis of photosynthetic reaction centers. *Current Opinion in Structural Biology*, 1(4):546 – 554.
- Diner, B. A. and Petrouleas, V. (1990). Formation by NO of nitrosyl adducts of redox components of photosystem II reaction center. II. evidence that  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  binds to the acceptor-side non-heme iron. *Biochim Biophys Acta*, 1015:141–149.
- Döring, G. (1975). Further results on the photoactive chlorophyll  $a_{II}$  in photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 376(2):274–284.
- Duysens, L. N. M. and Sweers, H. E. (1963). Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. *Japanese Society of Plant Physiologists (eds) Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, pages 353–372.
- Etienne, A. (1968). Etude de l'étape thermique de l'émission photosynthétique d'oxygène par une méthode d'écoulement. *Biochim Biophys Acta*, 153:895–897.
- Faller, P., Debus, R. J., Brettel, K., Sugiura, M., Rutherford, A. W., and Boussac, A. (2001). Rapid formation of the stable tyrosyl radical in photosystem II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(25):14368–14373.
- Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, 303(5665):1831–1838.
- Gerencser, L., Rinyu, L., Kalman, L., Wraight, C. A., and Maroti, P. (2004). Competitive binding of quinone and antibiotic stigmatellin to reaction centers of photosynthetic bacteria. *Acta Biologica Szegediensis*, 48(1-4):25–33.
- Gerken, S., Dekker, J., Schlodder, E., and Witt, H. (1989). Studies on the multiphasic charge recombination between chlorophyll  $a_{II}^+$  (P-680<sup>+</sup>) and plastoquinone  $Q_A^-$  in photosystem II complexes. Ultraviolet difference spectrum of Chl- $a_{II}^+$ /Chl- $a_{II}$ . *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics*, 977(1):52 – 61.

- Ginet, N. and Lavergne, J. (2001). Equilibrium and kinetic parameters for the binding of inhibitors to the  $Q_B$  pocket in bacterial chromatophores: dependence on the state of  $Q_A$ . *Biochemistry*, 40(6):1812–1823.
- Ginet, N. and Lavergne, J. (2008). Conformational control of the  $Q_A$  to  $Q_B$  electron transfer in bacterial reaction centers: evidence for a frozen conformational landscape below -25 degrees C. *J Am Chem Soc*, 130(29):9318–9331.
- Glöckner, C. (2009). *Functional Reconstitution of Mobile Plastoquinon in PS II Core Complexes Isolated from Thermosynechococcus elongatus*. PhD thesis, Technische Universität Berlin.
- Goltsev, V., Zaharieva, I., Chernev, P., and Strasser, R. J. (2009). Delayed fluorescence in photosynthesis. *Photosynth Res*, 101(2-3):217–232.
- Gorkom, H. (1985). Electron transfer in photosystem II. *Photosynth Research*, 6:97–112.
- Gorkom, H., Meiburg, R., and Vos, L. (1986). Thermodynamics of the charge recombination in photosystem II. *Photosynth Research*, 9:55–62.
- Govindjee (2004). Chlorophyll a fluorescence: A bit of basics and history. In Papegeorgiou, G. C. and Govindjee, editors, *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, pages 1–42. Kluwer Academic Publishers.
- Govindjee, Pulles, M. P., Govindjee, R., Van Gorkom, H. J., and Duysens, L. N. (1976). Inhibition of the reoxidation of the secondary electron acceptor of photosystem II by bicarbonate depletion. *Biochim Biophys Acta*, 449(3):602–605.
- Graan, T. and Ort, D. R. (1986). Detection of oxygen-evolving Photosystem II centers inactive in plastoquinone reduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 852(2-3):320 – 330.
- Grabolle, M. (2005). *Die Donorseite des Photosystems II der Pflanzen: Rekombinationsfluoreszenz- und Röntgenabsorptionsstudien*. PhD thesis, Freie Universität Berlin.
- Grabolle, M. and Dau, H. (2005). Energetics of primary and secondary electron transfer in photosystem II membrane particles of spinach revisited on basis of recombination-fluorescence measurements. *Biochim Biophys Acta*, 1708(2):209–218.
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., and Saenger, W. (2009). Cyanobacterial photosystem II at 2.9 Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat Struct Mol Biol*, 16(3):334–342.

- Hager, A. and Holocher, K. (1994). Localization of the synthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta*, 192:581–589.
- Haumann, M., Bögershausen, O., Cherepanov, D., Ahlbrink, R., and Junge, W. (1997). Photosynthetic oxygen evolution: H/D isotope effects and the coupling between electron and proton transfer during the redox reactions at the oxidizing side of Photosystem II. *Photosynth Research*, 51:193–208.
- Haumann, M. and Junge, W. (1999). Photosynthetic water oxidation: a simplex-scheme of its partial reactions. *Biochim Biophys Acta*, 1411(1):86–91.
- Haveman, J. and Lavorel, J. (1975). Identification of the 120  $\mu$ s phase in the decay of delayed fluorescence in spinach chloroplasts and subchloroplast particles as the intrinsic back reaction. The dependence of the level of this phase on the thylakoids internal pH. *Biochim Biophys Acta*, 408(3):269–238.
- Hays, A. M., Vassiliev, I. R., Golbeck, J. H., and Debus, R. J. (1998). Role of D1-His190 in proton-coupled electron transfer reactions in photosystem II: a chemical complementation study. *Biochemistry*, 37(32):11352–11365.
- Hays, A. M., Vassiliev, I. R., Golbeck, J. H., and Debus, R. J. (1999). Role of D1-His190 in the proton-coupled oxidation of tyrosine Y<sub>Z</sub> in manganese-depleted photosystem II. *Biochemistry*, 38(37):11851–11865.
- Häder, D.-P. (1999). *Photosynthese*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Henry, R. P. (1996). Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Anna Rev, Physiol*, 58:523–538.
- Hienerwadel, R., Boussac, A., Breton, J., and Berthomieu, C. (1996). Fourier transform infrared difference study of tyrosine D oxidation and plastoquinone Q<sub>A</sub> reduction in photosystem II. *Biochemistry*, 35(48):15447–15460.
- Hillier, W., McConnell, I., Badger, M. R., Boussac, A., Klimov, V. V., Dismukes, G. C., and Wydrzynski, T. (2006). Quantitative assessment of intrinsic carbonic anhydrase activity and the capacity for bicarbonate oxidation in photosystem II. *Biochemistry*, 45(7):2094–2102.
- Ido, K., Gross, C. M., Guerrero, F., Sedoud, A., Lai, T.-L., Ifuku, K., Rutherford, A. W., and Krieger-Liszka, A. (2011). High and low potential forms of the Q<sub>A</sub> quinone electron acceptor in Photosystem II of *Thermosynechococcus elongatus* and spinach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104(1-2):154–157.

- Iuzzolino, L., Dittmer, J., Dörner, W., Meyer-Klaucke, W., and Dau, H. (1998). X-ray absorption spectroscopy on layered photosystem II membrane particles suggests manganese-centered oxidation of the oxygen-evolving complex for the  $S_0 - S_1$ ,  $S_1 - S_2$ , and  $S_2 - S_3$  transitions of the water oxidation cycle. *Biochemistry*, 37(49):17112–17119.
- Jeans, C., Schilstra, M. J., and Klug, D. R. (2002). The temperature dependence of P680<sup>+</sup> reduction in oxygen-evolving photosystem II. *Biochemistry*, 41(15):5015–5023.
- Joliot, P., Barbieri, G., and Chabaud, R. (1969). Un nouveau modèle des centres photochimiques du système II. *Photochem. Photobiol.*, 10:309–329.
- Joliot, P., Hofnung, M., and Chabaud, R. (1966). Etude de l'émission d'oxygène par des algues soumises à un éclairage modulé sinusoïdalement. *J Chim Phys*, 63:1423–1441.
- Junge, W., Haumann, M., Ahlbrink, R., Mulikdjanian, A., and Clausen, J. (2002). Electrostatics and proton transfer in photosynthetic water oxidation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357(1426):1407–1417.
- Kanazawa, A., Kramer, D., and Crofts, A. (1992). Temperature dependence of PS2 electron transfer reactions measured by flash-induced fluorescence changes. *Research in Photosynthesis*, 2:131–134.
- Karge, M., Irrgang, K. D., and Renger, G. (1997). Analysis of the reaction coordinate of photosynthetic water oxidation by kinetic measurements of 355 nm absorption changes at different temperatures in photosystem II preparations suspended in either H<sub>2</sub>O or D<sub>2</sub>O. *Biochemistry*, 36(29):8904–8913.
- Karlsson, J., Clarke, A. K., Chen, Z. Y., Huggins, S. Y., Park, Y. I., Husic, H. D., Moroney, J. V., and Samuelsson, G. (1998). A novel alpha-type carbonic anhydrase associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO<sub>2</sub>. *EMBO J*, 17(5):1208–1216.
- Kautsky, H. and Hirsch, A. (1931). Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwiss*, 19:964–964.
- Kern, J. and Renger, G. (2007). Photosystem II: structure and mechanism of the water:plastoquinone oxidoreductase. *Photosynth Res*, 94(2-3):183–202.
- Klimov, V. V. and Baranov, S. V. (2001). Bicarbonate requirement for the water-oxidizing complex of photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1503(1-2):187–196.
- Klimov, V. V., Baranov, S. V., and Allakhverdiev, S. I. (1997a). Bicarbonate protects the donor side of photosystem II against photoinhibition and thermoinactivation. *FEBS Letters*, 418(3):243–246.

- Klimov, V. V., Hulsebosch, R. J., Allakhverdiev, S. I., Wincencjusz, H., van Gorkom, H. J., and Hoff, A. J. (1997b). Bicarbonate may be required for ligation of manganese in the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Biochemistry*, 36(51):16277–16281.
- Koike, H., Hanssum, B., Inoue, Y., and Renger, G. (1987). Temperature dependence of S-state transition in a thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus vulcanus* copeland measured by absorption changes in the ultraviolet region. *Biochim Biophys Acta*, 893:524–533.
- Kok, B., Forbush, B., and McGloin, M. (1970). Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochem Photobiol*, 11(6):457–475.
- Kós, P. B., Deák, Z., Cheregi, O., and Vass, I. (2008). Differential regulation of psbA and psbD gene expression, and the role of the different D1 protein copies in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Biochim Biophys Acta*, 1777(1):74–83.
- Krieger, A., Rutherford, A. W., and Johnson, G. N. (1995). On the determination of redox midpoint potential of the primary quinone electron acceptor, Q<sub>A</sub>, in Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1229(2):193 – 201.
- Krieger-Liszakay, A., Fufezan, C., and Trebst, A. (2008). Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynth Res*, 98(1-3):551–564.
- Krieger-Liszakay, A. and Rutherford, A. W. (1998). Influence of herbicide binding on the redox potential of the quinone acceptor in photosystem II: relevance to photodamage and phytotoxicity. *Biochemistry*, 37(50):17339–17344.
- Krishtalik, L. I. (1986). Energetics of multielectron reactions. photosynthetic oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta*, 849:162–171.
- Krivanek, R., Dau, H., and Haumann, M. (2008). Enthalpy changes during photosynthetic water oxidation tracked by time-resolved calorimetry using a photothermal beam deflection technique. *Biophys J*, 94(5):1890–1903.
- Krivanek, R., Kern, J., Zouni, A., Dau, H., and Haumann, M. (2007). Spare quinones in the Q<sub>B</sub> cavity of crystallized photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochim Biophys Acta*, 1767(6):520–527.
- Kulkarni, R. D. and Golden, S. S. (1994). Adaptation to high light intensity in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: regulation of three psbA genes and two forms of the D1 protein. *J Bacteriol*, 176(4):959–965.
- Lancaster, C. R. (2007). Structures of reaction centers in anoxygenic bacteria. *Primary processes of photosynthesis: basic principles and apparatus*, pages 5–56.

- Lancaster, C. R., Bibikova, M. V., Sabatino, P., Oesterhelt, D., and Michel, H. (2000). Structural basis of the drastically increased initial electron transfer rate in the reaction center from a *Rhodospseudomonas viridis* mutant described at 2.00-Å resolution. *J Biol Chem*, 275(50):39364–39368.
- Lancaster, C. R. and Michel, H. (1999). Refined crystal structures of reaction centres from *rhodospseudomonas viridis* in complexes with the herbicide atrazine and two chiral atrazine derivatives also lead to a new model of the bound carotenoid. *J Mol Biol*, 286(3):883–898.
- Lazar, D. (1999). Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochim Biophys Acta*, 1412(1):1–28.
- Leibl, W., Breton, J., Deprez, J., and Trissl, H.-W. (1989). Photoelectric study on the kinetics of trapping and charge stabilization in oriented PSII membranes. *Photosynth Research*, 22:257–275.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*, 148:350–382.
- Lindskog, S. (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther*, 74(1):1–20.
- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., and Biesiadka, J. (2005). Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature*, 438(7070):1040–1044.
- Mamedov, F., Sayre, R. T., and Styring, S. (1998). Involvement of histidine 190 on the D1 protein in electron/proton transfer reactions on the donor side of photosystem II. *Biochemistry*, 37(40):14245–14256.
- Mauzerall, D. (1972). Light-induced fluorescence changes in *Chlorella*, and the primary photoreactions for the production of oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(6):1358–1362.
- McConnell, I. L., Badger, M. R., Wydrzynski, T., and Hillier, W. (2007). A quantitative assessment of the carbonic anhydrase activity in photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1767(6):639–647.
- Melis, A. (1985). Functional properties of Photosystem II in spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 808(2):334 – 342.
- Menzel, J. (2009). *Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie am Photosystem II zur Untersuchung des Reaktionszyklus*. PhD thesis, Freie Universität Berlin.
- Metz, J. G., Nixon, P. J., Rögner, M., Brudvig, G. W., and Diner, B. A. (1989). Directed alteration of the D1 polypeptide of photosystem II: evidence that tyrosine-161 is the

redox component, Z, connecting the oxygen-evolving complex to the primary electron donor, P680. *Biochemistry*, 28(17):6960–6969.

Michel, H., Epp, O., and Deisenhofer, J. (1986). Pigment-protein interactions in the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*. *EMBO J*, 5(10):2445–2451.

Moenne-Loccoz, P., Robert, B., and Lutz, M. (1989). A resonance Raman characterization of the primary electron acceptor in photosystem II. *Biochemistry*, 28(9):3641–3645.

Moubarak-Milad, M. and Stemler, A. (1994). Oxidation-reduction potential dependence of photosystem II carbonic anhydrase in maize thylakoids. *Biochemistry*, 33(14):4432–4438.

Mulo, P., Sicora, C., and Aro, E. M. (2009). Cyanobacterial psbA gene family: optimization of oxygenic photosynthesis. *Cell Mol Life Sci*, 66(23):3697–3710.

Noguchi, T. (2007). Light-induced FTIR difference spectroscopy as a powerful tool toward understanding the molecular mechanism of photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth Res*, 91(1):59–69.

Noguchi, T., Ono, T., and Inoue, Y. (1992). Detection of structural changes upon  $S_1$  – to –  $S_2$  transition in the oxygen-evolving manganese cluster in photosystem II by light-induced Fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biochemistry*, 31(26):5953–5956.

Nugent, J. H., Rich, A. M., and Evans, M. C. (2001). Photosynthetic water oxidation: towards a mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 1503(1-2):138–146.

Oettmeier, W. (1999). Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cell Mol Life Sci*, 55(10):1255–1277.

Oettmeier, W., Godde, D., Kunze, B., and Höfle, G. (1985). Stigmatellin. a dual type inhibitor of photosynthetic electron transport. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics*, 807(2):216 – 219.

Park, Y. I., Karlsson, J., Rojdestvenski, I., Pronina, N., Klimov, V., Oquist, G., and Samuelsson, G. (1999). Role of a novel photosystem II-associated carbonic anhydrase in photosynthetic carbon assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, 444(1):102–105.

Parson, W. W. (2007). Functional pattern of reaction centers in anoxygenic photosynthetic bacteria. *Primary processes of photosynthesis: basic principles and apparatus*, pages 57–109.

Petrouleas, V. and Crofts, A. R. (2005). The iron-quinone acceptor complex. *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase*, pages 177–206.

- Rappaport, F., Cuni, A., Xiong, L., Sayre, R., and Lavergne, J. (2005). Charge recombination and thermoluminescence in photosystem II. *Biophys J*, 88(3):1948–1958.
- Rappaport, F., Guergova-Kuras, M., Nixon, P. J., Diner, B. A., and Lavergne, J. (2002). Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II. *Biochemistry*, 41(26):8518–8527.
- Rappaport, F. and Lavergne, J. (1997). Charge recombination and proton transfer in manganese-depleted photosystem II. *Biochemistry*, 36(49):15294–15302.
- Rappaport, F. and Lavergne, J. (2001). Coupling of electron and proton transfer in the photosynthetic water oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1503(1-2):246–259.
- Reinman, S. and Mathis, P. (1981). Influence of temperature on photosystem II electron transfer reactions. *Biochim Biophys Acta*, 635(2):249–258.
- Remy, A., Niklas, J., Kuhl, H., Kellers, P., Schott, T., Rögner, M., and Gerwert, K. (2004). FTIR spectroscopy shows structural similarities between photosystems II from cyanobacteria and spinach. *Eur J Biochem*, 271(3):563–567.
- Renger, G. (1979). A rapid vectorial back reaction at the reaction centers of photosystem II in tris-washed chloroplasts induced by repetitive flash excitation. *Biochim Biophys Acta*, 547(1):103–116.
- Renger, G. and Hanssum, B. (1992). Studies on the reaction coordinates of the water oxidase in PS II membrane fragments from spinach. *FEBS Letters*, 299(1):28–32.
- Renger, G. and Voelker, M. (1982). Studies on the proton release pattern of the donor side of system II: Correlation between oxidation and deprotonation of donor D1 in Tris-washed inside-out thylakoids. *FEBS Letters*, 149(2):203 – 207.
- Renger, G. and Wolff, C. (1976). The existence of a high photochemical turnover rate at the reaction centers of system II in Tris-washed chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 423(3):610–614.
- Richter, G. (1996). *Biochemie der Pflanzen*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Ruffle, S. V., Donnelly, D., Blundell, T. L., and Nugent, J. H. A. (1992). A three-dimensional model of the Photosystem II reaction centre of *Pisum sativum*. *Photosynth Research*, 34:287–300.
- Rutherford, A., Crofts, A., and Inoue, Y. (1982). Thermoluminescence as a probe of Photosystem II photochemistry. The origin of the flash-induced glow peaks. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics*, 682(3):457 – 465.
- Rutherford, A., Renger, G., Koike, H., and Inoue, Y. (1984). Thermoluminescence as a probe of photosystem II. The redox and protonation states of the secondary acceptor quinone

and the O<sub>2</sub>-evolving enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 767(3):548 – 556.

Rutherford, A. W. and Krieger-Liszkay, A. (2001). Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem Sci*, 26(11):648–653.

Sander, J. (2009). *Dynamische Anpassung von Photosystem 2 an Stressbedingungen : Die psbA-Genfamilie des Cyanobakteriums Thermosynechococcus elongatus als Modellsystem*. PhD thesis, Ruhr-Universität Bochum.

Sander, J., Nowaczyk, M., Buchta, J., Dau, H., Vass, I., Deák, Z., Dorogi, M., Iwai, M., and Rögner, M. (2010). Functional characterization and quantification of the alternative psba copies in thermosynechococcus elongatus and their role in photoprotection. *J Biol Chem*, 285(39):29851–29856.

Sane, P. V., Ivanov, A. G., Sveshnikov, D., Huner, N. P., and Oquist, G. (2002). A transient exchange of the photosystem II reaction center protein D1:1 with D1:2 during low temperature stress of *Synechococcus* sp. PCC 7942 in the light lowers the redox potential of Q<sub>B</sub>. *J Biol Chem*, 277(36):32739–32745.

Schatz, G. H., Brock, H., and Holzwarth, A. R. (1988). Kinetic and Energetic Model for the Primary Processes in Photosystem II. *Biophys J*, 54(3):397–405.

Schiller, H. and Dau, H. (2000). Preparation protocols for high-activity photosystem II membrane particles of green algae and higher plants, pH dependence of oxygen evolution and comparison of the S<sub>2</sub>-state multiline signal by X-band EPR spectroscopy. *J Photochem Photobiol B*, 55(2-3):138–144.

Schilstra, M. J., Rappaport, F., Nugent, J. H., Barnett, C. J., and Klug, D. R. (1998). Proton/hydrogen transfer affects the S-state-dependent microsecond phases of P680<sup>+</sup> reduction during water splitting. *Biochemistry*, 37(11):3974–3981.

Shigemori, K., Mino, H., and Kawamori, A. (1997). pH and Temperature Dependence of Tyrosine Z• Decay Kinetics in Tris-Treated PSII Particles Studied by Time-Resolved EPR. *Plant and Cell Physiology*, 38(9):1007–1011.

Shinkarev, V. P. (2005). Flash-induced oxygen evolution in photosynthesis: simple solution for the extended S-state model that includes misses, double-hits, inactivation, and backward-transitions. *Biophys J*, 88(1):412–421.

Shutova, T., Kenneweg, H., Buchta, J., Nikitina, J., Terentyev, V., Chernyshov, S., Andersson, B., Allakhverdiev, S. I., Klimov, V. V., Dau, H., Junge, W., and Samuelsson, G. (2008). The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O<sub>2</sub> evolution rate by proton removal. *EMBO J*, 27(5):782–791.

- Sinclair, J. and Arnason, T. (1974). Studies on a thermal reaction associated with photosynthetic oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta*, 368(3):393–400.
- Sobolev, V. and Edelman, M. (1995). Modeling the quinone-B binding site of the photosystem-II reaction center using notions of complementarity and contact-surface between atoms. *Proteins*, 21(3):214–225.
- Sonneveld, A., Rademaker, H., and Duysens, L. N. (1979). Chlorophyll a fluorescence as a monitor of nanosecond reduction of the photooxidized primary donor P-680 Of photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 548(3):536–551.
- Süss, B. (2011). *Entwicklung eines Step-Scan FTIR-Experiments zur Untersuchung der licht-induzierten Wasserspaltung der oxygenen Photosynthese*. PhD thesis, Freie Universität Berlin.
- Strehler, B. L. and Arnold, W. (1951). Light production by green plants. *J Gen Physiol*, 34(6):809–820.
- Sugiura, M., Kato, Y., Takahashi, R., Suzuki, H., Watanabe, T., Noguchi, T., Rappaport, F., and Boussac, A. (2010). Energetics in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* with a D1 protein encoded by either the psbA1 or psbA3 gene. *Biochim Biophys Acta*, 1797(8):1491–1499.
- Suzuki, H., Nagasaka, M. A., Sugiura, M., and Noguchi, T. (2005). Fourier transform infrared spectrum of the secondary quinone electron acceptor  $Q_B$  in photosystem II. *Biochemistry*, 44(34):11323–11328.
- Svensson, B., Etchebest, C., Tuffery, P., van Kan, P., Smith, J., and Styring, S. (1996). A model for the photosystem II reaction center core including the structure of the primary donor P680. *Biochemistry*, 35(46):14486–14502.
- Takahashi, R., Hasegawa, K., Takano, A., and Noguchi, T. (2010). Structures and binding sites of phenolic herbicides in the  $Q_B$  pocket of photosystem II. *Biochemistry*, 49(26):5445–5454.
- Takano, A., Takahashi, R., Suzuki, H., and Noguchi, T. (2008). Herbicide effect on the hydrogen-bonding interaction of the primary quinone electron acceptor  $Q_A$  in photosystem II as studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Photosynth Res*, 98(1-3):159–167.
- Thibodeau, D. L., Nabedryk, E., Hienerwadel, R., Lenz, F., Mäntele, W., and Breton, J. (1990). Time-resolved FTIR spectroscopy of quinones in *Rb. sphaeroides* reaction centers. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics*, 1020(3):253 – 259.

- Trebst, A. (1980). Inhibitors in electron flow: tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. *Methods Enzymol*, 69:675–715.
- Trebst, A. (1987). The three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II. *Z Naturforsch*, 42(6):742–750.
- Tyystjärvi, E. and Vass, I. (2004). Light emission as a probe of charge separation and recombination in the photosynthetic apparatus: Relation of prompt fluorescence to delayed light emission and thermoluminescence. In: *Papageorgiou G, Govindjee (eds) Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, Dordrecht, pages 363–388.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R., and Kamiya, N. (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature advance online publication*.
- van Rensen, J. J. (2002). Role of bicarbonate at the acceptor side of photosystem II. *Photosynth Res*, 73(1-3):185–192.
- Vass, I. (2003). The history of photosynthetic thermoluminescence. *Photosynth Res*, 76(1-3):303–318.
- Vass, I. (2011). Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex. *Physiol Plant*, 142(1):6–16.
- Vass, I. and Cser, K. (2009). Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. *Trends Plant Sci*, 14(4):200–205.
- Vass, I. and Govindjee (1996). Thermoluminescence from the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research*, 48:117–126.
- Vass, I. and Inoue, Y. (1986). pH dependent stabilization of  $S_2Q_A^-$  and  $S_2Q_B^-$  charge pairs studied by thermoluminescence. *Photosynth Research*, 10:431–436.
- Vass, I. and Styring, S. (1993). Characterization of chlorophyll triplet promoting states in photosystem II sequentially induced during photoinhibition. *Biochemistry*, 32(13):3334–3341.
- Vernotte, C., Etienne, A. L., and Briantais, J. M. (1979). Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool. *Biochim Biophys Acta*, 545(3):519–527.
- Villarejo, A., Shutova, T., Moskvina, O., Forssén, M., Klimov, V. V., and Samuelsson, G. (2002). A photosystem II-associated carbonic anhydrase regulates the efficiency of photosynthetic oxygen evolution. *EMBO J*, 21(8):1930–1938.
- Warburg, O. and Krippahl, G. (1958). Hill-Reaktionen. *Z Naturforsch B*, 13B(8):509–514.

- Whitmarsh, J. and Govindjee (2001). *Photosystem II, Encyclopedia of Life Sciences*. MacMillan Reference Limited, London.
- Wincencjusz, H., Allakhverdiev, S. I., Klimov, V. V., and van Gorkom, H. J. (1996). Bicarbonate-reversible formate inhibition at the donor side of photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1273(1):1–3.
- Wydrzynski, T. and Govindjee (1975). A new site of bicarbonate effect in photosystem II of photosynthesis: evidence from chlorophyll fluorescence transients in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 387:403–408.
- Xiong, J., Minagawa, J., Crofts, A., and Govindjee (1998). Loss of inhibition by formate in newly constructed photosystem II D1 mutants, D1-R257E and D1-R257M, of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta*, 1365(3):473–491.
- Xiong, J., Subramaniam, S., and Govindjee (1996). Modeling of the D1/D2 proteins and cofactors of the photosystem II reaction center: implications for herbicide and bicarbonate binding. *Protein Sci*, 5(10):2054–2073.
- Yerkes, C. T. and Babcock, G. T. (1980). Photosystem II oxidation of charged electron donors. surface charge effects. *Biochim Biophys Acta*, 590(3):360–372.
- Yerkes, C. T., Babcock, G. T., and Crofts, A. R. (1983). A Tris-induced change in the midpoint potential of Z, the donor to photosystem II, as determined by the kinetics of the back reaction. *FEBS Letters*, 158(2):359 – 363.
- Yruela, I., Allakhverdiev, S. I., Ibarra, J. V., and Klimov, V. V. (1998). Bicarbonate binding to the water-oxidizing complex in the photosystem II. A Fourier transform infrared spectroscopy study. *FEBS Letters*, 425(3):396–400.
- Zankel, K. (1971). Rapid delayed luminescence from chloroplasts: kinetic analysis of components; the relationship to the O<sub>2</sub> evolving system. *Biochim Biophys Acta*, 245(2):373–385.
- Zhang, H., Razeghifard, M. R., Fischer, G., and Wydrzynski, T. (1997). A time-resolved FTIR difference study of the plastoquinone Q<sub>A</sub> and redox-active tyrosine Y<sub>Z</sub> interactions in photosystem II. *Biochemistry*, 36(39):11762–11768.
- Zimmermann, K., Heck, M., Frank, J., Kern, J., Vass, I., and Zouni, A. (2006). Herbicide binding and thermal stability of photosystem II isolated from *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochim Biophys Acta*, 1757(2):106–114.
- Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., and Orth, P. (2001). Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, 409(6821):739–743.

---

## Abbildungsverzeichnis

---

1.1	Thylakoidmembran . . . . .	10
1.2	Z-Schema . . . . .	11
1.3	PSII-Schema . . . . .	12
1.4	Kok-Zyklus . . . . .	13
1.5	PSII-Energetik . . . . .	16
1.6	Das Reversible-Radikalpaar-Modell . . . . .	19
2.1	Filter für PF-Detektion . . . . .	28
2.2	Messaufbau der verzögerten Fluoreszenz . . . . .	29
3.1	Prompte Fluoreszenz . . . . .	39
3.2	Sauerstoffphase . . . . .	40
3.3	Arrhenius-Plots . . . . .	41
4.1	Messung der Sauerstoffentwicklung . . . . .	49
4.2	Ergebnisse der O <sub>2</sub> -Polarographie . . . . .	50
4.3	PF-Messungen zur Untersuchung der Akzeptorseite . . . . .	51
4.4	Messung der Sauerstoff-Rate . . . . .	52
4.5	Vergleich der Sauerstoffmuster der verzögerten Fluoreszenz . . . . .	53
4.6	Zeitverlauf der verzögerten Fluoreszenz nach Blitz 3 . . . . .	54
4.7	Vergleich der Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz . . . . .	55
4.8	Sequenz der Ereignisse nach Blitz 3 . . . . .	58
5.1	Übersicht über verschiedene Herbizidstrukturen . . . . .	62
5.2	pH-Abhängigkeit der Sauerstoff-Blitzmuster für PSII-Dimer- und Monomerproben . . . . .	65

5.3	Bindungskurven für Terbutryn . . . . .	67
5.4	Bindungskurven für Stigmatellin . . . . .	69
5.5	PSII-Struktur mit gebundenem Terbutryn an der Q <sub>B</sub> -Bindungsstelle . . . . .	72
5.6	PSII-Struktur mit gebundenem Plastochinon/Terbutryn, Chlorid-Positionen an der PSII-Donorseite . . . . .	72
6.1	Strukturmodell des D1-Proteins . . . . .	77
6.2	Wachstumskurven unter Normal- und Starklichtbedingungen . . . . .	78
6.3	Thermolumineszenzmessungen an den PsbA-Varianten . . . . .	79
6.4	Messungen der prompten Fluoreszenz an den PsbA-Varianten . . . . .	81
6.5	Sauerstoffmuster der verzögerten Fluoreszenz . . . . .	82
6.6	Vergleich der DF-Zeitverläufe zwischen WT und $\Delta psbA1/psbA2$ -Mutante . . . . .	83
6.7	Energieniveau-Schema . . . . .	85
6.8	Photoprotektiver Mechanismus . . . . .	86
7.1	DF-Kurven in Mn-befreiten PSII-Proben nach Blitz 1 und 4 . . . . .	89
7.2	P680 <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> -Rekombination: Blitzprotokoll . . . . .	90
7.3	pH-Abhängigkeit der partiellen Rekombination . . . . .	91
7.4	Bestimmung von $\Delta G(\text{Chl}^* - \text{P680}^+\text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-)$ . . . . .	93
7.5	P680 <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> -Rekombination, Temperaturabhängigkeit, DF-Kurven . . . . .	93
7.6	P680 <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> -Rekombination: Arrheniusplot . . . . .	94
7.7	Y <sub>Z</sub> <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> -Rekombination, pH-Abhängigkeit, PF-Kurven . . . . .	96
7.8	Y <sub>Z</sub> <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> - und S <sub>2</sub> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> -Rekombination, pH-Abhängigkeit, Zeit- und Ratenkonstanten . . . . .	96
7.9	Bestimmung von $\Delta G(\text{Chl}^* - \text{Y}_Z^+\text{Q}_A^-)$ . . . . .	100
7.10	Y <sub>Z</sub> <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> -Rekombination: Temperaturabhängigkeit . . . . .	101
7.11	Y <sub>Z</sub> <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> -Rekombination/S <sub>2</sub> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> -Rekombination: Arrheniusplots . . . . .	101
7.12	Langsame Y <sub>Z</sub> <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> /Q <sub>B</sub> <sup>-</sup> -Rekombination, Doppelblitzprotokoll . . . . .	103
7.13	Langsame Y <sub>Z</sub> <sup>+</sup> [Q <sub>A</sub> /Q <sub>B</sub> ] <sup>-</sup> -Rekombination: pH-Abhängigkeit, Zerfallskurven . . . . .	104
7.14	Langsame Y <sub>Z</sub> <sup>+</sup> [Q <sub>A</sub> /Q <sub>B</sub> ] <sup>-</sup> -Rekombination: pH-Abhängigkeit, Fit-Ergebnisse . . . . .	104
7.15	Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> -Zerfall bei T = 10 °C . . . . .	106
7.16	Bestimmung von $\Delta\Delta G(\text{Chl}^* - \text{Y}_Z^+[\text{Q}_A/\text{Q}_B]^-)$ . . . . .	107
7.17	Langsame Y <sub>Z</sub> <sup>+</sup> [Q <sub>A</sub> /Q <sub>B</sub> ] <sup>-</sup> -Rekombination: Temperaturabhängigkeit . . . . .	107
7.18	FTIR-Differenzspektrum nach 77 ms . . . . .	108
7.19	FTIR-Spektren, Zeitabhängigkeit, 3D-Darstellung . . . . .	111
7.20	Zeitverläufe des FTIR-Differenzsignals in Mn-befreiten PSII-Proben für verschiedene Wellenzahlen . . . . .	112
7.21	FTIR-Spektren (pH 8,0, Raumtemperatur) . . . . .	115
7.22	FTIR-Spektren (pH 6,2, Raumtemperatur) . . . . .	116
7.23	FTIR-Spektren (pH 8,0, 10 °C) . . . . .	117
7.24	FTIR-Fit-Ergebnisse (pH 8,0; RT) . . . . .	119

7.25	FTIR-Fit-Ergebnisse (pH 6,2; RT) . . . . .	120
7.26	FTIR-Fit-Ergebnisse (pH 8,0; 10 °C) . . . . .	121
7.27	PSII-Energieschema . . . . .	124
C.1	$Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination, pH-Abhängigkeit, PF-Kurven, Fit-Amplituden . . . . .	163
C.2	Die Amplitude der schnellen Phase der prompten Fluoreszenz in intakten PSII-Proben in Abhängigkeit der DCMU-Konzentration. . . . .	164
C.3	$S_2Q_A^-$ -Rekombination, pH-Abhängigkeit, PF-Kurven . . . . .	164
C.4	$S_2Q_A^-$ -Rekombination, pH-Abhängigkeit, Fit-Parameter . . . . .	165
C.5	$S_2Q_A^-$ -Rekombination, Temperatur-Abhängigkeit, PF-Kurven . . . . .	165
C.6	Ergebnisse der Kurvenanpassung der Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz in Abhängigkeit vom pH-Wert . . . . .	166
C.7	Langsame Rekombination: pH-Abhängigkeit, Fit-Ergebnisse . . . . .	167
C.8	Langsame Rekombination: Temperaturabhängigkeit, Fit-Ergebnisse . . . . .	167



---

## Tabellenverzeichnis

---

3.1	Übersicht über in der Literatur veröffentlichten Aktivierungsenergien für den sauerstoffbildenden Schritt. . . . .	43
4.1	Fit-Ergebnisse für die <i>cia3</i> -Mutante . . . . .	56
4.2	Fit-Ergebnisse für den WT . . . . .	56
5.1	Ermittelte Bindungskonstanten für Stigmatellin und Terbutryn . . . . .	73
6.1	Ergebnisse der Simulationen (3. Blitz) . . . . .	84
7.1	Ermittelte Zeitkonstanten für die $P680^+Q_A^-$ -Rekombination . . . . .	91
7.2	Vergleich der Aktivierungsenergien für die $P680^+Q_A^-$ -Rekombination. . . . .	94
7.3	Vergleich der Aktivierungsenergien für die $S_2Q_A^-$ -Rekombination . . . . .	102
7.4	Literaturübersicht der aus FTIR-Differenzspektren ermittelten Wellenzahlen in Mn-befreiten PSII-Proben . . . . .	109
7.5	Literaturübersicht der aus FTIR-Differenzspektren ermittelten Wellenzahlen in Mn-befreiten PSII-Proben (Fortsetzung) . . . . .	110
7.6	Energieniveaus und Anregungsenergien in PSII-Proben ohne Mangankomplex	123



# ANHANG A

---

## Pufferlösungen

---

Der pH-Wert der Pufferlösungen wurde durch Zugabe von HCl bzw. NaOH eingestellt.

### Herstellung der BBY-Präparationen

<b>Puffer A, pH 7,5 (Aufbruchpuffer)</b>		<b>Puffer B, pH 6,2 (Hypotonischer Puffer)</b>	
0,4 M	Saccharose	25 mM	MES
25 mM	HEPES	150 mM	NaCl
15 mM	NaCl	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
5 mM	MgCl <sub>2</sub>		
5 mM	CaCl <sub>2</sub>		
2 g/l	BSA		
5 mM	Na-Ascorbat		

<b>Puffer C, pH 6,2</b> <b>(Triton-Inkubationspuffer)</b>		<b>Puffer D, pH 6,2</b> <b>(Resuspensions-/Lagerpuffer)</b>	
1 M	Glycin-Betain	1 M	Glycin-Betain
25 mM	MES	25 mM	MES
15 mM	NaCl	15 mM	NaCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
5 mM	CaCl <sub>2</sub>	5 mM	CaCl <sub>2</sub>

## Messpuffer

<b>Puffer (pH 4,0 - 9,0)</b>	
1 M	Glycin-Betain
25 mM	MES
25 mM	MOPS
25 mM	EPPS
10 mM	NaCl
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
5 mM	CaCl <sub>2</sub>

## Puffer zur Entfernung des Mangankomplexes

<b>Puffer</b>	<b>Puffer</b>
<b>MnDepletion1, pH 6,5</b>	<b>MnDepletion2, pH 9,0</b>
20 mM TEMED	35 mM NaCl
0,5 M MgCl <sub>2</sub>	20 mM TRIS
20 mM MES	

## B.1 Messplatz - Verzögerte Fluoreszenz

- **Laser:** Minilite II Continuum, Blitzlampe und Q-Switch extern gesteuert.
- **Trigger-Photodiode**
- **Delay-Generator:** UN Gerätebau, Pulsgenerator für Photomultiplier-Gating. Einstellungen: PM-Delay = 143  $\mu$ s; PM-Gatedauer = 3  $\mu$ s; Verzögerung = beliebig; Endpulsdauer = beliebig, Zyklenzahl = 000 (externer Start).
- **Hochspannungsnetzteile:** HV1 (PM) - Heinzinger HNC 3000, U = -1000V; HV2 (Gegenspannung Gating) - Ltronix Power Supply 12,5K-10HR. U = -240 V
- **Filter:** 1) DT-Red (Linos Photonics); 2) DT-Magenta (Linos Photonics)
- **Vorverstärker:** Verstärkt Kanal 1, Gain 30, Bandbreite 1,5 MHz, Eingangswiderstand 1 M $\Omega$
- **Verstärker:** Tektronix AM 502 mit Power Module TM 501. Kanal 1: Gain 5, Bandbreite 100 kHz; Kanal 2: Gain 2, Bandbreite 300 kHz.
- **Oszilloskop:** Tektronix 2445A (150 MHz) zur Verstärkungs- und Offsetkontrolle von Kanal 1 und 2

- **PCs:** PC 1 - Windows 2000 mit PC-Messkarte PCI 9812, Ch 0 = Eingang Kanal 1, Ch 1 = Eingang Kanal 2, Ch 2 = Eingang Trigger-Photodiode; PC 2 - Windows 98, Lasersteuerung mit dem Programm FluorWin (PSI)
- **Steuerung:** Steuergerät des "Double-Modulation Fluorometer FL 3000 für externen Lasersteuerung. Belegung: AUX 4 = Laser-Blitzlampe, AUX 6 = Q-Switch.

## B.2 Laser

---

Wellenlänge	532 nm
Pulsenergie	25 mJ
mittlere Leistung	375 mW
Pulsbreite (FWHM)	3–5 ns
Polarisation	vertikal
Strahldurchmesser	<3 mm
Wiederholungsrate	1–15,Hz

---

## B.3 Photomultiplier

---

Anzahl Dynoden	10
Aktive Fläche ( $\varnothing$ )	34 mm
Fenstermaterial	Borosilicat
Anodenempfindlichkeit	50 A/lm
Verstärkung	$2,5 \cdot 10^5$
Dunkelstrom	8 nA
Transitzeit	40 ns
Anstiegszeit	2,8 ns
Betriebsspannung	-1000V

---

Ergänzende Abbildungen zu Kapitel 7

C.1 Abbildungen  $Y_Z^+ Q_A^-$ -Rekombination

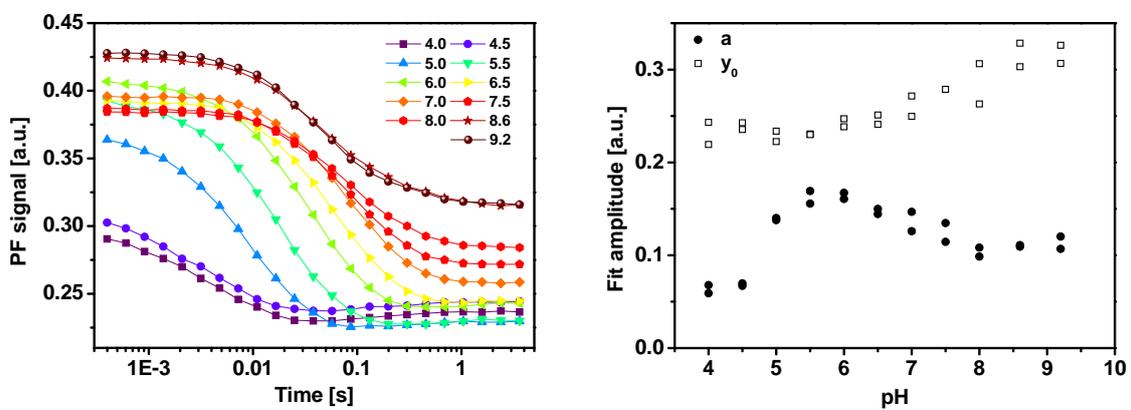


Abb. C.1: pH-Abhängigkeit der  $Y_Z^+ Q_A^-$ -Rekombination in Mn-befreiten PSII-Proben gemessen mit prompter Fluoreszenz bei Raumtemperatur. Links: Ermittelte Zerfallskurven. Rechts: Die aus einem monoexponentiellen Fit (bis pH 7,5, darüber biexponentiell) ermittelten Amplituden.

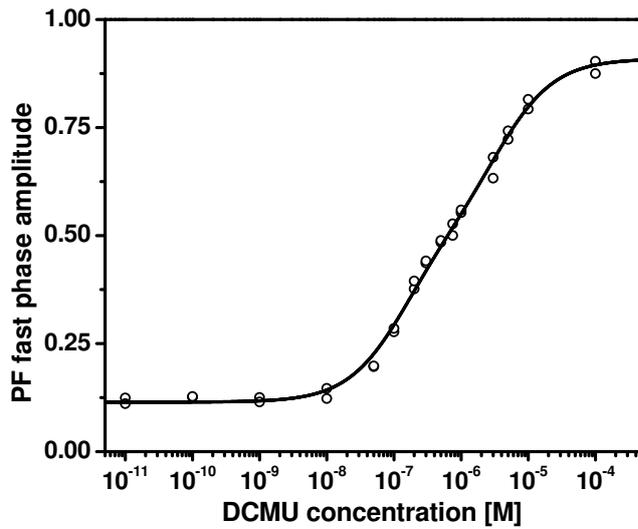


Abb. C.2: Die Amplitude der schnellen Phase der prompten Fluoreszenz in intakten PSII-Proben in Abhängigkeit der DCMU-Konzentration.

## C.2 Abbildungen $S_2Q_A^-$ -Rekombination

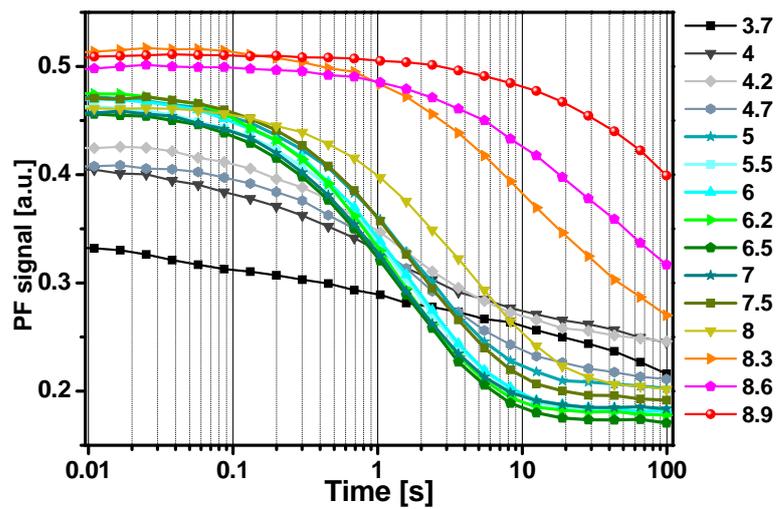


Abb. C.3: pH-Abhängigkeit der  $S_2Q_A^-$ -Rekombination in intakten PSII-Proben gemessen mit prompter Fluoreszenz bei Raumtemperatur. Die Kurven wurden mit einer biexponentiellen Funktion gefittet. Die erhaltenen Parameter sind in den Abb. C.4 und 7.8 dargestellt.

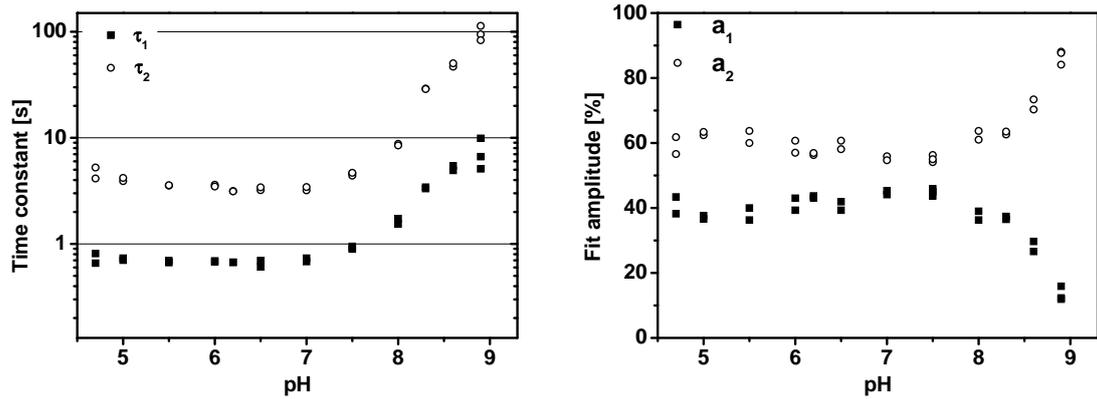


Abb. C.4: pH-Abhängigkeit der  $S_2Q_A^-$ -Rekombination in intakten PSII-Proben gemessen mit prompter Fluoreszenz bei pH 6,2. A) Ermittelte Zeitkonstanten eines biexponentiellen Fits. B) Die den Zeitkonstanten zugehörigen Amplitudenwerte.

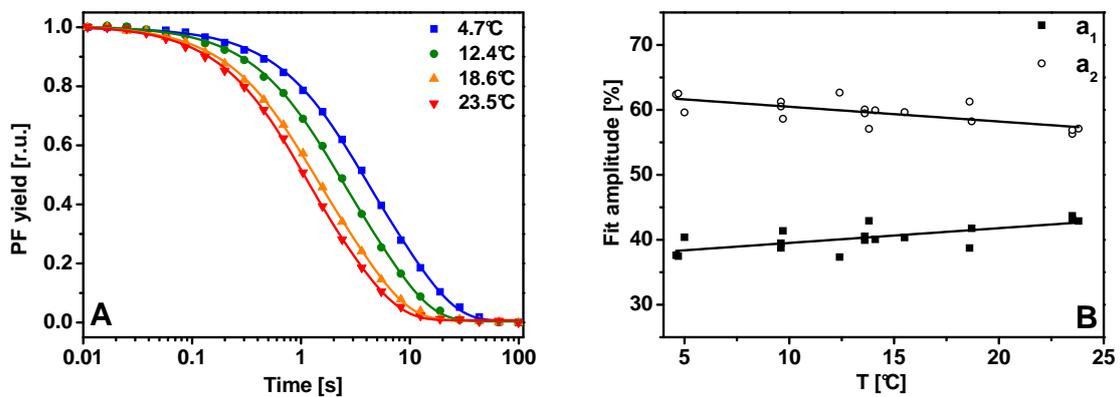


Abb. C.5: Temperaturabhängigkeit der  $S_2Q_A^-$ -Rekombination. A) Normierte PF-Kurven bei ausgewählten Temperaturen. Die Symbole geben gemessene Werte, die durchgezogene Linien die biexponentielle Kurvenanpassung wieder. B: Temperaturabhängigkeit der aus der biexponentiellen Kurvenanpassung erhaltenen Amplituden der  $S_2Q_A^-$ -Rekombination.

### C.3 Abbildungen $P680^+Y_Z^+Q_A^-$ -Rekombination

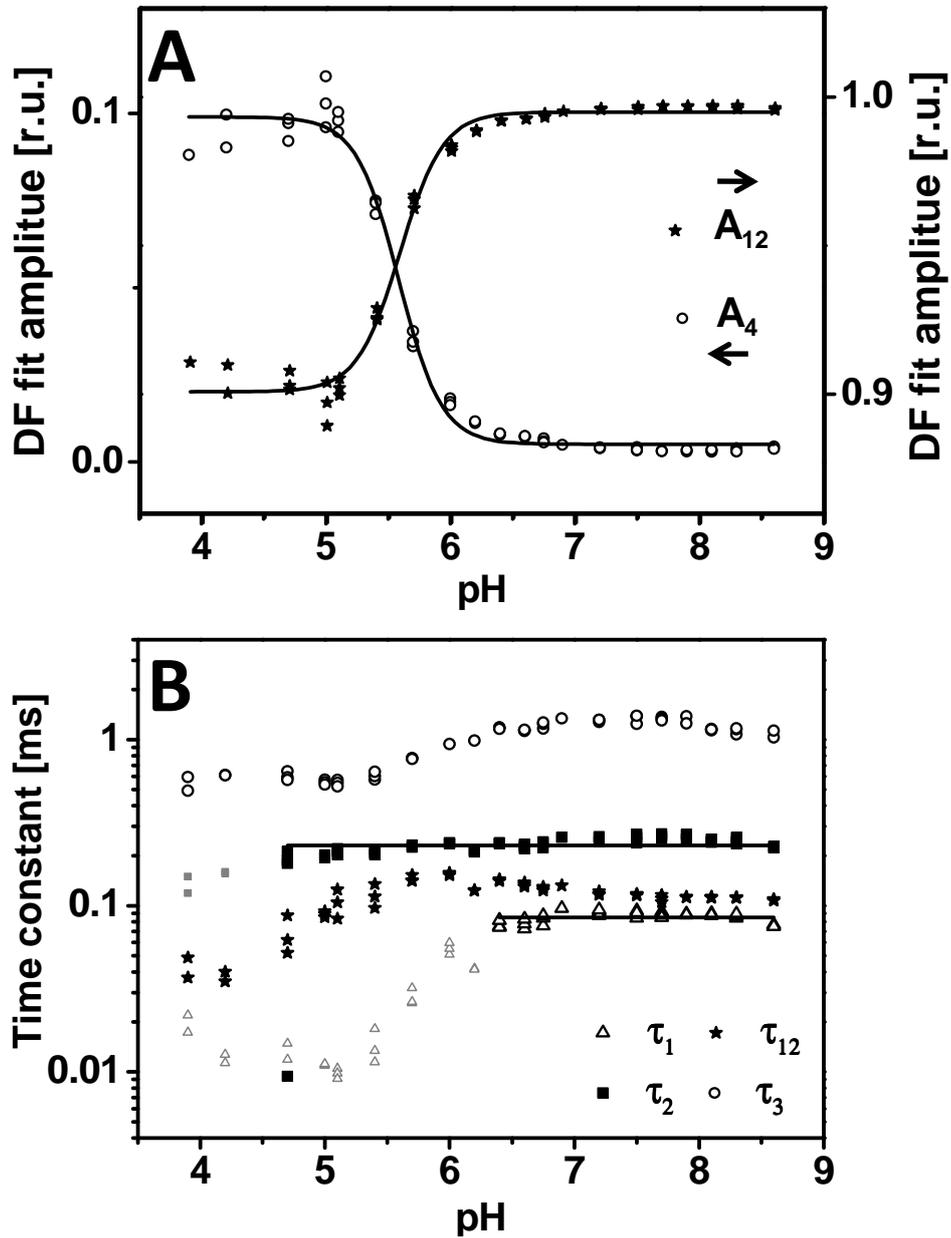


Abb. C.6: Ergebnisse der Kurvenanpassung der Zeitverläufe der verzögerten Fluoreszenz (Abb. 7.1 unten) in Abhängigkeit vom pH-Wert. A: Relative Amplituden  $A_{12}$  ( $A_1 + A_2$ ) und  $A_3$  (pK 5,6). B: Zeitkonstanten  $\tau_1$  (Dreiecke),  $\tau_2$  (Quadrate) und  $\tau_3$  (Kreise). Zusätzlich ist die mittlere Zeitkonstante  $\tau_{12}$  (Sterne) eingezeichnet.

## C.4 Abbildungen zur langsamen

### $Y_Z^+ Q_A^- / Q_B^-$ -Rekombination

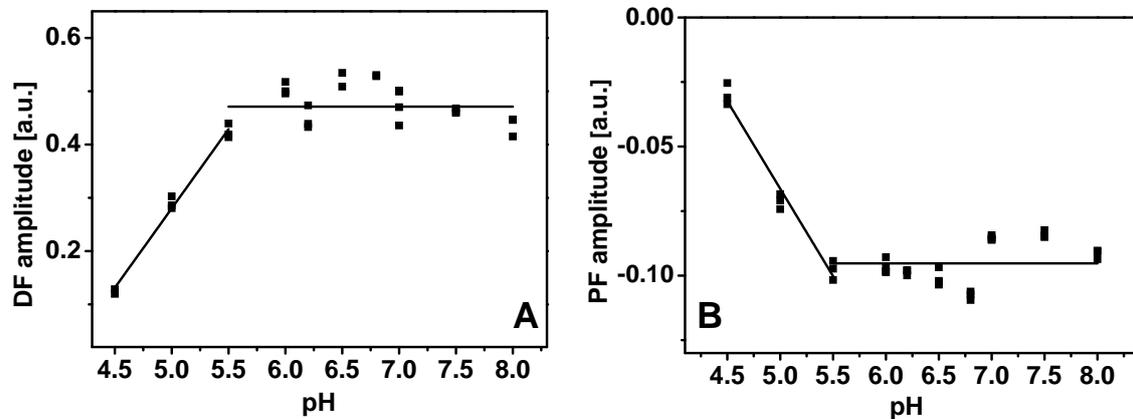


Abb. C.7: pH-Abhängigkeit der langsamen  $Y_Z^+ Q_A^- / Q_B^-$ -Rekombination in Mn-freien PSII bei Raumtemperatur. Die Zerfallskurven (siehe Abb. 7.13) wurden monoexponentiell gefittet. Die zugehörigen Zeit- bzw. Ratenkonstanten sind in Abb. 7.14 dargestellt. A: Fit-Amplituden der Messungen der verzögerten Fluoreszenz. B: Fit-Amplituden der Messungen der prompten Fluoreszenz.

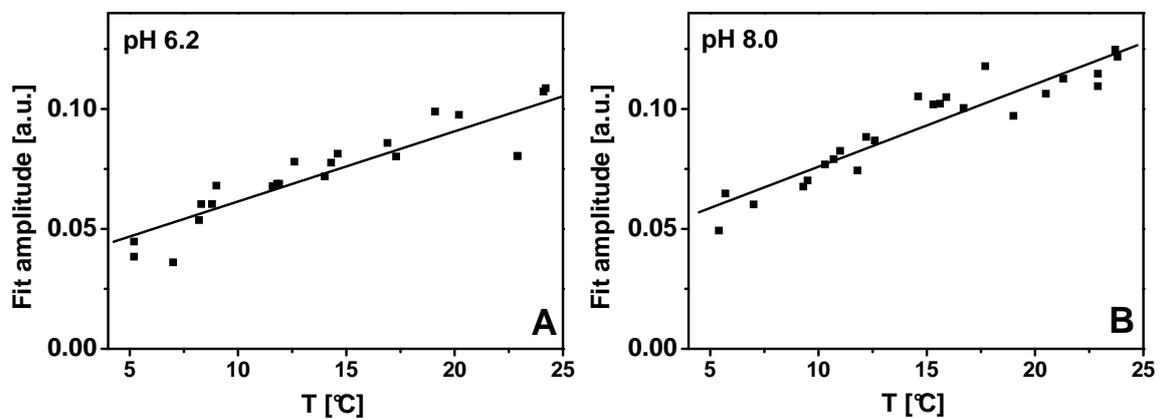


Abb. C.8: Temperaturabhängigkeit der langsamen  $Y_Z^+ Q_A^- / Q_B^-$ -Rekombination in Mn-freien PSII bei pH 6,2 (links) und pH 8,0 (rechts). Die Zerfallskurven (siehe Abb. 7.17A für pH 6,2) wurden monoexponentiell gefittet. Die zugehörigen Arrheniusplots sind in Abb. 7.14B dargestellt.

# Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die vorliegende Arbeit ist in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt worden.

Berlin,

Joachim Buchta



