

# Wasseroxidation am Photosystem II der Pflanzen:

## Photothermische Charakterisierung der lichtinitiierten Reaktionsschritte



Im Fachbereich Physik  
der Freien Universität Berlin  
eingereichte Dissertation von

André Klauß

Berlin, 2012



1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Dau

2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Heberle

Tag der Disputation: 17. Oktober 2012



## Kurzfassung

Die Oxidation von Wasser durch Cyanobakterien, Algen und Pflanzen stellt einen zentralen Schritt in der oxygenen Photosynthese dar. Das katalytische Zentrum – ein Mangan-Calcium-Komplex und seine Proteinumgebung – im Photosystem II (PSII) durchläuft zyklisch vier semistabile Zustände ( $S_0$  bis  $S_3$ ). Der vollständige Reaktionszyklus umfasst das Entfernen von 4 Elektronen und 4 Protonen von dem Mn-Komplex. Mit zeitaufgelösten photothermischen Experimenten konnte ich Volumenänderungen des PSII-Proteins beobachten, die mit lokaler Ladungsbildung durch lichtinduzierten Elektronentransfer (Kontraktion) und ladungskompensierenden Protonenbewegungen (Expansion) zusammenhängen. Zwei zuvor unsichtbare Protonenabgaben des Mn-Komplexes konnten so beobachtet und zwei Lücken im Reaktionszyklusmodell der photosynthetischen Wasseroxidation gefüllt werden. Im  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang des klassischen S-Zyklus wird durch Deprotonierung ein Intermediat deutlich vor dem Elektronentransfer (ET) zum Oxidans ( $Y_Z^{ox}$ ) gebildet. Charakteristisch für den ratenlimitierenden Elementarschritt ( $\tau \approx 35 \mu s$  bei  $20^\circ C$ ) der Überführung des Protons vom Mn-Komplex zur Wasser-Protein-Grenzschicht sind: eine hohe Aktivierungsenergie ( $E_a = 0,46 \pm 0,05 eV$ ), ein ausgeprägter H/D-Isotopenaustausch-Effekt ( $KIE \approx 5$ ) und eine deutliche pH-Abhängigkeit ( $\tau \approx 20 \mu s$  bei pH 7,0 und  $\tau \approx 60 \mu s$  bei pH 5,5). Die Eigenschaften eines Protonentransferschritts im  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang waren ähnlich ( $\tau \approx 100 \mu s$  bei  $20^\circ C$ ,  $E_a = 0,34 \pm 0,08 eV$ ,  $KIE \approx 3$ ,  $\tau^{5.5}/\tau^{7.0} \approx 1,5$ ). Die Abgabe des Protons erfolgte hier jedoch nach dem ET zu  $Y_Z^{ox}$ . Durch die Entdeckung zweier weiterer Intermediate im Reaktionszyklus der photosynthetischen Wasseroxidation wird eine zeitliche Sequenz strikt alternierender Entfernung von Elektronen und Protonen vom Mn-Komplex etabliert. In einem zweiten experimentellen Ansatz konnten Prozesse im Hundert-ns-Zeitbereich mit der Methode der Photoakustik beobachtet werden, die auf der Detektion einer Druckwelle nach Anregung von PSII-Proben mit ns-Laserpulsen basiert. Diese Prozesse mit Zeitkonstanten von  $\sim 350 ns$  bei  $25^\circ C$  gehen ET-Reaktionen am Mn-Komplex deutlich voraus und sind in der Vergangenheit als energetische Relaxation des oxidierten  $Y_Z^{ox}$  interpretiert worden. Die photoakustischen Experimente zeigen, dass speziell bei Anregung von PSII im  $S_2$ -Zustand nukleare Umordnungen ausgelöst werden, die zu einer Kontraktion von mindestens  $30 \text{ \AA}^3$  führen. Im  $S_3$ -Zustand fiel die ns-Kontraktion fünfmal kleiner aus, in  $S_0$  und  $S_1$  war keine Volumenänderung in diesem ns-Zeitbereich zu beobachten. Daher wird in der Schrift diskutiert, dass die Bildung eines Intermediatzustands spezifischer atomarer Struktur das oxidierte Tyrosin  $Y_Z^{ox}$  durch energetische Relaxation stabilisiert und den Mn-Komplex auf die folgende Entfernung des Protons und Elektrons vorbereitet.



## Abstract

Water oxidation by cyanobacteria, algae, and plants is pivotal in oxygenic photosynthesis, the process that powers life on earth. The catalytic site, a manganese-calcium complex and its protein environment in photosystem II (PSII), cycles through four semi-stable states ( $S_0$  to  $S_3$ ). Each turnover of the reaction cycle of photosynthetic water oxidation requires the removal of 4 electrons and 4 protons from the Mn-complex. In time-resolved photothermal beam deflection (PBD) experiments, it was possible to monitor the apparent volume changes of the PSII protein that are associated with charge creation by light-induced electron transfer (contraction) and charge-compensating proton relocation (expansion). Two previously invisible proton removal steps were detected, thereby filling two gaps in the basic reaction-cycle model of photosynthetic water oxidation. In the  $S_2 \rightarrow S_3$  transition of the classical S-state cycle, an intermediate is formed by deprotonation clearly before electron transfer to the oxidant ( $Y_Z^{\text{ox}}$ ). The rate-determining elementary step ( $\tau \approx 35 \mu\text{s}$  at  $20^\circ\text{C}$ ) in the long-distance proton relocation toward the protein-water interface is characterized by a high activation energy ( $E_a = 0.46 \pm 0.05 \text{ eV}$ ), strong H/D kinetic isotope effect ( $\text{KIE} \approx 5$ ), and pronounced pH dependence ( $\tau$  of  $20 \mu\text{s}$  at pH 7.0 vs  $\tau$  of  $60 \mu\text{s}$  at pH 5.5). The characteristics of a proton transfer step detected in the  $S_0 \rightarrow S_1$  transition are similar ( $\tau \approx 100 \mu\text{s}$  at  $20^\circ\text{C}$ ,  $E_a = 0.34 \pm 0.08 \text{ eV}$ ,  $\text{KIE} \approx 3$ ,  $\tau^{5.5}/\tau^{7.0} \approx 1.5$ ); however the proton removal from the Mn-complex proceeds after electron transfer to  $Y_Z^{\text{ox}}$ . By discovery of the transient formation of two further intermediate states in the reaction cycle of photosynthetic water oxidation, a temporal sequence of strictly alternating removal of electrons and protons from the catalytic site is established. In a second experimental approach, it was possible to monitor processes in the time domain of hundreds of nanoseconds by a photoacoustic method involving pressure-wave detection after excitation of PSII membrane particles by ns-laser flashes. Those processes with time constants of  $\sim 350 \text{ ns}$  at  $25^\circ\text{C}$  precede charge transfer reactions of the Mn complex clearly and have been assigned previously to energetic relaxation of the oxidized tyrosine ( $Y_Z^{\text{ox}}$ ). Evaluation of photoacoustic experiments shows that especially for excitation of PSII in the  $S_2$  state, nuclear rearrangements are induced which amount to a contraction of PSII by at least  $30 \text{ \AA}^3$ . In the  $S_3$  state, the 350-ns-contraction is about 5 times smaller whereas in  $S_0$  and  $S_1$  no volume changes are detectable in this ns-time domain. It is discussed that aside from stabilization of  $Y_Z^{\text{ox}}$  by energetic relaxation the formation of an intermediate state of specific (but still unknown) atomic structure prepares the Mn-complex entity for the subsequent proton removal and electron transfer.





# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Motivation .....	1
1.2 Die oxygene Photosynthese .....	2
1.2.1 Photosystem II .....	4
1.2.2 Wasserspaltung am Mangankomplex .....	6
1.2.3 Alternierende Entfernung von Elektronen und Protonen vom Mn <sub>4</sub> Ca-Komplex .....	9
<b>2. Experimentelle Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Grundlagen der photothermischen Strahlableitung .....	13
2.2 Apparatur zur Messung der photothermischen Strahlableitung .....	16
2.3 Grundlagen der Photoakustik .....	19
2.4 Bestehender Aufbau zur Messung der Photoakustik .....	20
2.5 Präparation von PSII-Membranpartikelproben .....	21
<b>3. Experimentelle Vorarbeiten .....</b>	<b>24</b>
3.1 Optimierung der PBD-Apparatur .....	24
3.2 Prompte Fluoreszenz zur Untersuchung von PSII- Akzeptorseitenreaktionen .....	29
3.2.1 Materialien und Methoden .....	29
3.2.2 Ergebnisse und Diskussion .....	30
3.2.3 Zusammenfassung und Fazit .....	44
<b>4. Detektion zweier Protonentransferschritte im Reaktionszyklus der photosynthetischen Wasseroxidation .....</b>	<b>46</b>
4.1 Materialien und Methoden .....	46
4.1.1 Vorbereitung der PSII-Proben .....	46
4.1.2 Durchführung der PBD-Experimente .....	47
4.1.3 PBD-Signalanalyse .....	48
4.1.4 Korrektur für die Desynchronisation von S-Zuständen .....	53
4.2 Ergebnisse .....	55
4.2.1 Temperaturabhängigkeit des instantanen Signalsprungs .....	57
4.2.2 S <sub>1</sub> →S <sub>2</sub> -Übergang (Blitz 1) .....	59
4.2.3 S <sub>2</sub> →S <sub>3</sub> -Übergang (Blitz 2) .....	60

4.2.4	$S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang (Blitz 3).....	61
4.2.5	$S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang (Blitz 4).....	65
4.2.6	Akzeptorseiten-Beiträge zu PBD-Signalen .....	66
4.3	Diskussion .....	69
<b>5.</b>	<b>Beobachtung von Ladungstransferreaktionen der PSII-Wasserspaltung durch verbesserte PBD-Signale.....</b>	<b>72</b>
5.1	Materialien und Methoden .....	72
5.1.1	Probenvorbereitung .....	72
5.1.2	Durchführung der Messungen .....	73
5.2	Ergebnisse und Diskussion.....	74
5.2.1	Elektronentransferzeiten in PBD-Signalen.....	77
5.2.2	Zerlegung der Signale nach Beiträgen der vier S-Zustandsübergänge .....	80
5.2.3	PBD-Signal des $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs .....	83
5.2.4	Nichtzyklische Beiträge zum PBD-Signal .....	85
5.2.5	PBD-Signal des $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs – Akzeptorseiten-Beiträge..	86
5.2.6	PBD-Signal des $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs .....	89
5.2.7	PBD-Signal des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs .....	93
5.2.8	Einfluss von DCBQ in hoher Konzentration .....	95
5.2.9	Kinetischer H/D-Isotopenaustausch-Effekt .....	99
5.2.10	pH-Abhängigkeit .....	103
5.2.11	Niedrige Temperatur (4 °C).....	112
5.2.12	Manganfreies PSII .....	113
5.3	Zusammenfassung .....	116
<b>6.</b>	<b>Schnelle (Sub-Mikrosekunden) Strukturänderungen an der PSII-Donorseite.....</b>	<b>120</b>
6.1	Materialien und Methoden .....	120
6.1.1	Probenvorbereitung .....	120
6.1.2	Photoakustische Messungen .....	121
6.1.3	Korrektur für die Desynchronisation von S-Zuständen.....	122
6.1.4	Quantitative Analyse von PA-Signalen .....	123
6.2	Ergebnisse.....	127
6.2.1	PA-Signale spezifischer S-Zustände .....	127
6.2.2	Streuartefakt.....	128
6.2.3	Korrektur für die Desynchronisation von S-Zuständen.....	129
6.2.4	Temperaturabhängigkeit .....	130
6.2.5	Einphasige und zweiphasige Volumenänderungen .....	132
6.2.6	Thermischer und struktureller Beitrag zum PA-Signal .....	135
6.3	Diskussion .....	136

6.3.1	Detektion einer schnellen und langsamen (~350 ns) Kontraktion	136
6.3.2	Ursprung der Kontraktionen	138
6.3.3	Hypothese zur $Y_Z^+$ -Relaxationsleiter	142
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>145</b>
	<b>Literatur</b>	<b>153</b>
	<b>Anhang A: Korrektur für die Desynchronisation von S-Zuständen</b>	<b>171</b>
	<b>Anhang B: Zusammensetzung der Pufferlösungen</b>	<b>175</b>
	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>177</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>179</b>

# Abkürzungen und Symbole

A/D	Analog/Digital
BSA	Rinderserumalbumin (engl: bovine serum albumin)
BCP	5,5'-Dibromo-o-cresolsulfonphthalein, C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> Br <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S, (engl: bromo-cresol purple)
Car	Carotinoide
Chl	Chlorophyll
D <sub>2</sub> O	Deuteriumoxid, schweres Wasser
DCBQ	engl: 2,6-Dichloro-1,4-benzoquinone
$E_a$	Aktivierungsenergie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET	Elektronentransfer
$F$	Fluoreszenz
$G$	Gibbssche freie Energie, freie Enthalpie
$H$	Enthalpie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IR	Infrarot
KIE	kinetischer Isotopen(austausch)effekt
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Mn-Komplex (oder Mn <sub>4</sub> Ca-Komplex)	katalytisches Zentrum der PSII-Wasseroxidation, bestehend aus dem Mn <sub>4</sub> Ca(μ-O) <sub>n</sub> -Kerncluster und seinen Protein- sowie Wasserliganden
P680	primärer Elektronendonator des PSII
PA	Photoakustik
PBD	Photothermische Strahlablenkung, (engl: photothermal beam deflection)
pK	abkürzend für pK <sub>acid</sub> bzw. pK <sub>base</sub>
PQ	Plastochinon
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PT	Protonentransfer
Q <sub>A</sub>	primäres Elektronenakzeptor-Plastochinon des PSII
Q <sub>B</sub>	sekundäres Elektronenakzeptor-Plastochinon des PSII
$S$	Entropie
$S_n$	Oxidationszustand n des Mangankomplexes
TEMED	N,N,N',N'-tetra-Methylethylenediamin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/Vis-Spektroskopie	(Absorptions-) Spektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich
Y <sub>Z</sub>	Tyrosin 161 des PSII-D1-Proteins, sekundärer Elektronendonator

---

# 1. Einleitung

## 1.1 Motivation

Effektive katalytische Systeme, die in der Lage sind, die Energie des Sonnenlichts in Form von praktischen Energieträgern zu speichern, könnten in der Zukunft eine wichtige Rolle bei der nachhaltigen Energieversorgung der Menschheit spielen. Das Verständnis von Reaktionen an metallischen Cofaktoren des katalytischen Zentrums von Enzymen kann dabei Inspirationsquelle für die Entwicklung neuer technischer Katalysatoren werden (Magnuson et al. 2009; Dau et al. 2010). In der Natur ist nur das Photosystem II (PSII) der Pflanzen, Algen und Cyanobakterien in der Lage, mit der lichtangetriebenen Aufspaltung von Wassermolekülen in Protonen, Elektronen und Sauerstoff ( $O_2$ ) eine in diesem Zusammenhang zentrale Reaktion zu vollführen. Diese photosynthetische Wasseroxidation findet an einem einzigartigen Mangan-Calcium-Komplex ( $Mn_4Ca$ ) statt, der an das sogenannte D1-Protein des PSII gebunden ist (Barber 2003; McEvoy und Brudvig 2006; Dau und Haumann 2008; Renger und Renger 2008). Internationale Forschungsinitiativen zielen darauf ab, gekoppelte Systeme zu entwickeln, die die Wasseroxidation mit der Produktion molekularen Wasserstoffs verbinden (Biowasserstoffproduktion) (Sun et al. 2001; Kruse et al. 2005; Lewis und Nocera 2006). In solche Systeme kann das PSII entweder direkt involviert sein, etwa als Baustein einer Reaktionskette in Mikroorganismen, die auf die Produktion von  $H_2$  hin optimiert sind, oder aber das PSII dient zur Inspiration und als Blaupause für biomimetische Systeme zur Wasserstoffproduktion (Lubitz et al. 2008; Rutherford und Moore 2008; Barber 2009; Dau und Zaharieva 2009; Herrero et al. 2011; Moore und Brudvig 2011).

Kristallografische Daten haben in den letzten Jahren immer genauere Informationen über die globale Anordnung der Metallionen des  $Mn_4Ca$ -Komplexes in der Proteinmatrix und die Position der Aminosäureliganden geliefert (Ferreira et al. 2004; Loll et al. 2005; Guskov et al. 2009; Umena et al. 2011). Röntgenabsorptionsuntersuchungen haben weitere strukturelle Details des  $Mn_4Ca(\mu-O)_5$ -Kernkomplexes aufgedeckt, wie etwa die Koordinierung der Mn-Ionen durch verbrückende Sauerstoffatome und Strukturänderungen im Verlauf des katalytischen Zyklus (Haumann et al. 2005b; Sauer et al. 2008). Eine Vielzahl von Ergebnissen spektroskopischer Studien über Redoxreaktionen und protolytische Reaktionen im Zusammenhang mit der Oxidation von Wasser ist heute in der Literatur zu finden (Miller und Brudvig 1991; Lavergne und Junge 1993; Messinger 2004; Haddy 2007; Noguchi 2008;

Berthomieu und Hienerwadel 2009). Zu einem allgemein akzeptierten, alle partiellen Reaktionen der Wasseroxidation umfassenden Bild ist man jedoch noch nicht gelangt (Dau und Haumann 2008). Die Wechselbeziehung zwischen Elektronentransferreaktionen und Protonierungsdynamiken, die Protonenbewegungen auf verschiedenen Zeit- und Längenskalen beinhalten, scheint bei der Aufspaltung von Wasser in Elektronen, Protonen und Sauerstoff eine entscheidende Rolle zu spielen (Hoganson und Babcock 1997; Meyer et al. 2007). Besonders die Protonierungsdynamiken sind jedoch experimentell nicht ausreichend gut charakterisiert, um eindeutige Schlüsse bezüglich der Sequenz der Prozesse zu ziehen.

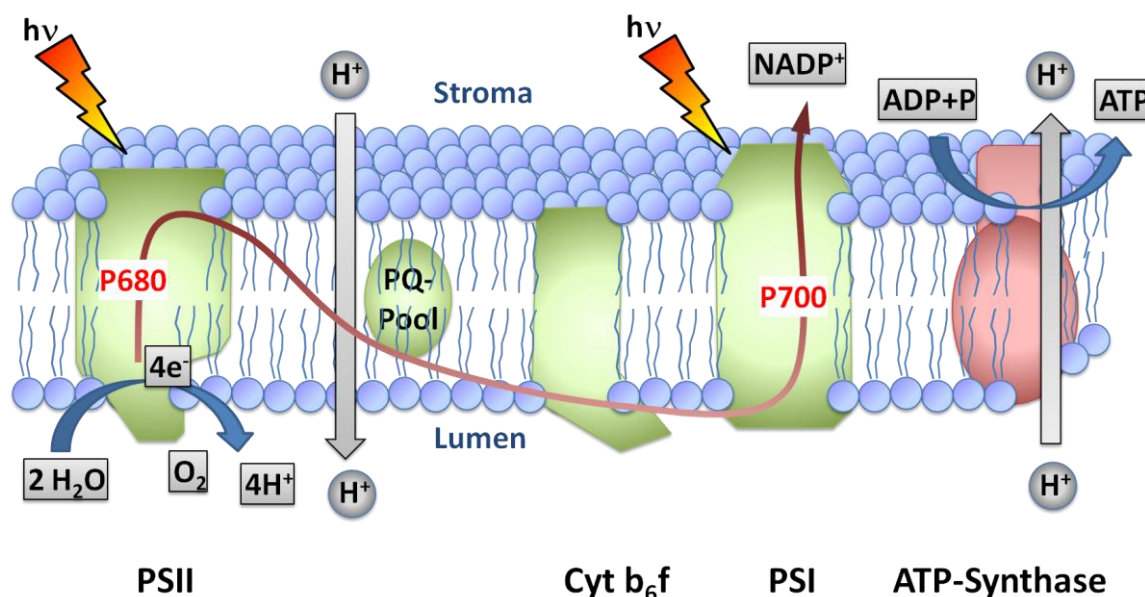
Einen in diesem Zusammenhang vielversprechenden experimentellen Ansatz stellen zeitaufgelöste photothermische und photoakustische Methoden dar. Mit diesen ist es prinzipiell möglich, neben kinetischen Informationen über Elektronentransfer- und protolytische Reaktionen auch thermodynamische Parameter wie Enthalpieänderungen  $\Delta H$  (zeitaufgelöste Kalorimetrie) und strukturelle Änderungen (Volumenänderungen,  $\Delta V$ ) zu beobachten (Braslavsky 1986; Delosme 2003; Hou und Mauzerall 2011). Es wurde gezeigt, dass der sauerstoffbildende Schritt (Halbwertszeit von etwa 1 ms) bei der PSII-Wasseroxidation ein gut aufgelöstes photothermisches Signal verursacht (Krivanek et al. 2008). An dieser Stelle setzt meine Forschungstätigkeit an. Hauptziel meiner Arbeit war die photothermische Charakterisierung aller vier Schritte zwischen stabilem und semi-stabilen Zuständen im Reaktionszyklus der photosynthetischen Wasserspaltung, um weitere „Puzzleteile“ zum vollständigen Verständnis der Funktion des Photosystems II beizutragen.

## **1.2 Die oxygene Photosynthese**

Die Bedeutung der oxygenen Photosynthese von Pflanzen, Algen und Cyanobakterien für praktisch alles höhere Leben auf der Erde ist unbestritten. Bei der Photosynthese wird Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) aus der Atmosphäre aufgenommen und unter Verwendung von Lichtenergie werden energiereiche organische Moleküle (Kohlenwasserstoffe) synthetisiert. Bei dem wichtigen Zwischenschritt der lichtgetriebenen Spaltung von Wasser im Photosystem II entsteht als Abfallprodukt molekularer Sauerstoff. Nahezu der gesamte Sauerstoff unserer Atmosphäre ist durch die photosynthetische Oxidation von Wasser entstanden. Die energiereichen Produkte der Photosynthese, in denen Sonnenenergie

chemisch gespeichert ist, bilden die Grundlage der Biomasseproduktion der Natur, von der letztendlich alles höhere Leben abhängig ist (Blankenship 2002).

Der Gesamtprozess der Photosynthese lässt sich in Licht- und Dunkelreaktion unterteilen. An der Lichtreaktion sind die vier Transmembran-Proteinkomplexe Photosystem II (PSII), Cytochrom- $b_6f$  (Cyt- $b_6f$ ), Photosystem I (PSI) und ATP-Synthase beteiligt. Diese sind in eine in sich geschlossene Lipid-Doppelschicht (Thylakoidmembran) eingebettet, die eine innere Phase (Lumen) von einer äußeren Phase (Stroma) trennt (Abbildung 1-1). Über eine Elektronentransferkette, die mehrere Redox-Cofaktoren im PSII (Abbildung 1-2), im Cyt- $b_6f$ -Komplex und im PSI umfasst, gelangen Elektronen, die an der Lumen-Seite des PSII durch lichtgetriebene Wasseroxidation gewonnen werden, über Cyt- $b_6f$  als Bindeglied zwischen den beiden Photosystemen an die Stromaseite des PSI. Dort reduzieren sie  $\text{NADP}^+$  zu NADPH, welches als starkes Reduktionsmittel in der Dunkelreaktion benötigt wird. Pro Elektron ist dafür die Absorption von mindestens einem Photon durch das PSII und einem weiteren durch das PSI erforderlich. Neben der Bereitstellung von Redoxäquivalenten (NADPH) wird durch die Lichtreaktion eine elektrochemische Potentialdifferenz über der Thylakoidmembran gebildet, zu der sowohl eine elektrische Potentialdifferenz als auch ein pH-Gradient beitragen (siehe Abbildung 1-1).



**Abbildung 1-1:** Schematische Darstellung der Thylakoidmembran. Die Proteinkomplexe Photosystem II (PSII), Cytochrom- $b_6f$  (Cyt  $b_6f$ ), Photosystem I (PSI) und ATP-Synthase sind an der Lichtreaktion der Photosynthese beteiligt. Die primären Elektronendonoren bei Lichtanregung sind P680 im PSII und P700 im PSI. Weitere Cofaktoren sind nicht gezeigt. Zwischen den Proteinkomplexen werden die Elektronen von Plastochinon- (PQ) und Plastocyanin-Molekülen transportiert. Details z.B. in (Ort und Yocum 1996).

Der elektrochemische Potentialgradient über die Thylakoidmembran wird auch als „Proton-motive force“ bezeichnet. Er treibt schließlich die ATP-Synthase an, die aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat energiereiches Adenosintriphosphat (ATP) bildet (Ort und Yocum 1996).

Die Dunkelreaktion findet in der wässrigen Phase des Stroma statt. Im Calvin-Zyklus katalysieren Enzyme die photosynthetische CO<sub>2</sub>-Fixierung, wobei mithilfe der energiereichen Produkte der Lichtreaktion (ATP und NADPH) CO<sub>2</sub> zu Kohlenwasserstoffen reduziert wird (Taiz und Zeiger 2000).

### 1.2.1 Photosystem II

Das Photosystem II beinhaltet mit einem Mn<sub>4</sub>Ca-Cluster das katalytische Zentrum der photosynthetischen Wasserspaltung. Der Kern-Proteinkomplex vom bakteriellen PSII besteht aus etwa 20 Polypeptiden, die neben wichtigen Redoxkomponenten (Abbildung 1-2) auch Pigmente binden (35 Chlorophyllmoleküle (Chl) und 11 Carotinoide (Car), in Abbildung 1-2 nicht eingezeichnet). Bei höheren Pflanzen ist an den Kernkomplex noch der Lichtsammelkomplex (Light-harvesting complex, LHC) gekoppelt, in dessen Proteinuntereinheiten weitere Pigmente angeordnet sind, sodass im pflanzlichen Photosystem pro PSII etwa 200 Chl-Moleküle und 50 Carotinoide zur Lichtabsorption beitragen.

Ein in diesem „Antennensystem“ durch Absorption eines Photons gebildeter angeregter Zustand wird durch schnelle Energietransferprozesse mit großer Wahrscheinlichkeit auf ein spezielles Chlorophyllpaar, das P680, übertragen. Dieses fungiert als primärer Elektronendonator und gibt innerhalb von 3 ps ein Elektron an ein benachbartes Pheophytin (Phe) ab. Ein weiterer Elektronentransfer (ET) im Pikosekunden-Zeitbereich zu dem gebundenen Plastochinon Q<sub>A</sub> stabilisiert die Ladungstrennung und führt weniger als 1 ns nach Lichtabsorption zur Bildung des relativ stabilen Radikalpaars P680<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> (Dekker und Van Grondelle 2000; Holzwarth et al. 2006; Renger und Renger 2008).

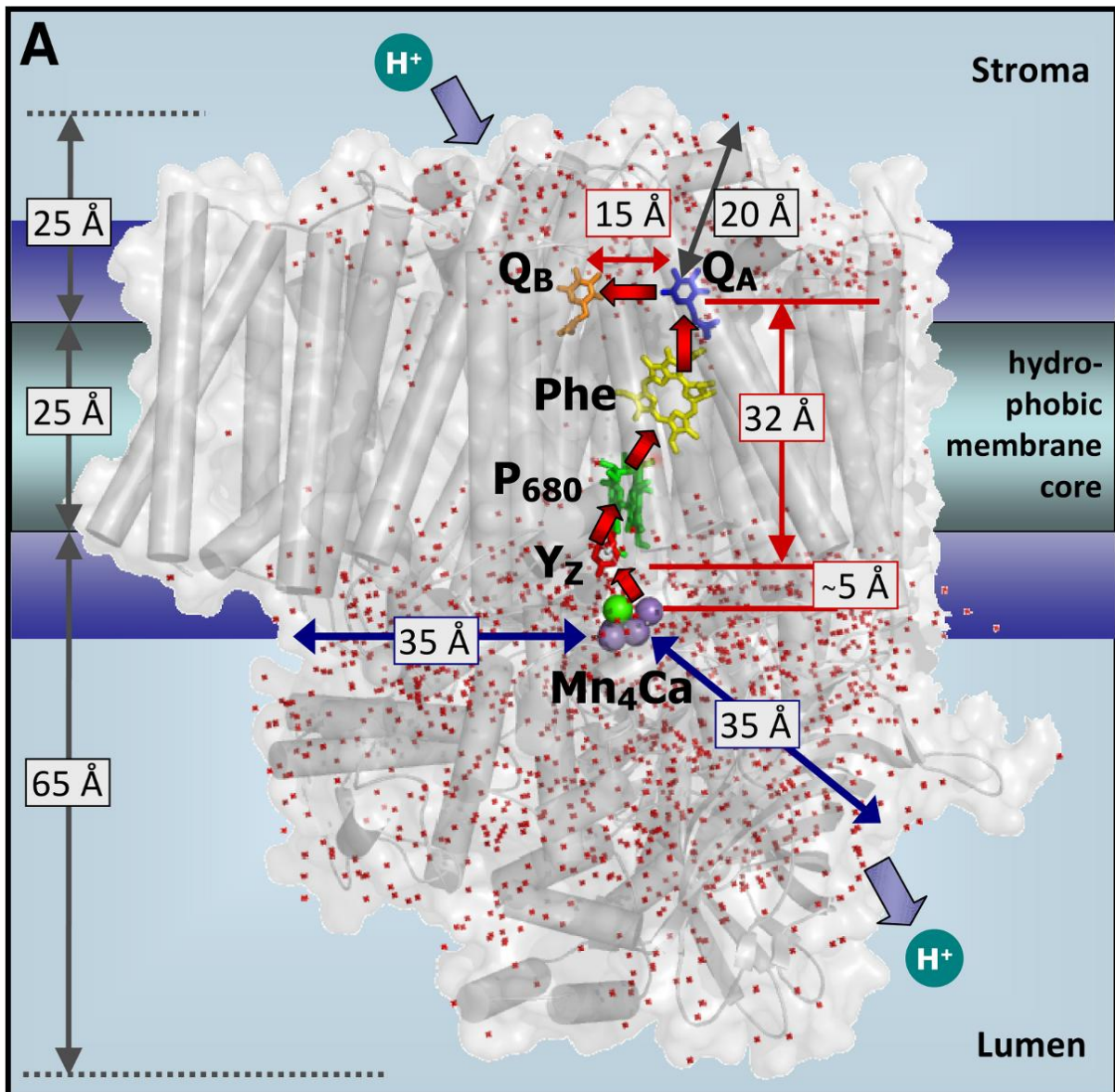
Die folgende Reduktion von P680<sup>+</sup> durch Y<sub>Z</sub>, das redoxaktive Tyr<sub>161</sub> des D1-Polypeptids, weist einen multiphasigen Zeitverlauf im Nanosekunden- und Mikrosekunden-Zeitbereich auf, der eine ausgeprägte Abhängigkeit vom Oxidationszustand des Mn<sub>4</sub>Ca-Komplexes zeigt (Brettel et al. 1984; Eckert und Renger 1988). Schnelle Nanosekunden-Kinetiken ( $\tau \sim 40$  ns) wurden später dahingehend interpretiert (Renger 2004), dass sich darin ein Elektronentransfer widerspiegelt, der an eine Protonenverschiebung innerhalb einer Wasserstoffbrücke zwischen



$Y_Z$  und dem nahen Histidin His<sub>190</sub> des D1-Polypeptids gekoppelt ist (Hays et al. 1999). Für die langsamen Nanosekunden-Phasen ( $\tau > 200$  ns) zeigte sich eine stärkere Ausprägung, wenn sich der Mn<sub>4</sub>Ca-Komplex im S<sub>2</sub>- oder S<sub>3</sub>-Zustand befand und eine weniger starke Ausprägung, wenn sich der Komplex in seinen niedrigen Oxidationszuständen S<sub>0</sub> oder S<sub>1</sub> befand (Brettel et al. 1984; Eckert und Renger 1988; Christen et al. 1998; Schilstra et al. 1998; Christen und Renger 1999; Christen et al. 1999; Jeans et al. 2002). S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> und S<sub>3</sub> beziehen sich auf die (semi-)stabilen Oxidationszustände des Mn<sub>4</sub>Ca-Komplexes (siehe unten), wobei der Index die Anzahl von akkumulierten Oxidationsäquivalenten anzeigt (Kok et al. 1970; Dau und Haumann 2007b). Für die Aktivierungsenergie und Reorganisationsenergie der langsamen Nanosekunden-Komponente der P680<sup>+</sup>-Reduktion im S<sub>2</sub>- und S<sub>3</sub>-Zustand wurden hohe Werte gefunden (Jeans et al. 2002). Es wurde angenommen, dass Relaxationsprozesse die Gibbs-Energie von  $Y_Z^{ox}$  gegenüber P680<sup>+</sup> absenken und so eine weitere Stabilisierung des P680Y<sub>Z</sub><sup>ox</sup>-Zustands bewirken (Schilstra et al. 1998; Mulkidjanian 1999; Renger 2004). Ein signifikanter kinetischer Isotopen-Effekt (KIE) bei Austausch von H<sub>2</sub>O durch D<sub>2</sub>O wurde nicht entdeckt (Karge et al. 1996; Schilstra et al. 1998). So wurde gefolgert, dass Protonenumlagerungen für den Relaxationsprozess nicht ratenlimitierend sind (Renger 2004).

Die Mikrosekunden-Kinetiken der P680<sup>+</sup>-Reduktion zeigten dagegen einen ausgeprägten KIE, woraus geschlossen wurde, dass sie durch Reorganisation des Wasserstoffbrücken-Netzwerks in der Umgebung des  $Y_Z$  bedingt sind (Schilstra et al. 1998; Renger 2004). Das oxidierte  $Y_Z^{ox}$  wird schließlich durch ET von dem Mn<sub>4</sub>Ca-Komplex reduziert (s.u.), wobei für diesen ET Zeitkonstanten von einigen 10  $\mu$ s bis einigen 100  $\mu$ s bei den niedrigen S-Zustandsübergängen beobachtet wurden sowie eine Zeitkonstante von 1,6 ms für den sauerstofffreisetzenden Schritt (Dekker et al. 1984a; Renger und Hanssum 1992; Haumann et al. 2005a).

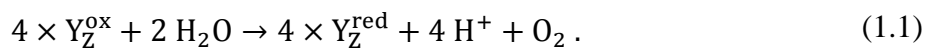
An der PSII-Akzeptorseite wird  $Q_A^-$  durch ET zum sekundären, locker gebundenen Plastochinon-Akzeptor  $Q_B$  innerhalb einiger hundert Mikrosekunden oxidiert (de Wijn und van Gorkom 2001). Nach zweifacher Reduktion von  $Q_B$  und der Aufnahme von zwei Protonen wird  $Q_B$  durch ein neues, oxidiertes PQ-Molekül aus dem Plastochinonpool ersetzt (Petrouleas und Crofts 2005).



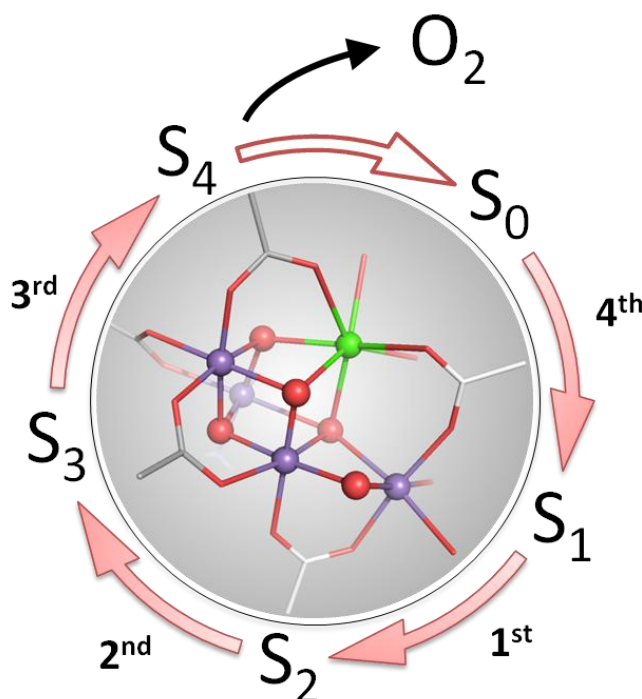
**Abbildung 1-2:** Wichtige Redox-Cofaktoren und Dimensionen des PSII-Komplexes. Die roten Pfeile verbinden die Redox-Cofaktoren der Elektronentransferkette, bestehend aus dem primären Elektronendonator (P680), dem primären Pheophytin-Akzeptor (Phe), dem primären ( $Q_A$ ) und sekundären ( $Q_B$ ) Chinon-Akzeptor und an der Donorseite dem redoxaktiven Tyrosin ( $Y_Z$ ) und dem Mn-Komplex ( $Mn_4Ca$ ). Wassermoleküle, die im kristallografischen Modell aufgelöst wurden (PDB Eintrag 3ARC (Umena et al. 2011)), sind als rote Punkte eingezeichnet. Einige relevante Abstände sind angegeben. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).

### 1.2.2 Wasserspaltung am Mangankomplex

Die Absorption eines Lichtquants durch einen PSII-Komplex führt zur Oxidation eines spezifischen Tyrosins  $Y_Z$  (D1-Tyr<sub>161</sub>), das als Oxidationsmittel für die Redoxchemie der Wasseroxidation dient (Barry und Babcock 1987; Gilchrist et al. 1995):



Der Katalysator, der die Reaktion nach Gleichung 1.1 ermöglicht, ist der  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplex, der an die D1- und CP43-Untereinheiten des PSII gebunden ist. Unter  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplex (auch sauerstoffentwickelnder Komplex oder kurz Mn-Komplex genannt) soll dabei der eigentliche  $\text{Mn}_4\text{Ca}(\mu\text{-O})_n$ -Kern und seinen Liganden (neben Protein-Seitenketten auch Wassermoleküle (Hillier und Wydrzynski 2008)) verstanden werden (siehe auch Abbildung 1-4).

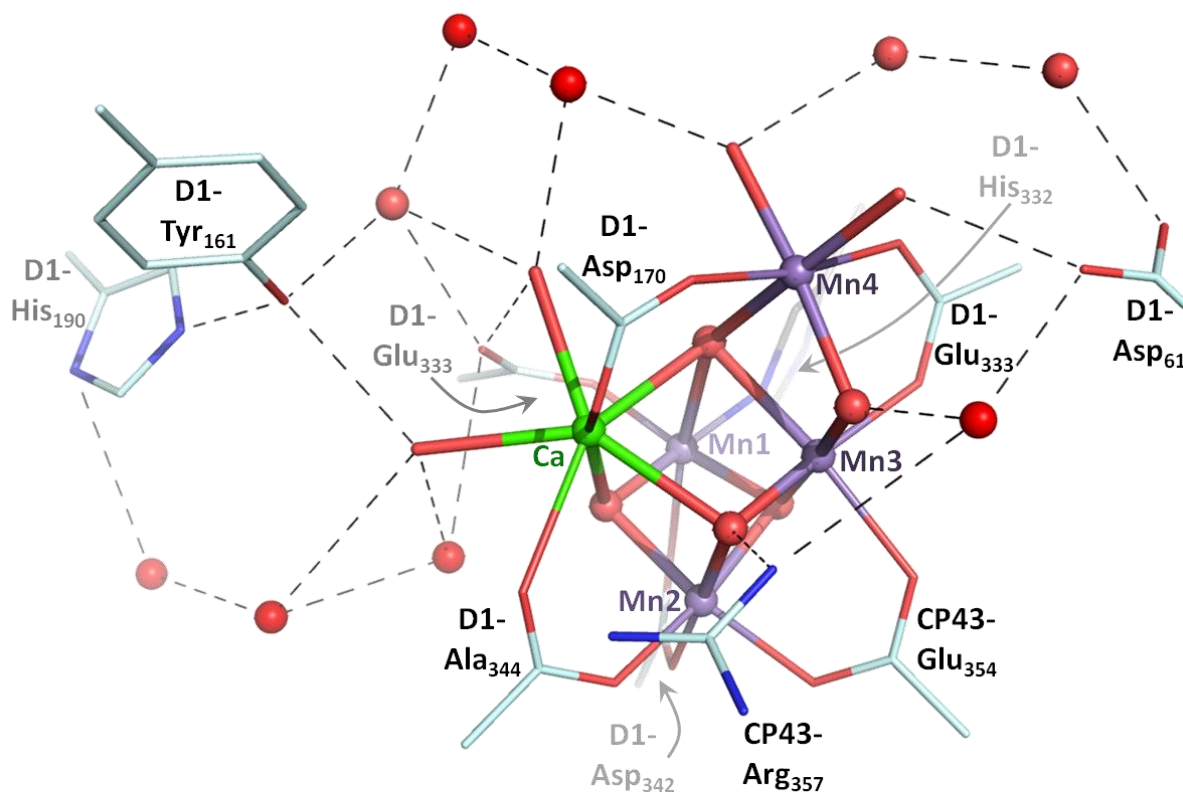


**Abbildung 1-3:** S-Zustandszyklus nach Bessel Kok. Die Indizes der Zustände entsprechen der Anzahl akkumulierter Oxidationsäquivalente. Die Nummerierung der Pfeile bezieht sich auf den Lichtblitz, der den entsprechenden Übergang ausgehend vom dunkelstabilen  $\text{S}_1$ -Zustand auslöst. Im inneren Kreis ist der  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplex nach den Koordinaten des PDB-Eintrags 3ARC (Umena et al. 2011) dargestellt.

In PSII-Proben können alle Photosysteme durch Dunkeladaption synchronisiert werden, sodass der  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplex sich vorwiegend in seinem dunkelstabilen  $\text{S}_1$ -Zustand befindet. Anregung mit drei aufeinander folgenden Laserblitzen schaltet das System ausgehend von diesem  $\text{S}_1$ -Zustand über den  $\text{S}_2$ - (Blitz 1) und  $\text{S}_3$ - (Blitz 2) in den  $\text{S}_0$ -Zustand (Blitz 3). Ein vierter Blitz schließt den Reaktionszyklus und der  $\text{S}_1$ -Zustand wird wieder erreicht (Abbildung 1-3). Die Freisetzung von Sauerstoff geht mit dem  $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$ -Übergang einher, der durch den dritten Blitz ausgelöst wird. Dieses elementare Schema des S-Zustandszyklus wurde bereits vor mehr als 40 Jahren vorgeschlagen (Kok et al. 1970). Es beschreibt den

lichtgetriebenen Kreislauf des  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplexes durch seine fünf verschiedenen Oxidationszustände  $S_0$  bis  $S_4$  mit Fokus auf der Akkumulation von Oxidationsäquivalenten durch Entfernen von Elektronen von dem katalytischen Zentrum. In dieser Nomenklatur gibt der Index (am S) die Anzahl akkumulierter Oxidationsäquivalente relativ zum reduziertesten  $S_0$ -Zustand an. Durch blitzinduzierte spektroskopische Experimente können die individuellen S-Übergänge zwischen (semi-) stabilen S-Zuständen untersucht werden. Jeder S-Übergang (mit Ausnahme des den Zyklus schließenden  $S_4 \rightarrow S_0$ -Übergangs) entspricht der Oxidation des Mn-Komplexes durch einen ET zu  $Y_Z^{\text{ox}}$ . Der  $S_4$ -Zustand zerfällt spontan unter Bildung und Abgabe eines  $\text{O}_2$ -Moleküls in den reduziertesten Zustand  $S_0$ . Es wurde gezeigt, dass die Ansammlung von Oxidationsäquivalenten mit der Oxidation von Mn-Ionen verbunden ist, wobei im  $S_0$ -Zustand eine  $\text{Mn}_3^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{IV}}$ -Konfiguration vermutet wird und im  $S_3$ -Zustand eine  $\text{Mn}_4^{\text{IV}}$ -Konfiguration (Dau et al. 2001; Haumann et al. 2005b; Gerencser und Dau 2010). Für andere Zuordnungen von Oxidationszuständen siehe auch (Kuzek und Pace 2001; Messinger et al. 2001; Robblee et al. 2001; Carrell et al. 2002).

Vier Protonen werden bei der Reaktion nach Gleichung 1.1 durch Deprotonierung und Umlagerung zur wässrigen Phase des Thylakoid-Lumen hin vom  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplex entfernt. Die Freisetzung von Protonen in die wässrige Phase im Zusammenhang mit dem ET vom  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  ist intensiv untersucht worden, wobei sich herausstellte, dass die beobachteten Protonen oft nicht die Deprotonierung des  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplexes widerspiegeln (Rappaport und Lavergne 1991; Lavergne und Junge 1993; Junge et al. 2002). Dies liegt daran, dass periphere Seitenketten des Proteins bereits bei der Bildung von  $Y_Z^{\text{ox}}$  eine elektrostatisch bedingte pK-Wert-Verschiebung erfahren und Protonen abgeben. Bei Messung der Protonenfreisetzung in das wässrige Medium interferieren diese Protonen peripherer Gruppen mit den vom  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplex entfernten Protonen (Rappaport und Lavergne 1991; Haumann und Junge 1994a). Trotz dieser Schwierigkeit ließ sich die Anzahl der Protonen bestimmen, die in jedem der klassischen S-Zustandsübergänge vom Mn-Komplex entfernt werden. Demnach ergibt sich ein Verhältnis von 0:1:2:1 Protonen, die vom  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplex in den klassischen S-Übergängen  $S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_0 \rightarrow S_1$  entfernt werden (Lavergne und Junge 1993; Schlodder und Witt 1999; Junge et al. 2002; Suzuki et al. 2009).



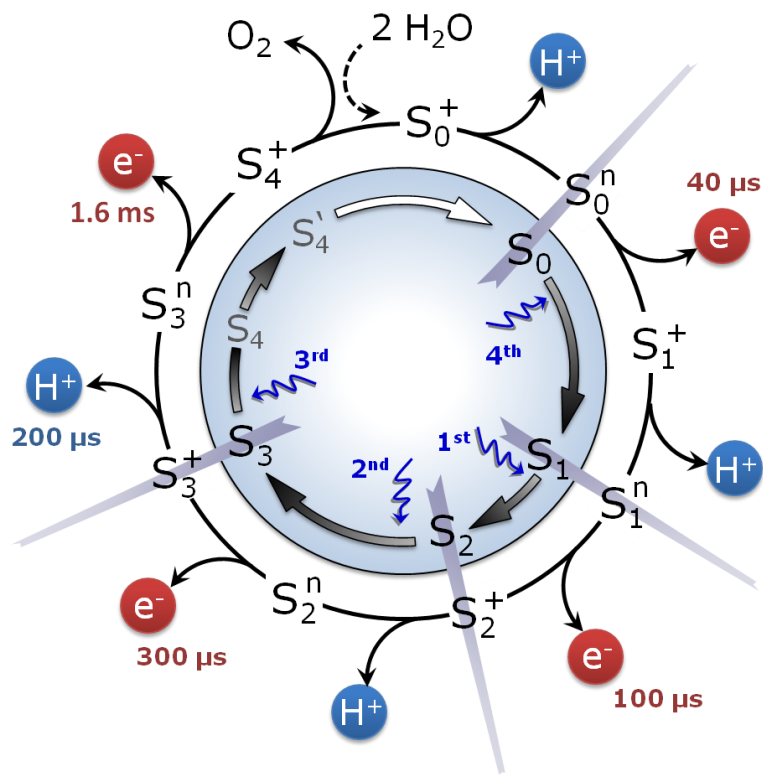
**Abbildung 1-4:** Der  $Mn_4Ca$ -Komplex und das redoxaktive Tyrosin Z (D1-Tyr<sub>161</sub>) umgeben von einem Wasserstoffbrücken-Netzwerk im Photosystem II. Der  $Mn_4Ca(\mu-O)_5$ -Kern des Komplexes ist an Seitenketten der D1- und CP43-Proteine gebunden. Die Aminosäurereste, die Liganden von Metallionen bilden, sind ebenso durch dünne Stäbe dargestellt wie weitere polare Seitenketten mit funktionaler Bedeutung. Die roten Kugeln stellen Sauerstoffatome von ausgewählten Wassermolekülen oder Hydroxid-Ionen dar. Die jeweils zwei Sauerstoffatome, die an das Mn4- und das Ca-Atom gebunden sind, wurden in Form roter Stäbe gezeichnet. Mögliche Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien zwischen Protonendonator und -akzeptor angedeutet. Die Zeichnung basiert auf den kristallographischen Daten aus dem PDB-Eintrag 3ARC (Umena et al. 2011).

### 1.2.3 Alternierende Entfernung von Elektronen und Protonen vom $Mn_4Ca$ -Komplex

Das klassische S-Zustandszyklus-Schema (Abbildung 1-3) kann nicht die sehr unterschiedlichen Eigenschaften der Redoxschritte am  $Mn_4Ca$ -Komplex in Hinsicht auf ihre Zeitkonstanten, Aktivierungsenergien, H/D-kinetische-Isotopenaustausch-Effekte und zugehörige protolytische Reaktionen erklären (Dau und Haumann 2008). Auf die wichtige Bedeutung von Protonentransfer- (PT) und Protonenabgabereaktionen wurde wiederholt

hingewiesen (Hoganson und Babcock 1997; Haumann und Junge 1999a; Rappaport und Lavergne 2001; Junge et al. 2002). Auf der Basis von Ergebnissen zeitaufgelöster Röntgenabsorptionsstudien (Haumann et al. 2005a) und weiteren spektroskopischen Anhaltspunkten wurde ein erweitertes Reaktionsschema vorgeschlagen, das zusätzliche Zwischenzustände beinhaltet und vorhersagt, dass Elektronen ( $e^-$ ) und Protonen ( $H^+$ ) im Reaktionszyklus streng alternierend vom  $Mn_4Ca$ -Komplex entfernt werden (Dau und Haumann 2006; Dau und Haumann 2008). Diese abwechselnden ET- und PT-Schritte führen demnach zu Zwischenzuständen, die im Vergleich mit dem dunkelstabilen  $S_1^n$ -Zustand entweder positiv geladen ( $S_1^+$ ) oder neutral ( $S_1^n$ ) sind (Abbildung 1-5). Ohne ladungsneutralisierende Schritte würde die sukzessive Akkumulation von positiver Ladung, resultierend aus den ET-Übergängen zu  $Y_Z^{ox}$ , zu einem Anstieg des Mittelpunkts-Redoxpotentials ( $E_m$ ) des  $Mn_4Ca$ -Komplexes führen und eine weitere Oxidation durch  $Y_Z^{ox}$  verhindern. Das erweiterte Schema kann direkt erklären, wie eine solche  $E_m$ -Zunahme durch Deprotonierungsschritte verhindert werden kann (Dau und Haumann 2007a). Einige der vorgeschlagenen Zwischenzustände sind jedoch hypothetisch geblieben, da es keine spektroskopischen Beweise für ihre Existenz gibt. Dies gilt insbesondere für die durch PT gebildeten Zustände. Die zeitliche Abfolge von ET- und PT-Schritten konnte ebenfalls nicht experimentell bestätigt werden. Eine Ausnahme bildet hier der  $S_3^n$ -Zustand, der über zeitaufgelöste spektroskopische Experimente nachgewiesen werden konnte (Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010).

Die Lage des  $Mn_4Ca$ -Komplexes zwischen dem membranintrinsic Teil des PSII und den extrinsischen Proteinen der Lumen-Seite (Zouni et al. 2001; Ferreira et al. 2004; Umena et al. 2011) legt nahe, dass eine Protonenumlagerung hin zum Lumen über eine große Distanz ( $\sim 30 \text{ \AA}$ , Abbildung 1-2) unter Beteiligung einer Kette von Wassermolekülen und polaren Seitenketten stattfindet (Ho 2008) und daher vermutlich nicht ultraschnell ist, sondern im Mikrosekunden-Zeitbereich vor sich geht.



**Abbildung 1-5:** Erweiterter Reaktionszyklus der PSII-Wasseroxidation. Der innere Zyklus stellt das klassische Kok-Modell dar, erweitert um den Zustand  $S_4'$ , wie er in Haumann *et al.* vorgeschlagen wurde (Haumann *et al.* 2005a). Die Erweiterung (äußerer Zyklus) beinhaltet sowohl die Oxidation des  $Mn_4Ca$ -Komplexes durch ET zum oxidierten Tyrosin  $Y_Z^{ox}$  als auch die Entfernung von Protonen vom  $Mn_4Ca$ -Komplex durch Protonentransfer über längere Distanzen. Eine Kopplung des ET-Schritts an lokale Protonenverschiebungen wird von diesem Modell nicht abgedeckt. Die tiefgestellten Indizes deuten die Anzahl von Oxidationsäquivalenten an, die am  $Mn_4Ca$ -Komplex akkumuliert wurden. Die hochgestellten Indizes geben die Ladung relativ zum dunkelstabilen  $S_1$ -Zustand an (n steht für neutral, + für positiv geladen). Zeitkonstanten sind für die vier ET-Schritte und den einen Protonenfreisetzungsschritt gegeben, die in zeitaufgelösten Experimenten bislang beobachtet werden konnten (typische Werte bei Raumtemperatur). Abbildung adaptiert aus Klauss *et al.* (2012a).

## 2. Experimentelle Methoden

Da photothermische Methoden die direkte Bestimmung von Enthalpieänderungen lichtinduzierter Reaktionen ermöglichen, ist eine Vielzahl photosynthetischer Systeme verschiedener Herkunft mit der zur Familie photothermischer Methoden gehörenden Technik der Photoakustik (PA) untersucht worden (Delosme 2003; Hou und Mauzerall 2011). Vorreiter auf diesem Gebiet waren Parson und seine Mitarbeiter, die ein Kondensatormikrofon direkt an eine Suspension koppelten, die nicht-oxygene bakterielle Reaktionszentren enthielt. In einem Zeitintervall von 100  $\mu\text{s}$  bis 1 ms nach Blitzanregung konnten Volumenänderungen entdeckt werden. Dabei war es möglich, Beiträge, die auf Wärmefreisetzung (Enthalpieänderung) zurückzuführen waren, von Beiträgen nicht-thermischen Ursprungs (Volumenänderung des Proteins) zu unterscheiden (Callis et al. 1972; Arata und Parson 1981). Später wurden Gasphasenmikrophone verwendet, um die Sauerstoffbildung und thermische Energieverluste in intakten Blättern mit der PA-Technik zu untersuchen (Poulet et al. 1983; Canaani et al. 1988; Dau und Hansen 1989; Dau und Hansen 1990).

Ein modifizierter Ansatz, dessen Anwendung bei der Untersuchung von biologischen Photorezeptoren hauptsächlich von der Gruppe um Silvia Braslavsky etabliert wurde, ist die laserinduzierte optoakustische Spektroskopie (LIOAS). Bei dieser Methode wurde ein gepulster Laser für die Anregung verwendet und ein mechanisch an die Probenkammer gekoppelter Transducer (Ultraschallmikrofon) detektierte die Druckwelle. Die LIOAS-Anordnung ermöglichte es, lichtinduzierte Reaktionen mit einer Zeitauflösung im Nano- und Mikrosekunden-Bereich zu untersuchen (Braslavsky 1986; Braslavsky und Heibel 1992).

Mit Hinblick auf das Photosystem II wurde LIOAS eingesetzt, um Enthalpieänderungen, Quantenausbeuten und strukturelle Volumenänderungen im Zusammenhang mit Ladungstrennungsreaktionen im niedrigen Mikrosekunden-Zeitbereich zu bestimmen (Hou und Mauzerall 2011). Die bestimmten Enthalpie- und Volumenänderungen unterschieden sich für verschiedene PSII-Präparationen. Für PSII-Membranpartikel, zubereitet aus Spinat, wurde eine Volumenänderung von  $-16 \text{ \AA}^3$  im Mikrosekunden-Zeitfenster gemessen (Delosme 2003). Für Kernkomplexe von *Synechocystis*, denen der  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplex entfernt wurde, ergab sich bei pH 6 eine Volumenänderung von  $-9 \text{ \AA}^3$  (Hou et al. 2001) und für ganze Zellen nur eine Kontraktion von  $-2 \text{ \AA}^3$  (Boichenko et al. 2001).



Der Reaktionszyklus der Wasseroxidation am  $Mn_4Ca$ -Komplex beinhaltet ET- und PT-Schritte, die in einem Zeitbereich von 10  $\mu s$  bis 10 ms stattfinden (Junge et al. 2002; Dau und Haumann 2007a). Mit dem LIOAS-Ansatz ist es nicht möglich Reaktionen in diesem Zeitbereich zu beobachten. Von der Gruppe um Silvia Braslavsky wurde mit der photothermischen Strahlablenkung (PBD) eine andere photothermische Methode zur Untersuchung von Photoenzymen eingesetzt, die in der Lage ist, Prozesse im Mikrosekunden- und Millisekunden-Zeitbereich zu verfolgen (Schulenberg et al. 1995; Falvey 1997; Michler und Braslavsky 2001). In einer ersten Anwendung der PBD-Technik zur Untersuchung des PSII konnte eine Kontraktion im Zusammenhang mit der Bildung des  $Y_Z^{ox}Q_A^-$ -Radikalpaars und eine Expansion, die mit der Sauerstoffbildung einhergeht, beobachtet werden (Krivanek et al. 2008; Klauss et al. 2009).

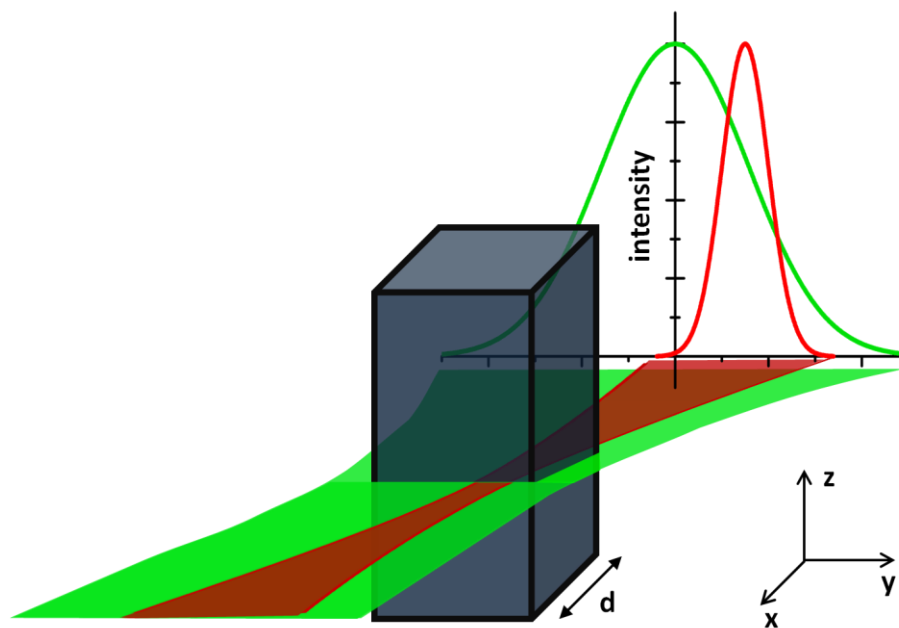
Auf den Ergebnissen von Roland Krivanek (Krivanek et al. 2008) aufbauend war ein zentrales Ziel meiner Arbeit die photothermische Charakterisierung der ET- und PT-Reaktionen in Verbindung mit den vier S-Zustandsübergängen bei der photosynthetischen Wasserspaltung.

## 2.1 Grundlagen der photothermischen Strahlablenkung

Photothermische Spektroskopie basiert auf der Detektion von Temperatur-, Druck- oder Dichteänderungen, die in flüssigen und gasförmigen Proben durch die Absorption von Licht ausgelöst werden. Druckänderungen können in optoakustischen Experimenten über akustische Mikrophone zeitaufgelöst direkt gemessen werden. Änderungen des Brechungsindex, als Folge von Temperatur und/oder Dichteänderungen, sind die Hauptquelle der Signalbildung bei photothermischen Methoden wie der photothermischen Strahlablenkung (*photothermal beam deflection* (PBD)), der „thermischen Linsenbildung“ (*thermal lensing* (TL)) und der „Beugungsgitter-Bildung“ (*transient grating* (TG)) (Bialkowski 1996; Gensch und Viappiani 2003; Terazima 2011).

Nach optischer Anregung einer photosynthetischen Probe stehen verschiedene konkurrierende Kanäle zur Verfügung, die absorbierte Energie abzubauen. Bei physiologisch relevanten Temperaturen sind die wichtigsten die Re-Emission von Photonen (Fluoreszenz), die Einleitung von chemischen Reaktionen und strahlungsloser Zerfall der angeregten Zustände, was zu Wärmeabgabe führt (Braslavsky und Heibel 1992). Fluoreszenz zieht keine photothermischen oder photoakustischen Signale nach sich. Die Abgabe oder Aufnahme von Wärme (Enthalpieänderung), hervorgerufen durch strahlungslose Relaxation und chemische

Reaktionen, verursacht eine thermische Expansion oder Kontraktion (Dichteänderung) des Mediums, die wiederum zu einer makroskopischen akustischen Welle und zu einer Änderung des Brechungsindex führt. Eine weitere Quelle für photoakustische und photothermische Signale sind (nicht-thermische) Dichteänderungen, die als Folge von einer Volumenexpansion oder Kontraktion des Proteins nach Lichtanregung auftreten. Als Ursache für solche Volumenänderungen kommen lokale Umorientierungen von Aminosäure-Seitenketten in Frage, die durch Wechselwirkung mit einem angeregten Chromophor ausgelöst werden (Losi et al. 1999b; Takeshita et al. 2000). Lichtinduzierte Elektronentransferreaktionen, die zu einer elektrostatischen Ladung auf dem Elektronendonator und/oder dem -akzeptor führen, sind in der Regel mit einer Kontraktion verbunden. Dies wurde für synthetische Moleküle (Feitelson und Mauzerall 2002; Rizzi et al. 2008) und Photosysteme gezeigt (Mauzerall et al. 2002; Losi et al. 2003). Auch die Änderungen einer Teilchenkonzentration in der Probe (z.B. durch protolytische Reaktionen, Sauerstoff-Freisetzung oder Wasserbindung) kann Ursache einer nicht-thermischen Dichteänderung sein (Borsarelli und Braslavsky 1998).



**Abbildung 2-1:** Schematische Darstellung der Überlagerung des Anregungslaserstrahls (grün) mit dem Infrarot- (IR-)Abfragestrahl (rot) im Bereich der Probenküvette. Von den Laserstrahlen ist nur ein zweidimensionaler Querschnitt in der x-y-Ebene gezeigt (in der y-z-Ebene weisen beide Strahlen einen elliptischen Querschnitt auf). Das Koordinatensystem im Hintergrund illustriert die normierten räumlichen Intensitätsverteilungen der beiden Strahlen und verdeutlicht den Versatz des Abfragestrahls zur Mittelachse des Anregungsstrahls in y-Richtung.

Das in dieser Arbeit behandelte Experiment der photothermischen Strahlablenkung basiert auf der parallelen Überlagerung eines Nanosekunden-Laserpulses als Anregungslicht mit einem Infrarot-Dauerstrichlaser als Abfragestrahl (Abbildung 2-1). Anregung der Photochemie durch den ns-Laserpuls führt zu einem räumlichen Profil des Brechungsindex in der Probe, das das Intensitätsprofil des Anregungslasers widerspiegelt und eine Ablenkung des Abfragestrahls durch das übergangsweise in der flüssigen Probe gebildete optische Element nach sich zieht. In verdünnten Proteinsuspensionen entspricht die Konzentration von lichtangeregten Molekülen der Geometrie des Intensitätsprofils des Anregungslasers (Braslavsky und Heibel 1992; Schulenberg et al. 1995). Wärmefreisetzung und nicht-thermische Prozesse, die mit der Photochemie zusammenhängen, führen über Dichteänderungen zu einer Änderung des Brechungsindex. Da der Brechungsindex proportional zur Dichte der angeregten Moleküle ist, hat sein räumliches Profil die gleiche Form wie die des Anregungslasers. Vorübergehend wird ein optisches Element, ähnlich einer Linse in der flüssigen Probe gebildet, das nach einiger Zeit aufgrund von Wärme- und Teilchendiffusion wieder zerfällt.

Detektiert wird die Ablenkung des Abfragestrahls als Spannungsdifferenz zwischen den zwei Elementen eines Differenz-Photodioden-Detektors, der bei Ablenkungswinkeln von  $\varphi > 0$  ungleichmäßig beleuchtet wird (siehe Abschnitt 2.2). Für kleine Winkel  $\varphi$  ist das PBD-Signal ( $X_{\text{PBD}}$ ) direkt proportional zu  $\varphi$ . Unter Anwendung elementarer optischer Gesetze kann der Ablenkungswinkel  $\varphi$  als Integral des Gradienten des Brechungsindex ( $dn/dr$ ) über die Länge des Lichtpfands in der Probe berechnet werden (Jackson 1981):

$$X_{\text{PBD}} \propto \varphi = \frac{1}{n} \int_{\text{Pfad}} \frac{dn}{dr} ds. \quad (2.1)$$

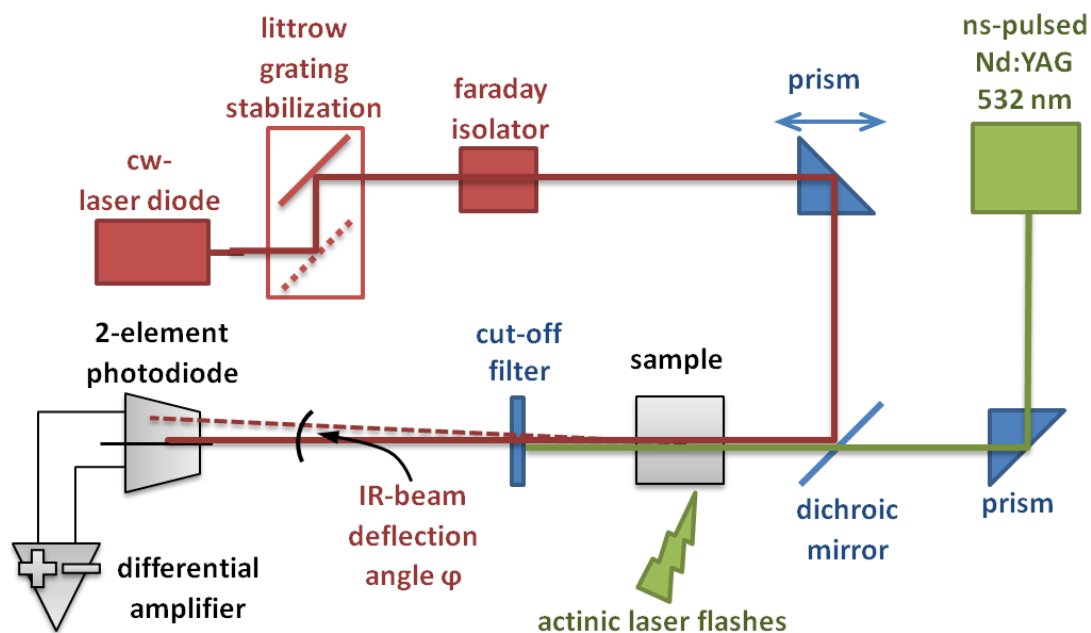
Für Proben geringer Absorption ist  $dn/dr$  annähernd konstant entlang des Integrationswegs und Gleichung 2.1 vereinfacht sich zu einer Proportionalität des PBD-Signals zum räumlichen Gradienten des Brechungsindex und der Länge  $d$  des optischen Pfades in der Probe. Bei einem Anregungslaser mit gaußförmigem Intensitätsprofil ist  $dn/dr$  im Wendepunkt der Gaußkurve bei  $r_0/2$  ( $r_0$  ist der Strahlradius) maximal. Das detektierbare PBD-Signal ist demnach maximal, wenn der Abfragestrahl zur Mittelachse des Anregungsstrahls um  $r_0/2$  versetzt auf den Umkehrpunkt des Anregungslaser-Intensitätsprofils zentriert ist (Abbildung 2-1). In dieser Konfiguration ist das PBD-Signal proportional zur Änderung des Brechungsindex  $\Delta n$ . Außerdem ergibt sich eine starke Abhängigkeit von dem Radius des Anregungsstrahls  $r_0$ .

$$X_{\text{PBD}}^{\text{max}} \propto \Delta n \cdot d \cdot r_0^{-3} \quad (2.2)$$

Die verschiedenen Beiträge zur Änderung des Brechungsindex  $\Delta n$  im Mikro- und Millisekunden-Bereich und ihre experimentelle Separierung werden in Abschnitt 4.1.3 besprochen.

## 2.2 Apparatur zur Messung der photothermischen Strahlableitung

Die photothermischen Messungen dieser Arbeit wurden an einem experimentellen Aufbau durchgeführt, der in Grundzügen von Martin Werthammer im Rahmen einer Diplomarbeit erstellt wurde. Weitere Komponenten wurden später von Roland Krivanek hinzugefügt, der auch eine umfangreiche Software zur Steuerung und Datenaufnahme programmierte. Ihm ist es nach weiterer Optimierung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses als erstem gelungen, mit dem PBD-Spektrometer zu wissenschaftlich relevanten Daten zu gelangen (Krivanek et al. 2008).



**Abbildung 2-2:** Vereinfachte, schematische Skizze des experimentellen Aufbaus für PBD-Experimente. Linsen und Blenden, die zur Strahlenformung durch Fokussierung bzw. Defokussierung verwendet wurden, sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Auch periphere Komponenten zur Temperaturkontrolle, Energiemessung der Laserpulse, Feinjustierung, Ablaufsteuerung, Datenaufnahme und zum automatisierten Probenwechsel sind nicht dargestellt.

---

Abbildung 2-2 zeigt schematisch die wichtigsten optischen Komponenten des Aufbaus in der heutigen Konfiguration. Im Vergleich zu Krivanek wurden die optischen Kernkomponenten des Experiments um eine mit externer Kavität (*littrow grating stabilization*) ausgestatteten Laserdiode erweitert.

Zentrales Element der Messapparatur ist der IR-Messlichtstrahl ( $\sim 920$  nm, roter Strahlengang in Abbildung 2-2), der von einer Laserdiode erzeugt wird. Räumliche Inhomogenitäten im Brechungsindex der flüssigen Probe (*sample*), ausgelöst durch Blitzanregung, führen zu einer Ablenkung des IR-Strahls. Zur Detektion einer solchen Ablenkung wurde der IR-Strahl auf eine zweielementige Photodiode (SFH-221, Osram Semiconductors, Regensburg) zentriert. Der Abstand zwischen Photodiode und Probenkammer betrug ein Meter. Die beiden  $0,7 \times 2,2$  mm<sup>2</sup> großen Diodenelemente waren durch einen vertikalen Spalt der Breite 90  $\mu$ m voneinander getrennt und an ihre gemeinsame Kathode war eine Vorspannung von +9 V angelegt, um die Sperrschichtkapazität und damit die Reaktionszeit der Diode zu verringern. Der Photostrom jeder der beiden Dioden wurde über einen 4,7-k $\Omega$ -Widerstand in eine Spannung umgewandelt. Ein zunächst für die Verstärkung der Spannungsdifferenz verwendeter Differenzverstärker (AM-502, Tektronix, Köln) wurde im Laufe der Arbeit durch einen rauschärmeren Verstärker ersetzt (SR560, Stanford Research Systems). Der Verstärkungsfaktor betrug jeweils 100, die gewählte Bandbreite war bei dem Verstärker von Tektronix auf 100 kHz, beim rauschärmeren auf 300 kHz beschränkt. Das verstärkte Differenzsignal wurde schließlich von einer Analog-Digital-Wandlerkarte (12 Bit, 20 MHz, ADLink, Irvine, Kalifornien, USA) digitalisiert und unter Verwendung von (in der Skriptsprache Python programmierter) Mess- und Steuersoftware in den Messrechner eingelesen.

Mit diesem relativ einfachen Detektionsprinzip konnte eine sehr hohe Sensitivität bezüglich der Strahlablenkung erreicht werden, was geeignete Maßnahmen zur Minimierung von Störungen erforderte. Der Abfragestrahl verlief daher zum Schutz vor Luftturbulenzen und Licht komplett in einem speziellen Dämmkasten, wobei alle optischen Elemente auf einen schwingungsisolierten Tisch (Opta, Bensheim) montiert waren. Neben mechanischen Störungen war das erreichbare Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch die Positions- und Leistungsstabilität der IR-Laserdiode limitiert. Zur Vermeidung von Modensprüngen bei den hier verwendeten Laserdioden war eine hochpräzise Temperatur- und Diodenstromkontrolle notwendig. Zur weiteren Stabilisierung der IR-Intensität wurde ein Faraday-Isolator (IO-5-950-VLP, Laser 2000, München) eingesetzt, um Rückreflektionen in die Diode und dadurch

ausgelöste Intensitätsschwankungen zu minimieren. Im Vergleich zu einem zunächst verwendeten Monomodul-IR-Laserdioden-Modul (LGT-920-100-EPS, LG Lasertechnologies, Kleinostheim,  $\lambda = 920$  nm, 61 mW) konnte das hochfrequente Intensitätsrauschen im Kilo- und Megahertz-Bereich und die Wahrscheinlichkeit von Frequenzsprüngen (longitudinale Modensprünge) durch Einsatz eines Brechungsgitters in sogenannter „Littrow-Konfiguration“ (Ricci et al. 1995) deutlich vermindert werden (siehe auch Abschnitt 3.1). Ein entsprechendes Lasermodul der Firma TUI Optics (DL100,  $\lambda = 910$  nm, 30 mW) wurde für die in Kapitel 5 präsentierten Messungen in den Aufbau integriert.

Ein dichroitischer Spiegel koppelte den IR-Messlichtstrahl parallel zum Strahlengang der Anregungslicht-Laserpulse, die von einem frequenzverdoppelten, gütegeschalteten Nd-YAG-Laser (Continuum Minilite-II,  $\lambda = 532$  nm, Pulsdauer  $\sim 5$  ns) erzeugt wurden. Der Anregungslaser wurde auf einen separaten Tisch montiert, um mögliche Schwingungen zu entkoppeln. Ein Langpassfilter (*cut-off filter*) mit einer Grenzwellenlänge von 850 nm verhinderte, dass der Anregungspuls den Detektor traf. Die Pulsenergie des Anregungslasers wurde für jeden Laserblitz von einem kalibrierten Energiemeter (LEM2410, PEM11-Messkopf, Sensor und Lasertechnik, Neuenhagen) gemessen und von dem Messprogramm aufgezeichnet. Eine automatische Feinausrichtung der horizontalen Position des IR-Messlichtstrahls wurde durch einen motorisierten Lineartisch ermöglicht, der das Umlenkprisma (in Richtung des Doppelpfeils in Abbildung 2-2) und damit die horizontale Position des IR-Strahls auf der zweielementigen Detektorphotodiode computergesteuert in Sub-Mikrometerschritten bewegt.

Laserblitze hoher Energie (*actinic laser flashes*) (bis  $\sim 50$  mJ), die die gesamte Probenkammer senkrecht zur Richtung des Messlichtstrahls ausleuchten, wurden durch einen zweiten Nd:YAG-Laser (Inlite, Continuum, Darmstadt,  $\lambda = 532$  nm, Pulsdauer  $\sim 5$  ns) erzeugt. Die Durchflussküvette (Helma, Probenkammer  $3 \times 3 \times 10$  mm<sup>3</sup>) befand sich in einem metallischen Halter, der mithilfe von wassergekühlten Peltier-Elemente (PKE 128 A 0020, Peltron GmbH, Fürth) temperiert werden konnte. Die Temperaturbestimmung in der Küvette erfolgte mit einem Sensor, der über die Küvettenabflussöffnung in die Probenkammer eingeführt wurde.

### 2.3 Grundlagen der Photoakustik

Die Anregung von flüssigen Proben mit Lichtblitzen führt zu Dichteänderungen, die als Folge von *i*) Erwärmung der Probe nach thermischer Relaxation der absorbierten Photonenenergie auftreten oder aber *ii*) als Folge von strukturellen Änderungen in der Probe bei lichtinduzierten Reaktionen zu beobachten sind. Die Druckwelle, die bei schnellen Dichteänderungen nach Anregung mit einem Laserblitz in der Flüssigkeit entsteht, wird bei der Methode der laserinduzierten optoakustischen Spektroskopie über einen piezoelektrischen Transducer, der an die Probenkammer gekoppelt ist, detektiert. Die Amplitude des PA-Signals  $X_{PA}$  ist dabei der absoluten Magnitude der photoinduzierten Druckwelle  $\Delta P$  proportional (Autrey 1998):

$$X_{PA} \propto \Delta P. \quad (2.3)$$

Der thermische Anteil der Druckänderung  $\Delta P_{\text{therm}}$  geht auf den Anteil  $Q$  der absorbierten Energie  $E_{\text{abs}}$  zurück, der als Wärme an das Medium abgegeben wird und über eine Erwärmung  $\Delta T$  zur thermischen Volumenänderung  $\Delta V_{\text{therm}}$  führt (Gensch und Viappiani 2003).

$$\Delta P_{\text{therm}} = -\frac{1}{\kappa_T} \cdot \frac{\Delta V_{\text{therm}}}{V} = \frac{1}{\kappa_T} \cdot \beta \cdot \Delta T = \frac{1}{\kappa_T} \cdot \beta \cdot \frac{1}{C_p \cdot \rho \cdot V} \cdot Q \cdot E_{\text{abs}} \quad (2.4)$$

In Gleichung 2.4 bezeichnet  $\kappa_T$  die isotherme Kompressibilität, über die die Volumenänderung  $\Delta V$  in eine Druckänderung  $\Delta P$  überführt wird. Der isobare Expansionskoeffizient  $\beta$  vermittelt zwischen Temperaturänderung  $\Delta T$  und  $\Delta V$ . In die Umrechnung der abgeführten Wärme  $Q$   $E_{\text{abs}}$  in eine Temperaturerhöhung  $\Delta T$  gehen die Wärmekapazität  $C_p$ , die Dichte  $\rho$  und das ausgeleuchtete Probenvolumen  $V$  ein.

Strukturelle Volumenänderungen  $\Delta V_{\text{struc}}$ , zu denen alle Umorientierungen von Molekülen und Atomen in der PSII-Probe beitragen, steuern einen zweiten Anteil zur Druckänderung bei:

$$\Delta P_{\text{struc}} = -\frac{1}{\kappa_T} \cdot \frac{\Delta V_{\text{struc}}}{V}. \quad (2.5)$$

Als Summe des thermischen und des strukturellen Terms lässt sich die photoakustische Signalamplitude wie folgt darstellen:

---

$$X_{\text{PA}} = \frac{C \cdot E_{\text{abs}}}{\kappa_{\text{T}}} \left( \frac{\beta}{C_{\text{p}}\rho} Q + \frac{\Delta V_{\text{e}}}{h\nu} \right), \quad (2.6)$$

wobei  $\Delta V_{\text{e}}$  der strukturellen Volumenänderung eines Photosystems bei Anregung mit einem Photon der Energie  $h\nu$  entspricht. Die instrumentenspezifische Konstante  $C$  umfasst unter anderem die piezoelektrischen Parameter des Transducers und das Volumen der Probenkammer. Die Auswertung der zeitlichen Entwicklung von PA-Signale ist in Abschnitt 6.1.4 beschrieben.

## 2.4 Bestehender Aufbau zur Messung der Photoakustik

Der experimentelle Aufbau, an dem photoakustische Messungen durchgeführt wurden, ist von Björn Süß im Laufe seiner Diplomarbeit konstruiert worden. Thomas Sikora hat im Rahmen seiner Diplomarbeit weitere Komponenten hinzugefügt, die einen weitgehend automatisierten Ablauf bei PA-Messungen von Temperaturreihen an PSII-Proben in verschiedenen S-Zuständen ermöglichen.

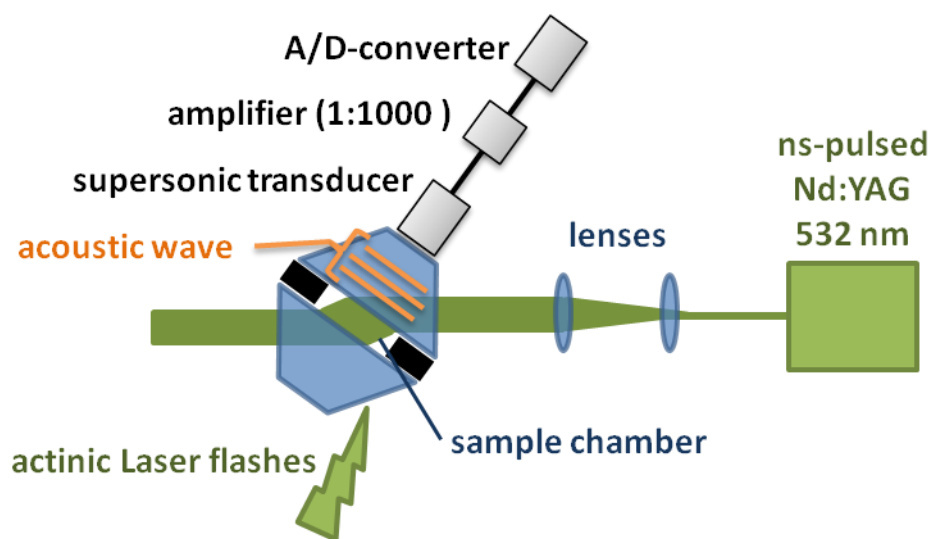
Die Probenkammer, die über eine peristaltische Pumpe (Masterflex) mit der PSII-Suspension befüllt werden kann, wird durch zwei Glasprismen und einen ringförmigen Abstandshalter (der Stärke 0,5 mm) gebildet (Abbildung 2-3). Ein Laserblitz, der von einem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (Continuum Minilite, 532 nm, Pulsdauer ~5 ns) erzeugt und über eines der beiden Prismen in das Probenvolumen eingekoppelt wurde, löst das PA-Signal aus. Der Vorteil dieser Doppelprismengeometrie ist, dass die Photoanregung frontal (in einem spitzen Winkel zur Transducermembrannormalen) geschieht, ohne dass das Anregungslicht die Transducermembran direkt trifft und störende Artefakte auslöst. Nach Weitung durch zwei Linsen und Begrenzung durch eine Blende hatte der Lichtstrahl des Anregungslasers einen Durchmesser von ~7 mm. Die Energie der Laserpulse wurde für jede Messung unter Verwendung eines Pyrosensors (PM21, Sensor und Lasertechnik) bestimmt und mit dem kalibrierten Energiemeter (LEM 2410) aufgenommen.

Schnelle Ausdehnungen oder Kontraktionen des Probenvolumens nach Blitzanregung werden als Druckwellen über das Glasprisma an das Ultraschallmikrofon (supersonic transducer, 2,25 MHz, V133-RM, Olympus NDT Inc., Waltham, MA) übertragen, wo die mechanische Schwingung in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Nach Verstärkung um einen Faktor 1000 mit einem Vorverstärker der Firma FEMTO (HVA-10M-60-FEMTO, Berlin) kam eine



12-bit, 7-MHz A/D-Wandlerkarte (PCI-1714U, Advantech, Taipei) zum Einsatz, um das Signal in den Messrechner einzulesen.

Die Prismenzelle konnte über zwei Peltierelemente (PKE 128 A 0020, Peltron GmbH, Fürth) elektrisch thermostatisiert werden, wobei die Gegenkühlung der Peltierelemente mit Wasser bei Raumtemperatur erfolgte. Um eine computergesteuerte Temperaturkontrolle zu ermöglichen wurde auf das Regelgerät PRG-RS-H-100 zurückgegriffen, dessen Temperatursensor in der Probenkammer installiert war. Zum Schutz vor Licht und äußerem Schall befindet sich die Zelle in einem speziellen Dämmkasten.



**Abbildung 2-3:** Vereinfachte, schematische Skizze des experimentellen Aufbaus für Photoakustik-Experimente. Periphere Komponenten zur Temperaturkontrolle, Energiemessung der Laserpulse, automatisierten Probenwechsel, Ablaufsteuerung und Datenaufnahme sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Ein zweiter Nd:YAG-Laser (Continuum Inlite, 532 nm, Pulsdauer ~5 ns) ermöglichte es Blitze hoher Energie in die Probenkammer einzukoppeln (*actinic Laser flashes*), um die PSII-Photochemie zu sättigen und in allen Photosystemen der Probe eine Ladungstrennung auszulösen.

## 2.5 Präparation von PSII-Membranpartikelproben

PSII-Membranpartikel wurden aus marktüblichem, frischem Spinat gewonnen. Dabei wurde nach der in den Referenzen (Iuzzolino et al. 1998; Schiller und Dau 2000) beschriebenen Präparationsvorschrift vorgegangen. Diese besteht im Wesentlichen aus fünf Schritten, in denen verschiedene Pufferlösungen zum Einsatz kommen (siehe Anhang B):

- 1) Zellaufbruch (in Puffer A),
- 2) Aufbruch der Chloroplasten und Extrahieren der Thylakoidmembranen (in hypotonischem Puffer B),
- 3) Abtrennung der PSI-haltigen Stromabereiche der Thylakoidmembran (in Triton-Inkubationspuffer C) unter Verwendung von Triton-x100 als Detergens, wie es erstmals von Berthold, Babcock und Yocum (Berthold et al. 1981) beschrieben wurde, weshalb dieser Typ von PSII-Proben auch BBY genannt wird,
- 4) Entfernen von Stärke und freigesetzten Chlorophyllmolekülen durch mehrmaliges Zentrifugieren und Resuspendieren der PSII-Membranpartikel (in Glycin-Betain-Puffer D),
- 5) Einfrieren der PSII-Membranpartikel bei einer Chlorophyllkonzentration von 2–3 mg Chl/ml und einer Temperatur von -80 °C.

Alle Präparationsschritte wurden bei gedimmtem grünem Licht durchgeführt, wobei die verwendeten Medien, Behältnisse und Zentrifugenrotoren auf Eis vorgekühlt und auf einer Temperatur von ~2 °C gehalten wurden.

Die Rate der Sauerstoffentwicklung beträgt bei dieser PSII-Präparation typischerweise 1000–1400 ( $\mu\text{mol O}_2$ )/(mg Chl  $\times$  h) unter sättigendem weißen Licht bei 28 °C. Das Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b liegt bei ca. 2,5.

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehalts wurden 100  $\mu\text{l}$  der PSII-Probe in 50 ml eines Aceton-Wasser-Gemischs (80% Aceton, 20% Wasser) für eine Minute inkubiert, die nicht-löslichen Bestandteile abzentrifugiert und ein Absorptionsspektrum des Überstandes aufgenommen (Cary 50 Conc UV-Vis Spectrophotometer, Varian). Nach Lichtenthaler (Lichtenthaler 1987) lässt sich die Konzentration von Chl a und b aus der optischen Dichte bei den Wellenlängen 646 nm und 663 nm ermitteln.

In PSII-Proben für PBD- und PA-Experimente betrug die Chl-Konzentrationen 80 bzw. 180  $\mu\text{g Chl/ml}$ . Zur Absorptionsbestimmung bei der Wellenlänge des Anregungslasers (532 nm) wurden von jeder Probe Absorptionsspektren im Bereich 300–1000 nm aufgenommen (Cary 50, Varian). Ein auf Lichtstreuung an den Membranpartikeln zurückzuführender Untergrund im Absorptionsspektrum wurde minimiert, indem die optische Küvette direkt vor der Detektionsdiode platziert wurde und das Messlicht die Milchglasseite der Küvette passierte. Der verbleibende Streuuntergrund wurde entfernt, indem ein dem

---

Spektrum im Bereich von 800–1000 nm angepasstes Polynom zweiter Ordnung von dem gesamten Spektrum abgezogen wurde.

### 3. Experimentelle Vorarbeiten

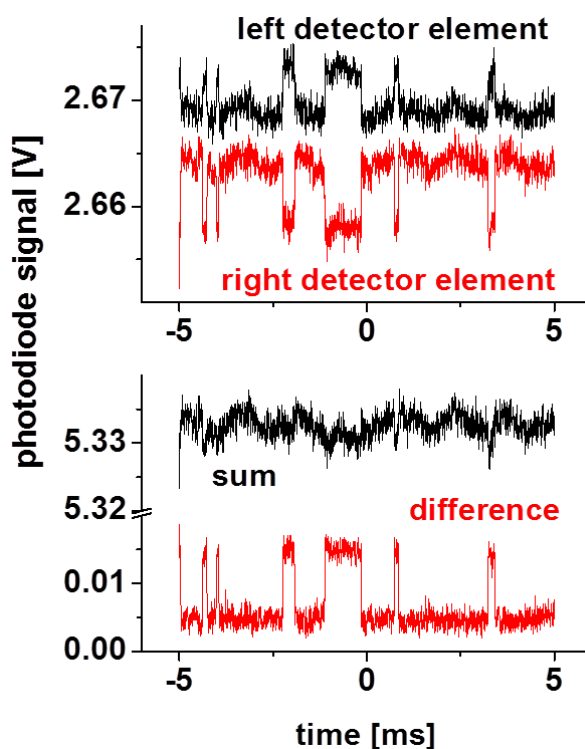
Ein beachtlicher Anteil meiner Arbeitszeit ist in die Instandhaltung, Anpassung bzw. Erweiterung und Optimierung des PBD-Aufbaus geflossen. Ein großes Problem, das bei fast allen im Verlauf der Jahre als Messlichtquelle verwendeten IR-Laserdioden auftrat, stellten Modensprünge dar, die kaum zu kontrollieren waren und erhebliche Störungen in den gemessenen PBD-Signalen verursachten. Im ersten Teil dieses Kapitels soll kurz darauf eingegangen werden, wie dieses Problem schließlich unter Verwendung eines IR-Lasermoduls mit externem Resonator behoben werden konnte. Im zweiten Teil des Kapitels geht es um eine Serie von Fluoreszenzmessungen. Diese liefern Zusatzinformationen über die Akzeptorseite des PSII, die in die Auswertung von photothermischen Messungen einfließen, und sind daher in dieses Kapitel vorbereitender Tätigkeiten eingegliedert.

#### 3.1 Optimierung der PBD-Apparatur

Höhere Transversalmoden (TEM) werden bei den hier verwendeten Laserdioden („*Single-Mode*“-Dioden) gegenüber der gaußförmigen Fundamentalmode  $TEM_{00}$  effektiv unterdrückt. Dennoch waren in den Photodioden-Differenzsignalen immer wieder stochastisch auftretende Sprünge zu beobachten. Die obere Grafik in Abbildung 3-1 zeigt die Spannung, die während des Auftretens von Sprüngen an den beiden einzelnen Diodenelementen abfällt. Plötzliche Spannungszunahmen an einem der beiden Diodenelemente sind mit Spannungsabnahmen ähnlicher Größe an der anderen Photodiode verbunden und umgekehrt. In der unteren Grafik von Abbildung 3-1 sind das Summen- und das Differenzsignal der beiden Photodioden dargestellt. Während sich die Sprünge in der Summe annähernd kompensieren, verstärken sie sich im Differenzsignal, was dafür spricht, dass die Ursache der Sprünge plötzliche Ablenkungen des IR-Strahles sind. Das stochastische Verhalten in Auftreten und Dauer der Sprünge zwischen zwei Niveaus sind Indizien dafür, dass hier Modensprünge beobachtet werden.

Das spektrale Verstärkungsprofil von Laserdioden erstreckt sich über einen Bereich von wenigen Nanometern. In diesen Bereich fallen mehrere Resonanzfrequenzen (longitudinale Moden) des Resonators, die bei Laserbetrieb simultan oszillieren können (Petermann 1991). Ist die Konkurrenz zwischen Moden ausreichend stark (starke Überlappung der Intensitätsverteilungen der Moden) so wird theoretisch die Mode mit der größten

Nettoverstärkung dominieren und die Verstärkung von anderen Moden wird durch den Verbrauch der Ladungsträger in der Halbleiterschicht unter die Oszillationsschwelle gedrückt (Paschotta 2008). In der Realität hat man es jedoch mit einer verringerten Konkurrenz zwischen Moden zu tun, was dazu führt, dass eine stark oszillierende Mode die Verstärkung anderer Moden nicht unter die Laserschwelle drücken kann. Das Resultat können instabile Leistungsverteilungen auf mehrere Moden sein, die komplizierte, nichtlineare Dynamiken aufweisen (Paschotta 2008). Die beobachteten Sprünge im PBD-Signal (Abbildung 3-1) entsprechen wahrscheinlich Übergängen der Hauptoszillation von einer Resonatorfrequenz zu einer anderen. Dass longitudinale Modensprünge bei Diodenlasern die Richtung des emittierten Strahls aufgrund von Dispersion in optischen Komponenten beeinflussen, ist aus der technischen Anwendung des Beschreibens von optischen Datenträgern bekannt (Gage und Bartholomeusz 1991).



**Abbildung 3-1:** Auswirkung von Modensprüngen der IR-Laserdiode auf das PBD-Differenzsignal. Oben ist die an den beiden Elementen der Photodiode abgenommene Spannung dargestellt. Die stochastischen Sprünge sind auf longitudinale Modensprünge zurückzuführen, die zu plötzlichen, räumlichen Versetzungen des IR-Strahls führen. Unten ist sowohl die Summe als auch die Differenz der Photospannungen an den beiden Diodenelementen dargestellt.

Für photothermische Messungen am PSII ist es wegen des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses notwendig, eine Vielzahl (hunderte) von Einzelmessungen durchzuführen. Die

PSII-Proben müssen dabei nach zeitaufwendiger Vorbereitung schnell vermessen werden, da ihre Aktivität trotz Lagerung bei ca. 2 °C innerhalb von wenigen Stunden deutlich abnimmt. Ein zuverlässiges Messsystem, das nach erfolgter Probenpräparation direkt einsatzbereit ist und mindestens einige Stunden stabil (ohne Auftreten von Modensprüngen) arbeitet, ist daher unentbehrlich.

Das Auftreten von Modensprüngen wird durch die Temperatur der Laserdiode und den Diodenstrom beeinflusst (Heumier und Carlsten 2005; Acsente 2007), weshalb beide Parameter über Regelkreise präzise stabilisiert wurden. (Entsprechende Regelkreise sind in den verwendeten Lasermodulen der Firmen Lasertechnics bzw. TUI Optics integriert (siehe auch Abschnitt 2.2).) Zur weiteren Verkleinerung der Modensprungwahrscheinlichkeit wurden Rückreflektionen des Strahls in die Laserdiode minimiert, indem alle optischen Elemente im Strahlengang leicht geneigt und ein Faraday-Isolator integriert wurde. Einen zusätzlichen, entscheidenden Fortschritt im Hinblick auf die Stabilität der IR-Laserdiode brachte die Installation eines Reflektionsgitters vor der Laserdiode in Littrow-Konfiguration. In dieser Konfiguration wird das emittierte Licht der Diode von einer kurzbrennweitigen, anti-reflexionsbeschichteten Linse parallelisiert, bevor es am Gitter in einem Abstand von ~15 mm zur Laserdiode reflektiert wird. Das Reflexionsgitter wirkt dabei als wellenlängen-selektierender Spiegel, indem Spaltabstand  $d$  und Einfallswinkel zur Gitternormalen  $\alpha$  so gewählt werden, dass bei der gewünschten Wellenlänge  $\lambda$  die erste Interferenzordnung in die Einfallsrichtung zurückreflektiert wird. Das am Gitter gebeugte Licht wird also zurück in die Diode gekoppelt, sodass Gitter und Diodenfenster einen externen Resonator bilden, der eine Frequenz (longitudinale Mode) des Diodenresonators auswählt (Ricci et al. 1995).

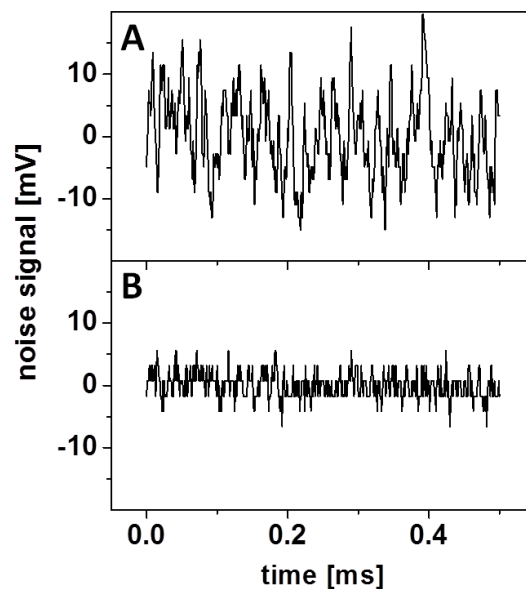
Bei einem Einfallswinkel  $\alpha$  zur Gitternormalen gilt für den Winkel  $\beta$ , unter dem das erste Beugungsmaximum auftritt (Demtröder 2009):

$$d(\sin \alpha + \sin \beta) = \lambda, \quad (3.1)$$

wobei  $d$  der Spaltabstand des Gitters ist. Damit Licht der Wellenlänge 910 nm von dem Gitter mit 1500 Linien pro Millimeter in die Einfallsrichtung zurückreflektiert wird, ergibt sich nach Gleichung 3.1 für Einfalls- und Beugungswinkel ein Wert von  $\alpha = \beta = 43^\circ$ . Durch minimales Verdrehen des Gitters ist es möglich, die Wellenlänge, die in die Laserdiode zurückreflektiert wird, zu variieren und somit die Emissionswellenlänge des Moduls innerhalb des Emissionsspektrums der Laserdiode zu modulieren. Der Laserkopf des verwendeten DL100-

Moduls (TUI Optics, Martinsried) im Ricci-Hänsch-Design stellt dafür eine stabile, mit Mikrometerschrauben bewegliche Halterung für das Gitter bereit.

Der Betrieb der Laserdiode als Einfrequenz- (Einmoden-)Laser, der durch die Littrow-Stabilisierung erreicht wurde, verhinderte nicht nur das Auftreten von Modensprüngen. Als Nebeneffekt nahm auch die Stabilität des PBD-Differenzsignals deutlich zu, wie in Abbildung 3-2 zu sehen ist. Das Phänomen, dass Modensprünge zu einer Zunahme des Intensitätsrauschens führen, ist als Modensprungrauschen (*mode-hopping noise*) bekannt (Petermann 1991; Acsente 2007). Die Standardabweichung der Rauschbänder in Abbildung 3-2 ist mit 2 mV in der Littrow-Konfiguration etwa dreimal kleiner als bei Mehrmodenbetrieb (7 mV), obwohl ausgeprägte Modensprünge in dem gezeigten Zeitbereich nicht zu sehen sind.

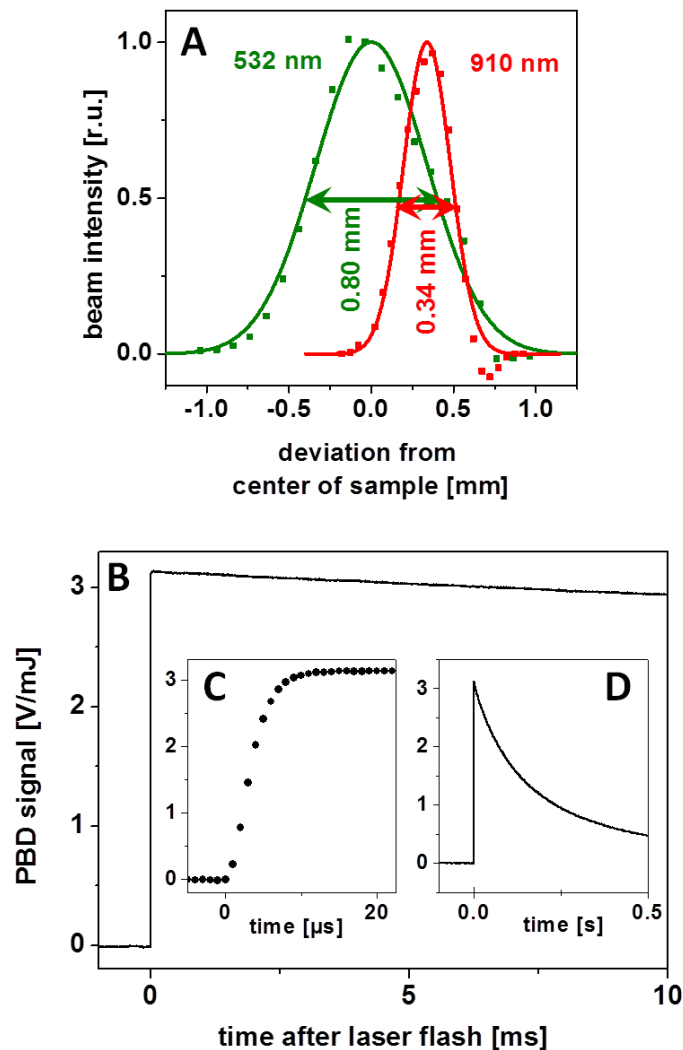


**Abbildung 3-2:** Stabilität des Differenzsignals der beiden Photodiodenelemente. Laserdiodenmodul ohne (A) und mit (B) Stabilisierung durch einen externen Resonator in Littrow-Konfiguration. Die Spannung, die an jedem der beiden Photodiodenelemente abfiel, betrug jeweils 1 V. Die Bandbreite des Differenzverstärkers war auf 100 kHz beschränkt, der Verstärkungsfaktor betrug 100.

Der IR-Strahl des Einfrequenz-Lasers wurde mit Zylinderlinsen auf die Probenküvette fokussiert, sodass der Strahlquerschnitt in der Probenflüssigkeit eine stark elliptische Form aufwies. Während die vertikale Halbachse  $\sim 5$  mm maß, betrug die Halbwertsbreite der Intensitätsverteilung in horizontaler Richtung 0,34 mm (Abbildung 3-3A). Der Strahl des 532-nm-Anregungslasers wurde ebenfalls mit einer Zylinderlinse fokussiert, allerdings auf einen Punkt 2 cm hinter der Küvette, sodass die Halbwertsbreite seiner horizontalen Intensitätsverteilung am Ort der Probe einen Wert von 0,80 mm aufwies (Abbildung 3-3A). Der

vertikale Durchmesser des Anregungsstrahls betrug etwa 1 cm. Eine Spaltblende ließ jedoch in vertikaler Richtung nur 5 mm aus dem Zentrum des Strahls zu der Probenküvette durch.

Ein PBD-Signal, das bei dieser Anordnung von Anregungs- und Abfragestrahl in einer Referenzprobe (BCP-Lösung) hervorgerufen wird, ist in Abbildung 3-3B-D gezeigt. Der Signalzerfall (Teilbild D) spiegelt die Diffusion der nach Lichtabsorption abgegebenen Wärme wieder und hängt daher von der räumlichen Ausdehnung der beiden Laserstrahlen ab.



**Abbildung 3-3:** (A) Normierte Intensitätsprofile und relative Positionen des Anregungslaserstrahls und des IR-Abfragestrahls. Rote Symbole, IR-Intensität gemessen mit einer Photodiode am Ort der Küvette; grüne Symbole Nd:YAG-Intensität gemessen mit einem Pyrosensor. Gaußförmige Simulationen sind als durchgezogene Linien dargestellt und die Halbwertsbreiten in den entsprechenden Farben angegeben. (B) PBD-Signal des Referenzfarbstoffs BCP bei Raumtemperatur (20 °C). Der Zeitverlauf stellt den Mittelwert aus 200 Einzelmessungen dar. (C) Die Anstiegszeit des Signals (<10  $\mu$ s) ist durch den Photodiodendetektor und die Hochpassbegrenzung des Differenzverstärkers bedingt. (D) Der Zerfall des Wärmesignals im 100-ms-Zeitbereich ist auf Wärmediffusion zurückzuführen.



Auch die Anstiegszeit des Signals (Teilbild C) hängt theoretisch mit der Dimension der Laserstrahlen zusammen. Das hier verwendete Detektorsystem reagiert jedoch um einige Größenordnungen zu langsam, um die Signalentstehung im Nanosekunden-Zeitbereich auflösen zu können (Bialkowski 1996).

### **3.2 Prompte Fluoreszenz zur Untersuchung von PSII-Akzeptorseitenreaktionen**

In dieser Arbeit wurde die Messung der prompten Fluoreszenz als komplementäre Messmethode eingesetzt, um erwartete Beiträge der Akzeptorseite des PSII auf photothermische Signale besser identifizieren und verstehen zu können. Die Messung der prompten Fluoreszenz erfolgte mit einem kommerziellen Gerät. In einem typischen Anrege-Abfrage-Experiment (pump-probe) wird die PSII-Probe zunächst durch einen sättigenden Nanosekunden-Laserpuls angeregt. Schwache Pulse einer Leuchtdiode (LED) lösen anschließend zeitversetzt Fluoreszenzsignale aus, die mit Hilfe einer Photodiode detektiert werden. Diese Fluoreszenzsignale stellen ein relatives Maß der Ausbeute der Chlorophyllfluoreszenz dar; im Folgenden ist dieses Signal kurz als prompte Fluoreszenz bezeichnet. Da der Redoxzustand des primären Akzeptorplastochinons  $Q_A$  einen ausgeprägten Einfluss auf die Fluoreszenzausbeute hat, wird die prompte Fluoreszenz häufig zur Untersuchung von Akzeptorseitenreaktionen eingesetzt (Dau 1994a).

#### **3.2.1 Materialien und Methoden**

##### **Probenvorbereitung**

Die PSII-Membranfragment-Proben wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben präpariert. Von einer Stammsuspension mit einer Konzentration von  $\sim 2$  mg Chl/ml, die auf Eis gelagert war, wurde die Probe in einer Plastikkuvette durch Verdünnen mit Puffer D auf eine Chlorophyllkonzentration von  $10 \mu\text{g Chl/ml}$  eingestellt und je nach Messung der künstliche Elektronenakzeptor DCBQ in verschiedenen Konzentrationen zugefügt. Die Plastikkuvetten hatten eine Grundfläche von  $10 \times 10 \text{ mm}^2$  und wurden mit einem Milliliter der verdünnten Probe befüllt. Der Puffer war jeweils auf die gewünschte Temperatur vortemperiert und der gewünschte pH-Wert war eingestellt. Für H/D-Isotopenaustausch-Experimente wurde Puffer D mit  $\text{D}_2\text{O}$  (99,9%) hergestellt und die konzentrierte Stammsuspension vor der Verdünnung in dem  $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer gereinigt (siehe auch Kapitel 4.1.1).

## Messungen der prompten Chlorophyllfluoreszenz

Zur Messung der prompten Fluoreszenz wurde das kommerzielle Doppelmodulations-Fluorometer FL3000 der Firma Photosystem Instruments (Tschechische Republik) eingesetzt, wie bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben (Grabolle 2005; Grabolle und Dau 2005). Die Erzeugung von Nanosekunden-Lichtblitzen zur sättigenden Anregung der PSII-Proben erfolgte mittels eines frequenzverdoppelten, gütegeschalteten (Q-switched) Nd:YAG-Lasers (Continuum Minilite II, Wellenlänge = 532 nm, Halbwertsbreite (FWHM) = 5 ns). Bei jeder Messung wurde die Probe mit einer Serie von 32 sättigenden Laserpulsen im Abstand von jeweils 700 ms angeregt. Als sättigend erwiesen sich dabei Energien von  $2 \text{ mJ/cm}^2$  je Laserpuls (Grabolle 2005), gemessen an der Position der Probenküvette mit dem kalibrierten Energiemeter LEM-2410 der Firma „Sensor und Lasertechnik“. Nach jeder Anregung wurde durch 23 schwache Lichtblitze von Leuchtdioden (LED-Arrays), die auf einer logarithmischen Zeitskala linear angeordnet waren, prompte Fluoreszenz ausgelöst und von einer Photodiode senkrecht zur Richtung des Sättigungslasers und zu den Abfragepulsen detektiert. Der erste der 23 Abfragepulse erfolgte dabei  $230 \mu\text{s}$  nach der jeweiligen Laseranregung, der letzte 690 ms danach.

### 3.2.2 Ergebnisse und Diskussion

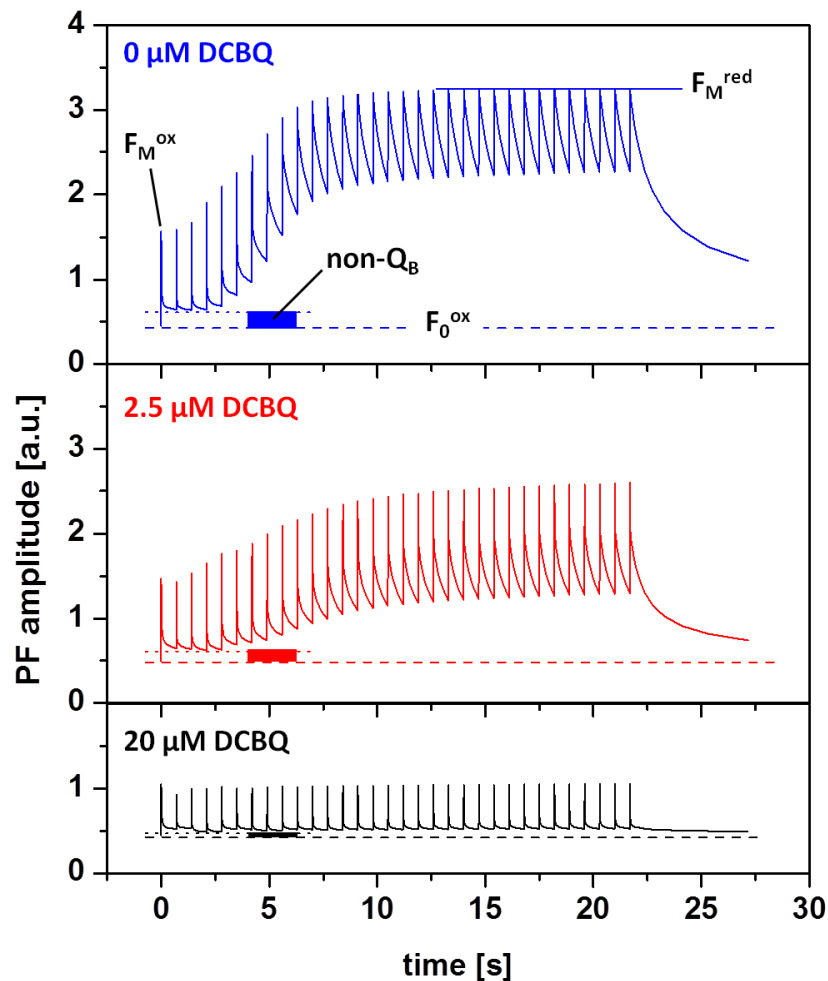
Die Fluoreszenzausbeute eines Photosystems hängt unter anderem vom Oxidationszustand des primären Akzeptorplastochinons  $Q_A$  ab, was bereits 1963 von Duysen und Sweers vorgeschlagen wurde (Duysens und Sweers 1963). Außerdem wird die prompte Fluoreszenz durch den Oxidationszustand des primären Elektronendonors P680, den Grad der Reduktion des Plastochinonpools und in geringem Maß auch vom S-Zustand des  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplexes beeinflusst, wie in den folgenden Abschnitten erläutert wird. Liegt  $Q_A$  in reduzierter Form vor, so ist die Quantenausbeute der prompten Fluoreszenz maximal, was unter anderem damit zusammenhängt, dass dann kein ET von dem Pheophytin zu  $Q_A$  möglich ist (siehe (Dau 1994a) für eine detaillierte Ableitung). Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einem geschlossenen Photosystem. Im Vergleich zu PSII-Komplexen mit oxidiertem  $Q_A$  ist die Fluoreszenzausbeute im System mit reduziertem  $Q_A$  um einen Faktor von 3 bis 5 erhöht (Dau 1994a; Papageorgiou und Govindjee 2011).

### 3.2.2.1 Laserinduzierte Änderung der Fluoreszenzausbeute

#### Einfluss des Oxidationszustands von Plastochinon auf die Fluoreszenzausbeute

Das niedrigste Fluoreszenzsignal  $F_0$  ist also zu erwarten, wenn die PSII-Probe dunkeladaptiert und  $Q_A$  somit großteils oxidiert ist (Dau 1994a; de Wijn et al. 2001; Krivanek et al. 2007). Zur experimentellen Bestimmung von  $F_0$  wurde die prompte Fluoreszenz an den dunkeladaptierten PSII-Proben kurz vor der Applikation des ersten Laserblitzes gemessen. Das  $F_0$ -Niveau ist in Abbildung 3-4 als gestrichelte Linie dargestellt. Das maximale Fluoreszenzniveau  $F_M$  wird hingegen erreicht, wenn nach sättigendem Laserpuls in allen Photosystemen  $Q_A$  in reduzierter Form vorliegt. Die Tatsache, dass das Fluoreszenzsignal nicht wieder auf das  $F_0$ -Niveau vor dem ersten Laserblitz zurückgeht, wird als Zeichen dafür gesehen, dass ein gewisser Anteil der Photosysteme nicht in der Lage ist, den Elektronentransfer von  $Q_A^-$  zum zweiten Plastochinon  $Q_B$  zu vollziehen (Krivanek et al. 2007). In diesen  $Q_B$ -inhibierten Zentren kann  $Q_A^-$  nur sehr langsam in hunderten von Millisekunden über Ladungsrekombination abgebaut werden (Lavergne 1991; Lavergne und Leci 1993). Die massiven Balken in Abbildung 3-4 geben also ein ungefähres Maß für den Anteil von  $Q_B$ -blockierten Zentren in den PSII-Proben an.

Ohne Zugabe eines künstlichen Elektronenakzeptors zur PSII-Probe nimmt  $F_M$  mit steigender Blitzzahl zu (Abbildung 3-4 oben). Diese Zunahme ist jedoch nicht auf Veränderungen in der  $Q_A^-$ -Konzentration zurückzuführen, da direkt nach dem sättigenden Laserpuls  $Q_A$  nahezu vollständig reduziert ist. Vielmehr kann die Zunahme von  $F_M$  (von  $F_M^{ox}$  bis  $F_M^{red}$ ) mit der fluoreszenzlöschenden Wirkung der oxidierten endogenen Elektronenakzeptoren (Plastochinonmoleküle) erklärt werden (Dau 1994a; Dau 1994b; Lazar 1999; Krivanek et al. 2007). Im dunkeladaptierten Zustand sind die ungebundenen bzw. locker gebundenen Plastochinonmoleküle ( $Q_B$ ,  $Q_C$  und eventuell andere) oxidiert. Lichtanregung führt über die induzierte Ladungstrennung zur sukzessiven Reduktion des Plastochinonpools, wobei jedes Plastochinon zwei Elektronen aufnehmen kann (Petrouleas und Crofts 2005). Mit der Abnahme von oxidiertem Plastochinon nimmt das Fluoreszenzniveau zu, da die zugehörige fluoreszenzlöschende Wirkung wegfällt. Das Sättigungsverhalten von  $F_M$  als Funktion der Blitzzahl zeigt so, dass nach etwa 9 Blitzen das maximale  $F_M^{red}$ -Fluoreszenzniveau erreicht, der Plastochinonpool also vollständig oxidiert ist.



**Abbildung 3-4:** Zeitverläufe der prompten Chlorophyllfluoreszenz in einer Reihe von sättigenden Laserblitzen an PSII-Proben. Die Konzentration des Elektronenakzeptors DCBQ wurde variiert: 0  $\mu\text{M}$  (oben), 2,5  $\mu\text{M}$  (Mitte) und 20  $\mu\text{M}$  (unten). Temperatur: 20  $^{\circ}\text{C}$ ; pH-Wert: 6,2. Die gezeigten Daten stellen jeweils den Mittelwert aus drei Einzelmessungen dar.

### **Einfluss des künstlichen Elektronenakzeptors DCBQ auf die Fluoreszenzausbeute**

Die Zugabe des künstlichen Elektronenakzeptors DCBQ in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  ist ausreichend, um die Zunahme von  $F_M$  bei der Anwendung von 32 sättigenden Laserpulsen in einem Abstand von jeweils 700 ms effektiv zu unterdrücken (Abbildung 3-4 unten). Das DCBQ wird durch direkten ET von  $Q_A^-$  oder durch ET von  $Q_B^-$  reduziert und der Anteil von oxidiertem Plastochinon nimmt nicht merklich ab. Dass DCBQ selbst auch eine fluoreszenzlöschende Wirkung hat, zeigt sich deutlich in der Abnahme der initialen Fluoreszenzamplitude ( $F_M^{\text{ox}} - F_0^{\text{ox}}$ ) nach dem ersten Laserblitz mit zunehmender DCBQ-Konzentration. Außerdem scheint der Anteil  $Q_B$ -inhibierter Photosysteme bei hoher DCBQ-Konzentration abzunehmen. (Die „Balkenhöhe“ in Abbildung 3-4 nimmt mit zunehmender

---

DCBQ-Konzentration relativ zu  $F_m - F_0$  ab.) Offensichtlich kann DCBQ  $Q_A^-$  auch in  $Q_B$ -inhibierten Zentren oxidieren und sie somit scheinbar reaktivieren (Grabolle 2005).

Die PBD-Messungen dieser Arbeit (Kapitel 4 und 5) wurden an Proben mit einer Chlorophyllkonzentration von 80  $\mu\text{g Chl/ml}$  durchgeführt, wobei der Elektronenakzeptor DCBQ in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  zugegeben wurde. Messungen der prompten Fluoreszenz wurden bei einer Chlorophyllkonzentration von nur 10  $\mu\text{g Chl/ml}$  durchgeführt, um ein optimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu garantieren. Ein identisches Verhältnis von DCBQ-Molekülen zu Photosystemen, wie bei den photothermischen Messungen, wäre demnach bei einer DCBQ-Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  gegeben. Entsprechende Fluoreszenzverläufe sind in Abbildung 3-4 Mitte gezeigt.

Die Masse von Chlorophyll beträgt etwa 900 g/Mol (Fischer und Wenderoth 1940; Fleming 1967; Airs und Keely 2000). Eine PSII-Probe mit 10  $\mu\text{g Chl/ml}$  enthält also 11  $\mu\text{Mol/l}$  Chlorophyll. Geht man davon aus, dass jedes PSII 200 Chlorophyllmoleküle gebunden hat (Schiller und Dau 2000; Liu et al. 2004; Nelson und Yocum 2006), ergibt diese einfache Abschätzung, dass die Fluoreszenzproben etwa 56 nMol PSII pro Liter enthalten. Eine DCBQ-Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  entspricht also 46 DCBQ-Molekülen pro Photosystem. Da sich DCBQ in der Grenzflächenregion von Membran und wässrigem Puffer stark anreichert (Krakover et al. 1981; Ilani und Krakover 1987), ist davon auszugehen, dass genügend künstlicher Elektronenakzeptor vorhanden ist, um den S-Zustandszyklus mehrmals effizient zu durchlaufen. Die Zunahme des  $F_M$ -Fluoreszenzniveaus in der mittleren Grafik von Abbildung 3-4 spricht zwar für eine effektive Abnahme von oxidiertem Plastochinon, eine vollständige Reduktion des Pools wird jedoch auch nach 32 sättigenden Laserpulsen nicht erreicht. Besonders bei den ersten 12 Laserblitzen, die für die photothermischen Messungen von Relevanz sind, ist ein Großteil des  $Q_A^-$  nach 700 ms, wenn also der nachfolgende Laserpuls erfolgt, reoxidiert und das Photosystem somit „offen“. Da bei den PSII-Membranpartikelproben, die für die photothermischen Messungen verwendet wurden, sowohl die PSII-Konzentration als auch die DCBQ-Konzentration achtmal so hoch war wie bei den Messungen der prompten Fluoreszenz (Abbildung 3-4 Mitte), lässt sich aufgrund der gesteigerten Anreicherungstendenz von DCBQ im Membranbereich bei höherer Konzentration vermuten, dass hier die Reoxidation von  $Q_A^-$  bzw.  $Q_B^-$  schneller und effizienter abläuft. So konnten Hinweise auf einen erhöhten *miss*-Parameter, durch etwaige Erschöpfung des Plastochinonpools, in den photothermischen Messungen nicht gefunden werden (siehe Kapitel 5).

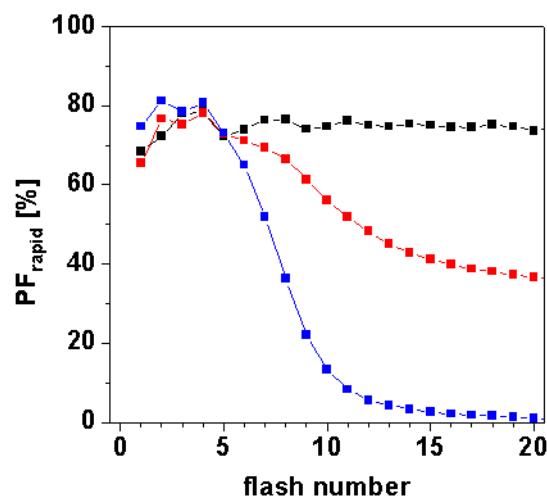
### 3.2.2.2 Zeitlicher Verlauf der prompten Fluoreszenz

Zerfälle von Signalen der prompten Fluoreszenz können in einem Zeitbereich von einigen hundert Mikrosekunden bis einigen hundert Millisekunden in ausreichender Genauigkeit durch die Summe aus drei einfachen Exponentialfunktionen und einer Konstante beschrieben werden (Crofts und Wraight 1983; de Wijn und van Gorkom 2001).

$$F(t) = y_0 + A_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + A_3 \exp\left(-\frac{t}{\tau_3}\right) \quad (3.2)$$

Im Zeitbereich unter  $\sim 300 \mu\text{s}$  sind auch schnell ansteigende Phasen auszumachen. In Abbildung 3-6A deuten sich diese ausschließlich dadurch an, dass der erste Messpunkt ( $220 \mu\text{s}$  nach dem sättigenden Laserpuls) etwas von der Simulation nach unten abweicht.

Wesentlich deutlicher werden diese Abweichungen bei Messungen in  $\text{D}_2\text{O}$  oder bei niedrigem pH-Wert (siehe auch Abbildung 3-7). Simulationen nach Gleichung 3.2 führen hier in einem Zeitbereich unter  $300 \mu\text{s}$  zu keinen guten Ergebnissen. Um Verfälschungen durch schnelle Anstiegsphasen, besonders bei Messungen in  $\text{D}_2\text{O}$ , bei niedrigen pH-Werten oder Temperaturen, zu vermeiden, wurde der Simulationsbereich für alle Kurvenanpassungen in diesem Kapitel auf  $330 \mu\text{s}$  bis  $690 \text{ms}$  beschränkt. Die ersten zwei Messpunkte in Abbildung 3-6A und C gehen also nicht in die Simulationsergebnisse ein.



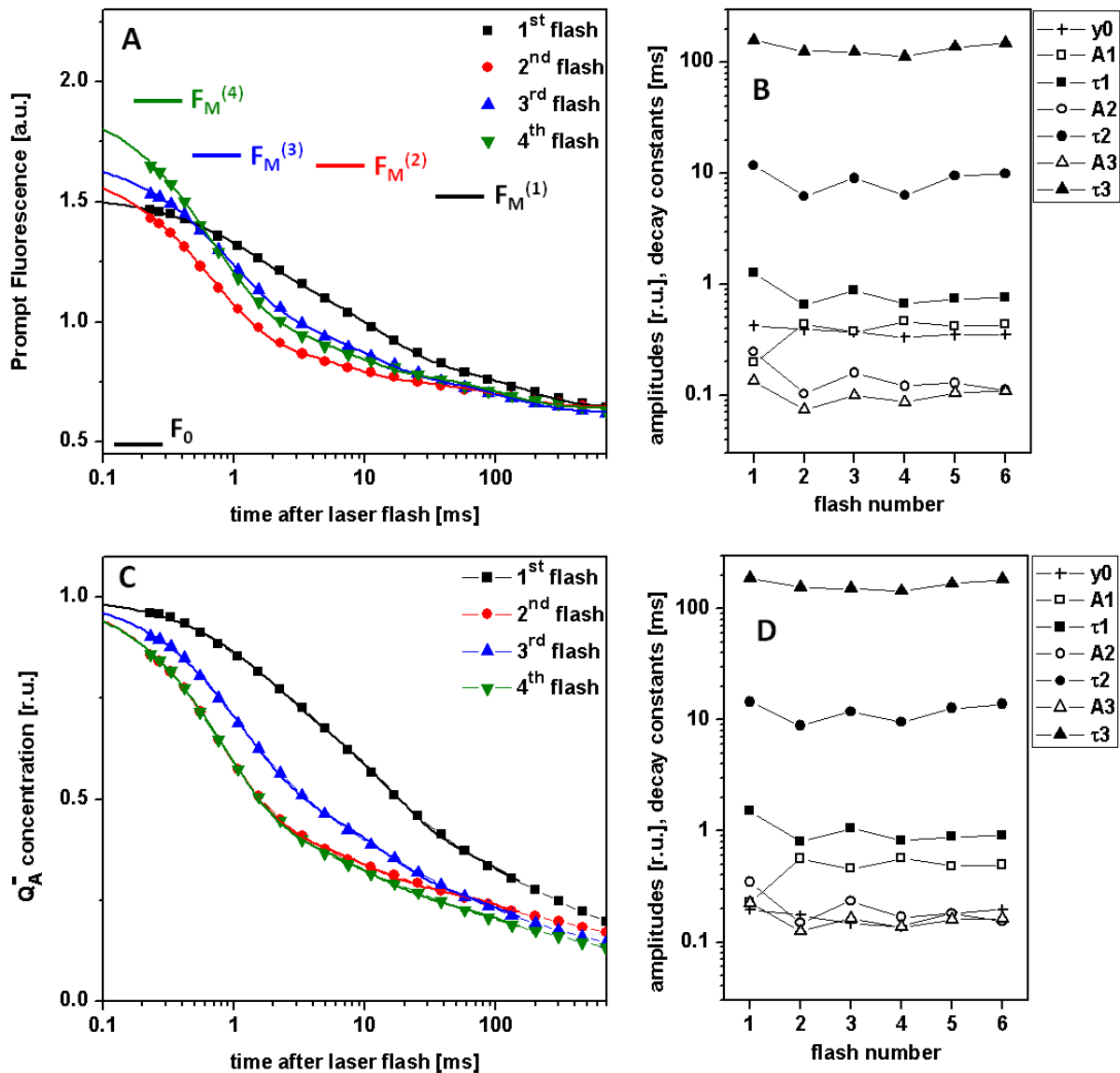
**Abbildung 3-5:** Schnelle  $\text{Q}_\text{A}^-$ -Oxidation in Abhängigkeit von der Anzahl sättigender Anregungsblitze. Für drei verschiedene DCBQ-Konzentrationen (schwarz Symbole,  $20 \mu\text{M}$ ; rote Symbole,  $2,5 \mu\text{M}$ ; blau Symbole,  $0 \mu\text{M}$ ) ist die Summe der relativen Amplituden der beiden schnellen Zerfallsphasen der prompten Fluoreszenz der ersten 20 Blitze dargestellt. Die Daten ermöglichen die Abschätzung des Anteils von PSII, in dem (bei jedem Blitz) der ET von  $\text{Q}_\text{A}$  zu  $\text{Q}_\text{B}$  stattfindet.

Die schnellen Anstiege des Fluoreszenzsignals (mit Zeitkonstanten  $< 100 \mu\text{s}$ ) können auf die fluoreszenzlöschende Wirkung des Kationradikals  $\text{P680}^+$  des primären PSII-Elektronendonors zurückgeführt werden (de Wijn et al. 2001; Grabolle 2005). Wie man aus zeitaufgelösten Absorptionmessungen im nahen Infrarotbereich weiß, ist die Re-Reduktion von  $\text{P680}^+$  ein mehrphasiger Prozess, der größtenteils im Sub-Mikrosekunden-Zeitbereich abläuft (Brettel et al. 1984; Eckert und Renger 1988). Ein Teil der  $\text{P680}^+$ -Reduktion verläuft aber auch langsamer, mit Zeitkonstanten von ungefähr  $30 \mu\text{s}$ . (Siehe auch Kapitel 6.3.3 für eine ausführlichere Diskussion von  $\text{P680}^+$ -Zerfallskinetiken im Zusammenhang mit der Interpretation von photoakustischen Signalen.) Da der schnelle Anstieg der prompten Fluoreszenz seine Ursache mit dem Verschwinden des Fluoreszenzlösers  $\text{P680}^+$  in Donorseitenreaktionen hat und zeitlich hinreichend gut von Zerfällen des Fluoreszenzsignals, die von der Akzeptorseite dominiert werden, getrennt ist, soll er an dieser Stelle nicht weiter untersucht werden.

Die Parameter, die sich bei Simulation der Fluoreszenzzerfälle nach einer Reihe von sättigenden Laserblitzen (Abbildung 3-6A) mit Gleichung 3.2 im Zeitbereich ( $330 \mu\text{s}$  bis  $690 \text{ms}$ ) ergeben, sind in Abbildung 3-6B dargestellt. Die Zahlenwerte für die schnellste Zerfallskonstante  $\tau_1$  und die zugehörige Amplitude  $A_1$  sind zusätzlich in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

**Tabelle 3-1:** Parameter der schnellen Zerfallsphase der prompten Fluoreszenz gemessen an PSII-Membranpartikeln unter Standardbedingungen ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH } 6,2$ ). Vergleich der Werte von Zerfallszeit  $\tau_1$  und relativer Amplitude  $A_1$  der Simulation von Fluoreszenzzerfällen nach Gleichung 3.2. Fluoreszenz: gemessen nach dem ersten, zweiten, dritten, vierten, fünften und sechsten sättigenden Laserblitz, sowie der Mittelwert der Blitze 3 bis 6;  $[\text{Q}_\text{A}^-]$ : für Zerfälle, die nach Formel 3.4 für die Konnektivität zwischen PSII-Einheiten korrigiert wurden und somit den Zerfall des  $\text{Q}_\text{A}^-$ -Radikals widerspiegeln. Konnektivitätsparameter: 0,32 (Grabolle 2005).

		<b>Blitz 1</b>	<b>Blitz 2</b>	<b>Blitz 3</b>	<b>Blitz 4</b>	<b>Blitz 5</b>	<b>Blitz 6</b>	<b>Mittel (3-6)</b>
<b>Fluoreszenz</b>	$\tau_1$ [ms]	<b>1.255</b>	<b>0.657</b>	<b>0.875</b>	<b>0.663</b>	<b>0.742</b>	<b>0.762</b>	<b>0.761</b>
	$A_1$ [r.u.]	0.194	0.435	0.373	0.461	0.419	0.429	0.420
<b>Konnektivität-korrigiert</b>								
<b><math>[\text{Q}_\text{A}^-]</math></b>	$\tau_1$ [ms]	<b>1.523</b>	<b>0.796</b>	<b>1.061</b>	<b>0.817</b>	<b>0.878</b>	<b>0.903</b>	<b>0.915</b>
	$A_1$ [r.u.]	0.227	0.557	0.455	0.561	0.481	0.491	0.497



**Abbildung 3-6:** Zeitlicher Zerfall der prompten Fluoreszenz und Abnahme der  $Q_A^-$ -Konzentration. (A) Promptes Fluoreszenzsignal von PSII-Membranpartikeln nach ein, zwei, drei und vier sättigenden Laserblitzen. Symbole geben das gemessene Signal wieder. Die dicken Linien ergeben sich durch Simulation mit der Summe aus drei einfachen Exponentialfunktionen und einer Konstante. Die waagrechten, mit  $F_M$  gekennzeichneten Linien geben die aus der entsprechenden Kurvenanpassung bestimmten Maximalwerte der Fluoreszenz an. Das Fluoreszenzniveau von dunkeladaptierten PSII-Proben (gemessen vor Applikation des ersten Laserpulses) ist mit  $F_0$  bezeichnet. Chlorophyllkonzentration, 10  $\mu\text{Mol/ml}$ ; DCBQ-Konzentration, 2,5  $\mu\text{Mol/ml}$ ; 20 °C; pH, 6,2. (B) Simulationsergebnisse der in (A) gezeigten (und weiterer nicht gezeigter) Zerfälle der prompten Fluoreszenz nach einer Serie von sechs sättigenden Laserblitzen. Zeitkonstanten ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$ ) und relative Amplituden ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ) sowie eine Konstante ( $y_0$ ) ergeben sich durch Kurvenanpassung einer dreifach exponentiellen Funktion an die Fluoreszenzsignale. (C) Zeitliche Entwicklung des reduzierten Anteils von  $Q_A^-$ , bestimmt aus den in (A) gezeigten Fluoreszenzverläufen durch Korrektur für die Konnektivität zwischen Photosystemen nach Gleichung 3.4. (D) Ergebnisse von Simulationen der in (C) gezeigten (und weiterer nicht gezeigter)  $Q_A^-$ -Zerfälle mit der Summe dreier Exponentialfunktionen in Abhängigkeit von der Anzahl applizierter Laserblitze.



### 3.2.2.3 Der $Q_A^-$ -Zerfall

Eine direkte Proportionalität zwischen  $Q_A^-$ -Konzentration und Fluoreszenzsignal nach

$$[Q_A^-](t) = \frac{F(t) - F_0}{F_M - F_0} \quad (3.3)$$

kann nur angenommen werden, wenn die Wahrscheinlichkeit für eine Übertragung von Anregungsenergie zwischen PSII-Einheiten klein ist. Die effektive Übertragung von Anregungsenergie zwischen benachbarten Einheiten einer PSII-Domäne wird in der Literatur als PSII-Konnektivität bezeichnet und deutet sich experimentell unter anderem durch die sigmoidale Form der sogenannten DCMU-Induktionskurve an (Melis und Homann 1975; Thielen und Van Gorkom 1981). Unter Berücksichtigung der PSII-Konnektivität sagen theoretische Modelle (Dau 1994a) einen hyperbolischen Zusammenhang zwischen  $Q_A^-$ -Konzentration und Fluoreszenzsignal voraus:

$$[Q_A^-](t) = \frac{F(t) - F_0}{F_M - F_0 + p(F(t) - F_M)} \quad (3.4)$$

In Gleichung 3.4 wird  $p$  als Konnektivitätsparameter bezeichnet, der die relative Wahrscheinlichkeit dafür angibt, dass ein Anregungszustand (Exziton) von einem geschlossenen auf ein weiteres PSII übergeht. Für die hier verwendeten PSII-Membranpartikelpräparationen wurde von Markus Grabolle (Grabolle 2005) über Messung der DCMU-Induktionskurve ein Wert von  $p = 0,32$  für den Konnektivitätsparameter bestimmt. Die zeitliche Entwicklung der  $Q_A^-$ -Konzentration, ermittelt aus den Fluoreszenzverläufen in Abbildung 3-6A unter Zuhilfenahme von Gleichung 3.4, ist in Abbildung 3-6C dargestellt. Es zeigt sich, dass der  $Q_A^-$ -Zerfall nach dem zweiten und dem vierten sättigenden Laserblitz (besonders im Zeitbereich bis zwei Millisekunden) sehr ähnliches Verhalten aufweist. Auffällig langsam ist der Zerfall nach dem ersten Laserpuls.

Wie auch schon die Zeitverläufe der prompten Fluoreszenz lassen sich die Zerfälle der  $Q_A^-$ -Konzentration in ausreichender Genauigkeit mit drei Exponentialfunktionen nach Gleichung 3.2 beschreiben. Entsprechende Werte der Anpassungsparameter sind als Funktion der Anzahl von sättigenden Laserpulsen in Abbildung 3-6D dargestellt. Die schnellste Zerfallsphase mit Zerfallskonstanten von  $\tau_1$  um eine Millisekunde wird dem Interchinon-ET zugeordnet, wobei der Akzeptor dieses ETs ( $Q_B$ ,  $Q_B^-$  oder DCBQ) bereits an die Chinon-

Bindungsstelle gebunden ist oder sich zumindest in unmittelbarer Umgebung befindet (Krivanek et al. 2007). Langsamere Zerfallskinetiken im Bereich von 10 Millisekunden und 100 Millisekunden kommen wahrscheinlich zustande, wenn ein Plastochinon zuerst gebunden werden muss, bzw. wenn ein nach Aufnahme von zwei Elektronen und zwei Protonen gebildetes Plastochinol die Bindungsstelle vorübergehend blockiert. Im Zeitbereich von hundert Millisekunden bis in den Sekundenbereich findet schließlich  $Q_A^-$ -Zerfall über Rekombination mit der PSII-Donorseite statt. Die Zerfallsparameter der für die Konnektivität korrigierten  $Q_A^-$ -Zerfälle sind für die ersten sechs Laseranregungen in Abbildung 3-6D dargestellt. Die Zahlenwerte der schnellsten Zerfallsphase sind zusätzlich im unteren Teil von Tabelle 3-1 zusammengefasst. Es zeigt sich, dass die drei Zerfallskonstanten  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  und  $\tau_3$  durch die Konnektivitätskorrektur etwas größer werden. Im Fall von  $\tau_1$  etwa um 20%. Die Zweierperiodizität, mit größeren Werten der Zeitkonstanten bei den ungeraden und kleineren Werten bei den geraden Nummern von sättigenden Laserblitzen (im Bereich der ersten fünf Blitze), wird durch die Korrektur qualitativ nicht beeinflusst. Das Gleiche gilt auch für die Periodizität der zugehörigen relativen Zerfallsamplituden. Bei den Amplituden fällt auf – sowohl bei den Fluoreszenzverläufen wie auch bei den daraus abgeleiteten  $Q_A^-$ -Zerfällen – dass die zum schnellsten Zerfall gehörende Amplitude  $A_1$  ein den Zeitkonstanten und auch den anderen beiden Amplituden  $A_2$  und  $A_3$  entgegengesetzte Oszillationsverhalten aufweist. So sind die größeren Werte von  $\tau_1$  bei ungerader Anzahl von Blitzen mit kleineren Amplituden verbunden und umgekehrt. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt für die erste Laseranregung von dunkeladaptierten PSII-Proben. Eine im Vergleich zu späteren Blitzen langsame Zerfallskonstante  $\tau_1$  ist hier mit einer herausstechend kleinen relativen Amplitude  $A_1$  gekoppelt. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die  $Q_B$ -Bindungsstelle der hier verwendeten PSII-Membranpartikel nicht vollständig mit oxidiertem  $Q_B$  besetzt ist. Der hohe Wert von  $A_2$  und der niedrige von  $A_1$  deuten darauf hin, dass in einer beträchtlichen Anzahl von Photosystemen  $Q_B$  erst gebunden werden muss.

Überraschend ist auch, dass der Interchinon-ET, der auf die erste und dritte Lichtanregung folgt, offensichtlich langsamer ist als der Interchinon-ET nach dem zweiten und vierten Blitz. Bei Messungen an Thylakoiden und Chloroplasten wurde entgegengesetzt gefunden, dass nach dem ersten und dritten Blitz schnellere ET-Reaktionen an der Akzeptorseite stattfinden als nach Blitz zwei und vier (Bowes und Crofts 1980; de Wijn und van Gorkom 2001). Da in dunkeladaptierten PSII-Proben  $Q_B$  hauptsächlich in oxidiertem Form vorliegen sollte, war die Schlussfolgerung aus diesen Beobachtungen, dass die Oxidation von  $Q_A^-$  durch  $Q_B$  schneller abläuft, als wenn sich das Semichinon  $Q_B^-$  an der Bindungsstelle befindet. Rein intuitiv ist es

leicht vorstellbar, dass der zweite ET zu einem bereits einfach reduzierten Semichinon langsamer ist als der erste ET. Die gegensätzliche Blitzabhängigkeit der  $Q_A^-$ -Oxidation bei den hier verwendeten PSII-Membranpartikeln lässt eine so direkte Erklärung nicht zu. Eine mögliche Ursache dafür, dass der  $Q_A^- - Q_B^-$ -ET langsamer ist als der  $Q_A^- - Q_B^-$ -ET, könnte in der Existenz von unterschiedlichen Bindungsstellen für  $Q_B$  und  $Q_B^-$  liegen (Garbers et al. 1998). So wurde für bakterielle Reaktionszentren (bei kryogenen Temperaturen) gezeigt, dass oxidiertes  $Q_B$  eine (lockere) Bindungsstelle in größerer Entfernung zu  $Q_A$  innehat als das einfach reduzierte Semichinon  $Q_B^-$  und gefolgert, dass seine Reduktion von der Umlagerung zur näheren Bindungsstelle ratenlimitiert wird (Stowell et al. 1997). Unbeantwortet bleibt bei dieser Erklärung warum ein ähnlicher Effekt nicht bei intakten Thylakoiden beobachtet wird. Vielleicht ist aber auch die Annahme, dass  $Q_B$  in dunkeladaptierten PSII-Proben vor allem in oxidiert Form vorliegt, für die hier verwendeten Proben nicht zutreffend. In der Literatur kann man Abschätzungen von bis zu 30%  $Q_B^-$  im Dunkeln finden (Fowler 1977; de Wijn und van Gorkom 2001). Bei einem Prozentsatz von über 50% wäre das Blitzmuster der schnellen Zerfallskonstante  $\tau_1$  wieder direkt elektrostatisch zu erklären, was jedoch reine Spekulation ist.

**Tabelle 3-2:** Parameter der schnellen Zerfallsphase der prompten Fluoreszenz gemessen an PSII-Membranpartikeln in  $D_2O$ -Puffer (20 °C; pD 6,2). Zerfallszeit  $\tau_1$  und relativer Amplitude  $A_1$  der Simulation von Fluoreszenzzerfällen nach Gleichung 3.2. Fluoreszenz: gemessen nach dem ersten, zweiten, dritten, vierten, fünften und sechsten sättigenden Laserblitz sowie der Mittelwert der Blitze 3 bis 6;  $[Q_A^-]$ : für Zerfälle, die nach Formel 3.4 für die Konnektivität zwischen PSII-Einheiten korrigiert wurden und somit den Zerfall des  $Q_A^-$ -Radikals widerspiegeln. Konnektivitätsparameter: 0,32 (Grabolle 2005).

		Blitz 1	Blitz 2	Blitz 3	Blitz 4	Blitz 5	Blitz 6	Mittel (3-6)
<b>Fluoreszenz</b>	$\tau_1$ [ms]	<b>1.601</b>	<b>1.260</b>	<b>1.757</b>	<b>1.451</b>	<b>1.499</b>	<b>1.539</b>	<b>1.562</b>
<b><math>D_2O</math></b>	$A_1$ [r.u.]	0.178	0.394	0.326	0.377	0.362	0.374	0.360
<b>Konnektivität-korrigiert</b>								
<b><math>[Q_A^-]</math></b>	$\tau_1$ [ms]	<b>1.956</b>	<b>1.543</b>	<b>2.123</b>	<b>1.814</b>	<b>1.815</b>	<b>1.840</b>	<b>1.898</b>
<b><math>D_2O</math></b>	$A_1$ [r.u.]	0.213	0.518	0.413	0.476	0.431	0.441	0.440

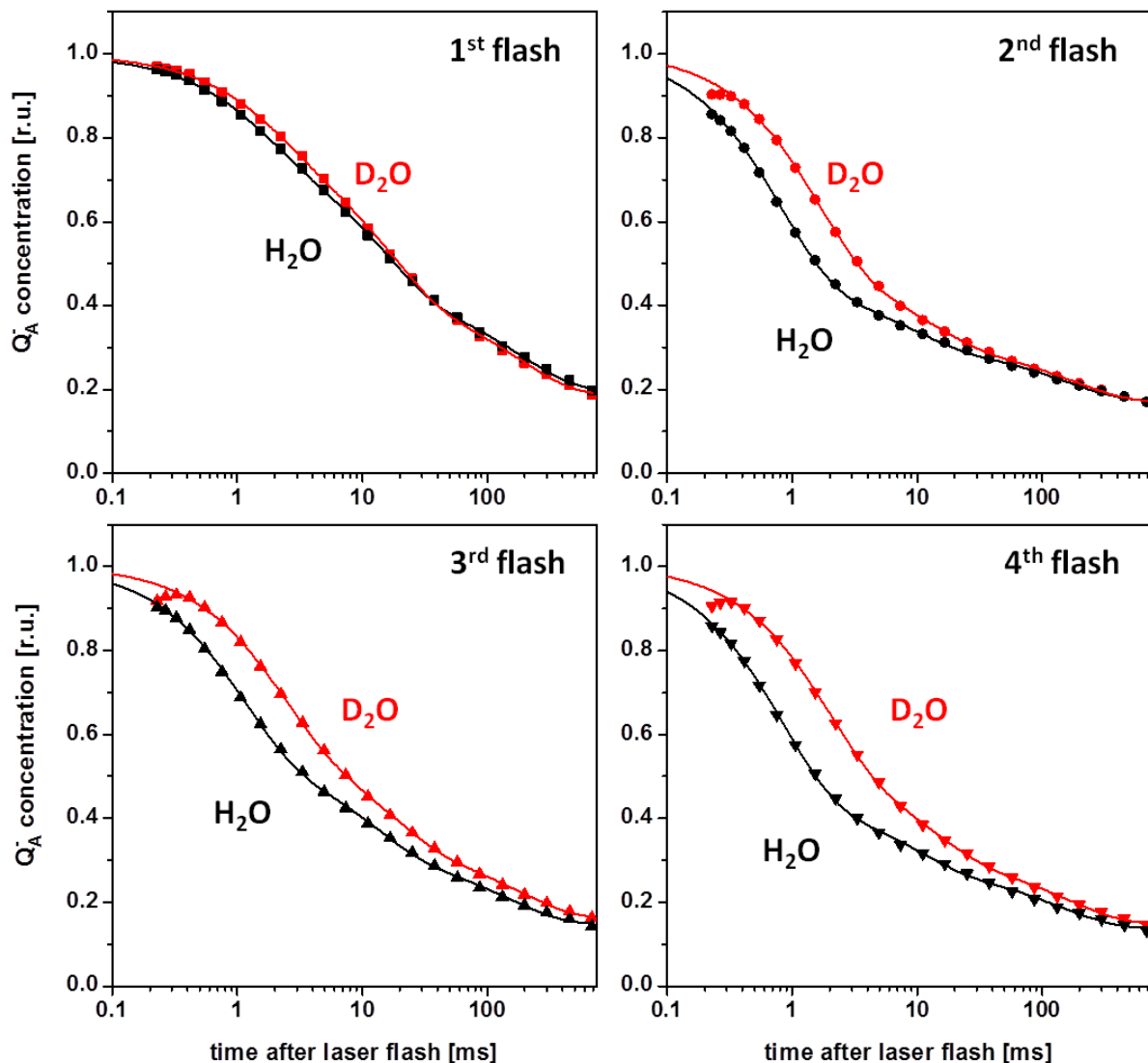
### 3.2.2.4 Einfluss von H/D-Isotopenaustausch, pH-Wert und Temperatur auf den Akzeptorseiten-Elektronentransfer

In dieser Arbeit ist im Zusammenhang mit den photothermischen Messungen vor allem die schnellste kinetische Phase der  $Q_A^-$ -Reduktion (im Bereich um eine Millisekunde) interessant, da sie am ehesten mit den untersuchten Donorseitenreaktionen interferiert. Messungen der

prompten Fluoreszenz wurden an PSII-Proben durchgeführt, die in verschiedenen Pufferlösungen angefertigt worden waren. Die gemessenen Fluoreszenzzerfälle wurden anschließend (wie im vorherigen Kapitel beschrieben) zur Bestimmung des zeitlichen  $Q_A^-$ -Zerfalls verwendet und mit der Summe aus drei Exponentialfunktionen (im Zeitbereich von 330  $\mu$ s bis 690 ms) beschrieben. Die Auswirkungen des H/D-Isotopenaustauschs auf die  $Q_A^-$ -Oxidation ist in Abbildung 3-7 dargestellt; die Parameter der Simulation sind für die schnellste Zerfallsphase in Tabelle 3-3 zusammengefasst. Mit Ausnahme des ersten Blitzes ist der  $Q_A^-$ -Zerfall in der  $D_2O$ -Probe deutlich langsamer als in  $H_2O$ . Die schnelle Zerfallskonstante  $\tau_1$  ist um einen Faktor von etwa zwei größer. Eine Verlangsamung der  $Q_B$ -Reduktion bei verschiedenen PSII-Präparationen in  $D_2O$  ist in der Literatur bekannt (Renger et al. 1995; de Wijn et al. 2001; de Wijn und van Gorkom 2001). Die Ursachen dafür scheinen eher indirekt zu sein. Vorstellbar ist etwa ein Einfluss auf die Raten der  $Q_B$ -Bindung sowie der Lösung und Reduktion des Chinons  $Q_B$  durch die damit verbundenen Verschiebungen in einem ausgedehnten Netz aus Wasserstoffbrücken im Protein.

Die Fluoreszenzsignale, die nach dem ersten sättigenden Blitz an dunkeladaptierten photosynthetischen Proben gemessen werden, zeigen oft ein anderes Verhalten als die Signale darauf folgender Lichtblitze (de Wijn et al. 2001; Grabolle 2005). Diese Besonderheit, die auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen an der verlangsamten  $Q_A^-$ -Oxidation sichtbar wird, ist nicht vollständig verstanden, wird jedoch oft mit defekten bzw. blockierten Photosystemen erklärt. So können etwa Photosysteme, denen an der Donorseite der Mangankomplex fehlt, beim ersten Blitz das Radikalpaar ( $Y_Z^+Q_A^-$ ) bilden. Da ohne Mangankomplex das Tyrosinradikal jedoch nicht re-reduziert wird, ist das Photosystem für weitere Lichtanregungen blockiert und ein Großteil der absorbierten Lichtenergie wird innerhalb von Nanosekunden thermisch deaktiviert (Lavergne und Leci 1993; Giorgi et al. 1996). Ähnlich sieht es bei  $Q_B$ -inhibierten Photosystemen aus. Auch diese werden sich bei der ersten Anregung nach Dunkeladaption anders verhalten als bei allen folgenden Lichtblitzen und daher zu gemessenen Fluoreszenzsignalen unterschiedliche Beiträge leisten. Es ist daher bei der Auswertung von spektroskopischen Daten nicht unüblich, den ersten Blitz unberücksichtigt zu lassen (Dekker et al. 1984b; Lavergne und Leci 1993; de Wijn und van Gorkom 2001). Bei der Bestimmung von mittleren Zeitkonstanten für die schnellste Phase der  $Q_A^-$ -Oxidation (letzte Spalte in Tabelle 3-1 bis Tabelle 3-5) wurden darüber hinaus auch auf die Daten aus Messungen nach der zweiten Laseranregung verzichtet. Dies wird damit begründet, dass hier Zeitkonstanten für akzeptorseitige Reaktionen gesucht werden, die dabei helfen, Akzeptorbeiträge zu photothermischen Signalen zu identifizieren und zu

interpretieren. Bei der Auswertung photothermischer Messungen mit sättigenden Laserpulsen erwies es sich jedoch als vorteilhaft, auf die Signale, gemessen nach den ersten beiden Laserblitzen, zu verzichten (siehe Kapitel 5). Um möglichst große Vergleichbarkeit zwischen Fluoreszenz- und PBD-Messungen herzustellen, wird als mittlere Zeitkonstante der schnellen  $Q_A^-$ -Zerfallsphase  $\tau_1$  also der Mittelwert der entsprechenden Werte nach Blitz 3, 4, 5 und 6 angegeben.



**Abbildung 3-7:**  $Q_A^-$ -Zerfall, bestimmt aus Messungen der prompten PSII-Fluoreszenz, nach dem ersten bis vierten sättigenden Blitz, jeweils in  $H_2O$ - und  $D_2O$ -Puffer. In den Simulationen (durchgezogenen Linien) wurden die ersten beiden Messpunkte (bei 230  $\mu s$  und 270  $\mu s$ ) nicht berücksichtigt.

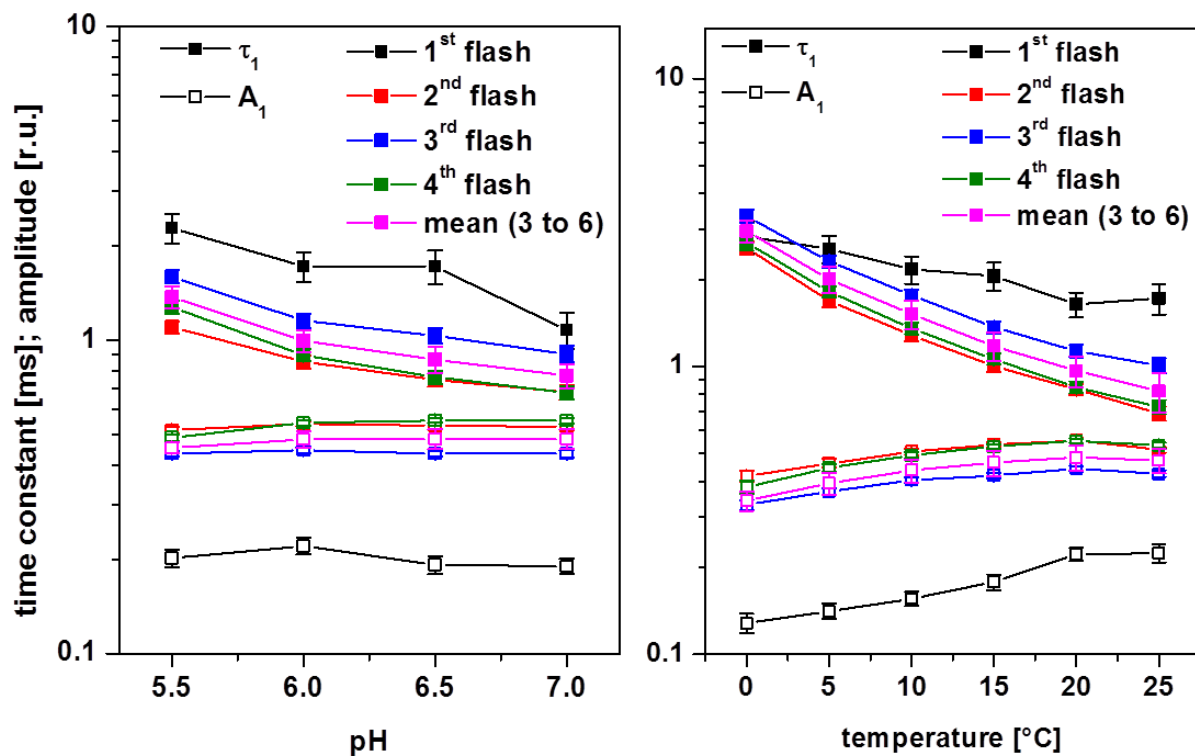
Die Zugabe des Elektronenakzeptors DCBQ in einer Konzentration von 20  $\mu M$  hat weder in  $H_2O$  noch in  $D_2O$  eine signifikante Auswirkung auf die schnelle Zerfallsphase von  $Q_A^-$ , wie man aus Tabelle 3-3 herauslesen kann. Die meisten  $\tau_1$ -Werte in Tabelle 3-3 weichen bei einer DCBQ-Konzentration von 20  $\mu M$  um weniger als 10% von den entsprechenden Werten bei

einer DCBQ-Konzentrationen von 2,5  $\mu\text{M}$  ab. Bei einer Ungenauigkeit der einzelnen  $\tau$ -Werte von etwa 5% (bedingt durch die Unsicherheit in der Kurvenanpassung) sind Abweichungen von weniger als 10% nicht als signifikant anzusehen. Unvermeidliche Inhomogenität von PSII-Membranpartikelproben ist vermutlich die Ursache dafür, dass vereinzelt auch Unterschiede auftreten, die größer als 10% sind.

**Tabelle 3-3:** Anpassungsparameter der schnellen Zerfallsphase der  $Q_A^-$ -Konzentration in PSII-Proben nach Anregung mit ein bis sechs sättigenden Laserpulsen. Proben in Standardpuffer und in aus  $\text{D}_2\text{O}$  angefertigtem Puffer bei den beiden DCBQ-Konzentrationen 2,5  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$ . Die letzte Spalte beinhaltet den Mittelwert der Blitze drei bis sechs.

		<b>Blitz 1</b>	<b>Blitz 2</b>	<b>Blitz 3</b>	<b>Blitz 4</b>	<b>Blitz 5</b>	<b>Blitz 6</b>	<b>Mittel (3-6)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b> <b>(2,5 <math>\mu\text{M}</math> DCBQ)</b>	$\tau_1$ [ms]	<b>1.523</b>	<b>0.796</b>	<b>1.061</b>	<b>0.817</b>	<b>0.878</b>	<b>0.903</b>	<b>0.915</b>
	$A_1$ [r.u.]	0.227	0.557	0.455	0.561	0.481	0.491	0.497
<b>D<sub>2</sub>O</b> <b>(2,5 <math>\mu\text{M}</math> DCBQ)</b>	$\tau_1$ [ms]	<b>1.956</b>	<b>1.543</b>	<b>2.123</b>	<b>1.814</b>	<b>1.815</b>	<b>1.840</b>	<b>1.898</b>
	$A_1$ [r.u.]	0.213	0.518	0.413	0.476	0.431	0.441	0.440
<b>H<sub>2</sub>O</b> <b>(20 <math>\mu\text{M}</math> DCBQ)</b>	$\tau_1$ [ms]	<b>1.638</b>	<b>0.744</b>	<b>1.300</b>	<b>0.799</b>	<b>0.864</b>	<b>0.935</b>	<b>0.974</b>
	$A_1$ [r.u.]	0.218	0.434	0.413	0.454	0.380	0.407	0.414
<b>D<sub>2</sub>O</b> <b>(20 <math>\mu\text{M}</math> DCBQ)</b>	$\tau_1$ [ms]	<b>1.444</b>	<b>1.373</b>	<b>2.367</b>	<b>1.945</b>	<b>1.536</b>	<b>1.775</b>	<b>1.906</b>
	$A_1$ [r.u.]	0.220	0.441	0.430	0.440	0.357	0.413	0.410

Die Tatsache, dass eine Verlangsamung der  $Q_A^-$ -Zerfallsphasen in PSII-Proben bei niedrigen pH-Werten auftritt, ist in der Literatur bekannt (de Wijn und van Gorkom 2001). Für die hier verwendeten PSII-Membranpartikel ist eine Verlangsamung der schnellsten Phase der  $Q_A^-$ -Oxidation um einen Faktor von etwa 2 im pH-Bereich zwischen 7,0 und 5,5 zu beobachten (Abbildung 3-8 links und Tabelle 3-4). Die Sonderstellung des Fluoreszenzsignals nach der ersten Laseranregung ist bei allen untersuchten pH-Werten an auffallend langsamen Zerfallskonstanten  $\tau_1$  und besonders niedrigen relativen Amplituden  $A_1$  der schnellen Phase zu sehen. Auch bei niedrigen Temperaturen nehmen Reaktionsgeschwindigkeiten an der Akzeptorseite ab. Im Temperaturbereich von 0 °C und 25 °C nimmt  $\tau_1$  um einen Faktor von rund 3 zu (Abbildung 3-7 rechts und Tabelle 3-5). Eine Ausnahme bildet auch hier wieder der erste Blitz. Bei diesem ändert sich die schnellste Zerfallskonstante mit zunehmender Temperatur weniger stark.



**Abbildung 3-8:** Anpassungsparameter der schnellen  $Q_A^-$ -Zerfallsphase als Funktion des pH-Wertes (links) und als Funktion der Temperatur (rechts). Gefüllte Symbole, Zeitkonstante  $\tau_1$ ; offene Symbole, relative Amplitude  $A_1$ . Die pH-Abhängigkeit wurde bei 20 °C, die Temperaturabhängigkeit bei pH 6,2 ermittelt. Die DCBQ-Konzentration betrug jeweils 2,5  $\mu\text{M}$ .

**Tabelle 3-4:** Parameter der schnellen Zerfallsphase der  $Q_A^-$ -Konzentration nach Anregung mit ein bis sechs sättigenden Laserpulsen bei verschiedenen pH-Werten. Temperatur, 20 °C; DCBQ-Konzentration, 2,5  $\mu\text{M}$ .

pH		Blitz 1	Blitz 2	Blitz 3	Blitz 4	Blitz 5	Blitz 6	Mittel (3-6)
5.5	$\tau_1$ [ms]	2.276	1.100	1.592	1.274	1.302	1.312	1.370
	$A_1$ [r.u.]	0.202	0.516	0.434	0.489	0.436	0.453	0.453
5.8	$\tau_1$ [ms]	1.379	0.874	1.206	0.899	0.966	0.999	1.018
	$A_1$ [r.u.]	0.266	0.574	0.490	0.565	0.495	0.519	0.517
6.0	$\tau_1$ [ms]	1.716	0.853	1.153	0.895	0.952	0.976	0.994
	$A_1$ [r.u.]	0.221	0.542	0.446	0.544	0.468	0.475	0.483
6.5	$\tau_1$ [ms]	1.716	0.747	1.032	0.762	0.821	0.849	0.866
	$A_1$ [r.u.]	0.192	0.533	0.434	0.555	0.466	0.482	0.484
7.0	$\tau_1$ [ms]	1.077	0.682	0.902	0.681	0.735	0.761	0.770
	$A_1$ [r.u.]	0.190	0.530	0.434	0.553	0.472	0.478	0.484

**Tabelle 3-5:** Parameter der schnellen Zerfallsphase der  $Q_A^-$ -Konzentration nach Anregung mit ein bis sechs sättigenden Laserpulsen bei verschiedenen Temperaturen. pH-Wert, 6,2; DCBQ-Konzentration, 2,5  $\mu$ M.

Temperatur		Blitz 1	Blitz 2	Blitz 3	Blitz 4	Blitz 5	Blitz 6	Mittel (3-6)
0 °C	$\tau_1$ [ms]	<b>2.835</b>	<b>2.580</b>	<b>3.327</b>	<b>2.697</b>	<b>2.873</b>	<b>2.926</b>	<b>2.956</b>
	$A_1$ [r.u.]	0.129	0.415	0.331	0.380	0.327	0.327	0.341
5 °C	$\tau_1$ [ms]	<b>2.563</b>	<b>1.691</b>	<b>2.318</b>	<b>1.822</b>	<b>1.953</b>	<b>1.945</b>	<b>2.009</b>
	$A_1$ [r.u.]	0.141	0.458	0.368	0.444	0.375	0.384	0.392
10 °C	$\tau_1$ [ms]	<b>2.178</b>	<b>1.284</b>	<b>1.771</b>	<b>1.356</b>	<b>1.481</b>	<b>1.478</b>	<b>1.521</b>
	$A_1$ [r.u.]	0.156	0.504	0.402	0.491	0.418	0.427	0.434
15 °C	$\tau_1$ [ms]	<b>2.064</b>	<b>1.003</b>	<b>1.369</b>	<b>1.060</b>	<b>1.131</b>	<b>1.147</b>	<b>1.177</b>
	$A_1$ [r.u.]	0.179	0.532	0.417	0.526	0.445	0.459	0.462
20 °C	$\tau_1$ [ms]	<b>1.644</b>	<b>0.833</b>	<b>1.131</b>	<b>0.847</b>	<b>0.933</b>	<b>0.956</b>	<b>0.967</b>
	$A_1$ [r.u.]	0.223	0.549	0.441	0.549	0.469	0.466	0.481
25 °C	$\tau_1$ [ms]	<b>1.725</b>	<b>0.688</b>	<b>1.009</b>	<b>0.724</b>	<b>0.768</b>	<b>0.787</b>	<b>0.822</b>
	$A_1$ [r.u.]	0.225	0.509	0.424	0.529	0.454	0.469	0.469

### 3.2.3 Zusammenfassung und Fazit

Bei der Untersuchung von Reaktionen der PSII-Donorseite, wie sie das Hauptziel dieser Arbeit war, stellen Interferenzen mit Signalen, die von Reaktionen an der Akzeptorseite stammen, eine potenzielle Verkomplizierung bei der Evaluierung von experimentellen Daten dar. So waren auch in photothermischen Signalen (Kapitel 4 und 5) Beiträge auszumachen, die vermutlich in Zusammenhang mit dem Elektronentransfer zwischen den Akzeptorchinonmolekülen  $Q_A$  und  $Q_B$  stehen. Um diese Beiträge besser identifizieren und verstehen zu können, wurden zusätzlich zu den photothermischen Experimenten Messungen der Chlorophyllfluoreszenz durchgeführt. Auf diese Weise konnten kinetische Parameter von Akzeptorseitenreaktionen für die in photothermischen Experimenten verwendeten PSII-Membranpartikelproben bestimmt werden. Parameter, wie etwa die Zeitkonstanten der  $Q_A^-$  Re-Reduktion in Abhängigkeit vom (in der PSII-Probe vorherrschenden) S-Zustand, sind für PSII-Membranpartikel in der Literatur bislang ausschließlich für den  $S_3$ -Zustand zu finden (Grabolle 2005). Um einen kompletten Satz von komplementären Zeitkonstanten der Akzeptorseitenreaktionen unter den Bedingungen zu erhalten, unter denen auch photothermische Messungen durchgeführt wurden, wurde die pH-Abhängigkeit dieser Parameter in einem Bereich von 5,5 bis 7,0, die Temperaturabhängigkeit in einem Bereich von 0 °C bis 25 °C sowie die Auswirkung von H/D-Isotopenaustausch bestimmt. Die genauen



---

Ursachen für einen verlangsamten Interchinon-ET, wie er bei Austausch von H<sub>2</sub>O durch D<sub>2</sub>O und Absenken des pH-Wertes auch schon für Thylakoide und Chloroplasten gefunden wurde (Renger et al. 1995; de Wijn et al. 2001; de Wijn und van Gorkom 2001), sind nicht bekannt. Vermutlich werden die ET-Ratenkonstanten von Veränderungen im die Plastochinonmoleküle umgebenden Wasserstoffbrückennetzwerk des Proteins eher indirekt beeinflusst. Auch wenn die hier vorgestellten Fluoreszenzergebnisse keine neuen funktionellen Erkenntnisse im Hinblick auf die PSII-Akzeptorseitenreaktionen liefern, so ist es doch hilfreich zumindest die kinetischen Parameter zu kennen.

Ein bemerkenswertes Ergebnis der Fluoreszenzmessungen an Membranpartikeln ist, dass scheinbar die Oxidation von Q<sub>A</sub><sup>-</sup> durch Q<sub>B</sub><sup>-</sup> schneller erfolgt als durch Q<sub>B</sub>. Bei Fluoreszenzmessungen an Thylakoiden wurde im Gegensatz dazu gefunden, dass der ET zu Q<sub>B</sub> schneller ist als der zu Q<sub>B</sub><sup>-</sup> (de Wijn und van Gorkom 2001). Auf Grundlage einer Vielzahl von Studien wurde vorgeschlagen, dass Strukturänderungen des Proteins, eine Umlagerung von Q<sub>B</sub>, Ladungsrelaxationen und/oder Protonierungsreaktionen Teile des ratenlimitierenden Prozesses des Interchinon-ET darstellen ((Nabedryk und Breton 2008) und Referenzen darin). Dass diese Prozesse sich in unterschiedlichen PSII-Präparationen unterscheiden und sich verschieden auf ET-Ratenkonstanten auswirken, ist gut vorstellbar. Weitere Studien sind für ein vertieftes Verständnis der molekularen Mechanismen erforderlich, wobei z.B. Infrarotspektroskopie eine wichtige Rolle spielen könnte.

## **4. Detektion zweier Protonentransferschritte im Reaktionszyklus der photosynthetischen Wasseroxidation**

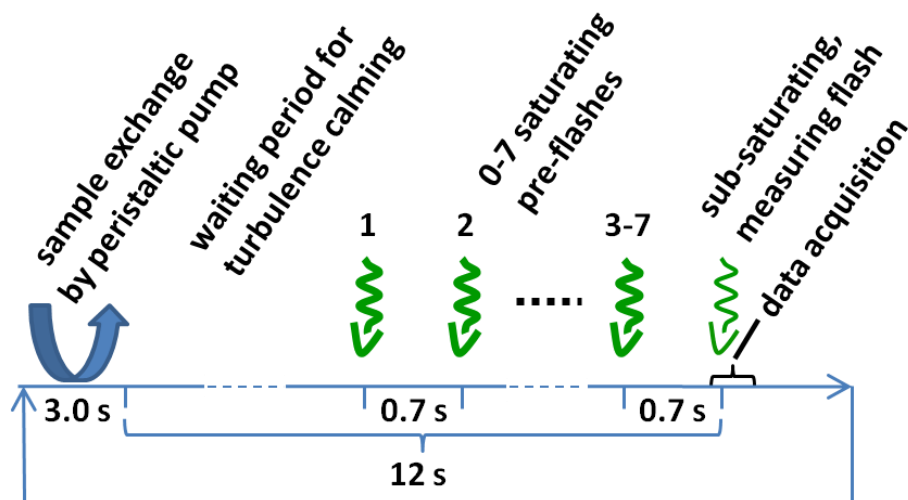
Im Reaktionszyklus der photosynthetischen Wasseroxidation werden pro Umlauf vier Elektronen und vier Protonen vom katalytischen Zentrum, dem  $Mn_4Ca$ -Komplex und seiner Proteinumgebung, entfernt. Im Folgenden sind zeitaufgelöste photothermische Experimente beschrieben, mit denen es möglich war, Volumenänderungen des PSII-Proteins zu verfolgen. Dabei wurden Kontraktionen beobachtet, die im Zusammenhang mit Ladungsbildung am  $Mn_4Ca$ -Komplex durch lichtinduzierte Ladungstrennung stehen, und Expansionen, im Zusammenhang mit ladungskompensierenden Umlagerungen von Protonen. Mit dem experimentellen Nachweis von zwei zuvor unsichtbaren protolytischen Reaktionsschritten konnten zwei Lücken im Reaktionszyklusmodell der photosynthetischen Wasserspaltung gefüllt werden.

Dieses Kapitel basiert im Wesentlichen auf der Arbeit, die in der Fachzeitschrift *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* ((2012): doi: 10.1073/pnas.1206266109) veröffentlicht wurde (Klauss et al. 2012a).

### **4.1 Materialien und Methoden**

#### **4.1.1 Vorbereitung der PSII-Proben**

Bei  $-80\text{ °C}$  gelagerte Präparationen von PSII-Membranpartikeln (siehe Kapitel 2.5) wurden für zwei Stunden, auf Eis gekühlt, aufgetaut. Nach Homogenisierung durch zehnminütiges rühren mit einem Pinsel erfolgte ein Reinigungsschritt, bestehend aus Zentrifugieren (12 Minuten bei 50000 g) und Resuspendieren des Sediments in Puffer D mit einem Pinsel für weitere 10 Minuten. Die Probe wurde anschließend auf eine Chlorophyllkonzentration von  $80\text{ }\mu\text{g/ml}$  verdünnt und der künstliche Elektronenakzeptor DCBQ (2,6-Dichloro-p-benzochinon) zugefügt ( $20\text{ }\mu\text{M}$ ). Für Experimente in  $D_2O$  wurde Puffer D mit  $D_2O$  zubereitet (pD 6,2) und dieser Puffer für den Reinigungsschritt und die Verdünnung verwendet.



**Abbildung 4-1:** Experimentelles Laserblitzprotokoll. Sättigende Laserblitze in einem Abstand von 0,7 s bevölkern vorwiegend einen spezifischen (semi-)stabilen S-Zustand in der ursprünglich dunkeladaptierten PSII-Probe. Der nicht sättigende Messlaserpuls erfolgt 0,7 s nach dem letzten aktinischen Laserpuls. Das PBD-Signal wurde in einem Zeitbereich von 8 ms vor bis 16 ms nach dem Messlaserpuls aufgenommen. Nach dem 3 s dauernden Pumpvorgang ist es nötig einige Sekunden zu warten, damit Turbulenzen in der Probenkammer der Küvette abklingen. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).

#### 4.1.2 Durchführung der PBD-Experimente

Ein Schema des experimentellen Protokolls ist in Abbildung 4-1 dargestellt. Ein Volumen von 100 ml der PSII-Suspension wurde in einem lichtundurchlässigen Reservoir auf Eis gelagert und dauerhaft leicht gerührt, um Zusammenlagerung und Sedimentation der Membranpartikel zu vermeiden. Eine peristaltische Pumpe (Masterflex) beförderte die Probe aus dem Reservoir zunächst durch einen Wärmetauscher und schließlich in die thermostatisierte Durchflussküvette mit einem optischen Pfad von 3 mm. Die Temperatur der Probe wurde innerhalb der Küvette nahe dem Laserstrahl bestimmt. Als Anregungslichtquelle diente ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (Continuum Minilite, 532 nm, Pulsdauer ~5 ns). Die Laserpulsenergie wurde für jeden einzelnen Blitz über ein Energiemeter (Sensor- und Lasertechnik) bestimmt. In Standardexperimenten betrug sie  $5 \pm 0,5 \mu\text{J}$ , wobei eine Fläche von  $5 \text{ mm}^2$  der Probe beleuchtet wurde. Jedes Signal wurde auf die Anregungspulsenergie normiert, bevor die Mittelung über mehrere Einzelmessungen stattfand. Bei den  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschexperimenten betrug die Anregungsenergie  $\sim 9 \mu\text{J}$ . Als Messlichtquelle zur Abfrage der Brechungsindexänderung wurde eine Infrarot-Laserdiode (920 nm, Dauerstrichbetrieb) eingesetzt. Der Probestrahl wurde auf eine Zweielemente-Photodiode fokussiert, die als Detektor für das PBD-Signal diente. Ein zweiter gepulster Nd:YAG-Laser (Continuum Inlite,

---

532 nm, Pulsdauer  $\sim 5$  ns, Pulsenergie abgeschwächt auf  $\sim 10$  mJ cm<sup>-2</sup>), ausgerichtet die Probe senkrecht zum Abfragestrahl zu treffen, wurde als aktinische Lichtquelle verwendet, um das PSII-Ensemble durch den S-Zustandszyklus zu schalten. Der zeitliche Abstand zwischen aktinischen Laserpulsen betrug 700 ms. Die Datenaufnahme erfolgte durch ein PC-System mit hausgener Software. Die elektrische Bandbreite des Detektorsystems betrug 100 kHz. Das Signal wurde bei einer Abtastfrequenz von 1 MHz aufgenommen und anschließend jeweils über zehn benachbarte Datenpunkte gemittelt. Die resultierenden Datenpunkte des PBD-Signals haben einen zeitlichen Abstand von 10  $\mu$ s und sind im Wesentlichen von der Bandbreite des Detektionssystems nicht beeinflusst.

Nach der Befüllung der Durchflussküvette mit dunkeladaptierter PSII-Probe aus dem Reservoir wurde das entsprechende Laserblitzprotokoll ausgeführt. Dies bestand aus einer Warteperiode (abhängig von der Anzahl der aktinischen Pulse 7,1 s bei 7 und 12 s bei 0 sättigenden Blitzen), den 0–7 sättigenden Laserpulsen und einem einzelnen, nicht-sättigenden Mess-Laserpuls. Das PBD-Signal, ausgelöst durch den nicht-sättigenden Laserpuls, wurde aufgenommen. Im nächsten Messzyklus wurde die Durchflussküvette erneut mit frischer Probe von dunkeladaptierten PSII-Membranpartikeln gefüllt. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurde über die Signale einer großen Anzahl von Einzelmessungen gemittelt (mehrere hundert in Abbildung 4-5).

#### 4.1.3 PBD-Signalanalyse

Bei der Analyse von PBD-Signalen wurde auf eine etablierte Prozedur zurückgegriffen (Krivanek et al. 2008; Klauss et al. 2009). Die PBD-Signalamplitude ( $X$ ) ist proportional zur Änderung des Brechungsindex in der Probe während der Photochemie (Abschnitt 2.1) und besteht aus zwei Hauptbeiträgen. (1) Der thermische Anteil ist bedingt durch Wärmefreisetzung ( $\Delta Q$ ) ins Medium nach Laserblitz-Anregung und der daraus resultierenden Abnahme der spezifischen Dichte. (2) Der nicht-thermische Beitrag ( $\Delta N$ ) ist auf Änderungen der Dichte der Probe zurückzuführen, verursacht etwa durch strukturelle Änderungen, die das effektive Volumen des Proteins vergrößern (Expansion) oder verkleinern (Kontraktion). Neben direkten Dichteänderungen, etwa durch Veränderungen von Bindungslängen oder -winkeln, räumliche Ausrichtung von polaren Gruppen oder Wassermolekülen, können auch indirekte Beiträge zu  $\Delta N$  beitragen, verursacht durch Absorptionsänderungen via die Kramers-Kronig-Relation (Gensch und Viappiani 2003). Um solche indirekten Beiträge gering zu halten, wurde eine Wellenlänge von 920 nm für den Abfragestrahl gewählt, die möglichst weit

rotverschoben gegenüber starken Protein-Absorptionsbanden im nahen UV-Bereich ist, ohne in einen Wellenlängenbereich zu gelangen, in dem Wasser absorbiert ( $>960$  nm). Der nicht-thermische Beitrag zur PBD-Signalamplitude kann bei Vernachlässigung von Absorptionsbeiträgen als Volumenänderung  $\Delta V \sim \Delta N$  (s.u.) diskutiert werden. Als Summe zweier Beiträge gilt für die PBD-Signalamplitude Gleichung 4.1:

$$X = X_Q(T) \cdot \Delta Q + \Delta N. \quad (4.1)$$

Während der Wert von  $\Delta N$  als temperaturunabhängig angenommen wird, hängt der Proportionalitätsfaktor  $X_Q$  von thermodynamischen und optischen Eigenschaften der Probenflüssigkeit (Dichte  $\rho$ , Wärmekapazität  $C_P$  und Ableitung des Brechungsindex nach der Temperatur  $dn/dT$ ) ab (Braslavsky und Heibel 1992)

$$X_Q(T) \propto \left( \frac{dn}{dT} \right) \frac{1}{\rho C_P} \quad (4.2)$$

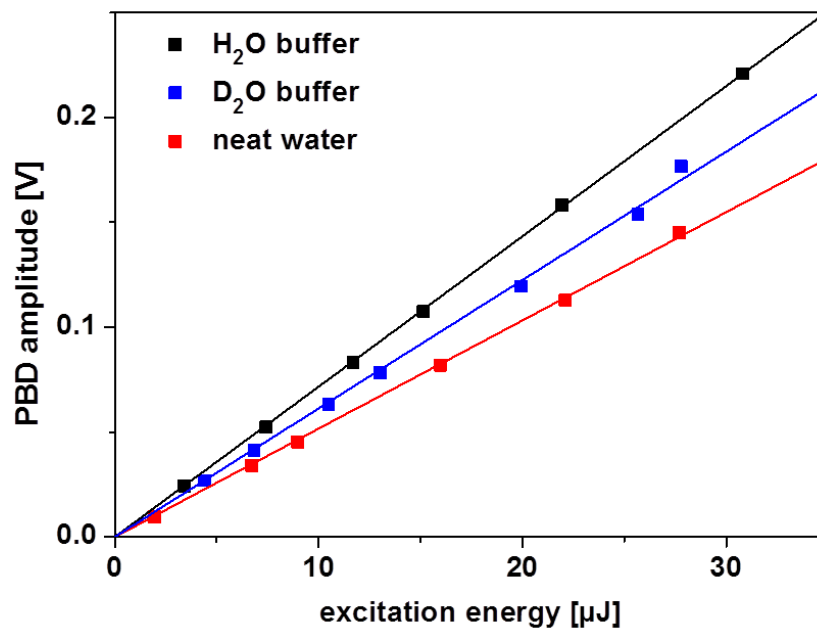
und seine Temperaturabhängigkeit ( $T$ ) in einer wässrigen Lösung kann mit einem Polynom zweiter Ordnung beschrieben werden (Vargaftik et al. 1996):

$$X_Q(T) = (\alpha + \beta T + \gamma T^2). \quad (4.3)$$

Die Parameter  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  wurden mithilfe einer kalorimetrischen Referenzprobe bestimmt (Abschnitt 4.2.1), die die gesamte absorbierte Anregungsenergie instantan (schnell im Vergleich zur Zeitauflösung des Experiments) thermisch deaktiviert. Die Wärmefreisetzung der idealen Referenzprobe ist also  $\Delta Q^{\text{Referenz}} = 100\%$  und  $\Delta N^{\text{Referenz}} = 0$ . In wässrigen Lösungen existiert eine Temperatur  $T_0$ , bei der der thermische Anteil und somit das PBD-Signal der kalorimetrischen Referenz verschwindet ( $X_Q(T_0) = 0$ ). Bei  $T_0$  gemessene PBD-Signale sind rein nicht-thermischen Ursprungs und  $\Delta N = X(T_0)$  kann direkt bestimmt werden (durch Extrapolation der Temperaturabhängigkeit der entsprechenden PBD-Amplitude). Durch Vergleich mit der Signalamplitude der Referenz ist es möglich, aus  $\Delta N$  nach Gleichung 4.4 eine scheinbare Volumenänderung  $\Delta V$  abzuleiten (Schulenberg et al. 1995):

$$\Delta V = \frac{\Delta N}{\Phi_0 \Phi_{\text{sat}} X^{\text{Referenz}}} \frac{dn}{dT} \frac{1}{C_P \rho} \frac{E_{\text{Ph}}}{\rho \frac{dn}{d\rho}} = \frac{\Delta N}{\Phi_0 \Phi_{\text{sat}} X^{\text{Referenz}}} 25 \text{ \AA}^3. \quad (4.4)$$

Das zweite Gleichheitszeichen in Gleichung 4.4 gilt für die Energie eines Photons der Wellenlänge 532 nm ( $E_{ph} = 2330$  meV) und die thermooptischen Eigenschaften von reinem Wasser:  $dn/dT = 9.1 \times 10^{-5} \text{ K}^{-1}$  (Bialkowski 1996);  $C_p = 2.6 \times 10^{25} \text{ meV kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ;  $\rho = 10^3 \text{ Kg m}^{-3}$ ;  $\rho dn/d\rho = 0.326$  (Eisenberg 1965).  $X^{\text{Referenz}}$  bezieht sich auf die PBD-Amplitude der kalorimetrischen Referenz bei 20 °C und das Produkt  $\Phi_0 \Phi_{\text{sat}}$  auf die Quantenausbeute (s.u.).



**Abbildung 4-2:** PBD-Signalamplituden eines Referenzfarbstoffs in verschiedenen Medien. Schwarze Symbole: Standardpuffer aus H<sub>2</sub>O; blaue Symbole: Standardpuffer aus D<sub>2</sub>O zubereitet; rote Symbole: reines Wasser. Die Amplituden sind für eine Temperatur von 20 °C gezeigt. Der pH-Wert der Puffer betrug pH 6,2 bzw. pD 6,2; der pH-Wert des reinen Wassers wurde durch Zugabe von verdünnter Salzsäure bzw. Natronlauge sorgfältig eingestellt. Die PBD-Amplituden sind auf die Absorption der Proben bei 532 nm normiert (OD 0,06). Die eingezeichneten Ausgleichsgeraden wurden zur Bestimmung des Proportionalitätsfaktors zwischen Signalamplitude und Energie des Anregungs-Laserpulses verwendet.

Für reines Wasser und andere Lösungsmittel sind optische Eigenschaften, die nach Gleichung 4.4 in die Umrechnung der nicht-thermischen PBD-Signalamplitude in eine Volumenänderung eingehen, wie etwa  $dn/dT$  oder  $dn/d\rho$ , tabelliert (s.o.). Die in dieser Arbeit für PBD-Experimente verwendete Pufferlösung enthielt jedoch verschiedene Salze in millimolarer Konzentration und 1M Glycin-Betain (siehe Anhang), was dazu führt, dass die in Gleichung 4.4 eingehenden Materialkonstanten sich deutlich von den tabellierten Werten von reinem Wasser unterscheiden können. Der Faktor  $(dn/dT \ 1/c_p\rho)$  kann durch Vergleich von PBD-Signalamplituden eines Referenzfarbstoffs in einem Medium, für das die entsprechenden Materialeigenschaften bekannt sind (reines Wasser), mit Amplituden, gemessen in der

Pufferlösung, bestimmt werden. Die Steigung der Ausgleichgeraden in Abbildung 4-2 beträgt  $7,17 \text{ V mJ}^{-1}$  für den Standardpuffer und  $5,16 \text{ V mJ}^{-1}$  für reines Wasser. Da das Referenzsignal rein thermischen Ursprungs ist ( $X^{\text{Referenz}} = X_Q$ ), ist nach Gleichung 4.2 das Verhältnis der Steigungen gleich dem Verhältnis der  $(dn/dT \ 1/c_p\rho)$ -Werte; es ergibt sich ein Faktor von  $1,4 \pm 0,1$  zwischen dem Standardpuffer und  $\text{H}_2\text{O}$ . Die größte Unsicherheit bei der Bestimmung dieses Faktors ergibt sich aus der Unsicherheit bei der Absorptionsbestimmung der Proben. Ein Fehler von  $\pm 0,1$  resultiert aus der Annahme, dass die Absorptionsbestimmungen mit einer relativen Genauigkeit von 5% erfolgten.

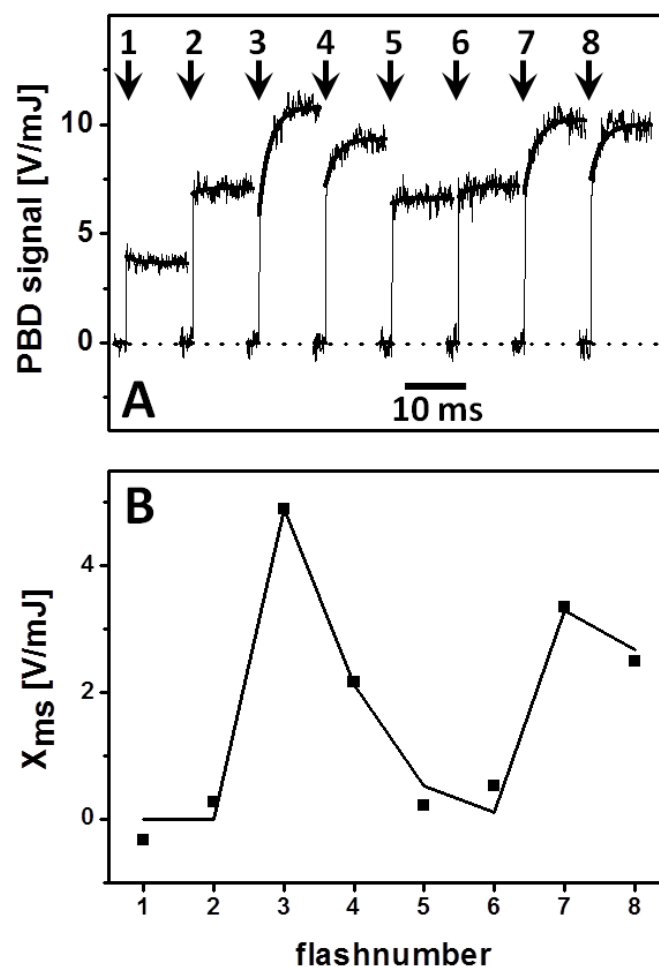
Bei der Berechnung von absoluten Volumenänderungen  $\Delta V$  nach Gleichung 4.4 könnte also eine Unterschätzung des  $\Delta V$ -Wertes um  $\sim 40\%$  möglich sein. Allerdings geht mit  $(\rho \ dn/d\rho)$  noch ein Faktor in die Volumenberechnung ein, der im Messpuffer einen anderen Wert annehmen wird als in reinem Wasser. Die Dichte  $\rho$  einer 1 molaren Glycin-Betain-Lösung unterscheidet sich um nur 2% von reinem Wasser (Shek und Chalikian 2011) und auch Salze in millimolaren Konzentrationen ändern die Dichte von Wasser nur um wenige Prozent (Cohen und Eisenberg 1968). Über die Auswirkungen der gelösten Stoffe auf die Ableitung des Brechungsindex nach der Dichte  $(dn/d\rho)$  kann mit PBD-Messungen an Referenzproben jedoch keine Aussage getroffen werden. Der Fehler bei der  $\Delta V$ -Berechnung (im Zusammenhang mit dem  $(dn/dT \ 1/C_p\rho)$ -Faktor) könnte (teilweise) kompensiert oder verstärkt werden. Eine Korrektur von Gleichung 4.4 soll daher an dieser Stelle nicht erfolgen.

In Abbildung 4-2 ist auch die Signalamplitude des Referenzfarbstoffs BCP in einem aus schwerem Wasser ( $\text{D}_2\text{O}$ ) hergestellten Messpuffer gezeigt. Der Vergleich der Ausgleichsgeraden ergibt, dass thermische PBD-Signale in  $\text{D}_2\text{O}$  um einen Faktor von  $\sim 1,2$  kleiner ausfallen, was auf Unterschiede des  $(dn/dT \ 1/C_p\rho)$ -Faktors in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  zurückzuführen ist.

Für die Quantenausbeute der lichtinduzierten Reaktionen  $\Phi_0$  konnte nur ein ungefährender Wert ermittelt werden. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 532 nm treten Verluste auf, bedingt durch die Anregung von Carotinoiden, welche die Energie nur teilweise an den primären Elektronendonator P680 übertragen. Auch die Löschung angeregter Zustände durch den künstlichen Elektronenakzeptor DCBQ trägt dazu bei, dass  $\Phi_0$  unter dem Maximalwert von 100% liegt. Einer groben Abschätzung nach liegt der Wert von  $\Phi_0$  zwischen 60% und 80%. Des Weiteren lag die Anregungsenergie in einem Bereich, die zu einer Teilsättigung der Photochemie führte (Krivanek et al. 2008). Diese resultierte in einem Wert von  $\Phi_{\text{sat}} = 70\%$

(wobei 100% der kompletten Abwesenheit von Sättigungseffekten entspricht). Die effektive Quantenausbeute ( $\Phi_{\text{eff}} = \Phi_0 \Phi_{\text{sat}}$ ) ergibt sich damit zu etwa 50%. Es bleibt zu betonen, dass die exakten numerischen Werte von  $\Phi_0 \Phi_{\text{sat}}$  und  $\Delta V$  für die weiteren Schlussfolgerungen unkritisch sind.

Der Anteil der als Wärme freigesetzten Energie ( $\Delta Q$ ) wurde bei PSII-Proben durch Simulation der Temperaturabhängigkeit der entsprechenden PBD-Amplitude nach Gleichung 4.1 gewonnen. Die Temperaturabhängigkeit des Faktors  $X_Q(T)$  ist dabei aus der Messung der Referenz bekannt und Anpassungsparameter sind  $\Delta Q$  und  $\Delta N$ .



**Abbildung 4-3:** Blitzabhängigkeit von PBD-Signalen in einer Serie von acht Laserblitzen. (A) PBD-Signalverläufe in einer Serie von Laserblitz-Anregungen (bei 20 °C). Die ansteigende Millisekunden-Phase weist eine gedämpfte Oszillation mit Periode vier auf und ist dem  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang zuzuordnen. Blitzabstand: 700 ms. (B) Amplitude der Millisekunden-Anstiegsphase ( $X_{\text{ms}}$ ) als Funktion der Anzahl von Laserpulsen, der die dunkeladaptierte PSII-Probe ausgesetzt war (Symbole). Die Linie repräsentiert eine Simulation, basierend auf dem Kok-Modell und den Parameterwerten: *miss*-Parameter = 10%, Anteil von  $Q_B$ -blockierten Zentren = 10% und Anteil von dunkeladaptierten PSII-Komplexen im  $S_0$ -Zustand = 5%. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).



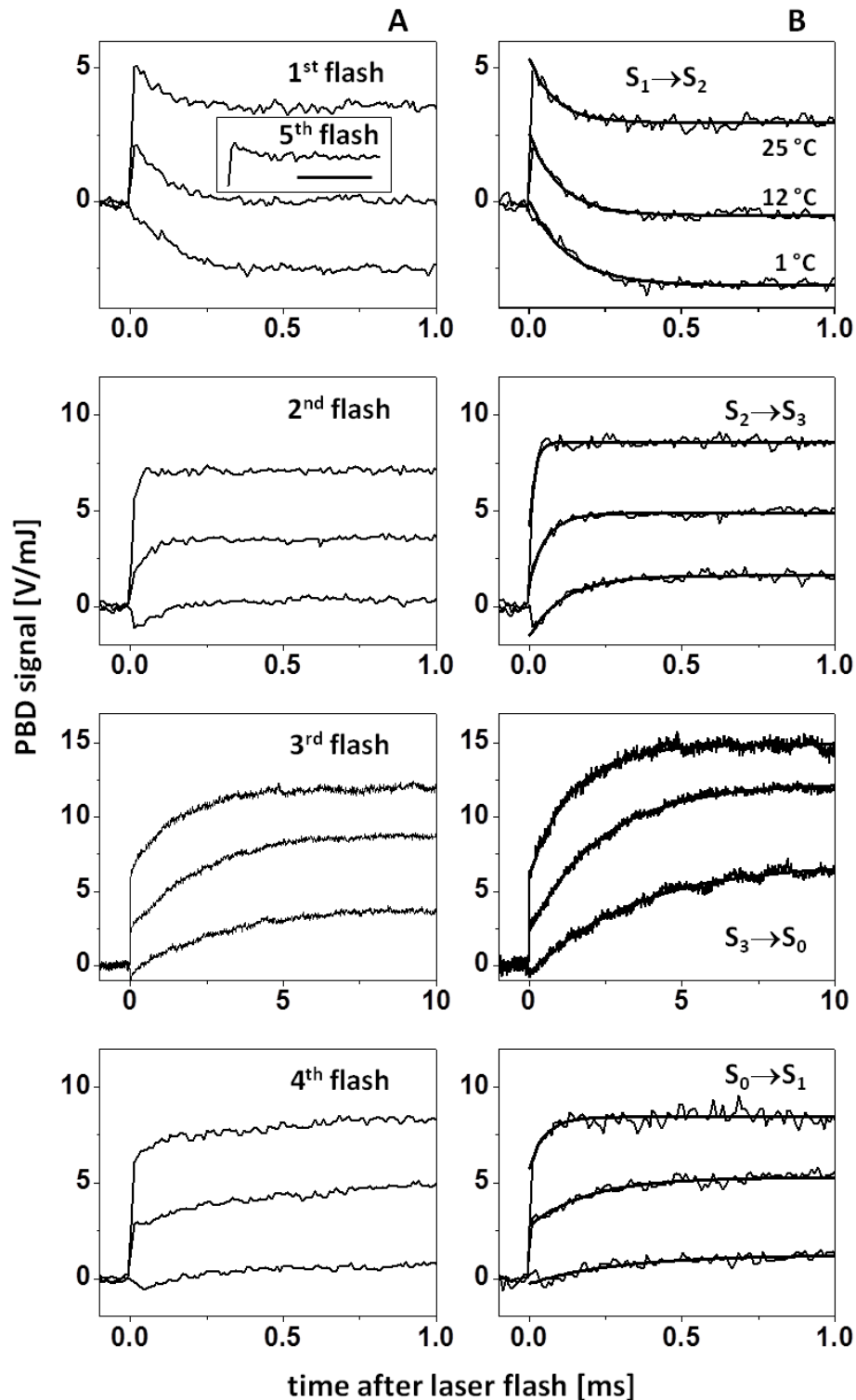
#### 4.1.4 Korrektur für die Desynchronisation von S-Zuständen

Drei Effekte, die bei einer Serie von Laserpulsen zu einer Durchmischung der S-Zustände in einer dunkeladaptierten PSII-Probe führen, wurden in der Korrektur der blitzinduzierten PBD-Signale nach dem Kok-Modell (Kok et al. 1970) berücksichtigt:

- (i) Sogenannte „misses“ resultieren daraus, dass die Quantenausbeute für die Anregung eines S-Zustandsübergangs bei Anwendung eines sättigenden Laserpulses kleiner als eins ist.
- (ii) Die Blockierung von höheren S-Zustandsübergängen in einem Teil der Photosysteme, denen das zweite Akzeptorchinon  $Q_B$  fehlt (Lazar 1999).
- (iii) Ein kleiner Anteil der PSII-Probe befindet sich nach Dunkeladaptation nicht im dunkelstabilen  $S_1$ -Zustand sondern im relativ langlebigen  $S_0$ -Zustand.

Zwei weitere Punkte, die in die Korrektur von UV-Zeitverläufen für die Vermischung von Signalen verschiedener S-Übergänge einfließen (Gerencser und Dau 2010), wurden hier vernachlässigt. So wurde eine Doppelanregung eines Photosystems, die zur Anregung von zwei S-Übergängen während eines Blitzes führt, durch die Verwendung von Nanosekunden-Blitzen ausgeschlossen. Ein wahrscheinlich geringer Einfluss eines Anteils von  $Q_B$ -blockierten Zentren im  $S_2$ -Zustand, der im Zeitintervall zwischen zwei Laserpulsen in den  $S_1$ -Zustand rekombiniert, wurde nicht berücksichtigt.

Die mathematischen Details der Korrektur sind im Anhang dargestellt. Der *miss*-Parameter  $m$  wurde über eine Simulation des Amplitudenmusters einer Serie von 8 Blitzen ermittelt (Abbildung 4-3). Die Amplitude des 1,6-ms-Anstiegs in PBD-Signalen, verursacht durch den  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang, zeigte eine Oszillation, die bei 20 °C am besten mit einem *miss*-Parameter von 10%, einem Anteil von  $Q_B$ -blockierten Zentren von 10% und einem Anteil von dunkeladaptierten PSII-Zentren im  $S_0$ -Zustand von 5% simuliert werden konnte. Ähnliche Werte sind für das gleiche Probenmaterial unter ähnlichen Bedingungen bestimmt worden (Grabolle und Dau 2005; Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010). Früher bestimmte Temperaturabhängigkeiten des *miss*-Parameters wurden berücksichtigt (Grabolle und Dau 2007).



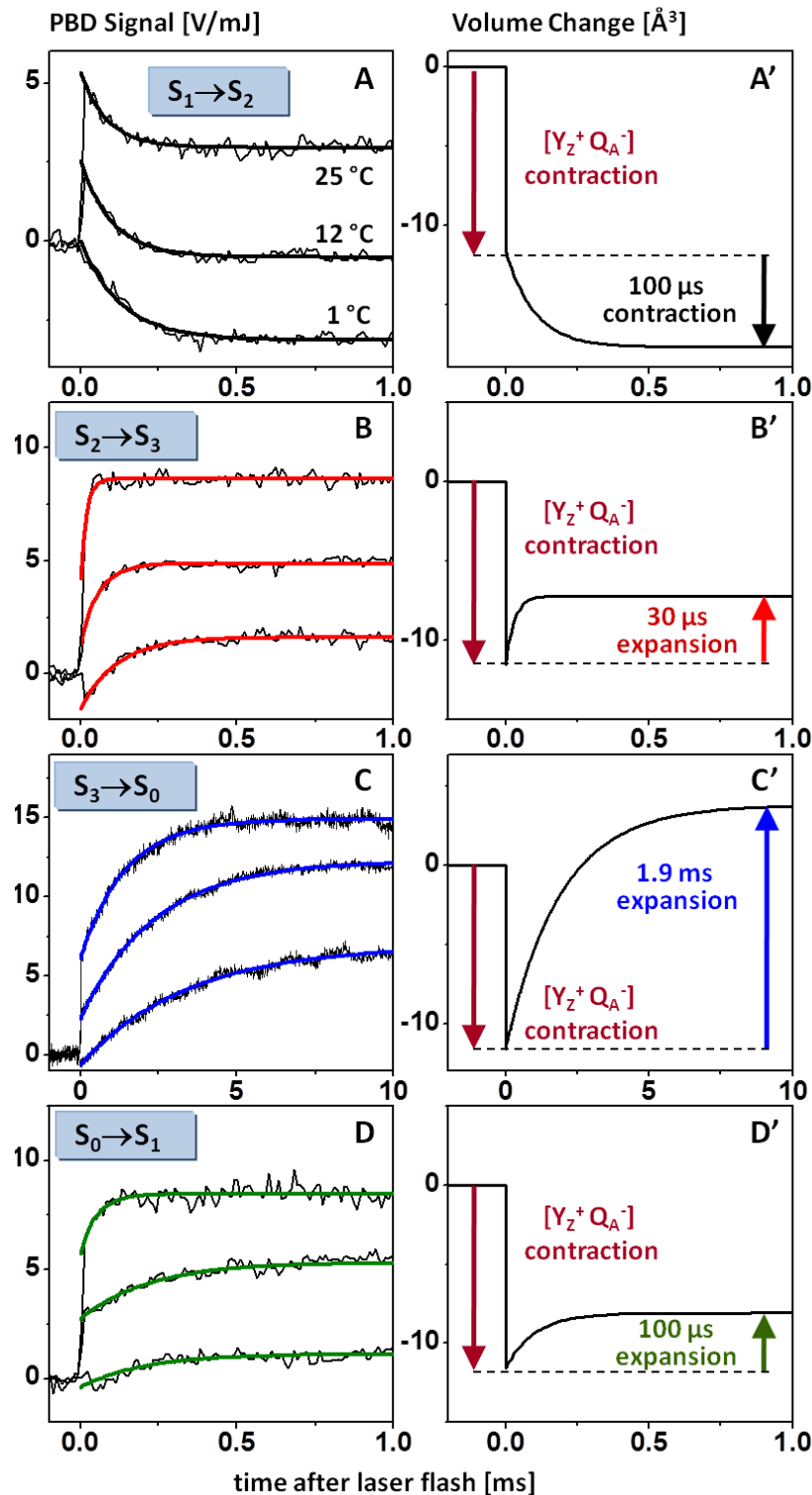
**Abbildung 4-4:** Vergleich von unkorrigierten (A) und korrigierten (B) PBD-Signalverläufen. (A) PBD-Signale ausgelöst durch Blitz 1, 2, 3 und 4 in dunkeladaptierten PSII-Membranpartikeln bei drei verschiedenen Messtemperaturen. Das „Inset“ zeigt das PBD-Signal ausgelöst durch den fünften Blitz bei 25 °C (die Länge des Balkens entspricht 250 μs). (B) PBD-Signale der Übergänge  $S_1 \rightarrow S_2$ ,  $S_2 \rightarrow S_3$ ,  $S_3 \rightarrow S_0$  und  $S_0 \rightarrow S_1$ , bestimmt aus den Signalen in A durch Korrektur für die Desynchronisation von S-Zuständen bei mehrfacher Blitzanregung; *miss*-Parameter: 11% bei 1 °C; 9% bei 12 °C und 11% bei 25 °C. Anteil  $Q_B$ -blockierter Zentren: 10%. Anteil von dunkeladaptierten PSII-Zentren im  $S_0$ -Zustand: 5%. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).

Die beschriebene Korrektur für die S-Zustandsvermischung in PSII-Proben basiert auf dem Kok-Modell und ist daher nur für solche Anteile der PBD-Signale gültig, die durch photochemische Reaktionen der Photosysteme verursacht werden. Alle kinetisch aufgelösten Phasen ( $\tau > 10 \mu\text{s}$ ) in den hier betrachteten PBD-Signalen haben offensichtlich einen solchen Ursprung, da der Anteil der absorbierten Anregungsenergie, der nicht photochemisch genutzt wird, sehr schnell in Wärme umgewandelt und abgegeben wird. Die überschüssige Energie eines absorbierten Photons, die vom Photosystem photochemisch nicht genutzt werden kann, trägt also zum prompten Signalsprung bei. Wie sich „misses“ auf die prompte Amplitude des PBD-Signals auswirken ist nicht ganz klar. Möglicherweise trägt ein Großteil der beteiligten Energie zum prompten Signalsprung bei. Ähnlich sieht es für  $Q_B$ -blockierte Photosysteme im  $S_2$ -Zustand aus. Dieser Ungewissheit wegen wurde die Korrektur für S-Zustandsvermischung nur für kinetische Phasen ( $> 10 \mu\text{s}$ ) im PBD-Signal durchgeführt. Die prompten Phasen wurden nicht korrigiert.

Die zentralen Schlussfolgerungen dieser Arbeit hängen nicht in kritischer Weise von den Details der Korrektur (wie etwa dem genauen Wert des *miss*-Parameters oder der Berücksichtigung von  $Q_B$ -blockierten Zentren) ab. Ein Vergleich von korrigierten und nicht korrigierten Signalverläufen ist in Abbildung 4-4 dargestellt.

## 4.2 Ergebnisse

Zeitverläufe, die für nicht perfektes Fortschreiten im S-Zustandszyklus korrigiert wurden, sind für jeden der vier Übergänge zwischen (semi-)stabilen S-Zuständen in Abbildung 4-5 dargestellt. Der instantane Signalsprung, der bei 25 °C nach allen Blitzen beobachtet wird, kann den schnellen, lichtinduzierten Prozessen zugeschrieben werden, die zur Reduktion des primären Akzeptorchinons ( $Q_A^-$ ) und zur Oxidation des Tyrosin-Donors ( $Y_Z^{\text{ox}(+)}$ ) führen (Rappaport und Diner 2008). Bei 12 °C fiel die Größe des instantanen Sprungs geringer aus als bei 25 °C und bei 1 °C war eher ein Zerfall zu beobachten (Abbildung 4-5 B). Dieses Verhalten resultiert aus den temperaturabhängigen thermischen ( $\Delta Q$ ) und temperaturunabhängigen nicht-thermischen ( $\Delta N$ ) Beiträgen zum PBD-Signal (Braslavsky und Heibel 1992; Falvey 1997; Gensch und Viappiani 2003), die mit der ( $Y_Z^+ Q_A^-$ )-Bildung einhergehen, wie im Folgenden ausgeführt wird.



**Abbildung 4-5:** Blitzinduzierte PBD-Signale und Volumenänderungen:  $S_1 \rightarrow S_2$  (A, A'),  $S_2 \rightarrow S_3$  (B, B'),  $S_3 \rightarrow S_0$  (C, C') und  $S_0 \rightarrow S_1$  (D, D'). Dünne Linien geben die experimentellen Daten wieder. Dicke Linien repräsentieren Simulationen, bestehend aus einer Stufenfunktion für den schnellen Sprung, der aus der  $Q_A^- Y_Z^+$ -Bildung resultiert, und einer einfachen Exponentialfunktion für langsamere Signalbeiträge. Die Graphen der rechten Spalte zeigen schematisch die Volumenänderungen, bestimmt aus der Analyse der Temperaturabhängigkeit von PBD-Signalen. Die gezeigten Zeitkonstanten geben den Wert bei 20 °C wieder (siehe Abbildung 4-8). Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).

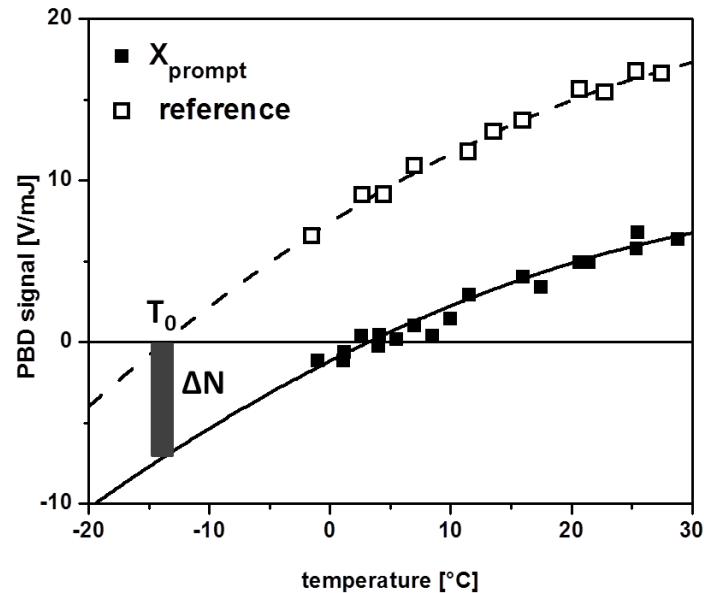
#### 4.2.1 Temperaturabhängigkeit des instantanen Signalsprungs

Die mittlere Amplitude des instantanen Signalanstiegs der Blitze 1 bis 4 ist in Abbildung 4-6 über der Temperatur aufgetragen (gefüllte Symbole). Vergleich mit der Temperaturabhängigkeit einer kalorimetrischen Referenz (offene Symbole) ermöglicht die Differenzierung zwischen thermischen und nicht-thermischen Beiträgen zum PBD-Signal. Als intrinsische Referenz wurde der Standard-PSII-Probe der Inhibitor DCMU (3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) ( $50 \mu\text{M}$ ) zugefügt und die Probe sättigendem Hintergrundlicht von einer grünen Leuchtdiode (LED) ausgesetzt. Unter diesen Bedingungen bleibt  $Q_A^-$  dauerhaft reduziert. Eine langlebige Ladungstrennung als Folge von Lichtabsorption ist in solchen „ $Q_A^-$ -geschlossenen“ Photosystemen nicht mehr möglich und absorbierte Anregungsenergie wird innerhalb einer Mikrosekunde größtenteils als Wärme abgegeben (Giorgi et al. 1996). Die Anforderungen an eine kalorimetrische Referenz, die die gesamte absorbierte Energie instantan in Wärme umwandeln soll, sind also erfüllt, wenn man Fluoreszenzverluste vernachlässigt.

Die offenen Symbole in Abbildung 4-6 stellen die skalierte prompte Amplitude der intrinsischen Referenz dar. Dieser Datensatz wurde zur Bestimmung des Verhältnisses der Parameter  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  durch Kurvenanpassung der Temperaturabhängigkeit mit einem Polynom zweiter Ordnung verwendet (Gleichung 4.3). Für die Temperatur  $T_0$ , bei der der thermische Anteil des PBD-Signals verschwindet (d.h. das Signal der Referenz verschwindet), wurde so ein Wert von  $-14 \text{ }^\circ\text{C}$  bestimmt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit früheren Kalkulationen (Krivanek et al. 2008). Die prompte negative Amplitude von PSII-Membranpartikeln bei  $T_0$ , die in Abbildung 4-6 als grauer Balken angedeutet ist, gibt direkt den nicht-thermischen Beitrag zum PBD-Signal an. Dieser kann als Kontraktion, ausgelöst durch die Bildung des ladungstrennten Zustands ( $Y_Z^+Q_A^-$ ), interpretiert werden.

In einer vorausgehenden Untersuchung wurde eine anspruchsvollere kalorimetrische Referenz, bestehend aus einer Mischung von PSII-Membranpartikeln und dem Farbstoff BCP, eingesetzt, um die Wärmefreisetzung  $\Delta Q$  zu bestimmen. Für eine Anregungsenergie von  $5 \mu\text{J}$  wurde im Zusammenhang mit der ( $Y_Z^+Q_A^-$ )-Bildung ein Wert von 76,4% gefunden (Krivanek et al. 2008). Mit Bezug auf diese Ergebnisse und unter Verwendung der Gleichung 4.1 mit  $\Delta N = 0$  wurden die absoluten Werte  $\alpha = 7,3899$ ,  $\beta = 0,4799 \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$  und  $\gamma = -0,0048 \text{ }^\circ\text{C}^{-2}$  unter der Annahme bestimmt, dass  $\Delta Q$  bei der Simulation der prompten PSII-Amplitude einen Wert von 80% und bei der intrinsischen Referenz einen Wert von 100% hat. Entsprechende

Simulationen sind in Abbildung 4-6 durch Linien (durchgezogen bzw. gestrichelt) repräsentiert. Die Simulationen der Temperaturabhängigkeit von PBD-Signalen der vier S-Zustandsübergänge (Abbildung 4-7) zur Bestimmung von Werten für  $\Delta Q$  und  $\Delta N$  erfolgten mit identischen Werten von  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Aus dem nicht-thermischen Anteil von PBD-Amplituden  $\Delta N$  wurden Volumenänderungen  $\Delta V$  nach Gleichung 4.4 berechnet.



**Abbildung 4-6:** Temperaturabhängigkeit des prompten Signalsprungs in PBD-Signalen von PSII-Proben und einer intrinsischen kalorimetrischen Referenz. Gefüllte Symbole geben die mittlere prompte Amplitude des instantanen Signalsprungs ( $X_{\text{prompt}}$ ) nach den Blitzen 1-4 wieder. Bestimmt wurde  $X_{\text{prompt}}$  durch Simulationen der entsprechenden Zeitverläufe (siehe Abbildung 4-5). Offene Symbole: PBD-Amplitude von  $Q_A^-$ -blockierten PSII-Membranpartikeln als intrinsische Referenz (siehe Haupttext). Linien geben Simulationen unter Verwendung von Polynomen zweiter Ordnung wieder. Der graue Balken deutet die Temperatur  $T_0$  an, bei der die Signalamplitude der Referenz verschwindet. Die Höhe der negativen prompten Amplitude der PSII-Probe bei  $T_0$  entspricht dem nicht-thermischen PBD-Signalbeitrag  $\Delta N$ . Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).

Für die Bildung des ladungsseparierten Zustands  $Y_Z^{\text{ox}(+)}Q_A^-$  ergab sich durch die Auswertung der Temperaturabhängigkeit der prompten PBD-Phase eine scheinbare Kontraktion von  $-12 \text{ \AA}^3$ , was in vernünftiger Übereinstimmung mit früheren Abschätzungen ist (Hou *et al.* 2001; Krivanek *et al.* 2008). Ein möglicher Beitrag zu PBD-Signalen, in Verbindung mit Interchinon-Elektronentransfer an der Akzeptorseite des PSII, wird weiter unten diskutiert (Abschnitt 4.2.6). Die hier präsentierten Volumenänderungen wurden nicht für die effektive Quantenausbeute  $\Phi_{\text{eff}}$  der lichtinduzierten Prozesse korrigiert. Diese könnte bei Anregung mit grünem Licht (532 nm) bei nur  $\sim 50\%$  liegen (siehe Abschnitt 4.1.3), was bedeutet, dass die

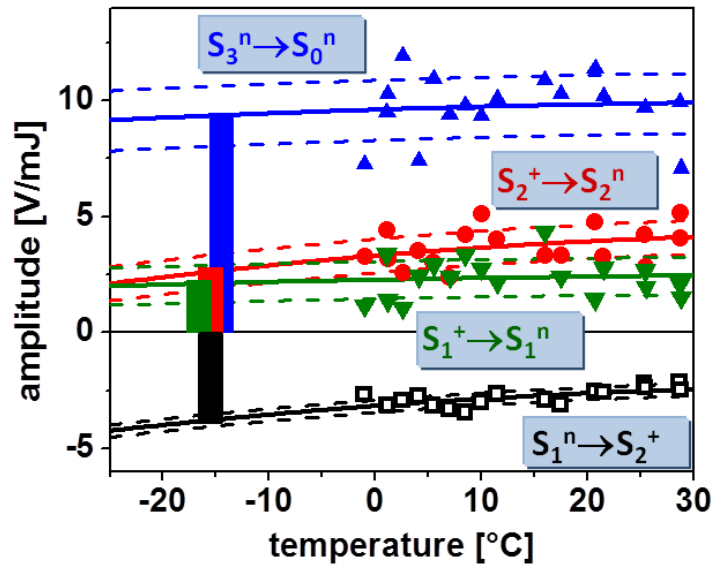
Volumenänderung pro Reaktionszentrum doppelt so groß sein könnte wie die hier angegebenen Werte.

#### 4.2.2 $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang (Blitz 1)

Im PBD-Signal des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs folgte auf den instantanen  $Y_Z^{\text{ox}(+)} Q_A^-$ -Anstieg ( $< 10 \mu\text{s}$ ) ein exponentieller Zerfall mit einer Zeitkonstante von etwa  $100 \mu\text{s}$  bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (siehe Abbildung 4-5A, Abbildung 4-8 und Tabelle 4-1). Die Amplitude dieser Zerfallsphase hing im untersuchten Bereich nur wenig von der Temperatur ab (Abbildung 4-7), was darauf hindeutet, dass sie hauptsächlich von einer Volumenänderung ( $\Delta V$ ) der PSII-Probe herrührt. Die negative Amplitude bzw. Abnahme des PBD-Signals weist auf eine Kontraktion hin. Eine leichte Temperaturabhängigkeit der Signalgröße lässt auf einen kleinen thermischen Beitrag zum Signal durch Wärmefreisetzung (positiver Wert von  $\Delta Q$ ) schließen (siehe Tabelle 4-1). Der Zerfall verlangsamte sich bei abnehmender Temperatur nur wenig und die Arrhenius-Darstellung der Ratenkonstante (Abbildung 4-8) ergab eine kleine Aktivierungsenergie (Tabelle 4-2). Aus PBD-Zeitverläufen, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$  (siehe Abbildung 4-9), wurde ein niedriger kinetischer Isotopen-Effekt (KIE) von 1,3 bestimmt. Der KIE gibt das Verhältnis der Zeitkonstanten an, die in  $\text{D}_2\text{O}$  und  $\text{H}_2\text{O}$  gefunden werden;  $\text{KIE} = \tau_{\text{D}_2\text{O}}/\tau_{\text{H}_2\text{O}} = k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$ . Die Werte der Zeitkonstante, der Aktivierungsenergie und des KIE stimmen gut mit entsprechenden Werten überein, die für den ET vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}(+)}$  im  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang bestimmt wurden (Haumann et al. 1997; Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010).

**Tabelle 4-1:** Zeitkonstanten ( $\tau$  bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), Volumenänderungen ( $\Delta V$ ) und Wärmefreisetzung ( $\Delta Q$ ) von vier in PBD-Messungen aufgelösten Übergängen. Die angegebenen Parameter wurden aus den in Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8 gezeigten Daten bestimmt. Die Fehlerangaben beziehen sich auf die  $1\sigma$ -Unsicherheit der Simulationsergebnisse. Volumenänderungen wurden nach Gleichung 4.4 berechnet. Negative und positive Vorzeichen stehen bei Volumenänderungen für Kontraktionen bzw. Expansionen. Die Werte für  $\Delta V$  und  $\Delta Q$  sind für einen einzelnen PSII-Komplex bei Absorption eines Lichtquants berechnet (ohne Korrektur für eine Quantenausbeute kleiner als 1). Tabelle adaptiert aus Klauss *et al.* (2012a).

Blitz Nr.	Übergang	$\tau [\mu\text{s}]$	$\Delta V [\text{Å}^3]$	$\Delta Q [\text{meV}]$
1	$S_1^n \rightarrow S_2^+$	$98 \pm 3$	$-6.1 \pm 0.4$	$160 \pm 50$
2	$S_2^+ \rightarrow S_2^n$	$29 \pm 2$	$+4.4 \pm 1.1$	$190 \pm 120$
3	$S_3 \rightarrow S_0$	$1960 \pm 90$	$+15.2 \pm 2.5$	$60 \pm 250$
4	$S_1^+ \rightarrow S_1^n$	$94 \pm 8$	$+3.5 \pm 1.3$	$40 \pm 140$

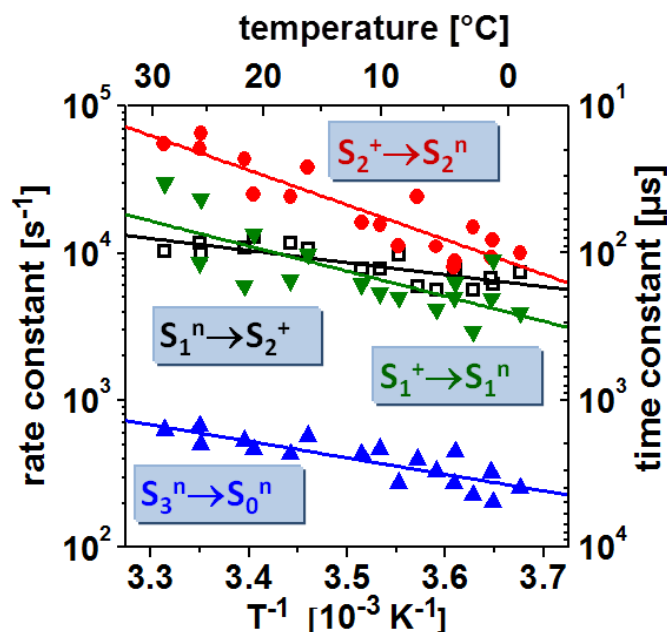


**Abbildung 4-7:** Temperaturabhängigkeit der PBD-Amplituden der vier aufgelösten Übergänge. Die Amplituden wurden über Kurvenanpassung mit Exponentialfunktionen bestimmt. Symbole repräsentieren die experimentellen Daten, Linien jeweils eine Simulation unter Verwendung eines Polynoms zweiter Ordnung (siehe Abschnitt 4.1.3). Gepunktete Linien zeigen den  $1\sigma$ -Fehlerbereich der angepassten Kurve an. Die Balken geben den nicht-thermischen Anteil des PBD-Signals (Volumenänderung  $\Delta V$ ) wieder, der bei der Temperatur  $T_0 = -14$  °C abgelesen werden kann. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).

#### 4.2.3 $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang (Blitz 2)

Im PBD-Signal des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs folgte auf den instantanen  $Y_Z^{\text{ox}(+)}$  $Q_A^-$ -Anstieg eine exponentiell ansteigende Phase mit einer Zeitkonstante von etwa  $30 \mu\text{s}$  bei  $20$  °C (Abbildung 4-5B, Abbildung 4-8 und Tabelle 4-1). Dieser Anstieg war ungefähr zehnmal schneller als der ET von dem Mn-Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  ( $30 \mu\text{s}$  gegenüber  $300 \mu\text{s}$ ) und kann daher einem Prozess zugeordnet werden, der dem ET-Schritt vorausgeht. Die annähernd temperaturunabhängige Signalamplitude (Abbildung 4-7) zeigt an, dass die ansteigende Phase größtenteils von einer Volumenexpansion herrührt (Tabelle 4-1). Eine bemerkenswerte Besonderheit dieses schnellen Anstiegs war sein großer KIE von 5,6 (Abbildung 4-9), der eine Zuordnung zu einem Prozess ermöglicht, der Protonenbewegungen beinhaltet. Bei allen untersuchten Temperaturen und auch in  $\text{D}_2\text{O}$  ging die scheinbare Expansion dem  $\text{Mn}_4\text{Ca} \rightarrow Y_Z^{\text{ox}}$ -ET voraus (Tabelle 4-2). Es liegt daher der Schluss nahe, dass in dem klassischen  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang eine Protonenumlagerung dem ET vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  vorausgeht.





**Abbildung 4-8:** Arrhenius-Diagramm der Ratenkonstanten der vier aufgelösten Übergänge. Linke Achse: Ratenkonstante  $k = \tau^{-1}$ ; rechte Achse: Zeitkonstante  $\tau$ . Die Symbole stellen die experimentell bestimmten Werte dar, die Linien die Anpassungskurven, die für die Bestimmung der entsprechenden Aktivierungsenergien verwendet wurden. Die Werte der Aktivierungsenergien sind in Tabelle 4-2 aufgeführt. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).

#### 4.2.4 $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang (Blitz 3)

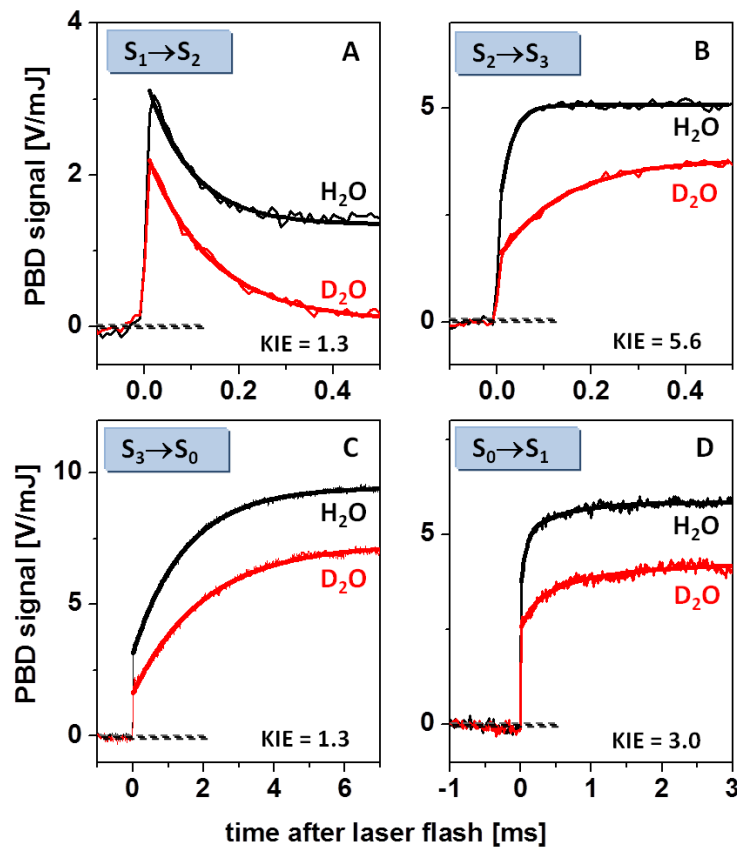
Im PBD-Signal des  $S_3 \rightarrow S_0 + O_2$ -Übergangs war ein prominenter Millisekunden-Anstieg mit einer Zeitkonstante von  $\sim 2$  ms (bei 20 °C) zu sehen. Dieser resultierte hauptsächlich aus einer Volumenausdehnung von etwa  $15 \text{ \AA}^3$  (Abbildung 4-5 und Abbildung 4-7). Die moderate Aktivierungsenergie und der niedrige KIE der Millisekunden-Phase (Abbildung 4-8, Abbildung 4-9) fielen ähnlich wie die entsprechenden Werte des ET-Schritts ( $S_3 \rightarrow S_4$ ) und der damit einhergehenden Sauerstoffbildung ( $S_4 \rightarrow S_0 + O_2$ ) aus (Haumann *et al.* 1997; Karge *et al.* 1997; Buchta *et al.* 2007; Gerencser und Dau 2010).

Bei zeitaufgelösten Untersuchungen des Oxidationszustands des Mn-Komplexes mittels Röntgenspektroskopie und Absorptionsmessungen im nahen UV-Bereich wurde eine scheinbare Verzögerungsphase mit einer Dauer von etwa 200  $\mu\text{s}$  gefunden, die dem Millisekunden-Anstieg der Sauerstoffbildung vorausgeht (Rappaport *et al.* 1994; Haumann *et al.* 1997; Haumann *et al.* 2005a; Gerencser und Dau 2010). Eine ähnliche Verzögerungsphase war in den PBD-Zeitverläufen nicht auszumachen. Stattdessen konnte eine ansteigende Phase mit ähnlicher Zeitkonstante wie die zuvor beobachtete Verzögerungsphase bei der Simulation

von aufsummierten PBD-Zeitverläufen aufgespürt werden (Abbildung 4-10). So zeigte sich bei dem durch massive Mittelung von PBD-Signalen erreichten Signal-zu-Rausch-Verhältnis in Abbildung 4-10 eine Abweichung der monoexponentiellen Simulation von den experimentellen Daten im Zeitbereich  $< 0,5$  ms. Dem zeitlichen Verlauf der Residuen konnte in einer exponentiellen Simulation eine Zerfallszeit von  $360 \mu\text{s}$  (Amplitude:  $0,45 \text{ V/mJ}$ ) zugeordnet werden. Bessere Übereinstimmung ergab eine Simulation des Millisekunden-Anstiegs mit der Summe aus zwei Exponentialfunktionen ( $\tau_1 = 430 \mu\text{s}$ ,  $\tau_2 = 2,3 \text{ ms}$ ,  $A_1 = 0,95 \text{ V/mJ}$ ,  $A_2 = 8,87 \text{ V/mJ}$ ). Für eine Analyse der Temperaturabhängigkeit und eine quantitative Bestimmung der Wärmefreisetzung ( $\Delta Q$ ) und der Volumenänderung ( $\Delta V$ ) war diese schnelle, vorgelagerte Phase jedoch nicht genügend gut aufgelöst. An dieser Stelle sind Schlussfolgerungen daher auf die Aussage beschränkt, dass die PBD-Daten mit einer Volumenexpansion in Zusammenhang mit einer Protonenfreisetzung ( $S_3^+ \rightarrow S_3^n$ -Übergang) verträglich sind.

**Tabelle 4-2:** Kinetische Parameter des Elektronentransfers (ET,  $e^-$ ) und des ratenlimitierenden Protonentransfers (PT,  $H^+$ ) im Reaktionszyklus der PSII-Wasseroxidation ( $\sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Die Aktivierungsenergien wurden aus der Temperaturabhängigkeit der Ratenkonstanten abgeleitet (Abbildung 4-8). Die Parameter wurden zum großen Teil für pflanzliche PSII-Proben bestimmt: <sup>a</sup>PBD-Ergebnisse dieser Arbeit, <sup>b</sup>(Gerencser und Dau 2010), <sup>c</sup>(Haumann et al. 2005a), <sup>d</sup>(Haumann et al. 1997), <sup>e</sup>(Renger und Hanssum 1992), <sup>f</sup>(Buchta et al. 2007), <sup>g</sup>(Dekker et al. 1984a), <sup>h</sup>(Zaharieva et al. 2012) und für thermophile Cyanobakterien in (Rappaport et al. 2011). Tabelle adaptiert aus Klauss *et al.* (2012a).

S-State Transition		ET/PT	$\tau$ [ $\mu\text{s}$ ]	$E_a$ [meV]	$k_H/k_D$
$S_1 \rightarrow S_2$	$S_1^n \rightarrow S_2^+$	$e^-$	$100^{a,(b,c,d)}$	$160 \pm 30^{a,(d,e)}$	$1.3^a, (1.2^b)$
$S_2$	$S_2^+ \rightarrow S_2^n$	$H^+$	$30^a$	$470 \pm 50^a$	$5.6^a$
$\rightarrow S_3$	$S_2^n \rightarrow S_3^+$	$e^-$	$300^{b-e}$	$\sim 360^{d,e}$	$1.7^b$
$S_3$	$S_3^+ \rightarrow S_3^n$	$H^+$	$200^{b,c}$	$180^h$	$2.4^b$
	$S_3^n \rightarrow S_0^+$	$e^-$	$\sim 1700^{b-h}$	$230 \pm 40^{a,(e,f)}$	$1.3^a, (1.2^b)$
$\rightarrow S_0 + O_2$	$S_0^+ \rightarrow S_0^n$	$H^+$	—	—	—
$S_0$	$S_0^n \rightarrow S_1^+$	$e^-$	$40^{c,g}$	$50^e$	$1.3^d$
$\rightarrow S_1$	$S_1^+ \rightarrow S_1^n$	$H^+$	$100^a$	$340 \pm 75^a$	$3.0^a$



**Abbildung 4-9:** Vergleich von PBD-Signalen der vier S-Zustandsübergänge, gemessen für PSII-Membranpartikel in  $\text{H}_2\text{O}$  (schwarz) und  $\text{D}_2\text{O}$  (rot) bei  $20^\circ\text{C}$ . Dünne Linien stellen die experimentellen Daten dar. Dicke Linien repräsentieren Simulationen mit einfachen Exponentialfunktionen plus einer Stufenfunktion. Nur der Signalverlauf des  $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$ -Übergangs wurde mit einer Summe aus zwei Exponentialfunktionen und einer Stufenfunktion simuliert. Das jeweilige Verhältnis der Ratenkonstanten ist angegeben ( $\text{KIE} = k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$ ). Die PBD-Amplituden unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen thermoelastischen Eigenschaften von  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$ . Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).

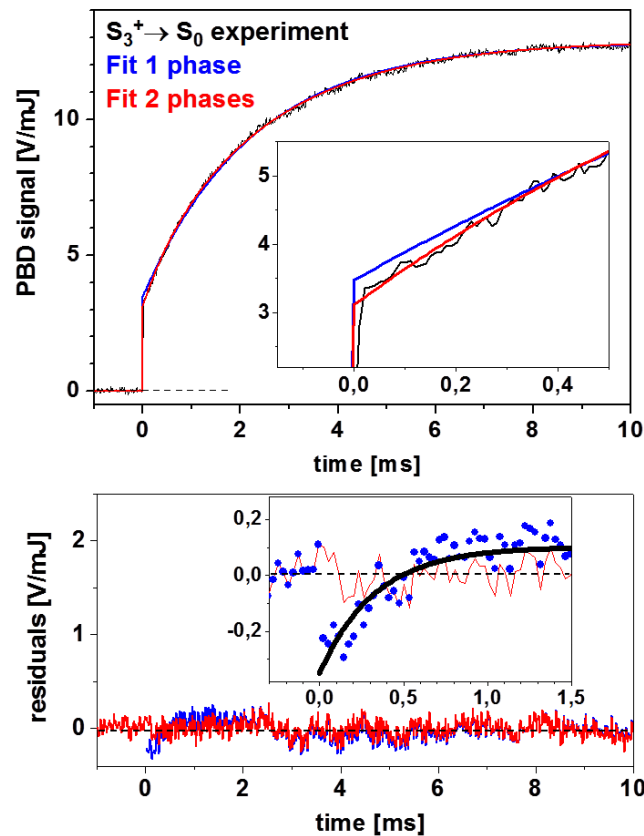
Der Gesamtbetrag der Expansion während des  $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$ -Übergangs könnte durch drei additive Beiträge erklärt werden. Die drei Prozesse, die im  $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$ -Übergang der  $\text{Y}_Z^{\text{ox}}$ -Bildung folgen und die vermutlich eine Expansion bewirken, sind:

- (i) Die Entfernung eines Protons vom Mn-Komplex ( $\text{S}_3^+ \rightarrow \text{S}_3^{\text{n}}$ -Übergang in Abbildung 1-5) innerhalb von etwa  $200 \mu\text{s}$  (bei Zimmertemperatur). In Analogie zu dem PT-Schritt des  $\text{S}_2^+ \rightarrow \text{S}_2^{\text{n}}$ -Übergangs könnte diese Ladungsneutralisierung an der PSII-Donorseite zu einer Expansion führen.
- (ii) Der ratenlimitierende ET von dem Mn-Komplex zu  $\text{Y}_Z^{\text{ox}}$  ( $\text{S}_3^{\text{n}} \rightarrow \text{S}_0^+$ ,  $\tau \sim 2\text{ms}$ ) ist mit der Reduktion von Mn und der Bildung des  $\text{O}_2$ -Moleküls verbunden und

beinhaltet somit die Umkehrung der Kontraktion, die mit vorheriger Mn-Oxidation verbunden war.

- (iii) Ein zweites Proton wird direkt vor oder nach der Sauerstoffbildung vom Mn-Komplex entfernt ( $S_0^+ \rightarrow S_0^n$  in Abbildung 1-5), was vermutlich auch mit einer Volumenausdehnung verbunden ist.

In den PBD-Signalen des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs sind die drei genannten Beiträge nicht als getrennte Prozesse aufgelöst. Ob die Bildung des  $O_2$ -Moleküls und dessen Freisetzung auch zu der experimentell bestimmten Volumenänderung beitragen, bleibt eine offene Frage.



**Abbildung 4-10:** PBD-Zeitverläufe des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs und Simulationen. Oben: PBD-Signal bei einer mittleren Temperatur von  $\sim 14$  °C. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurde der Mittelwert von Signalen in einem Temperaturbereich von  $1-25$  °C gebildet. Die blaue Linie repräsentiert eine monoexponentielle Simulation, die rote Linie eine doppel-exponentielle. Das „Inset“ zeigt die erste halbe Millisekunde auf einer vergrößerten Zeitskala. Unten: Darstellung der Residuen der oben gezeigten Daten. Im „Inset“ sind die Daten auf einer vergrößerten Zeitskala und bei einer Auflösung von  $30 \mu\text{s}$  pro Datenpunkt dargestellt. Zusätzlich ist als schwarze Linie eine exponentielle Simulation der Residuen der monoexponentiellen Simulation der Daten oben eingezeichnet. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).

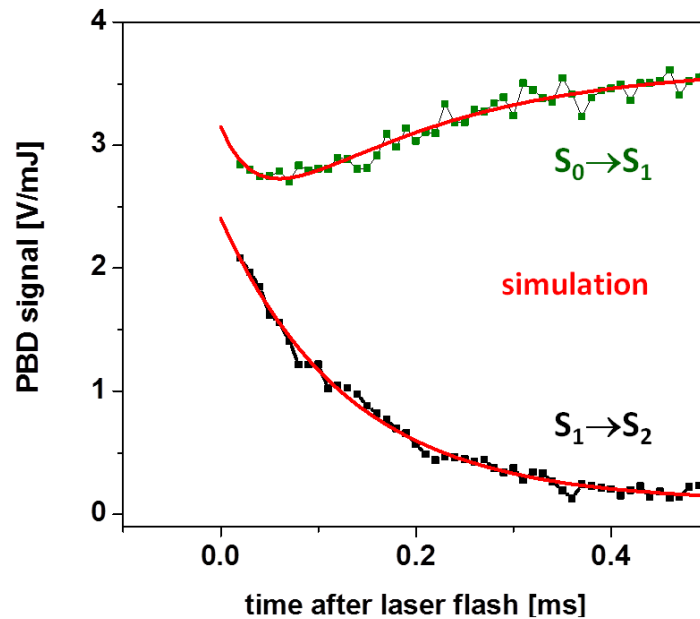
#### 4.2.5 $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang (Blitz 4)

Im PBD-Signal des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs folgte auf den instantanen  $Y_Z^{\text{ox}(+)}$  $Q_A^-$ -Anstieg eine exponentiell ansteigende Phase mit einer Zeitkonstante von etwa 100  $\mu\text{s}$  bei 20 °C (Abbildung 4-5 D). Die Amplitude des Signalanstiegs zeigte keine starke Temperaturabhängigkeit, was auf eine Volumenausdehnung, ähnlich dem Signalanstieg des  $S_2^+ \rightarrow S_2^n$ -Übergangs, hindeutet (Abbildung 4-7). Auch weitere Parameter dieser Anstiegsphase im  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang zeigten Ähnlichkeiten (zu Parametern der  $S_2^+ \rightarrow S_2^n$ -Anstiegsphase), wie etwa die hohe Aktivierungsenergie und der hohe KIE von  $\sim 3$  (Tabelle 4-2). Mit einer Zeitkonstante von 100  $\mu\text{s}$  war der Signalanstieg langsamer als der ET vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  ( $\sim 40 \mu\text{s}$  in (Dekker et al. 1984a; Haumann et al. 2005a))(Tabelle 4-1), was impliziert, dass der zugrundeliegende Prozess nach dem  $S_0^n \rightarrow S_1^+$ -ET-Schritt stattfindet.

Es ist festzuhalten, dass in der Literatur verschiedene Werte für die Zeitkonstante des ETs im  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang in einem Bereich von 40  $\mu\text{s}$  bis 300  $\mu\text{s}$  (bei 20 °C) zu finden sind (Dekker et al. 1984a; Renger und Hanssum 1992; Rappaport et al. 1994; Haumann et al. 1997; Razeghifard und Pace 1997). Für die hier verwendeten PSII-Proben wurde ein Wert von 40  $\mu\text{s}$  bestimmt (Haumann et al. 2005a), was nahelegt, dass der ET-Schritt im  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang schneller ist als der Schritt der Protonenentfernung. Dies ist demnach bereits bei Raumtemperatur der Fall, aber noch ausgeprägter bei niedrigen Temperaturen und in  $\text{D}_2\text{O}$  (Renger und Hanssum 1992; Haumann et al. 1997). Abschließend lässt sich die Volumenexpansion, die im klassischen  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang gefunden wurde, einem Protonentransfer ( $S_0^+ \rightarrow S_0^n$ -Übergang in Abbildung 1-5) zuordnen, der nach der Oxidation des Mn-Komplexes durch ET zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  stattfindet.

Eine schnelle Zerfallsphase im Signal des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs deutete sich bei Messungen in  $\text{D}_2\text{O}$  an (Abbildung 4-11 grüne Symbole). Dieser Signalzerfall kann in guter Näherung mit einer Zeitkonstante von 40  $\mu\text{s}$  simuliert werden (rote Linie). Bei tiefen Temperaturen gab es auch in  $\text{H}_2\text{O}$  Anzeichen für eine schnelle Zerfallsphase im PBD-Signal des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs (Abbildung 4-5D). Dieser Beitrag war jedoch sehr klein, hob sich vom Untergrundrauschen kaum ab und ist daher unsicher. Der ähnlichen Zeitkonstante von 40  $\mu\text{s}$  wegen könnte man die Zerfallsphase mit dem ET vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  im  $S_0^n \rightarrow S_1^+$ -Übergang in Verbindung bringen. Die Volumenkontraktion, die sich andeutet, ist deutlich kleiner als die Kontraktion, die für den ET des  $S_1^n \rightarrow S_1^+$ -Übergangs beobachtet wird. In  $\text{H}_2\text{O}$  waren bei Raumtemperatur

keine Anzeichen für eine solche schnelle Zerfallsphase auszumachen. Dies liegt vermutlich daran, dass der schnelle Zerfall kinetisch nicht gut von dem dominierenden Signalanstieg getrennt ist. Ein schneller Zerfall kann als weiterer Beleg dafür gewertet werden, dass der PT des  $S_1^+ \rightarrow S_1^n$ -Übergangs ( $\tau_2 = 186 \mu\text{s}$ ) nach dem ET ( $\tau_1 = 40 \mu\text{s}$ ) vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  im  $S_0^n \rightarrow S_1^+$ -Übergang stattfindet.



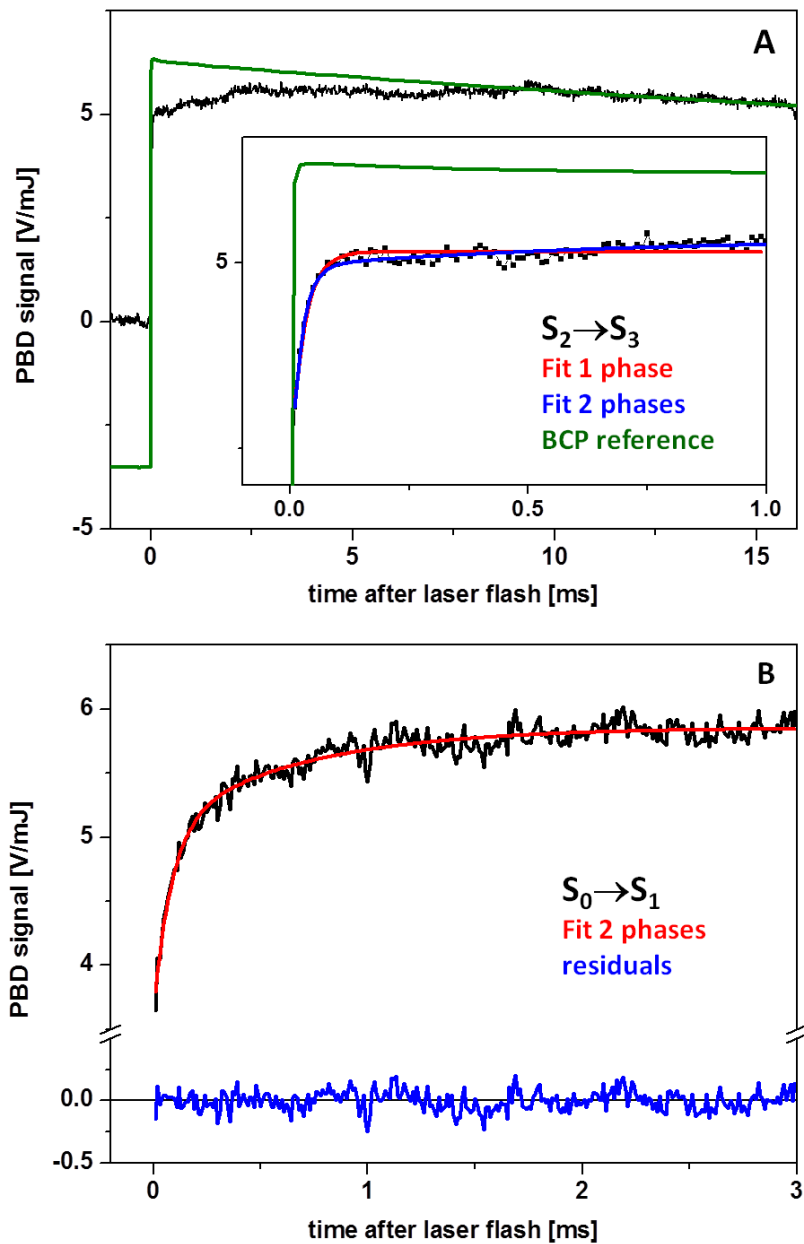
**Abbildung 4-11:** PBD-Signale des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs (schwarz) und des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs (grün) in  $D_2O$  (bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Rote Linien repräsentieren Simulationen mit einer einfachen Exponentialfunktion plus Konstante für den  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang ( $a = -2,30 \text{ V/mJ}$ ;  $\tau = 131 \mu\text{s}$ ) und einer Summe zweier Exponentialfunktionen ( $a_1 = -1,12 \text{ V/mJ}$ ;  $a_2 = 1,61 \text{ V/mJ}$ ;  $\tau_1 = 40 \mu\text{s}$ ,  $\tau_2 = 186 \mu\text{s}$ ) plus einer Konstanten für den  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).

#### 4.2.6 Akzeptorseiten-Beiträge zu PBD-Signalen

Ein möglicher Beitrag zu PBD-Signalen im Zusammenhang mit dem Interchinon-ET an der PSII-Akzeptorseite deutete sich in den Daten des H/D-Isotopenaustausch-Experiments bei den PBD-Signalen des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs und des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs an. In Abbildung 4-12A ist der PBD-Zeitverlauf des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs (schwarz) im Vergleich zu dem PBD-Signal des Referenzfarbstoffs BCP (grün) über einen Zeitraum von 16 ms gezeigt. Der langsame Zerfall des Referenzsignals kann auf Wärmediffusion zurückgeführt werden, da das PBD-Signal von BCP rein thermischen Ursprungs ist. Der Unterschied zwischen schwarzem und grünem Zeitverlauf in den ersten Millisekunden nach Blitzanregung deutet eine kleine Volumenzunahme an, die möglicherweise mit Reaktionen der PSII-Akzeptorseite in Verbindung steht. Tatsächlich zeigt der Vergleich mit einer einphasigen Simulation (rote

Linie), dass das PBD-Signal des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs besser mit der Summe zweier Exponentialfunktionen (blaue Linie) simuliert werden kann. Die zweiphasige Simulation umfasste dabei die schnell ansteigende Phase ( $\tau_1 \sim 30 \mu\text{s}$ ), die bereits diskutiert wurde, und eine zusätzliche kleine, langsam ansteigende Phase mit einer Zeitkonstante von  $660 \mu\text{s}$ . Der Wert der langsamen Zeitkonstante  $\tau_2 = 660 \mu\text{s}$  stammt aus komplementären Fluoreszenzmessungen (siehe Kapitel 3.2) und beschreibt die schnellste Zerfallsphase von Fluoreszenzsignalen, die dem ET an der Akzeptorseite des PSII zugeschrieben werden kann. Die Parameter der zweiphasigen Simulation der PBD-Signalverläufe, bei denen sich Akzeptorseiten-Beiträge andeuten, sind in Tabelle 4-3 aufgeführt. Die Zeitkonstante, die für den schnellen Anstieg des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs bestimmt wurde, war nur wenig davon beeinflusst, ob die einphasige oder die zweiphasige Simulation gewählt wurde. Dies galt für sowohl in  $\text{H}_2\text{O}$  als auch in  $\text{D}_2\text{O}$  gemessene PBD-Signale und auch für den bestimmten KIE (Tabelle 4-3).

Betrachtet man einen Zeitbereich von 3 ms nach Blitzanregung, so zeigt sich auch für das Signal des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs, dass eine zweiphasige Simulation (Summe zweier Exponentialfunktionen und einer Konstante) zu besseren Ergebnissen führt als eine einphasige. Die rote Linie in Abbildung 4-12B repräsentiert eine Simulation, bei der neben der schnell ansteigenden Phase eine langsamer ansteigende Phase mit der Zeitkonstante des Akzeptorseiten-ETs (bestimmt durch Messungen des Fluoreszenzzerfalls) berücksichtigt wurde. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass die Volumenexpansion, die sich durch die langsam ansteigende Phase andeutet, mit dem Interchinon-ET zusammenhängt. Die Anpassungsparameter verschiedener Simulationen des PBD-Signals des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst. Variationen der Länge des Zeitbereiches, über den sich die Simulation des Signalverlaufs erstreckte, zeigten, dass einphasige Simulationen nicht ausreichend sind, da die bestimmten Zeitkonstanten der schnellen Phase ( $\tau_1$ ) mit größer werdendem Zeitbereich zunahm. Der errechnete KIE nahm dementsprechend ab. Die zweiphasige Simulation führte zu besseren Ergebnissen und die Residuen fielen niedrig aus (blaue Linie in Abbildung 4-12B). Zur Bestimmung des KIE der PBD-Phase, die mit einer Protonenbewegung in Verbindung gebracht wird, wurden die in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  gemessenen PBD-Signale daher zweiphasig (unter Berücksichtigung einer vermutlich durch Interchinon-ET verursachten Phase) simuliert. Dabei ergab sich für den KIE des  $S_1^+ \rightarrow S_1^n$ -Übergangs ein Wert von 3,0 (siehe Abbildung 4-9D und Tabelle 4-3).



**Abbildung 4-12:** PBD-Signale des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs (A) und des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs (B). In A ist neben dem Signal des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs (gemessen bei 20 °C in  $H_2O$ , schwarze Linie) auch der Signalverlauf des Referenzfarbstoffs Bromkresolpurpur (BCP) (grüne Linie) dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der beiden Signale ist das BCP-Signal skaliert und vertikal verschoben worden. Das „Inset“ zeigt den Bereich der ersten Millisekunde in vergrößertem Maßstab. Hier sind zusätzlich Simulationen mit einer einfachen Exponentialfunktion (rote Linie) und der Summe zweier Exponentialfunktionen (blau) eingezeichnet. In B ist das PBD-Signal des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs (20 °C,  $H_2O$ ) schwarz dargestellt. Die rote Linie repräsentiert eine Simulation mit der Summe aus zwei Exponentialfunktionen und einer Konstante, die blaue Linie die zugehörigen Residuen. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).



**Tabelle 4-3:** Zeitkonstanten ( $\tau_i$ ), Amplituden ( $A_i$ ), kinetische Isotopen-Effekte (KIE) und ein Fehlermaß ( $1-R^2$ ), die durch ein- oder zweiphasige Simulationen von PBD-Signalverläufen der Übergänge  $S_2 \rightarrow S_3$  und  $S_0 \rightarrow S_1$  bestimmt wurden (Abbildung 4-12). Als Maß für die Qualität einer Kurvenanpassung wurde der „angepasste  $R^2$ -Wert“ mit Origin (OriginLab, Version 8.5) berechnet. Aus Darstellungsgründen ist der Wert  $1-R^2$  angegeben. Ein niedrigerer Wert von  $1-R^2$  (näher an null) deutet auf einen besseren Fit (eine höhere Übereinstimmung zwischen angepasster Kurve und Daten) hin. Einphasige Simulation: Summe aus einfacher Exponentialfunktion und einer Konstante; zweiphasige Simulation: Summe aus zwei Exponentialfunktionen und einer Konstante. Der Asterisk (\*) zeigt an, dass die entsprechenden Werte der Zeitkonstanten den Ergebnissen von Fluoreszenzmessungen entnommen sind (Kapitel 3.2) und bei der Simulation konstant gehalten wurden. Tabelle adaptiert aus Klauss *et al.* (2012a).

Simulationsbereich	Parameter	H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O	KIE	(1-R <sup>2</sup> ) [%]
<b>S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub> einphasige Simulation</b>					
1 ms	$\tau_1$ [μs]	29	162	5.6	9.8
	$A_1$ [V/mJ]	2.88	2.37		
<b>S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub> zweiphasige Simulation</b>					
1 ms	$\tau_1$ [μs]	22	124	5.6	6.7
	$A_1$ [V/mJ]	3.03	2.12		
	$\tau_2$ [μs]	660*	1260*		
	$A_2$ [V/mJ]	0.38	0.76		
<b>S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub> einphasige Simulation</b>					
0.5 ms	$\tau_1$ [μs]	118	608	5.2	7.2
	$A_1$ [V/mJ]	1.77	1.75		
3 ms	$\tau_1$ [μs]	271	585	2.2	12.2
	$A_1$ [V/mJ]	1.67	1.45		
<b>S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub> zweiphasige Simulation</b>					
3 ms	$\tau_1$ [μs]	84	261	3.0	9.5
	$A_1$ [V/mJ]	1.45	0.93		
	$\tau_2$ [μs]	660*	1450*		
	$A_2$ [V/mJ]	0.79	0.82		

### 4.3 Diskussion

Im Verlauf des klassischen  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs geht dem ET-Schritt eine Volumenexpansion voraus, die dem Entfernen eines Protons vom Mn-Komplex im  $S_2^+ \rightarrow S_2^n$ -Übergang des erweiterten S-Zustandszyklus (Abbildung 1-5) zugeordnet werden kann. Diese zentrale

Erkenntnis der vorliegenden Arbeit ist ein direkter Beleg für die Annahme, dass dem ET des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs eine Protonentransfer über größere Distanz vorausgeht, und eine enge Analogie zum ersten Schritt ( $S_3^+ \rightarrow S_3^n$ ) im  $S_3 \rightarrow S_0 + O_2$ -Übergang besteht (Haumann et al. 2005a). Dieses Ergebnis impliziert, dass durch Deprotonierung ein bisher unentdeckter Zwischenzustand ( $S_2^n$ ) vorübergehend gebildet wird. Die Volumenzunahme im Zusammenhang mit diesem Protonentransfer kann folgendermaßen erklärt werden: Das Entfernen einer positiven Ladung ( $H^+$ ) von der Donorseite des PSII hebt die vorausgegangene Kontraktion wieder auf, die das Resultat der Ladungsakkumulation an der Donorseite durch  $Y_Z^{ox(+)}$ -Bildung war. Es könnte möglich sein, diesen PT-Schritt über die Analyse elektrochromer Absorptionsänderungen von PSII-Pigmenten nachzuweisen. Dies ist bisher jedoch noch nicht erfolgt (Dekker et al. 1984a; Renger und Hanssum 1992; Rappaport et al. 1994). Bei einer Halbwertszeit von nur  $\sim 20 \mu s$  bei pH 6,2 und vermutlich noch kürzeren Zeitkonstanten bei höheren pH-Werten ist dies vermutlich auf technische Limitationen zurückzuführen.

Im Verlauf des klassischen  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs wird eine Volumenexpansion beobachtet, die nach dem ET-Schritt stattfindet und dem Entfernen eines Protons vom Mn-Komplex im  $S_1^+ \rightarrow S_1^n$ -Übergang zugeordnet wird. Wie schon beim  $S_2^+ \rightarrow S_2^n$ -Übergang wird auch hier die Volumenausdehnung durch Entfernung einer positiven Ladung ( $H^+$ ) von der PSII-Donorseite erklärt, da dies zu einer (teilweisen) Aufhebung der Kontraktion als Folge der  $Y_Z^{ox(+)}$ -Bildung führt. Im Gegensatz zum  $S_2^+ \rightarrow S_2^n$ -Übergang findet der Deprotonierungsschritt im Verlauf des klassischen  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs nach der Oxidation des Mn-Komplexes statt, d.h. nach  $S_1^+$ -Bildung. Die Beobachtung der vorübergehenden Bildung des Zwischenzustandes  $S_1^+$  liefert einen weiteren Beleg für das Reaktionsschema des erweiterten S-Zustandszyklus (Abbildung 1-5). Bei der Untersuchung von elektrochromen Absorptionsänderungen im Zusammenhang mit dem klassischen  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang wurde eine langsame Entladung der PSII-Donorseite gefunden (Zeitkonstante von  $330 \mu s$ ) (Rappaport et al. 1994). In dieser Studie war allerdings auch der ET-Schritt mit  $\sim 360 \mu s$  sehr langsam, sodass keine Aussagen zur zeitlichen Abfolge von Ereignissen gemacht werden konnte.

Die kinetischen Parameter, die für das Entfernen von Protonen vom Mn-Komplex bestimmt wurden, beziehen sich auf den langsamsten einer Reihe von elementaren Protonentransferschritten, die zusammengenommen den Transport eines Protons über eine große Distanz (vom Mn-Komplex hin zur wässrigen Phase des Lumen) bewirken. Genauere Informationen über den ratenlimitierenden Schritt, wie etwa beteiligte Gruppen, können hier nicht gegeben

werden. Hohe Aktivierungsenergien und KIE-Werte wurden für die Protonenentfernung in beiden Zwischenzuständen ( $Y_Z^{\text{ox}}S_2^+$  und  $Y_Z^{\text{red}}S_1^+$ ) bestimmt, was auf einen Übergangszustand relativ hoher Energie sowie Protonentunneln über eine beachtliche energetische Barriere schließen lässt. Eine tiefergehende Analyse der thermodynamischen und kinetischen Parameter könnten hier weitere Einsichten ermöglichen (Krishtalik 2000; Hatcher et al. 2005). Interessanterweise sind die Aktivierungsenergie und der KIE der Protonenentfernung im  $Y_Z^{\text{ox}}S_3^+$ -Zustand kleiner, was darauf hindeutet, dass der Ort und/oder die Natur des ratenlimitierenden PT-Schritts verschieden sein könnten. Eine Identifikation des PT-Pfades innerhalb des PSII könnte experimentell zum Beispiel mithilfe von zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie erreicht werden (Barry et al. 2006; Garczarek und Gerwert 2006).

Ein Reaktionszyklusmodell, das in Erweiterung des klassischen S-Zyklusmodells neben der lichtinduzierten Oxidation des Mn-Komplexes durch ET zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  auch Protonentransfer vom Mn-Komplex hin zur wässrigen Phase zeitlich sequentiell einordnet (Abbildung 1-5), wurde bereits im Jahr 2006 vorgeschlagen (Dau und Haumann 2006; Dau und Haumann 2007a). In Hinblick auf die Protonenentfernungsschritte vom Mn-Komplex beschränkte sich die experimentelle Unterstützung großteils auf (indirekte) Indizien. Nur der  $S_3^+ \rightarrow S_3^n$ -Übergang konnte in zeitaufgelösten Experimenten nachgewiesen werden (Rappaport et al. 1994; Haumann et al. 1997; Razeghifard und Pace 1999; Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010; Rappaport et al. 2011). In meiner Arbeit ist es nun gelungen, den ladungskompensierenden PT im klassischen  $S_0 \rightarrow S_1$ - und  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang experimentell zu verfolgen und kinetische Parameter dieser wichtigen Reaktionsschritte zu bestimmen (siehe Tabelle 4-3).

## 5. Beobachtung von Ladungstransferreaktionen der PSII-Wasserspaltung durch verbesserte PBD-Signale

Im vorhergehenden Kapitel wurde beschrieben, dass es mit photothermischen Experimenten möglich war, Protonentransferreaktionen am katalytischen Zentrum der PSII-Wasseroxidation zu verfolgen. Mit der Aktivierungsenergie und dem kinetischen H/D-Isotopenaustausch-Effekt konnten erstmals kinetische Parameter für einen PT, der dem ET im klassischen  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang vorausgeht, und für einen weiteren PT, der auf den ET im  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang folgt, bestimmt werden. Offene Fragen blieben jedoch in Hinblick auf Volumenänderungen im Zusammenhang mit dem ET zwischen dem Mn-Komplex und  $Y_Z^{ox}$ , da überraschenderweise nur im  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang eine mit der Ladungsakkumulation verbundene Kontraktion detektiert werden konnte. Außerdem ergaben sich bei der Datenauswertung Schwierigkeiten im Zusammenhang mit relativ langsamen Phasen in PBD-Signalen, die mit Reaktionen an der PSII-Akzeptorseite in Verbindung gebracht wurden. In diesem fünften Kapitel werden nun PBD-Signale diskutiert, die nach Optimierung der PBD-Apparatur in ausreichend guter Qualität aufgenommen werden konnten, um wichtige, verbleibende Lücken in der photothermischen Beschreibung des Reaktionszyklus der PSII-Wasserspaltung zu schließen. Neben der Beobachtung von vorher in PBD-Signalen verborgenen ET-Reaktionen an der Donor- und Akzeptorseite gelang auch eine Untersuchung der pH-Abhängigkeit von Reaktionsschritten im S-Zustandszyklus. Den Abschluss dieses Kapitels bildet eine kurze Beschreibung von photothermischen Messungen an Mn-freiem und damit inaktivem PSII.

### 5.1 Materialien und Methoden

#### 5.1.1 Probenvorbereitung

Bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagerte Präparationen von PSII-Membranpartikeln wurden identisch zum Vorgehen in Kapitel 4.1 zwei Stunden lang auf Eis aufgetaut, mit einem Pinsel für 10 Minuten homogenisiert und für 12 min zentrifugiert (50000 g). Nach Resuspendieren des Sediments bei einer Konzentration von etwa 2 mg Chl/ml wurde die Probe mit leichtem Unterdruck durch Filterpapier der Porengröße 16  $\mu\text{m}$  gesaugt. Das Filtrat wurde durch Verdünnen mit Puffer D auf eine Chlorophyllkonzentration von 80  $\mu\text{g/ml}$  eingestellt, die gewünschte Menge

des Elektronenakzeptors DCBQ wurde beigefügt und die Messung direkt gestartet. Um einen H/D-Isotopenaustausch in der Probe zu erreichen, wurden der Reinigungsschritt und alle folgenden Arbeitsschritte in Puffer D durchgeführt, der aus 99,9% Deuteriumoxid (Fa. Carl Roth) zubereitet war (pD 6,2). Für Messungen bei verschiedenen pH-Werten wurde der Reinigungsvorgang bei dem Standard-pH-Wert von 6,2 durchgeführt und erst beim Verdünnen der Stammsuspension auf 80 µg Chl/ml ein Puffer mit entsprechend variiertem pH-Wert verwendet. Bei allen Arbeitsschritten waren die Probenbehältnisse auf Eis gekühlt gelagert. In der Zentrifuge herrschte eine Temperatur von 4 °C.

Zur Präparation von inaktiven PSII-Proben durch Extraktion von Mangan wurde vorgegangen wie von Allakhverdiev *et al.* beschrieben (Allakhverdiev *et al.* 1994). In einem auf Eis gekühlten TEMED-Puffer (20 mM N,N,N',N'-tetra-Methylethylenediamin (TEMED), 0,5 M MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MES-NaOH, pH 6,5) wurden die PSII-Membranpartikel bei einer Konzentration von 200 µg Chl/ml für 10 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugierung bei 15000 U/min wurde das Sediment zweimal in einem Tris-Puffer (35 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0) durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 15000 U/min und anschließendes Resuspendieren gereinigt. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Sediment in Puffer D resuspendiert, filtriert und auf die Endkonzentration von 80 µg Chl/ml eingestellt. Schließlich wurde auch den inaktiven PSII-Proben DCBQ in einer Konzentration von 20 µM zugefügt. Bei dieser Behandlung gehen dem PSII neben dem Mn<sub>4</sub>Ca-Komplex auch die leichten extrinsischen PSII-Proteine O, P und Q (33 kDa, 24 kDa und 18 kDa) verloren (Allakhverdiev *et al.* 1994).

### 5.1.2 Durchführung der Messungen

Die Steuerung des verbesserten PBD-Spektrometers (Abschnitt 2.2 und 3.1) wurde dahingehend angepasst, dass nach jedem Probenwechsel anstelle von nur einer jetzt 12 Messungen im Abstand von 0,7 s durchgeführt und die Signalverläufe getrennt abgespeichert wurden. Ein Messzyklus bestand aus:

- (i) dem 3 Sekunden dauernden Pumpvorgang, der die Probenflüssigkeit aus dem auf Eis gelagerten und mittels eines Magnetrührers dauernd bewegten Reservoir durch den Wärmtauscher in die Durchflussküvette pumpt,
- (ii) einer Wartezeit von 10 Sekunden, in der Konvektionsströme innerhalb des Probenvolumens abklingen und

- (iii) der Applikation von 12 Laserblitzen im Abstand von 0,7 Sekunden zur Auslösung der photothermischen Signale.

Um eine größtmögliche Puls-zu-Puls-Stabilität der Laserenergie zu gewährleisten, wurde der Laser dauerhaft mit konstanter Frequenz betrieben und der Durchlass des Lichtes zur Probe über einen „Shutter“ gesteuert. Die Pulsenergie betrug  $100 \pm 5 \mu\text{J}$ . Bei Messungen an manganfreien PSII-Proben wurde die Anregungsenergie des Lasers zwischen  $8 \mu\text{J}$  und  $122 \mu\text{J}$  variiert und die Probe in der Messküvette nach jeweils 30 Belichtungen ausgetauscht.

Von den 100 ml der angesetzten Probe wurden 100 Messzyklen innerhalb von etwa 40 Minuten durchgeführt. Das Reservoir wurde dabei nicht vollständig aufgebraucht, da sich zeigte, dass trotz des dauerhaften Rührens nach 40 Minuten Störungen im Signal, die auf Streuung zurückzuführen sind, zunahmen.

Die PBD-Signale wurden in einem Zeitbereich von vier Millisekunden vor dem Laserpuls bis 20 ms nach der Anregung bei einer Abtastfrequenz von 1 MHz aufgenommen. Der Hochpassfilter des Differenzverstärkers war auf 300 kHz eingestellt. Durch die Mittelung über jeweils 10 benachbarte Datenpunkte wurden die Signalverläufe geglättet, ohne die Zeitauflösung des Systems, welche durch die Anstiegszeit des Detektors und den Hochpassfilter bestimmt ist, zu beeinträchtigen. Zur weiteren Datenreduktion wurde eine logarithmische Mittelung der Punkte im Zeitintervall von  $90 \mu\text{s}$  bis 20 ms durchgeführt. Mittelungsintervalle wurden dabei exponentiell vergrößert, sodass die Anzahl der Datenpunkte auf etwa 18 pro Dekade zurückging. Im Anfangsbereich der ersten  $90 \mu\text{s}$  nach Laseranregung wurde der Punktabstand von jeweils  $10 \mu\text{s}$  beibehalten. Zur Datenanalyse und Kurvenanpassung wurden die 50 resultierenden Punkte jedes Zeitverlaufs im Bereich von  $20 \mu\text{s}$  bis 18,33 ms verwendet. Die in diesem Kapitel gezeigten Signalverläufe stellen den Mittelwert aus Messungen an jeweils 300 bis 500 PSII-Proben dar.

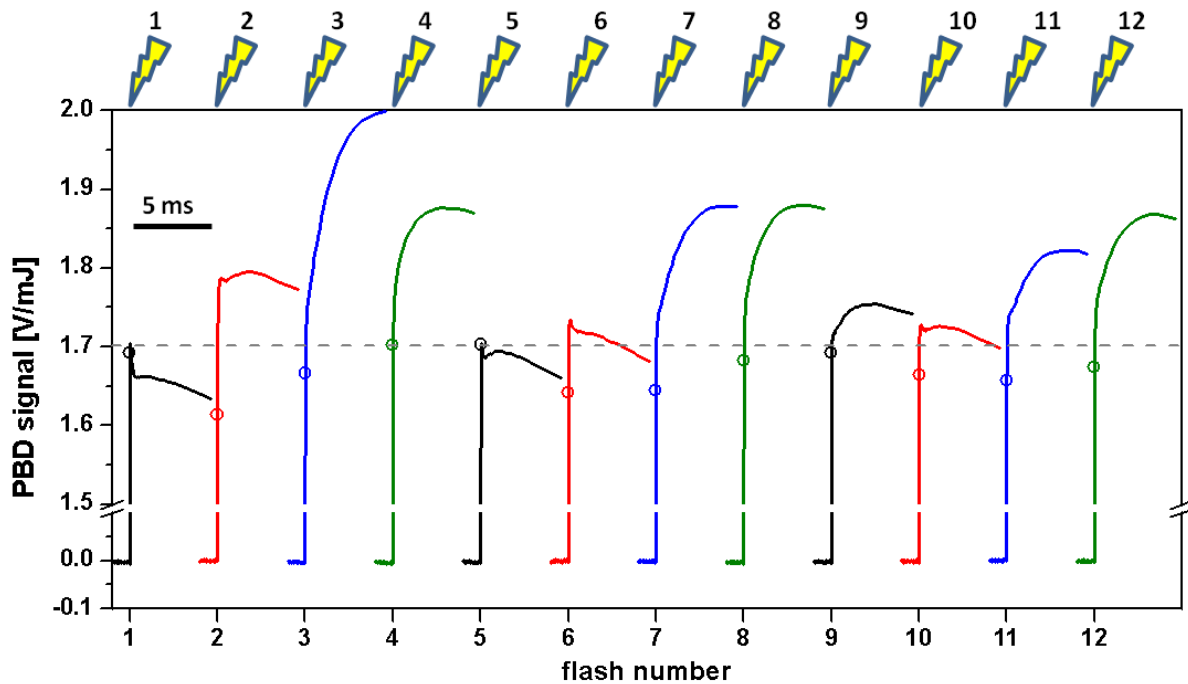
## 5.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Auslösung des PBD-Signals durch (die PSII-Photochemie) sättigende Laserpulse ermöglicht es, eine ganze Serie von Signalen verschiedener S-Zustandsübergänge an ein und derselben PSII-Probe aufzunehmen. Die Signale einer Serie von 12 Blitzen ist in Abbildung 5-1 gezeigt. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist im Vergleich zu Abbildung 4-3 sehr gut, wozu verschiedene Faktoren beitragen:

- 
- (i) Im Vergleich zu den niederenergetischen, etwa halbsättigenden Anregungspulsen in Kapitel 4 sind die mit photochemischen Reaktionen verbundenen PBD-Signale bei voller Sättigung etwa doppelt so hoch.
  - (ii) Es können jetzt an jeder Einzelprobe die Signale 12 verschiedener (durch die Applikation von 0-11 Laserpulsen eingestellter) S-Zustandskonfigurationen vermessen werden (vorher jeweils nur eine pro Einzelprobe). Der Bedarf an Probenmaterial und der Zeitaufwand sinken dadurch auf einen Bruchteil und es können mehr Mittelungen zur Signalverbesserung durchgeführt werden.

Ein weiterer Vorteil bei Anregung mit sättigenden Laserblitzen liegt in der gestiegenen Vergleichbarkeit der PBD-Signale innerhalb einer Blitzserie, die an derselben Probe gemessen wurden. Bei wiederholter Neubefüllung der Durchflussküvette mit der PSII-Suspension aus dem Reservoir kann nicht garantiert werden, dass die Proben immer identische optische Eigenschaften (Absorption und Streuverhalten) aufweisen. Dies führt in Kapitel 4 zu einer gewissen Unsicherheit beim Vergleich absoluter Amplituden von Signalen verschiedener S-Zustandsübergänge. In Abbildung 5-1 ist die Vergleichbarkeit der Signale der Serie sehr gut. Man kann so ein Muster des prompten Signalsprungs (mit Kreisen markiert) in Abhängigkeit der Anzahl von Blitzen deutlich sehen. Nach dem zweiten und dritten Blitz fällt der prompte Sprung deutlich niedriger aus als nach Blitz eins und vier. Bei einer Zeitauflösung des PBD-Experiments von  $\sim 10 \mu\text{s}$  tragen alle Sub-Mikrosekunden-Prozesse zum prompten Signalsprung bei. Die Ergebnisse der photoakustischen Messungen aus Kapitel 6, die zeigen, dass strukturell bedingte Kontraktionen im Sub-Mikrosekunden-Zeitbereich auftreten, wenn sich der Mn-Komplex im  $S_2$ - oder  $S_3$ -Zustand befindet, werden dadurch bestätigt.

Ein Nachteil bei PBD-Messungen mit sättigender Anregung ist das dominierende Wärmesignal. Da ein Großteil der Anregungsenergie ( $\sim 99\%$ ) photochemisch nicht genutzt werden kann und somit innerhalb von Nanosekunden thermisch deaktiviert wird, ist der prompte Signalsprung von der Wärmefreisetzung dominiert und um eine Größenordnung größer als nicht-thermische Beiträge, die mit Ladungstransferreaktionen im Mikrosekunden-Zeitbereich einhergehen. In einigen der Signalverläufe in Abbildung 5-1 deutet sich ein Signalzerfall im Millisekunden-Zeitbereich an. Besonders in den schwarz und rot dargestellten Verläufen ist bereits 5 ms nach der Blitzanregung deutlich zu sehen, dass die Signalamplitude abnimmt. Da der Wärmebeitrag zum PBD-Signal im Vergleich zu den nicht-thermischen Beiträgen viel ausgeprägter ist, wirkt sich der Signalzerfall durch Wärmediffusion stärker auf den Signalverlauf aus als noch im vorherigen Kapitel.



**Abbildung 5-1:** PBD-Signale einer Serie von 12 sättigenden Laserblitzen an PSII-Proben unter Standardbedingungen ( $80 \mu\text{g Chl/ml}$ ;  $\text{pH } 6,2$ ;  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{DCBQ: } 20 \mu\text{M}$ ). Der Abstand zwischen zwei Laseranregungen betrug jeweils  $700 \text{ ms}$ . Die Signale sind für jeweils eine Millisekunde vor und fünf Millisekunden nach der Anregung dargestellt. Leere Kreise geben die Signalhöhe des prompten Sprungs an. Diese wurde durch Extrapolation der Kurvenanpassung nach Gleichung 5.1 auf den Zeitpunkt der Blitzanregung bestimmt. Signale stellen den Mittelwert aus ungefähr 500 Einzelmessungen dar.

Eine Viererperiodizität der Signalformen ist in Abbildung 5-1 deutlich zu sehen und zusätzlich durch entsprechende Farbgebung unterstrichen. So folgt bei den Signalen des ersten und des fünften Blitzes eine Kontraktion auf die prompte Wärmeausdehnung. Diese Kontraktion konnte in Kapitel 4.2 dem Elektronentransfer des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs zugeordnet werden. Auf dem durch den neunten Blitz ausgelösten Signal ist die Kontraktion wegen bereits fortgeschrittener Durchmischung der S-Zustände aufgrund eines *miss*-Parameters von etwa 10% nicht mehr zu sehen. (Sieh auch Abschnitt 5.2.2.) Gut zu sehen sind die Auswirkungen der zunehmenden S-Zustandsdurchmischung der zunächst dunkeladaptierten PSII-Probe an der Amplitude der prominenten Millisekunden-Anstiegsphase, die zum ersten Mal bei dem Signal des dritten Laserpulses erscheint. Einen Zyklus später, beim Signal des siebten Blitzes, ist die Millisekunden-Amplitude auf etwa zwei Drittel zurückgegangen, einen weiteren Zyklus später, bei Blitz 11, auf etwa die Hälfte. Eine quantitative Analyse erfolgt in den kommenden Abschnitten.



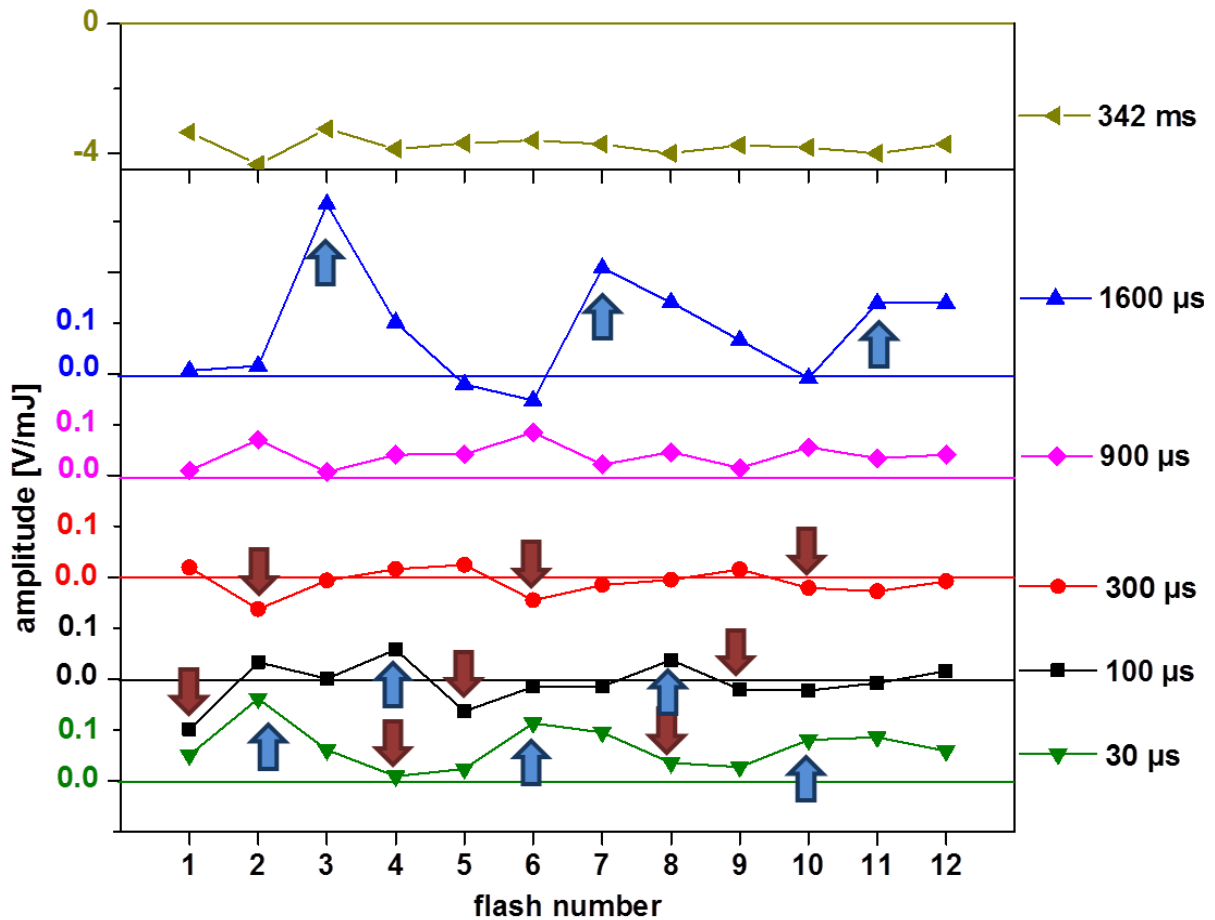
### 5.2.1 Elektronentransferzeiten in PBD-Signalen

Um einen ersten Eindruck von dem Informationsgehalt der in Abbildung 5-1 gezeigten Signale im Bezug auf bekannte Elektronentransferreaktionen zu erhalten, wurde eine globale Analyse durchgeführt, die im Folgenden beschrieben wird. Den 12 Zeitverläufen, gemessen bei Blitzanregung 1 bis 12, wurde eine Funktion angepasst, die als Summe aus sechs einfachen Exponentialfunktionen und einer Konstante angelegt war:

$$S(t) = y_0 + \sum_{i=1}^6 A_i \left(1 - \exp\left[-\frac{t}{\tau_i}\right]\right). \quad (5.1)$$

Freie Parameter, die bei der Kurvenanpassung variiert wurden, waren die Amplituden  $A_1, A_2, \dots, A_6$  und die Konstante  $y_0$ . Die ersten fünf der sechs Zeitkonstanten  $\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_6$  wurden nicht variiert. Sie wurden auf bekannte Werte von Elektronentransfer-Zeitkonstanten, die bei der PSII-Wasseroxidation auftreten, eingestellt und bei der Minimierung der Fehlerquadrate festgehalten. Im Einzelnen wurden die folgenden Werte gewählt:  $\tau_1 = 30 \mu\text{s}$ , ET-Konstante des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs (Dekker et al. 1984a; Haumann et al. 2005a);  $\tau_2 = 100 \mu\text{s}$ , ET-Konstante des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs;  $\tau_3 = 300 \mu\text{s}$ , ET-Konstante des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs;  $\tau_4 = 1600 \mu\text{s}$ , ET-Konstante des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs (Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010). Die fünfte Phase mit der Zeitkonstante  $\tau_5$  wurde eingeführt, um mögliche Signalbeiträge von der Akzeptorseite des PSII zu berücksichtigen. Über Messungen der prompten Fluoreszenz konnten Zeitkonstanten von  $\sim 900 \mu\text{s}$  für die schnellsten Phasen der Oxidation des reduzierten Elektronenakzeptors  $Q_A^-$  bestimmt werden (Kapitel 3.2). In der globalen Simulation der 12 PBD-Signale wurde daher für  $\tau_5 = 900 \mu\text{s}$  gewählt.

Eine sechste Phase mit den Parametern  $A_6$  und  $\tau_6$  war notwendig, um den Zerfall der Signale im Zeitbereich von einigen 10 ms zu beschreiben. Durch die Signale, die in einem Zeitbereich von  $20 \mu\text{s}$  bis 20 ms zur Verfügung stehen, ist die Zerfallskonstante eines so langsamen Prozesses nicht sehr gut definiert. Erschwerend kommt hinzu, dass langsam ansteigende Phasen von Akzeptorseitenreaktionen mit Zeitkonstanten im Bereich von 10 ms sowie das unvermeidliche Driften des Signals in ähnlichen Zeitbereichen in hier unbestimmbarer Weise zum Signalverhalten ( $> 5 \text{ ms}$ ) beitragen. Sehr gute Simulationsergebnisse konnten erzielt werden, wenn die drei genannten Beiträge im Millisekunden-Bereich in einer Zerfallsphase zusammengefasst wurden. Als globalen Anpassungsparameter, der für alle 12 Signalverläufe gleichermaßen variiert wurde, ergab sich für  $\tau_6$  ein Wert von  $\tau_6 = (342 \pm 115) \text{ ms}$ .



**Abbildung 5-2:** Amplituden der multiexponentiellen Anpassung von PBD-Signalen einer Serie von 12 Laserblitzen. Als Anpassungsfunktion wurde die Summe aus sechs Exponentialfunktionen und einer Konstante gewählt, wobei Zeitkonstanten von ET-Reaktionen der PSII-Donorseite und -Akzeptorseite vorgegeben wurden (siehe Haupttext). Die langsamste Zerfallskonstante ergab sich als globaler Anpassungsparameter, der für alle 12 Zeitverläufe der Serie gleichermaßen variiert wurde, zu 342 ms. Standardbedingungen der PSII-Probe: 80 µg Chl/ml, pH 6,2, 20 °C. Zeitkonstanten der Elektronentransfers vom Mangankomplex zu  $Y_Z^{ox}$  sind der Literatur entnommen (Dekker et al. 1984a; Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010). Rote Pfeile markieren Positionen, an denen Elektronentransfer mit der jeweiligen Zeitkonstante stattfindet. Blaue Pfeile markieren Positionen, an denen aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 4 Expansionen zu erwarten sind (siehe Text).

Die Amplituden, ermittelt aus der globalen Kurvenanpassung, sind in Abbildung 5-2 als Funktion der Anzahl von Laserblitzen dargestellt. Pfeile deuten dabei an, an welchen Positionen der jeweiligen Blitzmuster Minima (rote Pfeile) beziehungsweise Maxima (blaue Pfeile) zu erwarten sind, wie im Folgenden ausgeführt wird. Die 100-µs-Kontraktionen nach Anregung mit dem ersten und fünften Blitz waren bereits in den Rohdaten in Abbildung 5-1 deutlich auszumachen. Im Blitzmuster der Amplituden der 100-µs-Phase (schwarze Symbole) sind dementsprechend Minima bei dem ersten und dem fünften Blitz zu sehen und auch die Amplitude des neunten Blitzes ist niedriger als die des Vorblitzes. In Kapitel 4 wurde eine

Expansion mit einer Zeitkonstante von 100  $\mu\text{s}$  bei PBD-Signalen gefunden, die nach Anregung von PSII-Proben im  $S_0$ -Zustand gemessen wurden. Diese Expansionen rufen Maxima der 100- $\mu\text{s}$ -Amplitude bei den Blitzen 4, 8 und 12 hervor (markiert mit blauen Pfeilen). Zerfallsphasen im Zusammenhang mit den anderen ETs an der Donorseite des PSII konnten in den Signalen, die in Kapitel 4 diskutierten werden, nicht gefunden werden. Im Blitzmuster der den  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang repräsentierenden 300- $\mu\text{s}$ -Phase (rote Symbole) sind nun jedoch eindeutige Minima bei Blitz 2 und 6 auszumachen. Und auch von Blitz 9 zu Blitz 10 nimmt die Amplitude ab. Es sieht also so aus, als könne eine Kontraktion im Zusammenhang mit dem  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang in den mit sättigenden Laserpulsen gemessenen PBD-Signalen aufgelöst werden. Das Blitzmuster einer 30- $\mu\text{s}$ -Phase (grüne Symbole) zeigt wieder ein etwas komplexeres Verhalten. Eindeutig sind die Maxima bei den Blitzen 2, 6 und 10, die eine prominente Expansion, dem  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang vorausgehend (ausführlich in Kapitel 4 diskutiert), widerspiegeln. Ausgeprägte Minima bei den Blitzen 4, 8 und 12, wie man sie entsprechend zu den PBD-Signalen des  $S_1 \rightarrow S_2$ - beziehungsweise des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs erwarten könnte, sind nicht auszumachen.

Die größten Amplituden stammen von der 1,6-ms-Phase (blaue Symbole). Das Blitzmuster ist typisch für ein Sauerstoff-Blitzmuster mit Maxima bei dem dritten, siebten und elften Blitz (Joliot et al. 1969; Haumann et al. 1997; Clausen et al. 2004) und bestätigt eine ausgeprägte Expansion im Zusammenhang mit dem sauerstoffentwickelnden Schritt an der Donorseite des PSII. Die negativen Werte bei Blitz 5 und 6 sind vermutlich auf Interferenzen mit der 900- $\mu\text{s}$ -Phase bei der Kurvenanpassung zurückzuführen. Die Tatsache, dass die 900- $\mu\text{s}$ -Phasen bei Blitz 5 und 6 besonders hohe, den 1,6-ms-Amplituden entgegengesetzte Amplituden annehmen, deuten stark darauf hin, dass hier ein Problem mit der Simulation vorliegt und die negativen ms-Amplituden als Artefakt anzusehen sind.

Mit einer Zeitkonstante von 900  $\mu\text{s}$  werden ET-Reaktionen an der Akzeptorseite des PSII erwartet (siehe Kapitel 3.2). Die Amplituden der entsprechenden Phase (magentafarbene Symbole in Abbildung 5-2) zeigen eine leichte Zweieroszillation mit Maxima auf den geraden Blitznummern. Da das Plastochinon  $Q_B$  als Zweielektronenakzeptor fungiert, das nach zweifacher Reduktion und der zusätzlichen Aufnahme von zwei Protonen ausgetauscht wird, ist die Zweieroszillation zusammen mit der Zeitkonstante, die der  $Q_A^-$ -Oxidation entspricht, ein Indiz dafür, dass Akzeptorseiten-Beiträge in PBD-Signalen zu beobachten sind.

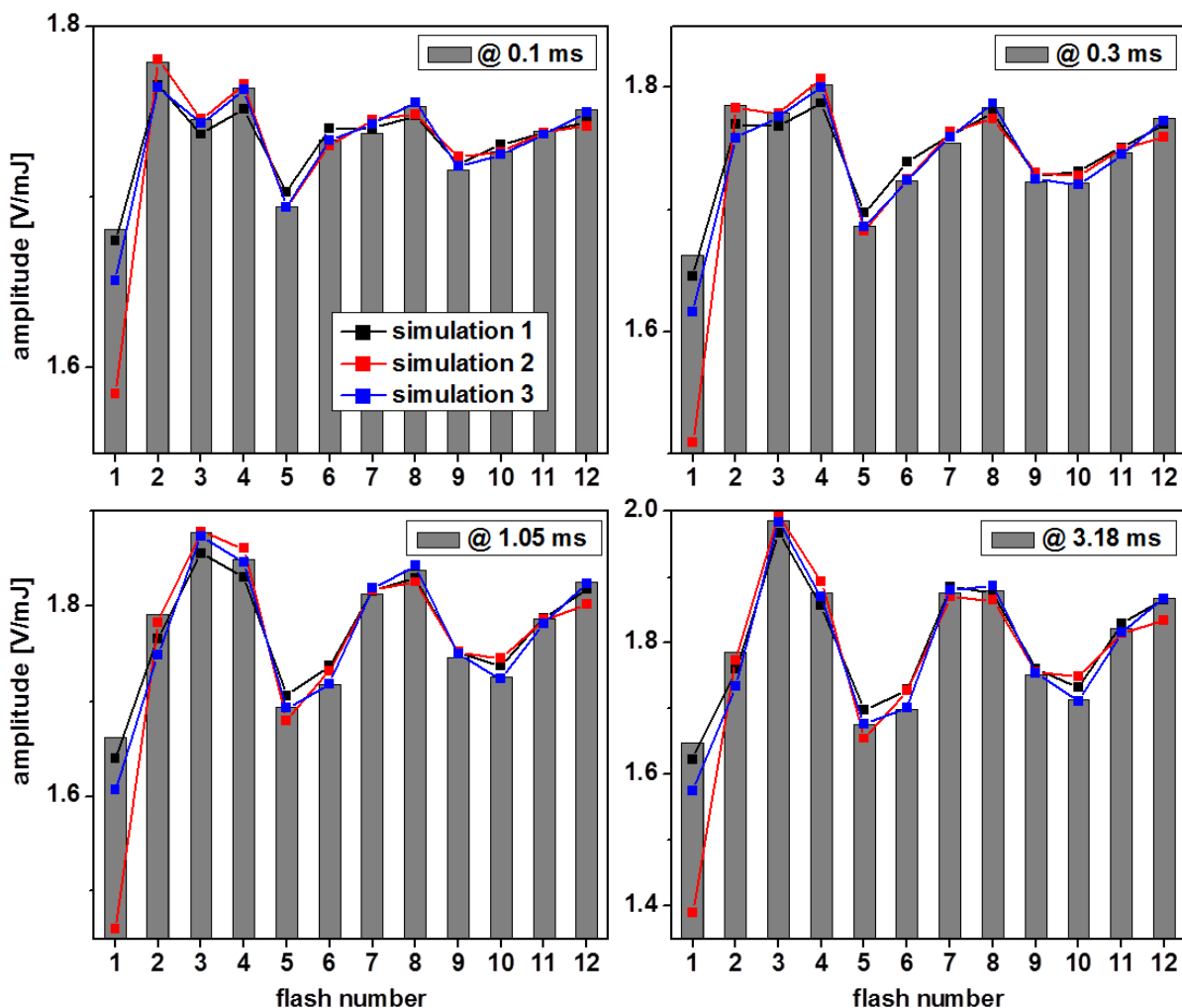
## 5.2.2 Zerlegung der Signale nach Beiträgen der vier S-Zustandsübergänge

Nachdem sich abzeichnet, dass die bei sättigender Anregung gemessenen PBD-Signale eine Vielzahl von Ladungstransferreaktionen nachzeichnen, stellt sich die Aufgabe der Extraktion von PBD-Signalen, die den reinen S-Zustandsübergängen entsprechen (Renger und Hanssum 1988; Lavergne 1991; Iuzzolino et al. 1998).

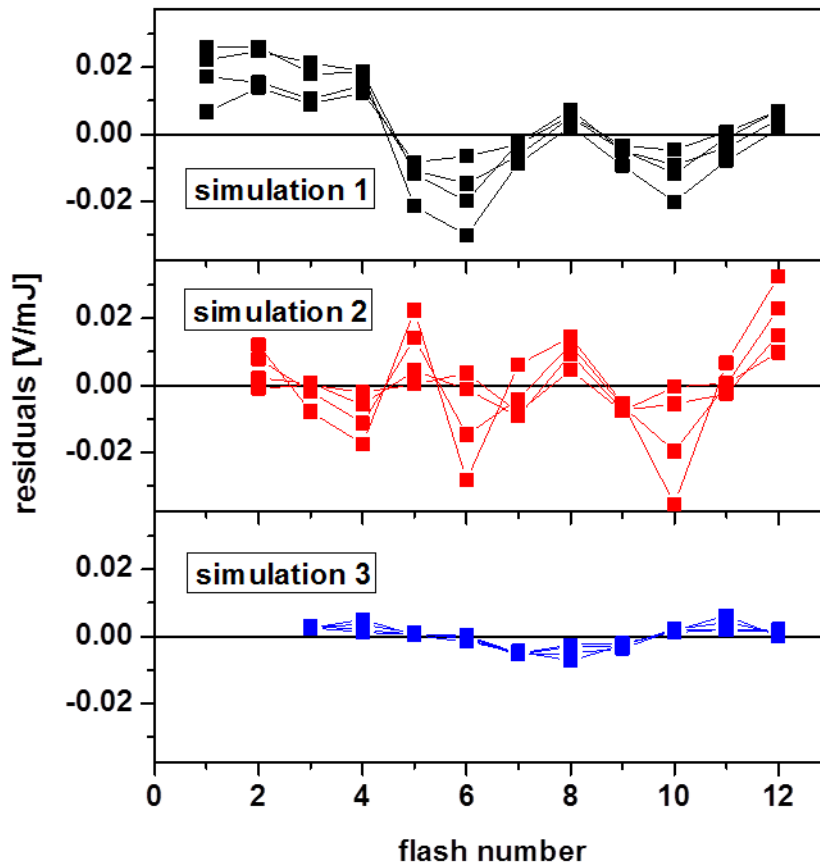
Im Vergleich zu den Messdaten in Kapitel 4, für die zur Korrektur der Desynchronisation von S-Zuständen (auch Entfaltung genannt) nur die PBD-Signale der ersten vier oder fünf Blitze zur Verfügung standen, eröffnet die verbesserte Datenlage mit Signalen der ersten zwölf Blitze weitere Möglichkeiten der S-Zustandsentfaltung. Um möglichst viel der in den Messdaten enthaltenen Information über die puren S-Zustandsänderungen zu nutzen, wurde wie folgt verfahren: Die Zeitverläufe der 12 PBD-Signale der Serie wurden in die Amplituden zu jeder der 50 auf einer logarithmischen Skala linear angeordneten Zeitpunkte ( $t_1, t_2, \dots, t_{50}$ ) im Bereich 20  $\mu\text{s}$  bis 18,33 ms zerlegt. Man erhält so die Amplituden-Blitzmuster von zwölf Blitzen zu jedem der 50 Zeitpunkte  $t_i$ . Vier beispielhaft ausgewählte Blitzmuster zu den Zeitpunkten  $t_9 = 0,105$  ms,  $t_{17} = 0,3$  ms,  $t_{27} = 1,05$  ms und  $t_{36} = 3,18$  ms nach dem anregenden Laserpuls sind in Abbildung 5-3 als Balkendiagramme gezeigt. Die Blitzmuster verändern sich im Laufe der Zeit, so ist 0,105 ms nach Laseranregung die maximale Amplitude bei Blitz zwei zu finden. Nach einer Millisekunde macht sich die starke Amplitudenzunahme der Sauerstoffentwicklung bemerkbar und die maximale Amplitude im Blitzmuster geht auf den dritten Blitz über.

Zur Bestimmung der Amplituden der reinen S-Übergänge wurde nun jedes der 50 Blitzmuster mit einem Kok-Modell simuliert. Ausgehend von einer angenommenen hundertprozentigen Besetzung des  $S_1$ -Zustandes in den dunkeladaptierten Proben (Vermaas et al. 1984) wurde mithilfe der Populationsmatrix die jeweilige Populationsverteilung auf die vier semistabilen S-Zustände nach 1 bis 12 sättigenden Laserpulsen berechnet. (Die zugrundeliegenden mathematischen Details sind im Anhang A dargelegt.) Als einzige Veränderliche geht hier der *miss*-Parameter in die Populationsmatrix ein. „*Double hits*“, von denen man spricht, wenn ein Photosystem bei einer Blitzanregung um zwei Schritte im S-Zyklus voranschreitet, können bei Anregung mit Nanosekunden-Laserpulsen ausgeschlossen werden (Weiss und Sauer 1970). Die Berücksichtigung einer  $S_0$ -Population nach Dunkeladaption erwies sich als nicht notwendig. Die Simulationen der Blitzmuster konnten dadurch nicht verbessert werden. Weitere Veränderliche in der Simulation waren neben dem *miss*-Parameter die gesuchten

Amplituden der vier reinen S-Zustandsübergänge:  $A_{S1 \rightarrow S2}(t_i)$ ,  $A_{S2 \rightarrow S3}(t_i)$ ,  $A_{S3 \rightarrow S0}(t_i)$  und  $A_{S0 \rightarrow S1}(t_i)$ . Die Amplituden, gemessen nach 0 bis 12 Blitzen, konnten nun durch anteilige Addition der vier Amplituden der reinen Übergänge  $A_{S_j \rightarrow S_{j+1}}(t_i)$ , ( $j = 0, \dots, 3$ ), ( $i = 1, \dots, 50$ ) entsprechend der berechneten Populationsverteilung nach der jeweiligen Anzahl von Blitzen simuliert werden. In einem globalen Ansatz wurde die Fehlersumme zwischen simulierten und gemessenen Blitzmustern nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate minimiert, wobei der *miss*-Parameter als globaler Parameter für die Blitzmuster zu verschiedenen Zeitpunkten gleichermaßen variiert wurde. Als Ergebnis dieser Simulation erhält man also Werte für die Amplituden der PBD-Signale der reinen, unvermischte S-Zustandsübergänge zu den 50 verschiedenen Zeitpunkten  $A_{S_j \rightarrow S_{j+1}}(t_i)$ , ( $j = 0, \dots, 3$ ), ( $i = 1, \dots, 50$ ) und einen Wert für den (globalen) *miss*-Parameter  $m$ .



**Abbildung 5-3:** Blitzmuster und Simulationen der PBD-Signalamplituden zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach dem anregenden Laserpuls. Die grauen Balken stellen die jeweilige Amplitudenhöhe dar. Die Zeitpunkte sind oben rechts in den Graphen angegeben. Drei verschiedene Simulationen beruhend auf dem Kok-Modell sind durch schwarze, rote und blaue Symbole repräsentiert. Simulationsdetails im Text.



**Abbildung 5-4:** Residuen der in Abbildung 5-3 dargestellten Simulationen von Blitzmustern nach dem Kok-Modell.

Ein Vorteil dieser Art der Korrektur von gemessenen PBD-Signalen für die Vermischung von S-Zuständen (im Vergleich zu Kapitel 4) ist, dass hier die Informationen von allen Signalen, gemessen bei dreimaligem Durchlaufen des Zyklus, in das Endergebnis einfließen. Auch wenn ein Großteil der extrahierten Information über die S-Zustandsänderungen in den beim ersten Durchlaufen des Zyklus gemessenen Signalen steckt, so wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch Einbeziehung der Signale späterer Blitze weiter verbessert.

Die Ergebnisse der beschriebenen Blitzmuster-Simulation sind in Abbildung 5-3 für die vier gezeigten Zeitpunkte mit schwarzen Symbolen eingezeichnet (Simulation 1). Es ergibt sich ein *miss*-Parameter von 10,4%. Qualitativ wird das Blitzmuster zu allen Zeitpunkten richtig durch die Simulation wiedergegeben. Betrachtet man jedoch die Residuen der in Abbildung 5-3 dargestellten Simulation (Abbildung 5-4), so zeigen sich systematische Abweichungen zu jedem der Zeitpunkte im Bereich von 20  $\mu$ s bis 20 ms.

So liegt die simulierte Amplitude der ersten vier Blitze bei allen vier gezeigten Zeitpunkten deutlich zu tief. Bei den Blitzen fünf und sechs gehen die simulierten über die gemessenen

Signalamplituden hinaus. Eine Berücksichtigung von möglichen Doppelanregungen und einer eventuellen  $S_0$ -Population in dunkeladaptierten PSII-Proben führte zu keiner wesentlichen Verbesserung der Simulation. Die systematischen Abweichungen sprechen vielmehr dafür, dass die Viererperiodizität in den gemessenen Daten gestört ist. Bei Messungen der Fluoreszenz oder Absorption hat sich schon vorher gezeigt, dass dunkeladaptierte PSII-Proben sich bei der ersten Anregung mit einem Laserpuls anders verhalten können als bei darauf folgenden, weiteren Lichtenregungen (Dekker et al. 1984b; Lavergne 1991; de Wijn et al. 2001). Diese Besonderheit wird auf defekte Photosysteme zurückgeführt (siehe auch Kapitel 3.2.2). Als Konsequenz haben einige Autoren darauf verzichtet, Signale, die bei der ersten Lichtenregung aufgenommen wurden, in ihre Datenauswertung einfließen zu lassen (de Wijn und van Gorkom 2001; Jeans et al. 2002; Grabolle und Dau 2007).

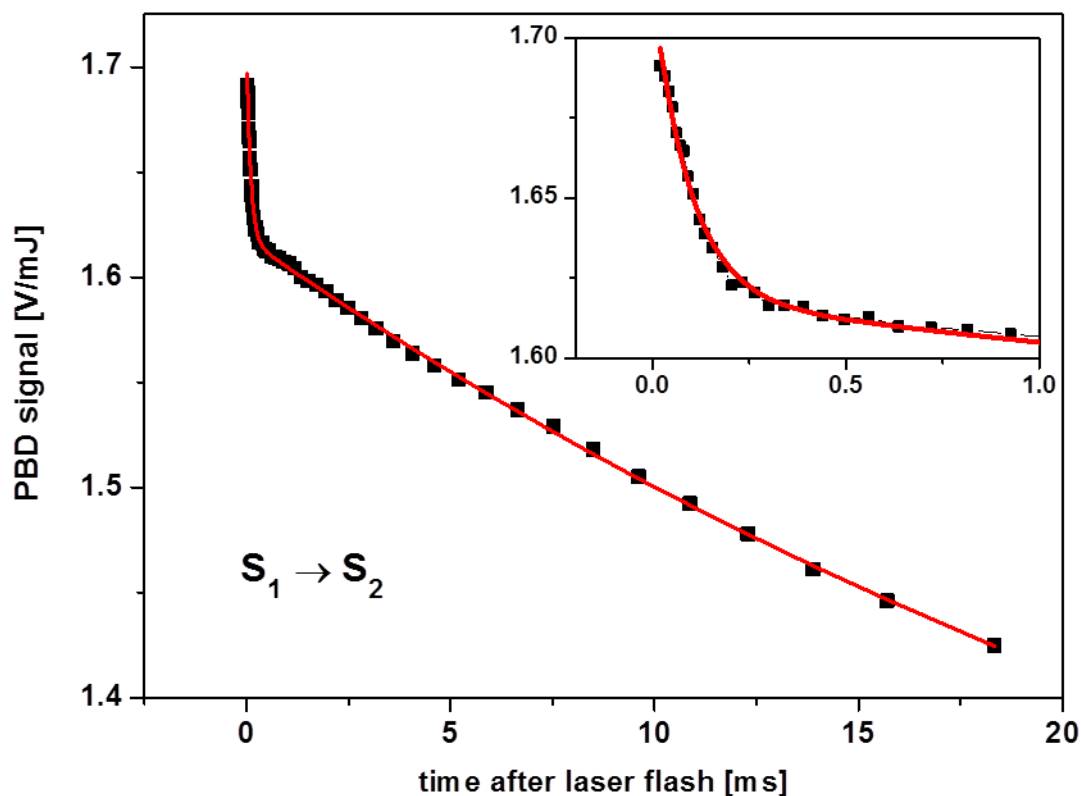
In Analogie dazu wurde auch hier die oben beschriebene Simulation der Blitzmuster mit dem Kok-Modell unter Ausschluss der Amplitude des ersten Blitzes durchgeführt. (Die Abweichung der simulierten Amplitude von der gemessenen des ersten Blitzes geht also nicht in die Fehlersumme ein.) Die Ergebnisse der entsprechenden Simulation 2 sind in Abbildung 5-3 als rote Symbole gezeigt. Die zugehörigen Residuen sind ebenfalls in rot in Abbildung 5-4 dargestellt. Die ähnlich hohen Residuenbeträge wie bei Simulation 1 zeigen, dass die Simulation durch den Ausschluss der Amplituden des ersten Blitzes nicht wesentlich besser geworden ist.

Dass eine bessere Simulation der Blitzmuster mit einem Kok-Modell sehr wohl möglich ist, zeigt die in blau dargestellte Simulation 3 (Abbildung 5-3 und Abbildung 5-4). Hier wurden die Amplituden der PBD-Signale der ersten zwei Anregungsblitze bei der Optimierung der Simulation nicht berücksichtigt. Bei einem sich ergebenden *miss*-Parameter von  $m = 10,9\%$  werden die Blitzmuster von Blitz 3 bis Blitz 12 von Simulation 3 sehr gut beschrieben. Der Vergleich der drei diskutierten Simulationen ist ein Hinweis darauf, dass bei den ersten (zwei) Blitzen Beiträge zum PBD-Signal beobachtet werden, die nicht zyklisch wiederkehren, wie das bei Beiträgen, die mit Donorseitenreaktionen des PSII zusammenhängen, sein müsste.

### 5.2.3 PBD-Signal des $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs

Wegen der Hinweise auf nichtzyklische Beiträge zu den PBD-Signalen, gemessen bei der ersten und zweiten Blitzanregung, wurden diese beiden Signale bei der Korrektur für die S-Zustands-Desynchronisation nicht berücksichtigt (Simulation 3 in Abschnitt 5.2.2). Die bei der Optimierung der Simulation der Blitzmuster erhaltenen Werte der Amplituden  $A_{S_1 \rightarrow S_2}(t_i)$ ,

( $i = 1, \dots, 50$ ) sind in Abbildung 5-5 dargestellt (schwarze Symbole) und ergeben den zeitlichen PBD-Signalverlauf des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs. Da das vom ersten Blitz ausgelöste Signal nicht berücksichtigt wurde, ist der  $S_1 \rightarrow S_2$ -Signalverlauf hauptsächlich aus dem Signal, das bei Blitz fünf gemessen wurde, abgeleitet.



**Abbildung 5-5:** Blitzinduziertes PBD-Signal des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs. Schwarze Symbole geben den durch Korrektur für S-Zustandsdurchmischung (siehe vorhergehender Abschnitt) bestimmten Zeitverlauf der PBD-Amplitude an. Die rote Linie repräsentiert eine Simulation mit der Summe aus zwei exponentiellen Zerfällen und einer Konstante. Die eingesetzte Grafik zeigt den Signalverlauf im Bereich der ersten Millisekunde in vergrößertem Maßstab.

Der PBD-Signalverlauf des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs konnte in guter Näherung mit der Summe zweier Exponentialfunktionen und einer Konstante beschrieben werden. Die beste Übereinstimmung ergab sich bei Werten von  $\tau_1 = 97 \pm 4 \mu\text{s}$  und  $\tau_2 = 35,2 \pm 3,5 \text{ ms}$  für die Zeitkonstanten (siehe auch Tabelle 5-1). (Werte der zugehörigen Amplituden wurden zu  $A_1 = -97 \pm 2 \text{ mV/mJ}$  und  $A_2 = -476 \pm 38 \text{ mV/mJ}$  bestimmt.) Eine Zerfallsphase mit einer Zeitkonstante von rund  $\sim 100 \mu\text{s}$  ist in sehr guter Übereinstimmung mit den entsprechenden Ergebnissen aus Kapitel 4 und kann einer Kontraktion, die mit dem ET vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  beim  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang einhergeht, zugeordnet werden. Die langsame Phase kompensiert hauptsächlich den Zerfall des Wärmesignals, aber auch langsame Akzeptorseiten-Beiträge im



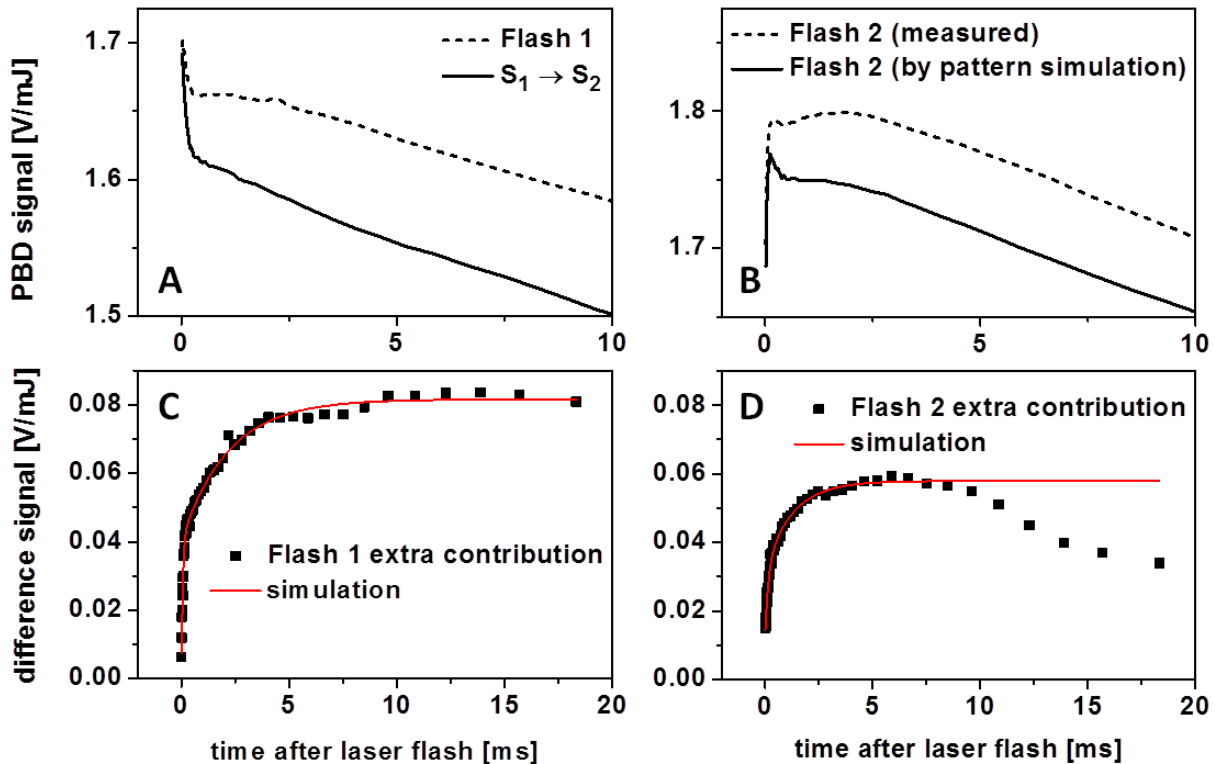
10-ms-Bereich und langsame Drifte der Probensuspension können hier beitragen. Schnelle Akzeptorseiten-Beiträge mit Zeitkonstanten von  $\sim 900 \mu\text{s}$  (siehe Kapitel 3.2) konnten in diesem Signal nicht aufgelöst werden.

#### 5.2.4 Nichtzyklische Beiträge zum PBD-Signal

Amplituden-Blitzmuster konnten am besten mit dem Kok-Modell beschrieben werden, wenn die bei Blitz eins und zwei gemessenen Signale bei der Fehlerminimierung nicht berücksichtigt wurden. Über Simulation 3 (blaue Symbole in Abbildung 5-3) können, beruhend auf den Amplituden bei den Blitzen 3 bis 12, die Amplituden der Blitze 1 und 2 bestimmt werden. Die so bestimmten Werte weichen von den experimentell bestimmten deutlich nach unten ab. Als Funktion der Zeit ist dies in Abbildung 5-6A und B gezeigt. Für den ersten Blitz ist das Signal, das durch Blitzmuster-Simulation bestimmt wird, identisch mit dem Signal des reinen  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs. Die Differenz aus diesem durch Blitzmuster-Simulation bestimmten und dem gemessenen Signal ist in Abbildung 5-6C gezeigt. Die Differenz kann als Signalbeitrag interpretiert werden, der ausschließlich bei der ersten Blitzanregung auftritt. Der Zeitverlauf dieses Differenzsignals konnte zweiphasig simuliert werden. Zeitkonstanten von  $\tau_1 = 70 \mu\text{s}$  und  $\tau_2 = 2,2 \text{ ms}$  wurden gefunden, wobei die zugehörigen Amplituden mit jeweils  $\sim 0,04 \text{ V/mJ}$  etwa gleich groß waren.

Entsprechende Signale des zweiten Blitzes, gemessene und durch Blitzmuster-Simulation bestimmte, sind in Abbildung 5-6B und die Differenz in D dargestellt. Das Differenzsignal zeigte ein ähnliches Zeitverhalten wie beim ersten Blitz. Bei zweiphasiger Simulation ergaben sich ähnliche Zeitkonstanten von  $\tau_1 = 150 \mu\text{s}$  und  $\tau_2 = 1,3 \text{ ms}$ . (Die Simulation wurde hier auf den Zeitbereich von 10 ms nach der Laserpulsanregung beschränkt.) Die Amplituden gingen im Vergleich zum ersten Blitz auf etwa die Hälfte zurück.

Die Tatsache, dass bei der Blitzmuster-Simulation vom dritten Blitz an (Simulation 3 in Abbildung 5-3) keine Unstimmigkeiten festgestellt wurden, lässt vermuten, dass ein möglicher nichtzyklischer Zusatzbeitrag zum Signal des dritten Blitzes noch deutlich kleiner ausfällt als beim zweiten Blitz. Die starke Abnahme der Amplituden von nichtzyklischen „Extrabeiträgen“ mit zunehmender Blitzzahl könnte auf einen schnell sättigenden Effekt als Ursache für die nichtzyklischen Beiträge hindeuten.



**Abbildung 5-6:** Spezielle Beiträge zum PBD-Signal bei der ersten und zweiten Blitzanregung. (A) Die gestrichelte Linie gibt das bei dem ersten Blitz gemessene PBD-Signal wieder. Die durchgezogene Linie zeigt das aus Signalen des dritten bis zwölften Blitzes bestimmte Signal des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs. (B) Die gestrichelte Linie gibt das bei dem zweiten Blitz gemessene PBD-Signal wieder. Die durchgezogene Linie zeigt das aus Signalen des dritten bis zwölften Blitzes bestimmte Signal der zweiten Blitzanregung. (C) Differenzsignal der in A gezeigten Zeitverläufe mit Simulationskurve, bestehend aus der Summe zweier Exponentialfunktionen (rot). (D) Differenzsignal der in B gezeigten Zeitverläufe mit Simulationskurve, bestehend aus der Summe zweier Exponentialfunktionen (rot).

### 5.2.5 PBD-Signal des $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs – Akzeptorseiten-Beiträge

Bereits in Abbildung 5-6B sind bei den PBD-Signalen des zweiten anregenden Laserpulses nach einem schnellen Signalanstieg, bekannt schon aus Kapitel 4 als dominierendes Charakteristikum des durch den zweiten Blitz ausgelösten PBD-Signals, weitere Kinetiken zu vermuten. Zumindest qualitativ ist sowohl bei dem mit Blitz 2 gemessenen Signal als auch bei dem aus der Blitzmuster-Simulation (unter Vernachlässigung des Blitz-2-Signals) bestimmten Signal ähnliches Zeitverhalten zu beobachten. Nach dem schnellen Anstieg folgt ein Zerfall, der von einer erneuten Signalzunahme und schließlich dem Wärmezerfall des Signals überlagert wird.

Zur quantitativen Analyse ist in Abbildung 5-7 der Zeitverlauf des, wie oben beschrieben für S-Zustandsvermischung korrigierten, PBD-Signals des reinen  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs dargestellt

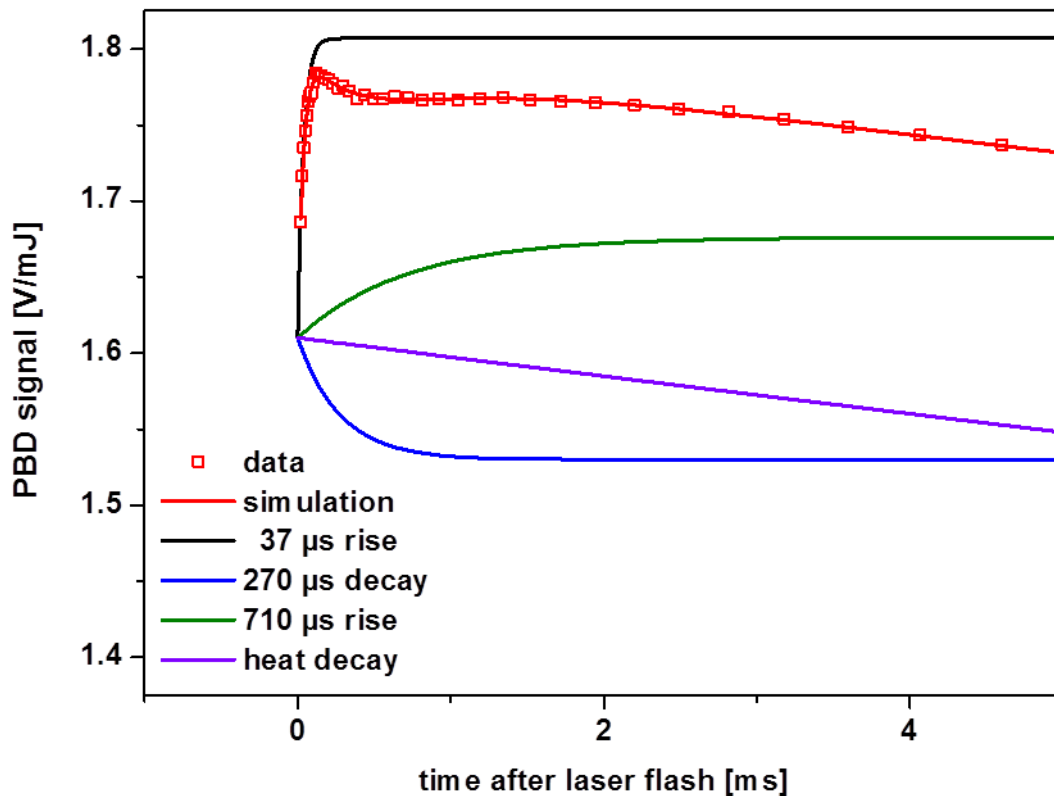
(rote Symbole). Die rote, durchgezogene Linie repräsentiert eine den Daten im Zeitbereich von 20  $\mu\text{s}$  bis 20 ms angepasste Funktion, bestehend aus der Summe von vier Exponentialfunktionen und einer Konstante. Die vier einfachen Exponentialfunktionen, deren Summe die Simulationsfunktion ergibt, sind um den Wert des prompten Signalsprungs  $y_0 = 1,61 \text{ V/mJ}$  versetzt ebenfalls in Abbildung 5-7 eingezeichnet. Die jeweiligen Zeitkonstanten sind in der Legende angegeben. Neben der prominenten Anstiegsphase mit einer Zeitkonstante von 37  $\mu\text{s}$  können dank des guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses zwei weitere Phasen im Sub-Millisekunden-Bereich aufgelöst werden (siehe auch Tabelle 5-1). Mit  $\tau$ -Werten von 270  $\mu\text{s}$  und 710  $\mu\text{s}$  liegen diese kinetisch relativ dicht beieinander. Da sie ähnlich große Amplituden mit entgegengerichteten Vorzeichen haben, heben sie sich in der Summe großteils auf und sind im PBD-Signal nur als relativ kleine Vertiefung mit Minimum bei etwa 0,7 ms auszumachen. Die entsprechenden Daten in Kapitel 4 wiesen kein genügend gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf, um diese Charakteristik des Signals eindeutig zu identifizieren.

Die Zeitkonstante des Sub-Millisekunden-Zerfalls ist mit einem Wert von 270  $\mu\text{s}$  in guter Übereinstimmung mit der ET-Zeit des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs von  $\sim 300 \mu\text{s}$  (Dekker et al. 1984a; Rappaport et al. 1994; Karge et al. 1997; Razeghifard und Pace 1997; Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010). Der negative Wert der zugehörigen Amplitude weist auf eine Kontraktion hin, wie sie auch mit dem ET des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs einhergeht. Eine Zuordnung dieser Phase zum ET  $Y_Z^{\text{ox}}S_2 \rightarrow Y_Z S_3$  ist also naheliegend.

Eine 700- $\mu\text{s}$ -Reaktion an der Donorseite des PSII ist nicht bekannt. Eine Zeitkonstante in diesem Zeitbereich weist eher auf Ladungstransportreaktionen an der Akzeptorseite hin. In Kapitel 3.2 wurde die Zeitkonstante der schnellsten Akzeptorseitenreaktion nach  $Q_A^-$ -Bildung zu 800–900  $\mu\text{s}$  bestimmt. Der ähnliche Wert der Zeitkonstante deutet an, dass die ansteigende Phase des PBD-Signals einen Interchinon-ET abbildet. Die positive Amplitude spricht für eine Expansion, die etwa durch eine Ladungskompensation an der Akzeptorseite ausgelöst werden könnte. Eine Kompensation von Ladungen erfolgt zum Beispiel bei der Chinolbildung im Reaktionsschritt  $Q_A^- + Q_B^-(H^+) + (H^+) \rightarrow Q_A Q_B H_2$ , wie er im PSII nach der zweiten Lichtanregung stattfindet (de Wijn und van Gorkom 2001; Petrouleas und Crofts 2005).

Eine vierte Phase mit einer Zeitkonstante von 115 ms beschreibt den langsamen Signalzerfall in guter Genauigkeit. Mögliche Signalbeiträge langsamer Akzeptorseiten-Reaktionen im

Zeitbereich von 10 ms konnten nicht getrennt vom Wärmezerfall des PBD-Signals aufgelöst werden.



**Abbildung 5-7:** PBD-Signal des klassischen  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs und Simulationen. Die rote, durchgezogene Linie repräsentiert die beste Anpassung einer Funktion, bestehend aus der Summe von vier einfachen Exponentialfunktionen und einer Konstante, an das PBD-Signal (rote Symbole). In Schwarz, Blau, Grün und Violett sind die Verläufe der einzelnen Exponentialfunktionen, versetzt um den prompten Signalsprung  $y_0 = 1,61$  V/mJ dargestellt. Die einzelnen Anpassungsparameter sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst.

**Tabelle 5-1:** Anpassungsparameter der Summe mehrerer Exponentialfunktionen und einer Konstante an die PBD-Signale der vier S-Zustandsübergänge. \*\*, beschränkter Parameter (siehe Abschnitt 5.2.6).

	$S_1 \rightarrow S_2$	$S_2 \rightarrow S_3$	$S_3 \rightarrow S_0$	$S_0 \rightarrow S_1$
$\tau_1$ [ms]	--	$0.037 \pm 0.002$	$0.025 \pm 0.004$	$0.101 \pm 0.005$
$A_1$ [V/mJ]	--	$0.197 \pm 0.005$	$0.033 \pm 0.005$	$0.082 \pm 0.003$
$\tau_2$ [ms]	$0.097 \pm 0.004$	$0.278 \pm 0.108$	$1.604 \pm 0.013$	--
$A_2$ [V/mJ]	$-0.097 \pm 0.002$	$-0.080 \pm 0.044$	$0.424 \pm 0.008$	--
$\tau_3$ [ms]	--	$0.706 \pm 0.271$	--	$0.587 \pm 0.043$
$A_3$ [V/mJ]	--	$0.066 \pm 0.048$	--	$0.060 \pm 0.003$
$\tau_4$ [ms]	$35.2 \pm 3.5$	$115.4 \pm 54.2$	$1000^{**}$	$256.9 \pm 137.2$
$A_4$ [V/mJ]	$-0.476 \pm 0.038$	$-1.461 \pm 0.621$	$-9.448 \pm 0.074$	$-3.205 \pm 1.648$
$y_0$ [V/mJ]	$1.715 \pm 0.038$	$1.611 \pm 0.623$	$1.677 \pm 0.073$	$1.710 \pm 1.649$

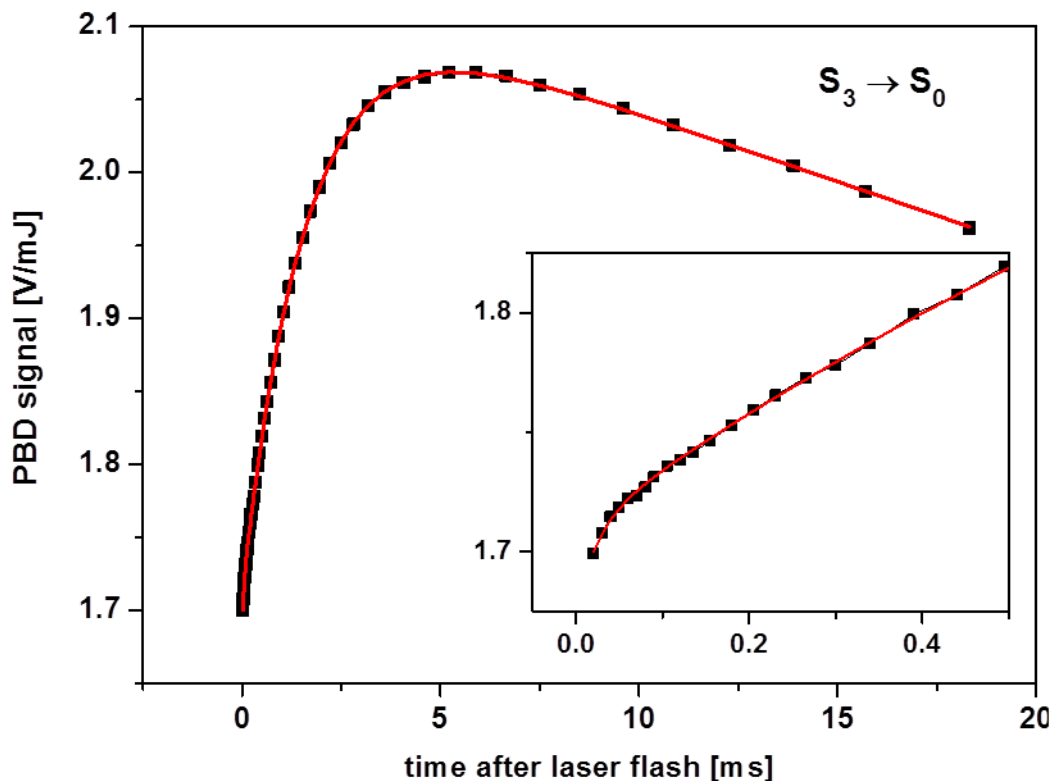
### 5.2.6 PBD-Signal des $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs

Wie in Abbildung 5-8 gezeigt, lässt sich das sehr rauscharme PBD-Signal des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs in guter Übereinstimmung mit drei Exponentialfunktionen beschreiben. Die prominenteste Phase ist wie erwartet ein Signalanstieg mit der charakteristischen Zeitkonstante von 1,6 ms (siehe Tabelle 5-1). Die mit verschiedenen Techniken bestimmte Zeitkonstante der Sauerstoffbildung und der damit einhergehenden Oxidation des Mn-Komplexes (Dekker et al. 1984a; Rappaport et al. 1994; Karge et al. 1997; Razeghifard und Pace 1997; Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010) werden hier in überzeugender Weise reproduziert. Für den langsamen Signalzerfall konnte hier keine Zeitkonstante ermittelt werden. Dafür war der gemessene Zeitbereich mit 20 ms zu kurz. Der Parameter  $\tau_3$  wurde daher nach oben auf einen Wert von 1000 ms beschränkt (in den Tabellen dieses Kapitels mit \*\* gekennzeichnet), um das Konvergieren der Kurvenanpassung zu gewährleisten. Für die in der Simulation bestimmten Parameterwerte der anderen beiden Phasen hat diese (mehr oder weniger beliebig gewählte) Einschränkung keine Auswirkung, da bereits eine Zerfallskonstante von 1000 ms in dem betrachteten Zeitbereich von nur 20 ms kaum von linearem Verhalten abweicht.

In der eingesetzten Grafik in Abbildung 5-8, die den Sub-Millisekunden-Bereich des Signalverlaufs vergrößert darstellt, wird eine kleine, sehr schnell ansteigende Phase sichtbar. Diese 25- $\mu$ s-Phase ist jedoch nah an der zeitlichen Auflösungsgrenze und ihre Eigenschaften sind somit nur ungenau bestimmbar. Verschiedene Szenarien, die zur Entstehung dieses schnellen Signalanstiegs führen könnten, sind vorstellbar:

- So konnte bei photothermischen Messungen an PSII-Proben, deren Mn-Komplex entfernt wurde (siehe Abschnitt 5.2.12), eine ansteigende Phase mit ähnlichen Zeitkonstanten von 20-30  $\mu$ s aber größeren Amplituden gefunden werden. Auch in den aktiven PSII-Proben ist ein gewisser Anteil defekter Photosysteme zu vermuten (~10–15% (de Wijn et al. 2001)). Eine mögliche Erklärung für den schnellen, der Millisekunden-Phase vorgelagerten Anstieg im PBD-Signal des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs könnten demnach Beiträge von defekten Reaktionszentren liefern.
- Aber auch an intakten Photosystemen II wurde gezeigt, dass bereits die Bildung von  $Y_Z^{OX}$  nach Blitzanregung dazu führt, dass über den sogenannten Bohreffekt der pK-Wert von peripheren Basen verändert wird und Protonen mit Zeitkonstanten von 20–50  $\mu$ s in die wässrige Phase freigesetzt werden (Haumann und Junge 1996; Haumann und Junge

1999b; Junge et al. 2002). Eine alternative Erklärung für den 25- $\mu$ s-Anstieg des PBD-Signals könnte demnach mit Deprotonierungen peripherer Basen des PSII gegeben werden. Da die Dielektrizitätskonstante des (wässrigen) Puffers vermutlich größer als die der Protein-Puffer-Grenzphase ist, könnte man dem einfachen Kontinuummodell der Elektrostriktion (Marcus 2011) nach erwarten, dass die durch die positiven Ladung des Protons bedingte Dichtezunahme des umgebenden Mediums im Protein kleiner ausfällt als in der wässrigen Phase des Puffers. Bei Deprotonierung (und Übergang des Protons ins wässrige Medium) wäre demnach eine scheinbare Expansion zu beobachten.



**Abbildung 5-8:** Blitzinduziertes PBD-Signal des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs. Schwarze Symbole geben den durch Korrektur für S-Zustanddurchmischung (siehe Abschnitt 5.2.2) bestimmten Zeitverlauf der PBD-Amplitude wieder. Die rote Linie repräsentiert eine Simulation mit der Summe aus drei Exponentialfunktionen und einer Konstante. Die Werte der Anpassungsparameter sind in Tabelle 5-1 aufgeführt. Die eingesetzte Grafik zeigt den Signalverlauf im Bereich der ersten 0,5 Millisekunden in vergrößertem Maßstab.

Beide Erklärungen implizieren, dass die entsprechende Phase bei den Signalen aller vier S-Übergänge zu beobachten sein sollte. Dies kann tatsächlich nicht ausgeschlossen werden. So wäre ein eventueller 25- $\mu$ s-Anstieg im  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang von dem sehr viel größeren 37- $\mu$ s-Anstieg komplett verdeckt. Auch im PBD-Signal des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs wäre eine Überlagerung des 100- $\mu$ s-Zerfalls mit einem kleinen 25- $\mu$ s-Anstieg kaum aufzulösen.

Entsprechende Simulationsansätze führten weder zur eindeutigen Bestätigung noch zum Ausschluss der Existenz einer solchen Phase. Eine abschließende Besprechung dieser Frage erfolgt am Ende des Kapitels (Abschnitt 5.3) nach Diskussion weiterer diesbezüglich relevanter Ergebnisse.

Eine zusätzliche 200- $\mu$ s-Phase, die im Zusammenhang mit einer spezifischen, dem  $S_3 \rightarrow S_0$ -ET vorausgehenden, protolytischen Reaktion mit Zeitkonstante von  $\sim 200 \mu$ s steht (Rappaport et al. 1994; Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010), ist im PBD-Signal des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs nicht auszumachen. Auch in diesem Punkt bestätigen die qualitativ hochwertigen PBD-Signale, gemessen bei sättigender Laseranregung, die Ergebnisse aus Kapitel 4. Wie in Abschnitt 4.2.4 diskutiert, lassen sich die Expansionen, die bei der Anregung von PSII-Komplexen im  $S_3$ -Zustand mit der Entfernung zweier Protonen und der Sauerstoffbildung einhergehen, kinetisch nicht trennen. Dies ist offensichtlich auch bei verbessertem Signal-zu-Rausch-Verhältnis nicht möglich.

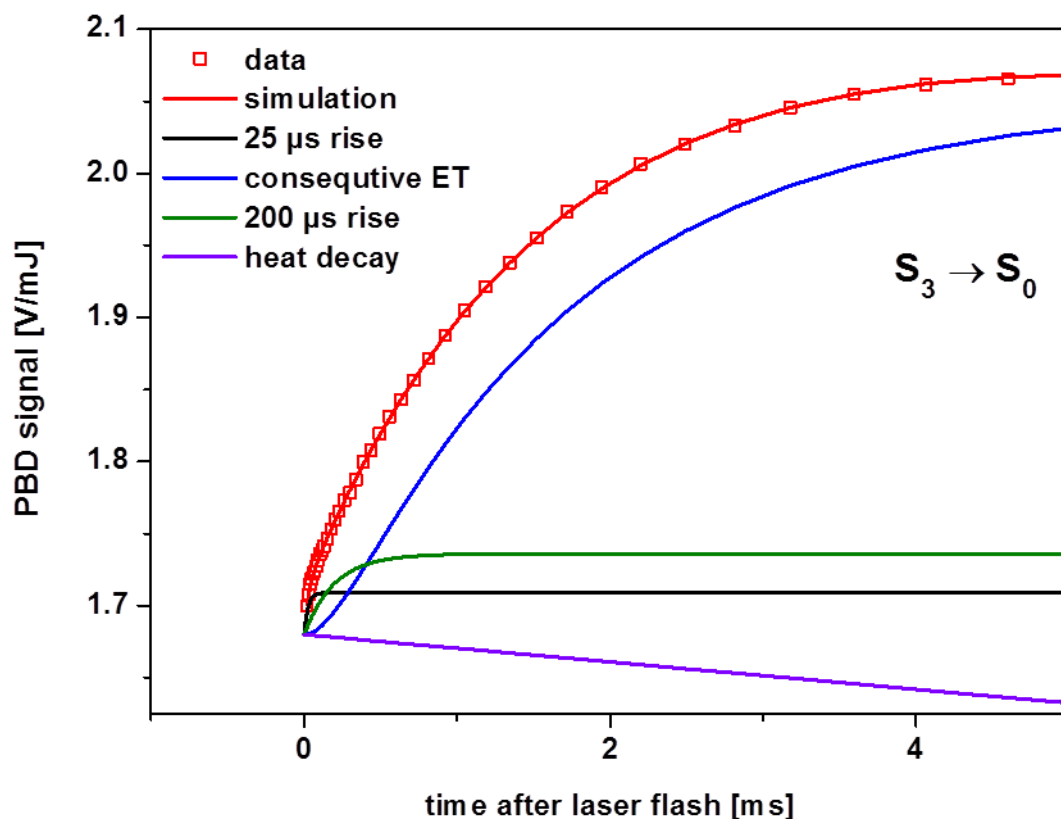
Durch die Blitzanregung von PSII-Proben im  $S_3$ -Zustand wird eine Reihe von Ereignissen im Photosystem ausgelöst, darunter die Bildung eines Sauerstoffmoleküls. Eine Verzögerungsphase des Elektronentransfers von etwa 200  $\mu$ s konnte mit zeitaufgelöster XAFS und UV/Vis-Spektroskopie nachgewiesen werden. Unter der Annahme einer konsekutiven Reaktion wurde der zeitliche Verlauf des ETs erfolgreich durch Gleichung 5.2 simuliert (Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010).

$$A(t) = A_{\max} \left[ 1 + \frac{k_{\text{lag}} \exp(-k_{\text{O}_2} t) - k_{\text{O}_2} \exp(-k_{\text{lag}} t)}{k_{\text{O}_2} - k_{\text{lag}}} \right] \quad (5.2)$$

Die Ratenkonstanten entsprechen den reziproken Zeitkonstanten der Verzögerungsphase  $k_{\text{lag}} = 1/\tau_{\text{lag}}$  und der Sauerstoffbildung  $k_{\text{O}_2} = 1/\tau_{\text{O}_2}$ . Interpretiert wurde die Verzögerungsphase mit der Bildung eines Zwischenzustandes durch die Entfernung eines Protons vom Mn-Komplex vor der Sauerstoffbildung.

Eine solche Verzögerungsphase war im PBD-Signal (Abbildung 5-8) nicht zu finden. In Kapitel 4 wurde diskutiert, dass die Entfernung eines Protons vom Mn-Komplex vor dem  $S_2 \rightarrow S_3$ -ET und nach dem  $S_0 \rightarrow S_1$ -ET jeweils mit einer scheinbaren Expansion einhergeht. Eine Anstiegsphase mit Zeitkonstante im Bereich von 200  $\mu$ s, die den Protonentransfer, der der  $\text{O}_2$ -Bildung vorausgeht, widerspiegelt, sollte demnach auch im entsprechenden PBD-

Signal zu beobachten sein. Ein solcher Signalanstieg ist in Abbildung 5-8 jedoch nicht auszumachen, genauso wenig wie eine Verzögerungsphase.



**Abbildung 5-9:** PBD-Signal des klassischen  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs und eine mögliche Simulation sowie die einzelnen Komponenten der Simulation. Die rote, durchgezogene Linie repräsentiert eine Simulation aus der Summe mehrerer Funktionen (siehe Text) an das PBD-Signal (rote Symbole). In Schwarz, Blau, Grün und Violett sind die Verläufe der einzelnen Funktionen dargestellt, aus deren Summe sich die Simulationsfunktion zusammensetzt. Diese sind um den prompten Signalsprung  $y_0 = 1,68 \text{ V/mJ}$  versetzt dargestellt.

In Anlehnung an die Schlussfolgerungen der Analyse des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Signals im vorhergehenden Abschnitt kann man nun vermuten, dass sich auch das PBD-Signal des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs durch Überlagerung verschiedener Beiträge zusammensetzt. In Abbildung 5-9 ist zur Illustration einer möglichen Überlagerung verschiedener Kinetiken eine Simulation des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Signalverlaufs (rote Symbole) mit der Summe aus einem konsekutiven Reaktionsverlauf nach Gleichung 5.2 und drei einfachen Exponentialfunktionen gezeigt. Die einzelnen Komponenten der angepassten Kurve sind in Schwarz, Blau, Grün und Violett dargestellt. Der blaue Kurvenverlauf zeigt dabei, wie eine Expansion, die mit der Sauerstoffbildung einhergeht, aussehen würde, wenn eine Verzögerung mit Zeitkonstante  $\tau_{\text{lag}} = 200 \text{ } \mu\text{s}$  berücksichtigt wird. Der kleine, in Schwarz gezeigte 25- $\mu\text{s}$ -Anstieg wurde bereits diskutiert. Der langsame Signalzerfall ist violett dargestellt. Für eine Anstiegsphase



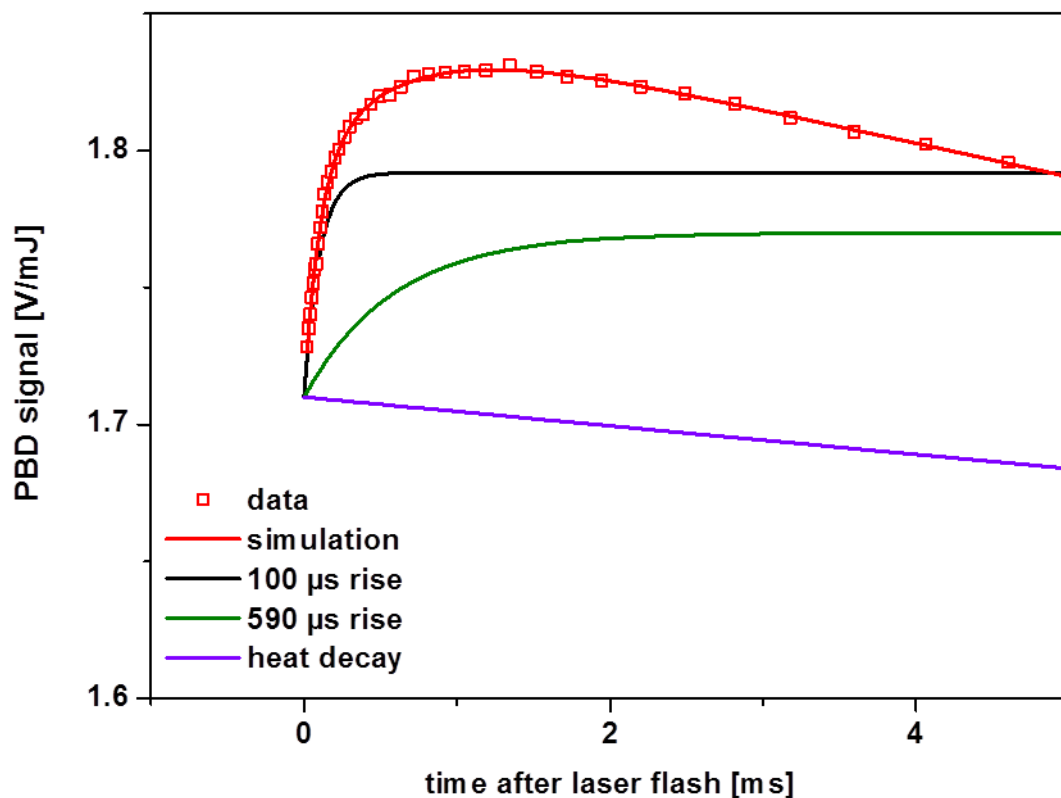
mit 200  $\mu\text{s}$  (grüne Linie) wird bei dieser Simulation eine Amplitude von 0,056 V/mJ gefunden. Diese Amplitude fällt somit etwas kleiner aus als die Amplituden, die protolytischen Reaktionen vor dem  $S_2 \rightarrow S_3$ - und nach dem  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang zugeordnet wurden (siehe Tabelle 3-1). Es zeigt sich, dass eine mögliche Verzögerungsphase in der Volumenzunahme bei der Sauerstoffbildung durch eine scheinbare Expansion von vernünftiger Größenordnung, verbunden mit einer Protonenverschiebung, sehr gut kompensiert werden kann. Das Nichtvorhandensein von offensichtlichen Extraphasen im Zeitbereich von 200  $\mu\text{s}$  im PBD-Signal des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs kann also durch Überlagerung verschiedener Signalbeiträge erklärt werden und führt nicht zu Widersprüchen mit vorherigen Interpretationen.

### 5.2.7 PBD-Signal des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs

Zur Simulation des PBD-Signals des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs waren drei einfache Exponentialfunktionen ausreichend (Abbildung 5-10). Die größte zeitaufgelöste Komponente stellte dabei ein Signalanstieg mit Zeitkonstante von 100  $\mu\text{s}$  dar, was in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Kapitel 4 ist. Diese Phase wurde einer Expansion zugeschrieben, die eine Deprotonierung des Mn-Komplexes nach dem  $S_0 \rightarrow S_1$ -ET widerspiegelt (Abschnitt 4.2.5). Für eine zweite Phase wurde eine Zeitkonstante von 590  $\mu\text{s}$  bestimmt. In Analogie zu einer ähnlichen ansteigenden Phase im PBD-Signal des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs (Abschnitt 5.2.5) liegt auch hier die Vermutung nahe, dass es sich dabei um einen Signalbeitrag von der Akzeptorseite des PSII handelt. Die Zeitkonstante entspricht mit einem Wert von 590  $\mu\text{s}$  nicht exakt den kürzesten in Kapitel 3.2 bestimmten Zeitkonstanten der  $Q_A^-$ -Reoxidation (800–900  $\mu\text{s}$ ). Bekannte Reaktionen an der Donorseite des PSII bei Anregung im  $S_0$ -Zustand sollten nach 600  $\mu\text{s}$  jedoch weitgehend abgeklungen sein. Bedingt durch Unsicherheiten bei der Kurvenanpassung sind beide Zeitkonstanten zudem mit einer gewissen Ungenauigkeit belegt, sodass diese Zuordnung vertretbar ist. Ein weiteres Indiz dafür, dass die ansteigende Phase mit einer Zeitkonstante von mehreren hundert Mikrosekunden Reaktionen an der PSII-Akzeptorseite widerspiegelt, liefert die Zweierperiodizität, die das Auftreten einer solchen Phase nach zwei und nach vier Blitzen zeigt (siehe auch Abschnitt 5.2.1).

Zerfallsphasen mit der jeweiligen Zeitkonstante des ETs vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  wurden sowohl im PBD-Signal des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs als auch des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs ausgemacht. Anzeichen für eine entsprechende Phase mit negativer Amplitude sind in Abbildung 5-10 trotz des guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht zu finden. Dies hatte sich bereits in Abschnitt

5.2.1 angedeutet, in dem gezielt nach bekannten ET-Zeitkonstanten in PBD-Signalen gesucht wurde. Im vorhergehenden Abschnitt wurde im PBD-Signal des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs ein schneller Signalanstieg ( $25 \mu\text{s}$ ) identifiziert und als mögliche Ursache defekte Photosysteme oder Protonierungsreaktionen peripherer Basen diskutiert. Solche Signalbeiträge sollten nach jeder Lichtanregung gleichermaßen aussehen. Nach Blitzanregung im  $S_0$ -Zustand wäre ein entsprechender  $25\text{-}\mu\text{s}$ -Anstieg dem erwarteten Signalzerfall des  $30\text{-}\mu\text{s}$ -ETs (Dekker et al. 1984a; Haumann et al. 2005a) bei fast identischer Zeitkonstante entgegengerichtet und könnte diesen zumindest teilweise aufheben.



**Abbildung 5-10:** PBD-Signal des klassischen  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs und Simulationen. Die rote, durchgezogene Linie repräsentiert die beste Anpassung einer Funktion, bestehend aus der Summe von drei einfachen Exponentialfunktionen und einer Konstante, an das PBD-Signal (rote Symbole). In Schwarz, Grün und Violett sind die Verläufe der einzelnen Exponentialfunktionen, versetzt um den prompten Signalsprung  $y_0 = 1,71 \text{ V/mJ}$ , dargestellt. Die einzelnen Anpassungsparameter sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst.

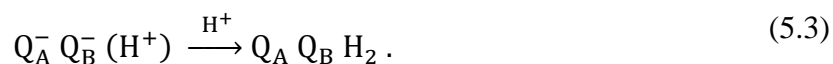
Ein mögliches Indiz zur Unterstützung dieser hochgradig hypothetischen Erklärung für die Nichtsichtbarkeit des  $S_0 \rightarrow S_1$ -ETs ist im Blitzmuster der  $30\text{-}\mu\text{s}$ -Amplitude in Abbildung 5-2 zu finden. Diese mit grünen Symbolen dargestellte Amplitude zeigt bei dem vierten Blitz sein absolutes Minimum nahe einem Wert von  $0 \text{ V/mJ}$ . Da der Wert der  $30\text{-}\mu\text{s}$ -Amplitude bei allen anderen Blitzen einen positiven Wert aufweist, könnte man in diesem Zusammenhang

vermuten, dass ein Signalanstieg mit Zeitkonstante  $\sim 30 \mu\text{s}$ , ausgelöst zum Beispiel durch Prozesse in defekten Photosystemen, auf jedem Blitz erfolgt. Bei Blitz 2 (, 6 und 10) kommt zusätzlich noch der Signalbeitrag des 37- $\mu\text{s}$ -PTs hinzu, sodass dort Maxima im Blitzmuster entstehen. Bei Blitz 4 wird in dieser Hypothese der Beitrag von defekten Photosystemen am effektivsten durch die Kontraktion des ETs kompensiert, was im Blitzmuster als Minimum sichtbar wird. (Eine abschließende Diskussion dieses Punktes erfolgt in Abschnitt 5.3.)

### 5.2.8 Einfluss von DCBQ in hoher Konzentration

Signalanstiege mit Zeitkonstanten im Bereich einiger hundert Mikrosekunden wurden bei PBD-Signalen, die nach Blitzanregung von PSII-Membranpartikeln im  $S_2$ - und im  $S_0$ -Zustand gemessen wurden, gefunden und mit Reaktionen an der Akzeptorseite des PSII in Verbindung gebracht (Abschnitt 5.2.5 und 5.2.7).

Hinweise darauf, dass in PBD-Signalen tatsächlich ET-Reaktionen der Akzeptorseite verfolgt werden können, sind zum einen die Zeitkonstanten von Anstiegsphasen, die Werte ähnlich denen der  $Q_A^-$ -Oxidation aufwiesen (siehe Kapitel 3.2.2.3). Zum anderen deutet das Auftreten dieser Anstiegsphasen bei Anregung von PSII-Proben im  $S_2$ - und im  $S_0$ -Zustand auf eine Zweieroszillation (im Blitzmuster) hin, wie sie typisch für Reaktionen unter Beteiligung der Akzeptorplastochinon-Moleküle ist. Eine Oszillation mit Periode zwei hat sich bei den Blitzmustern der Amplitude einer 900- $\mu\text{s}$ -Phase bereits in Abbildung 5-2 angedeutet. Das locker gebundene Plastochinon  $Q_B$  fungiert als Zweielektronenakzeptor und bildet nach zweifacher Blitzanregung durch die Aufnahme von zwei Elektronen und zwei Protonen Plastochinol, das die Bindungsstelle verlässt und durch oxidiertes Plastochinon aus einem *Pool* ersetzt wird (Petrouleas und Crofts 2005). Die Chinolbildung kann als Ladungsneutralisation angesehen werden:



Die der Akzeptorseite zugeordneten Anstiegsphasen im PBD-Signal könnten demnach die scheinbare Expansion widerspiegeln, die aufgrund von abnehmender Elektrostriktion beim Verschwinden von Ladungen durch Kompensation erwartet werden kann.

Eine Protonenaufnahme, die in PSII-Einheiten nach dem  $Q_A^- \rightarrow Q_B$ -ET beobachtet wurde (Haumann und Junge 1994b), ist wahrscheinlich auf elektrostatisch bedingte pK-Wert-

Änderungen von Aminosäuren als Reaktion auf die  $Q_B^-$ -Bildung zurückzuführen (Zhu und Gunner 2005; Nabedryk und Breton 2008; Chernev et al. 2011). In Analogie zur Deprotonierung von peripheren Aminosäuren an der Grenzfläche zur wässrigen Phase des Lumen, als Reaktion auf  $Y_Z^{ox}$ -Bildung nach Lichtanregung (siehe Abschnitt 5.2.6), stellt sich auch an der Akzeptorseite die Frage nach möglichen Volumenänderungen, die aus solchen Protonenaufnahmereaktionen resultieren. Betrachtet man ausschließlich den Effekt der Elektrostriktion, so würde man für die Überführung einer Ladung aus einer wässrigen Phase (mit hoher Dielektrizitätskonstante) in das Protein (mit viel niedrigerer Dielektrizitätskonstante) eine Kontraktion erwarten. Eine entsprechende Zerfallsphase (mit einer Zeitkonstante von einigen hundert Mikrosekunden) war auf keinem PBD-Signal auszumachen. Insbesondere nicht auf dem Signal des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs, wo sie am besten zu sehen sein sollte. Es lässt sich daher vermuten, dass Protonenaufnahme von peripheren Gruppen keine großen Effektiv-Volumenänderungen verursacht. Eventuell ist die Veränderung der Dielektrizitätskonstante im Grenzbereich Protein/wässrige Phase über einen gewissen Raumbereich „verschmiert“ und der resultierende Elektrostriktionseffekt daher klein. Es deutet sich hier vielmehr an, dass Expansionen im PBD-Signal erst sichtbar werden, wenn  $Q_B H_2$  (nach zwei bzw. vier Blitzen) gebildet wird und noch nicht, wenn Protonen angelagert werden ( $Q_B^-(H^+)$ ), etwa an benachbarten Basen nach der ersten Blitzanregung.

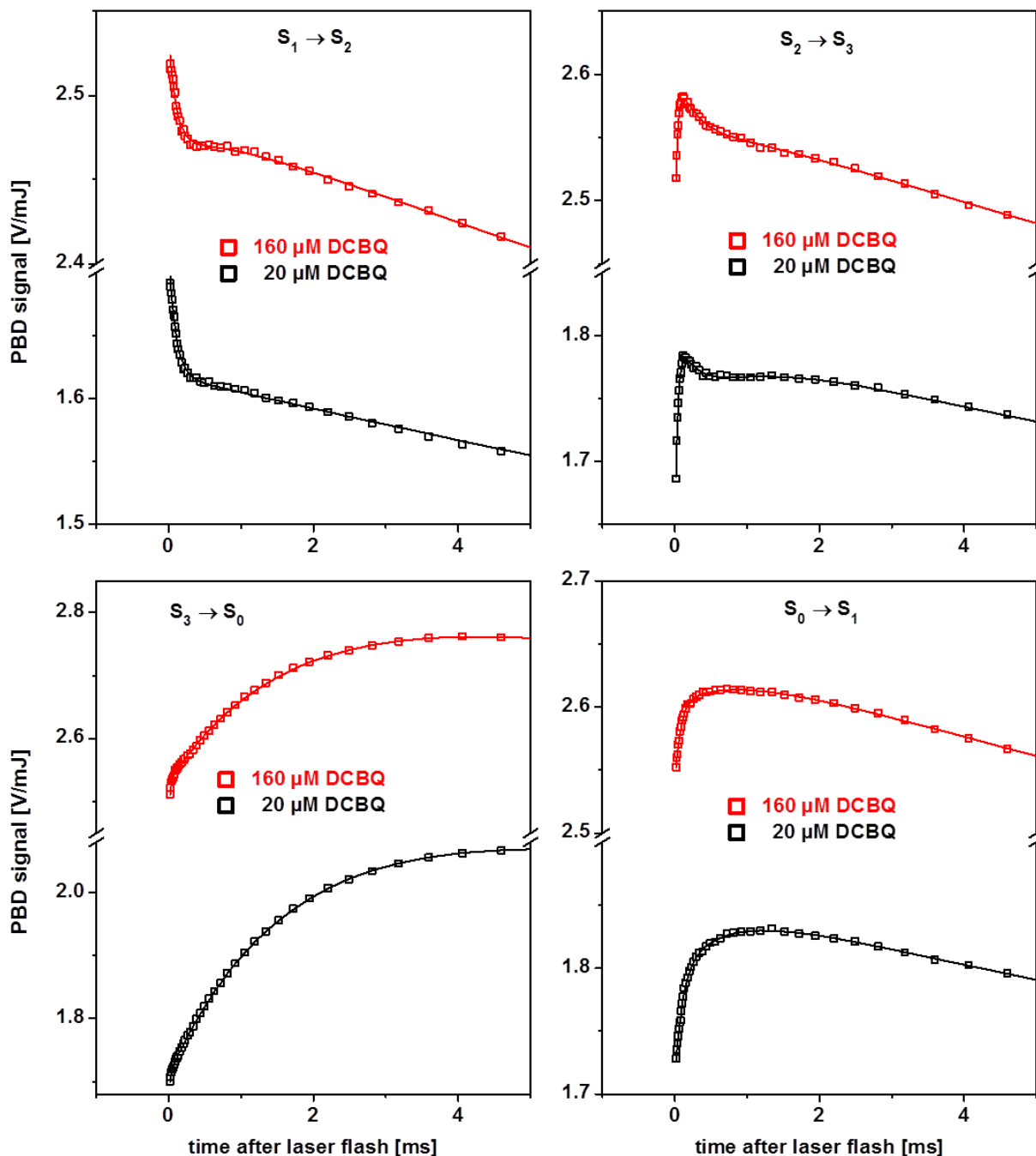
Standardproben bei PBD-Messungen enthielten den exogenen Elektronenakzeptor DCBQ in niedriger Konzentration (20  $\mu M$  bzw.  $\sim 50$  Moleküle pro PSII). Durch Interaktion mit  $Q_A$  oder  $Q_B$  kann DCBQ die sukzessive Reduktion des endogenen Plastochinonpools bei wiederholter Lichtanregung verlangsamen oder bei höherer Konzentration auch ganz unterdrücken, wie in Kapitel 3.2 mit Fluoreszenzmessungen gezeigt wurde. Eine Konzentration entsprechend 400 DCBQ-Molekülen pro Photosystem ist dabei ausreichend, um die durch Ladungstrennung nach Lichtanregung gebildeten Elektronen effektiv aufzunehmen. Für noch höhere DCBQ-Konzentrationen ( $\sim 1500$  Moleküle pro PSII) wurde mit UV-Absorptionsmessungen für Thylakoide gezeigt, dass auch  $Q_B^-$  innerhalb von einer Sekunde effektiv oxidiert wird und somit die Zweierperiodizität im Mess-Signal unterdrückt werden kann (Lavergne 1991).

Um zu überprüfen, ob sich die Blitzmuster-Zweieroszillation von Anstiegsphasen im Zeitbereich mehrerer hundert Mikrosekunden durch eine hohe Konzentration von künstlichem Elektronenakzeptor unterdrücken lässt, werden in Abbildung 5-11 PBD-Signale, die bei einer hohen DCBQ-Konzentration von 160  $\mu M$  gemessen wurden, mit unter Standardbedingungen gemessenen (20  $\mu M$  DCBQ) Signalen verglichen. Der größere promptere Signalsprung der

roten Signale ist dabei nicht auf Unterschiede in den Proben zurückzuführen, sondern auf eine um etwa 30% erhöhte Sensitivität des PBD-Aufbaus bei den Messungen mit hoher DCBQ-Konzentration. Diese wurde durch erneute Feinjustierung der Laserstrahlen zueinander (nach Abschluss der Messungen bei der Standard-DCBQ-Konzentration) erreicht. Trotz der höheren Empfindlichkeit fällt auf, dass die Amplituden der kinetisch aufgelösten Phasen bei den Messungen mit hoher DCBQ-Konzentration kleiner ausfielen als die entsprechenden Amplituden, gemessen unter Standardbedingungen. Die in Tabelle 5-2 aufgelisteten Parameter der als durchgezogene Linien dargestellten Simulationen bestätigen dies quantitativ. So gingen etwa die PBD-Amplituden, die mit dem ET vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{OX}$  einhergehen, (bei hoher DCBQ-Konzentration) um etwa 25% zurück (siehe Reihe  $A_2$  in Tabelle 5-2). Dies deutet auf eine Abnahme der PSII-Aktivität bei hoher DCBQ-Konzentration hin, was in Einklang mit vorherigen Untersuchungen steht (Lavergne 1991). Als einzige Amplitude in Tabelle 5-2 hat der schnelle Anstieg  $A_1$ , der dem  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang vorausgeht, bei hoher DCBQ-Konzentration einen größeren Wert als bei niedriger Konzentration des Elektronenakzeptors. Dieser schnelle Anstieg wurde in Abschnitt 5.2.6 versuchsweise mit defekten Reaktionszentren in Verbindung gebracht. Eine Zunahme dieser Phase bei Abnahme der PSII-Aktivität, wie sie hier beobachtet wird, ist konsistent mit dieser Erklärung.

Kinetische Phasen, die aufgrund ihrer Zeitkonstanten mit Reaktionen der PSII-Akzeptorseite in Verbindung gebracht wurden ( $A_3$  und  $\tau_3$  in Tabelle 5-2), konnten bei PBD-Messungen mit niedriger DCBQ-Konzentration (20  $\mu\text{M}$ ) nur nach der zweiten und der vierten Blitzanregung beobachtet werden. Bei hoher DCBQ-Konzentration konnte hingegen auch eine auf den  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang folgende Anstiegsphase mit entsprechender Zeitkonstante im PBD-Signal aufgelöst werden. Die 700- $\mu\text{s}$ -Phase, die auf den  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang folgt, nahm dagegen bei hoher DCBQ-Konzentration deutlich ab. Die Abnahme war dabei ausgeprägter als die 25%, die wegen der geringeren Aktivität zu erwarten waren. Auch die Akzeptorseiten-Amplitude nach dem  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang fiel nach Zugabe von DCBQ in hoher Konzentration kleiner aus. Unter dem dominanten PBD-Signal der Sauerstoffentwicklung war ein möglicher Beitrag der Akzeptorseite, der erwartungsgemäß eine Größenordnung kleiner ausfallen dürfte, nicht auszumachen. Das Bild, das sich hier abzeichnet, spricht dafür, dass die Blitzmuster-Oszillation, die sich durch Auftreten einer 700- $\mu\text{s}$ -Phase nach Anregung im  $S_2$ - und  $S_0$ -Zustand manifestiert, durch Zugabe von DCBQ in hoher Konzentration unterdrückt wird. Auch wenn man für  $S_3$  keine Aussage treffen kann, sieht es so aus, dass Expansionen

aufgrund von Ladungskompensation an der Akzeptorseite sich gleichmäßiger auf alle vier S-Zustandsübergänge verteilen, wenn DCBQ in genügend hoher Konzentration vorhanden ist. Dies steht in Einklang mit der Annahme, dass DCBQ als Einelektronenakzeptor das Chinon  $Q_B$  effektiv ersetzen kann (Bogershausen und Junge 1995; Bukhov et al. 2003).



**Abbildung 5-11:** PBD-Signale der vier S-Zustandsübergänge bei jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen des künstlichen Elektronenakzeptors DCBQ. Rote Symbole geben die Signale bei einer DCBQ-Konzentration von  $160 \mu\text{M}$  wieder, schwarze bei einer Konzentration von  $20 \mu\text{M}$ . Durchgezogene Linien repräsentieren Simulationen bestehend aus der Summe mehrerer Exponentialfunktionen und einer Stufenfunktion. Die zugehörigen Anpassungsparameter sind in Tabelle 5-2 aufgeführt.

**Tabelle 5-2:** Anpassungsparameter der Simulation von PBD-Signalen der vier S-Zustandsübergänge bei zwei verschiedenen DCBQ-Konzentrationen mit Summen aus Exponentialfunktionen. \*\*, beschränkter Parameter (siehe Abschnitt 5.2.6).

	$S_1 \rightarrow S_2$		$S_2 \rightarrow S_3$		$S_3 \rightarrow S_0$		$S_0 \rightarrow S_1$	
[DCBQ]	20 $\mu\text{M}$	160 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	160 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	160 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	160 $\mu\text{M}$
$\tau_1$ [ms]	--	--	<b>0.037 <math>\pm</math></b> <b>0.002</b>	<b>0.033 <math>\pm</math></b> <b>0.002</b>	<b>0.025 <math>\pm</math></b> <b>0.004</b>	<b>0.019 <math>\pm</math></b> <b>0.003</b>	<b>0.101 <math>\pm</math></b> <b>0.005</b>	<b>0.074 <math>\pm</math></b> <b>0.004</b>
$A_1$ [V/mJ]	--	--	0.197 $\pm$ 0.005	0.152 $\pm$ 0.005	0.033 $\pm$ 0.005	0.069 $\pm$ 0.011	0.082 $\pm$ 0.003	0.066 $\pm$ 0.002
$\tau_2$ [ms]	<b>0.097 <math>\pm</math></b> <b>0.004</b>	<b>0.100*</b>	<b>0.278 <math>\pm</math></b> <b>0.108</b>	<b>0.284 <math>\pm</math></b> <b>0.114</b>	<b>1.604 <math>\pm</math></b> <b>0.013</b>	<b>1.666 <math>\pm</math></b> <b>0.015</b>	--	--
$A_2$ [V/mJ]	-0.097 $\pm$ 0.002	-0.067 $\pm$ 0.004	-0.080 $\pm$ 0.044	-0.058 $\pm$ 0.035	0.424 $\pm$ 0.003	0.316 $\pm$ 0.002	--	--
$\tau_3$ [ms]	--	<b>0.704 <math>\pm</math></b> <b>0.215</b>	<b>0.706 <math>\pm</math></b> <b>0.271</b>	<b>0.726 <math>\pm</math></b> <b>0.595</b>	--	--	<b>0.587 <math>\pm</math></b> <b>0.043</b>	<b>0.739 <math>\pm</math></b> <b>0.062</b>
$A_3$ [V/mJ]	--	0.017 $\pm$ 0.003	0.066 $\pm$ 0.048	0.025 $\pm$ 0.037	--	--	0.060 $\pm$ 0.003	0.037 $\pm$ 0.003
$\tau_4$ [ms]	<b>35.2 <math>\pm</math></b> <b>3.5</b>	<b>326.5 <math>\pm</math></b> <b>335.7</b>	<b>115.4 <math>\pm</math></b> <b>54.2</b>	<b>55.5 <math>\pm</math></b> <b>7.9</b>	<b>1000**</b>	<b>1000**</b>	<b>256.9 <math>\pm</math></b> <b>137.2</b>	<b>420.2 <math>\pm</math></b> <b>283.5</b>
$A_4$ [V/mJ]	-0.476 $\pm$ 0.038	-5.018 $\pm$ 5.004	-1.461 $\pm$ 0.621	-1.016 $\pm$ 0.118	-9.448 $\pm$ 0.074	-14.36 $\pm$ 0.115	-3.205 $\pm$ 1.648	-6.537 $\pm$ 4.305
$y_0$ [V/mJ]	<b>1.715 <math>\pm</math></b> <b>0.038</b>	<b>2.536 <math>\pm</math></b> <b>5.006</b>	<b>1.611 <math>\pm</math></b> <b>0.623</b>	<b>2.450 <math>\pm</math></b> <b>0.119</b>	<b>1.677 <math>\pm</math></b> <b>0.073</b>	<b>2.455 <math>\pm</math></b> <b>0.114</b>	<b>1.710 <math>\pm</math></b> <b>1.649</b>	<b>2.535 <math>\pm</math></b> <b>4.306</b>

### 5.2.9 Kinetischer H/D-Isotopenaustausch-Effekt

Proton/Deuteron-Isotopenaustausch-Experimente, die bereits in Kapitel 4.2 interessante Ergebnisse gebracht hatten, wurden mit dem auf die Auflösung kinetischer Phasen optimierten PBD-Aufbau wiederholt. Entsprechende Signale sind in Abbildung 5-12 dargestellt. Die deutlichen Unterschiede des prompten Sprungs (Signalversatz) zwischen den Signalen, gemessen in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$ , sind auf die Unterschiede der entsprechenden thermoelastischen Konstanten der beiden Lösungsmittel zurückzuführen (siehe auch Abbildung 4-2). Dies führt dazu, dass bei gleicher Temperatur die gleiche Menge an freigesetzter Wärme in  $\text{D}_2\text{O}$  zu einem wesentlich kleineren photothermischen Signal führt als in  $\text{H}_2\text{O}$ .

Die Korrektur für die Desynchronisation von S-Zuständen bei wiederholter Blitzanregung nach Abschnitt 5.2.2 ergab einen *miss*-Parameter von 16,2% in  $\text{D}_2\text{O}$  (in  $\text{H}_2\text{O}$  waren es 10,9%).

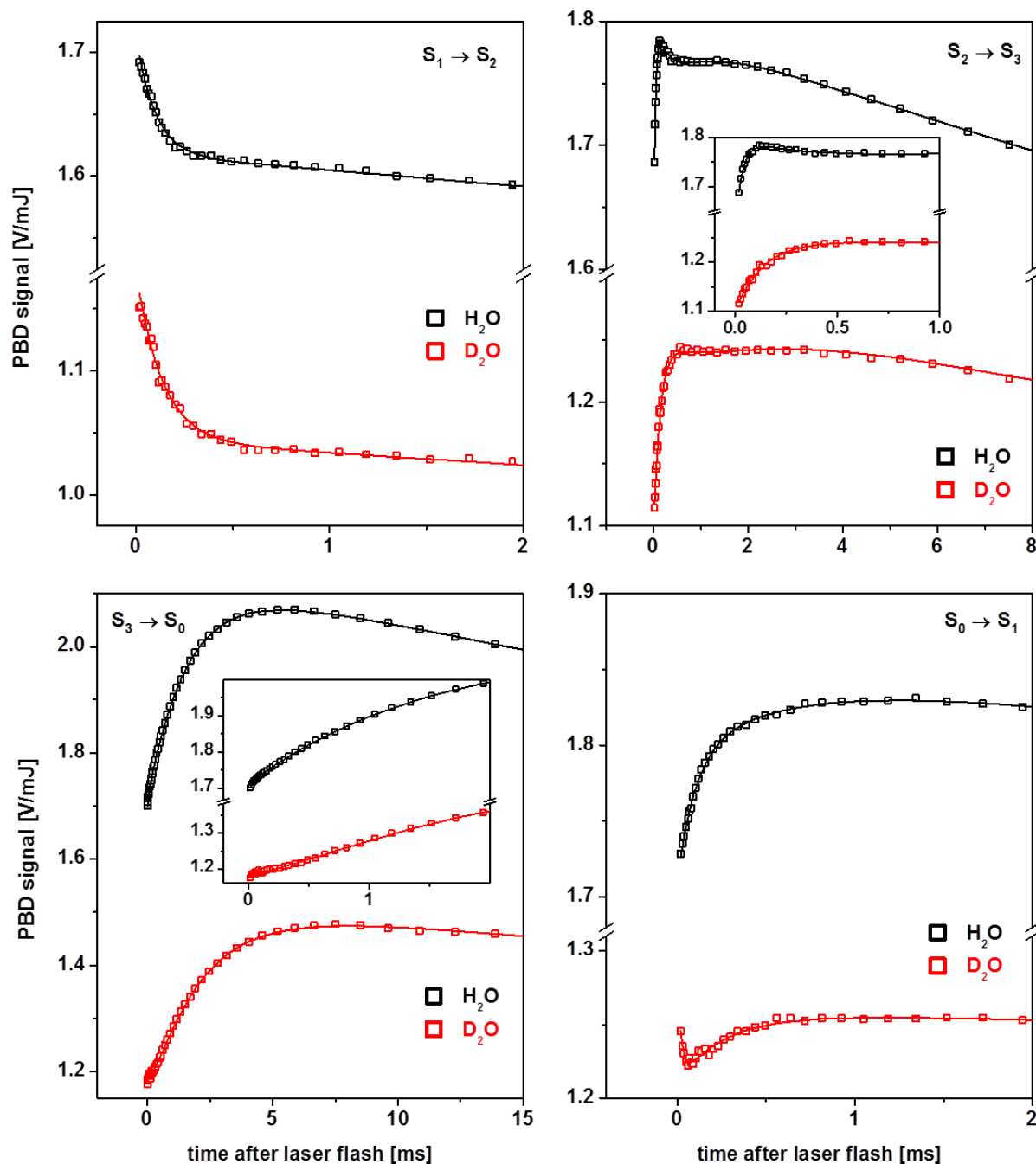
In Übereinstimmung mit vorherigen Beobachtungen nahm der *miss*-Parameter bei H/D-Isotopenaustausch also zu (Haumann et al. 1997; Gerencser und Dau 2010). Die Parameter der als durchgezogene Linien in Abbildung 5-12 dargestellten Simulationen werden in Tabelle 5-3 für die Messungen in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O zum Vergleich gegenübergestellt. Die Reihen  $\tau_2$  und  $A_2$  beinhalten dabei die Anpassungsparameter der Phasen, die Zeitkonstanten ähnlich denen der ETs zwischen Mn-Komplex und  $Y_Z^{\text{ox}}$  aufwiesen.

**S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>:** Der entsprechende Zerfall des PBD-Signals, gemessen nach Laseranregung von PSII-Proben im S<sub>1</sub>-Zustand, wies demnach einen kinetischen H/D-Isotopen-Effekt (H/D-KIE) von  $134 \mu\text{s}/97 \mu\text{s} = 1,38$  auf. Dieser Wert ist nahe dem in Abschnitt 4.2 bestimmten Wert von 1,3. Er ist jedoch etwas größer als mit anderen Techniken bestimmte Werte für den Einfluss von H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O-Austausch auf den reinen ET des S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>-Übergangs (~1,2 in (Gerencser und Dau 2010)).

**S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>:** Photothermische Signale des S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>-Übergangs konnten in einem Zeitbereich von 20 ms in guter Näherung durch eine Summe aus vier Exponentialfunktionen beschrieben werden. Während jedoch bei dem unter Standardbedingungen gemessenen Signal der dem schnellen Anstieg folgende Zerfall und der erneute Anstieg genügend gut voneinander getrennt waren, um durch Optimierung der Kurvenanpassung entsprechende Zeitkonstanten bestimmen zu können, war dies beim D<sub>2</sub>O-Signal nicht der Fall. Eine dem ersten Anstieg folgende „Kuhle“ deutete auch hier einen Zerfall (vor erneutem Anstieg) an, dieses Merkmal war jedoch schwach ausgeprägt und die Kurvenanpassung entsprechend unsicher. Um trotzdem eine sinnvolle Simulation durchführen zu können, wurde die Anzahl freier Anpassungsparameter reduziert, indem Werte für die beiden Parameter  $\tau_2$  und  $\tau_3$  eingeführt und in der Kurvenoptimierung konstant gehalten wurden. Der Logik folgend, dass (wie bei den PBD-Signalen in H<sub>2</sub>O) Phasen mit Zeitkonstanten des ETs zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  und solche mit Zeitkonstanten des ETs an der Akzeptorseite auftreten, wurde für  $\tau_2$  ein der Literatur entnommener Wert von ~500  $\mu\text{s}$  für die Oxidation des Mn-Komplexes im S<sub>2</sub>-Zustand in D<sub>2</sub>O angenommen (Gerencser und Dau 2010). Für  $\tau_3$  wurde entsprechend der in Kapitel 3.2.2.4 bestimmte Wert der schnellsten Akzeptorseiten-ET-Reaktion in D<sub>2</sub>O von 1,90 ms gewählt. Die beiden fixierten Parameter sind in Tabelle 5-3 mit \* gekennzeichnet. Der Signalverlauf ließ sich mit den gewählten Zeitkonstanten gut beschreiben. Wie erwartet ergab sich für eine Phase mit Zeitkonstante des S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>-ETs eine scheinbare Kontraktion (negative Amplitude). Die Amplitude fiel dabei in D<sub>2</sub>O etwas kleiner aus als in H<sub>2</sub>O, der Unterschied ist im Rahmen der Ungenauigkeit jedoch nicht als signifikant anzusehen. Die scheinbare Expansion mit



Zeitkonstante des akzeptorseitigen ETs war in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  ähnlich groß. Für das Hauptmerkmal des PBD-Signals des  $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ -Übergangs, den schnellen Signalanstieg, ergibt sich der H/D-KIE zu  $150 \mu\text{s}/37 \mu\text{s} = 4,1$ . Der etwas niedrigere Wert als in Abschnitt 4.2 resultiert wahrscheinlich aus der Aufnahme zusätzlicher Phasen in die Simulationsfunktion.



**Abbildung 5-12:** PBD-Signale der vier S-Zustandsübergänge in  $\text{H}_2\text{O}$  und in  $\text{D}_2\text{O}$ . Rote Symbole geben die Signale gemessen nach H/D-Isotopenaustausch an, schwarze unter Standardbedingungen. Durchgezogene Linien repräsentieren Simulationen, bestehend aus der Summe mehrerer Exponentialfunktionen und einer Sprungfunktion. Die zugehörigen Anpassungsparameter sind in Tabelle 5-3 aufgeführt. Die eingesetzten Grafiken zeigen die jeweiligen Signalverläufe auf einer vergrößerten Zeitskala.

**Tabelle 5-3:** Anpassungsparameter der Simulation von PBD-Signalen der vier S-Zustandsübergänge, gemessen unter Standardbedingungen und nach Austausch der Protonen durch Deuteronen. Simulationsfunktionen bestanden aus Summen von zwei bis vier Exponentialfunktionen und einer Konstante. Mit \* gekennzeichnete Werte wurden bei der Kurvenanpassung nicht variiert. \*\*, beschränkter Parameter (siehe Abschnitt 5.2.6).

	$S_1 \rightarrow S_2$		$S_2 \rightarrow S_3$		$S_3 \rightarrow S_0$		$S_0 \rightarrow S_1$	
	H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O
$\tau_1$ [ms]	--	--	<b>0.037 ±</b> <b>0.002</b>	<b>0.150 ±</b> <b>0.013</b>	<b>0.025 ±</b> <b>0.004</b>	<b>0.423 ±</b> <b>0.085</b>	<b>0.101 ±</b> <b>0.005</b>	<b>0.257 ±</b> <b>0.039</b>
$A_1$ [V/mJ]	--	--	0.197 ± 0.005	0.169 ± 0.012	0.033 ± 0.005	-0.057 ± 0.013	0.082 ± 0.003	0.044 ± 0.003
$\tau_2$ [ms]	<b>0.097 ±</b> <b>0.004</b>	<b>0.134 ±</b> <b>0.003</b>	<b>0.278 ±</b> <b>0.108</b>	<b>0.500*</b>	<b>1.604 ±</b> <b>0.013</b>	<b>2.028 ±</b> <b>0.088</b>	--	<b>0.020 ±</b> <b>0.004</b>
$A_2$ [V/mJ]	-0.097 ± 0.002	-0.138 ± 0.003	-0.080 ± 0.044	-0.052 ± 0.019	0.424 ± 0.003	0.386 ± 0.003	--	-0.086 ± 0.016
$\tau_3$ [ms]	--	--	<b>0.706 ±</b> <b>0.271</b>	<b>1.900*</b>	--	--	<b>0.587 ±</b> <b>0.043</b>	<b>1.900*</b>
$A_3$ [V/mJ]	--	--	0.066 ± 0.048	0.062 ± 0.009	--	--	0.060 ± 0.003	0.015 ± 0.004
$\tau_4$ [ms]	<b>35.2 ±</b> <b>3.5</b>	<b>27.4 ±</b> <b>4.4</b>	<b>115.4 ±</b> <b>54.2</b>	<b>1000**</b>	<b>1000**</b>	<b>1000**</b>	<b>256.9 ±</b> <b>137.2</b>	<b>1000**</b>
$A_4$ [V/mJ]	-0.476 ± 0.038	-0.290 ± 0.035	-1.461 ± 0.621	-7.317 ± 0.255	-9.448 ± 0.074	-3.793 ± 0.336	-3.205 ± 1.648	-5.941 ± 1.142
$y_0$ [V/mJ]	<b>1.715 ±</b> <b>0.038</b>	<b>1.182 ±</b> <b>0.035</b>	<b>1.611 ±</b> <b>0.623</b>	<b>1.099 ±</b> <b>0.253</b>	<b>1.677 ±</b> <b>0.073</b>	<b>1.183 ±</b> <b>0.332</b>	<b>1.710 ±</b> <b>1.649</b>	<b>1.297 ±</b> <b>0.140</b>

$S_3 \rightarrow S_0$ : Das prominenteste Merkmal des PBD-Signals nach Blitzanregung von PSII-Membranpartikeln im  $S_3$ -Zustand ist auch in  $D_2O$  ein Millisekunden-Anstieg. Der H/D-KIE, der sich hier zu  $2,028 \text{ ms}/1,604 \text{ ms} = 1,26$  ergab, steht in guter Übereinstimmung zu dem in Abschnitt 4.2 bestimmten Wert von 1,3. Auch in der Literatur findet man ähnliche Werte für die Verlangsamung der Sauerstoffbildung bzw. des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs (Haumann et al. 1997; Gerencser und Dau 2010). Der Millisekunden-Anstieg scheint in  $D_2O$  leicht sigmoidal zu verlaufen. In der Kurvenanpassung mit der Summe dreier Exponentialfunktionen zeigt sich dies in einer  $\sim 400\text{-}\mu\text{s}$ -Phase mit negativer Amplitude. Eine Verzögerung des sauerstoffbildenden Schritts um etwa  $400 \mu\text{s}$  in  $D_2O$  (und  $\sim 200 \mu\text{s}$  in  $H_2O$ ) ist bereits beobachtet worden (Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010). Eine ähnliche Verzögerungsphase war in PBD-Signalen, die in  $H_2O$  gemessen wurden, nicht zu beobachten, wie in Abschnitt 5.2.6 diskutiert ist.

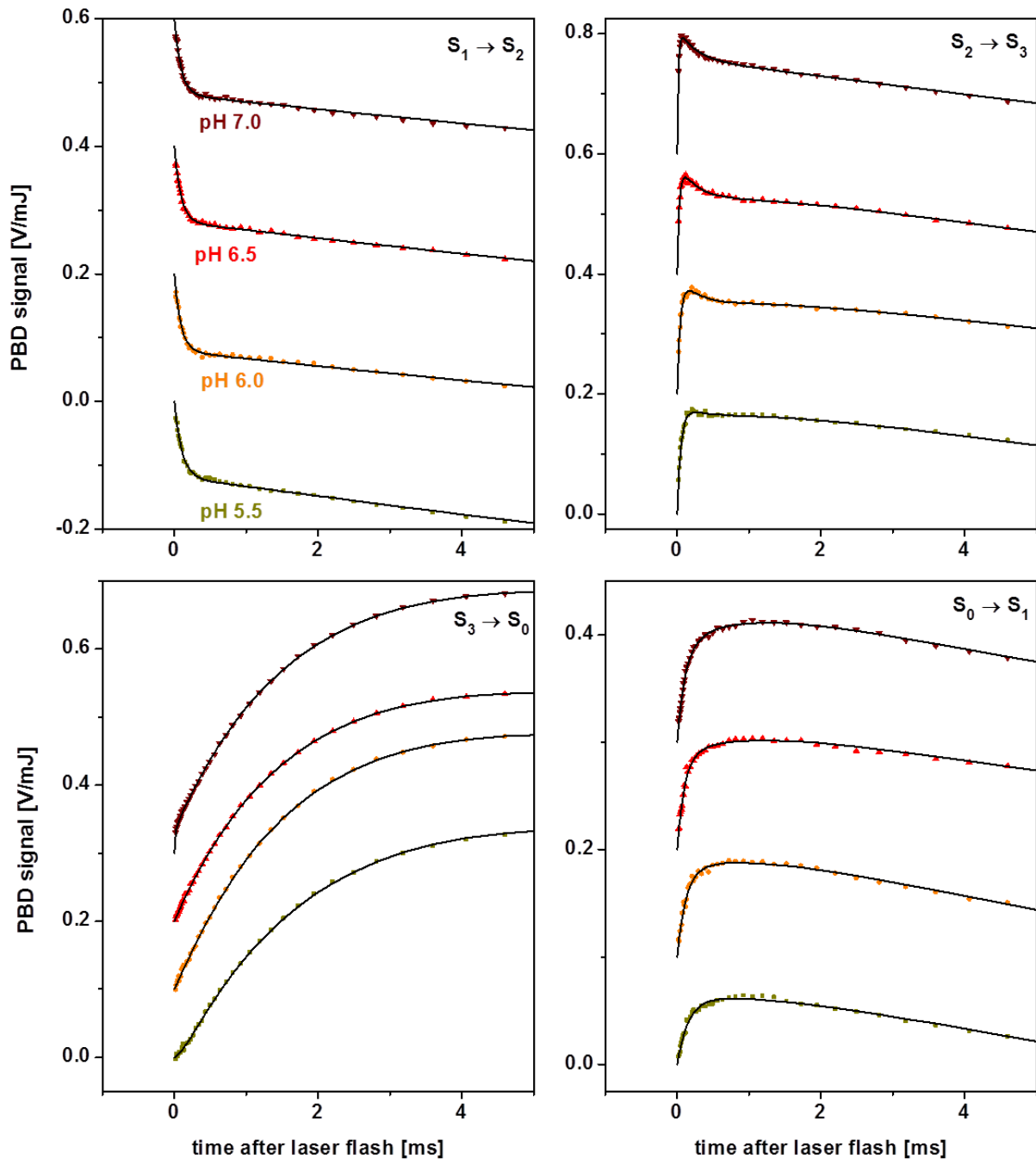
**S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub>:** Die vielleicht interessantesten Ergebnisse dieser Messreihe ergaben sich für die Signale, die durch Anregung von PSII-Komplexen im S<sub>0</sub>-Zustand ausgelöst wurden. Die in H<sub>2</sub>O- und D<sub>2</sub>O-Puffer gemessenen Signale unterschieden sich deutlich. So ist auf dem roten Signal in Abbildung 5-12D ein sehr schneller Zerfall zu sehen, der sich im schwarzen Signal nicht ansatzweise andeutet. Zur Simulation wurde daher für das D<sub>2</sub>O-Signal eine weitere Exponentialfunktion einbezogen. Um eine Überparametrisierung bei Anpassung einer Summe aus vier Exponentialfunktionen zu vermeiden, wurde für den erwarteten Signalbeitrag der Akzeptorseite eine Zeitkonstante ( $\tau_3 = 1900 \mu\text{s}$ ) auf den in Kapitel 3.2 bestimmten Wert für Interchinon-ET festgesetzt. (Der entsprechende Wert ist in Tabelle 5-3 mit \* gekennzeichnet.) Für den schnellen Zerfall ergab sich eine Zeitkonstante von  $\tau_2 = 20 \mu\text{s}$ . Dieser Wert ist etwas kleiner als ein Wert von  $>30 \mu\text{s}$ , den man aufgrund der Literaturlage für die Zeitkonstante des ETs im S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub>-Übergang in D<sub>2</sub>O erwarten würde (Dekker et al. 1984a; Haumann et al. 2005a). Eine solch schnelle Phase liegt jedoch nahe der Auflösungsgrenze des Experiments und der angegebene 1 $\sigma$ -Fehler, der sich aus der Kurvenanpassung formal ergibt, stellt eher eine sehr optimistische Abschätzung dar. Eine Zerfallskonstante mit einem Wert von  $>30 \mu\text{s}$  kann mit den in Abbildung 5-12D gezeigten Daten nicht ausgeschlossen werden. Der schnellste Anstieg hat nach der beschriebenen Simulation eine Anstiegs-Zeitkonstante von  $\tau_1^{\text{D}_2\text{O}} = 257 \mu\text{s}$ . Mit dem entsprechenden Wert von  $\tau_1^{\text{H}_2\text{O}} = 101 \mu\text{s}$  ergibt sich ein H/D-KIE von 2,54. Dies ist in vernünftiger Übereinstimmung mit dem in Kapitel 4 bestimmten Wert von 3,0.

### 5.2.10 pH-Abhängigkeit

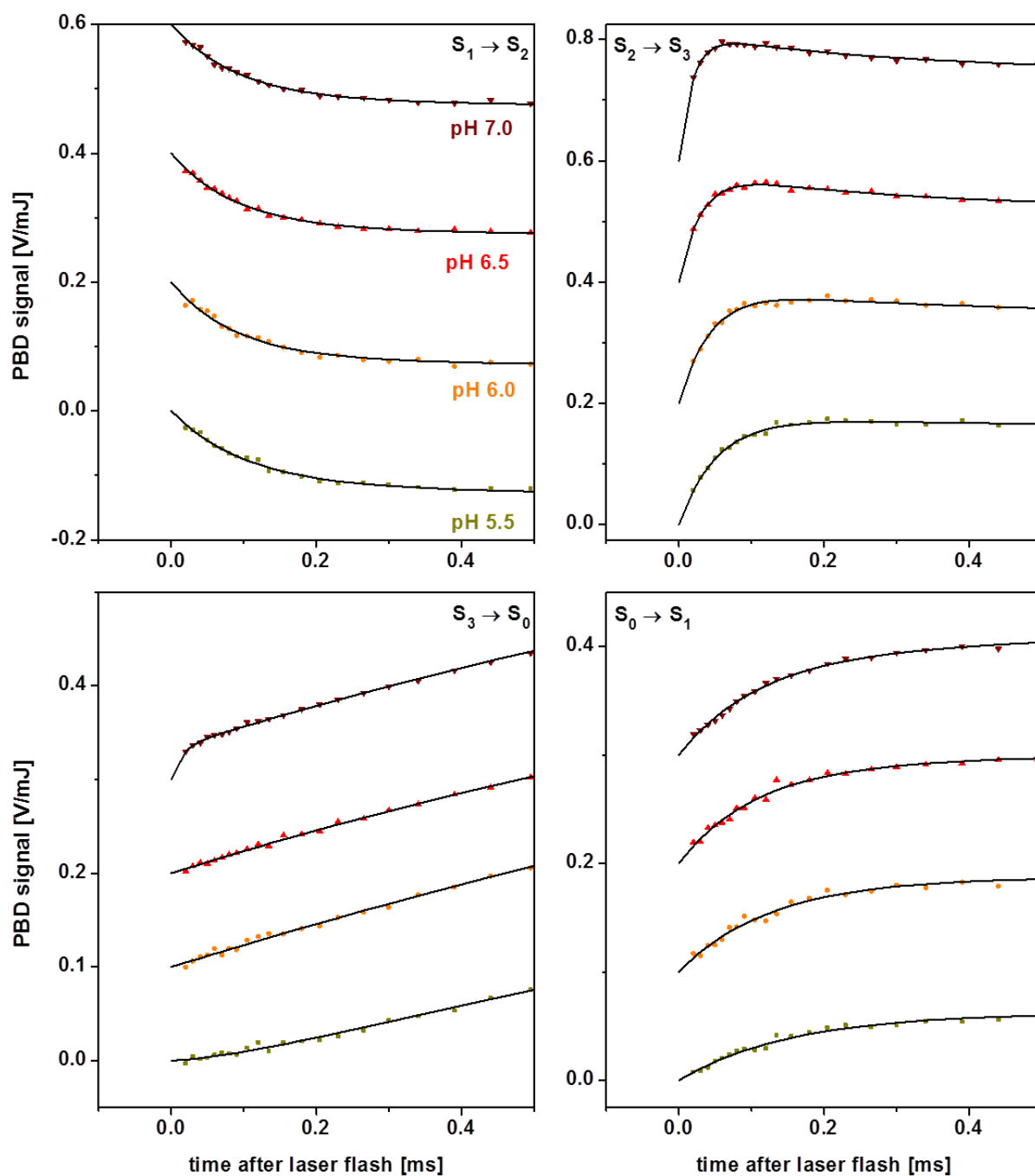
Mit abnehmendem pH-Wert nahm der *miss*-Parameter, mit dem PBD-Signale für die Vermischung der S-Zustände korrigiert werden mussten, von 8,9% bei pH 7,0 auf 14,8% bei pH 5,5 zu. Dieser Effekt ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden (Messinger und Renger 1994; Christen et al. 1999; Grabolle und Dau 2007; Gerencser und Dau 2010).

**S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>:** Die PBD-Signale des S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>-Übergangs zeigen zwischen pH 5,5 und 7,0 kaum Veränderungen. Alle vier Signale in Abbildung 5-13A lassen sich mit zwei exponentiellen Zerfällen beschreiben, wobei der langsame Signalzerfall nicht weiter betrachtet werden soll. Die ermittelten Werte der Zeitkonstanten des schnelleren Zerfalls sind als Funktion des pH-Wertes in Abbildung 5-15A dargestellt und zusätzlich in Tabelle 5-4 zusammengefasst. Eine Ausgleichsgerade der logarithmisch dargestellten  $\tau$ -Werte ist als gestrichelte Linie gezeigt und impliziert eine leichte Zunahme der Zeitkonstante mit abnehmendem pH-Wert. Die lineare

Interpolation nimmt von 90  $\mu\text{s}$  bei pH 7,0 bis 97  $\mu\text{s}$  bei pH 5,5 zu, was einer Verlangsamung um den Faktor 1,08 entspricht und in guter Übereinstimmung zur pH-Abhängigkeit des  $S_1 \rightarrow S_2$ -ETs steht (Haumann et al. 1997; Gerencser und Dau 2012).



**Abbildung 5-13:** PBD-Signale und Simulationen der vier S-Zustandsübergänge bei vier verschiedenen pH-Werten. *miss*-Parameter: 14,8% bei pH 5,5; 11,8% bei pH 6,0; 9,6% bei pH 6,5 und 8,9% bei pH 7,0. Die Signale wurden um den prompten Signalsprung bereinigt, sodass die Simulationen im Ursprung beginnen, und sie sind vertikal versetzt dargestellt. Durchgezogene Linien repräsentieren Simulationen, die aus der Summe mehrerer Exponentialfunktionen bestehen. Die zugehörigen Anpassungsparameter sind in Tabelle 5-4 aufgeführt.



**Abbildung 5-14:** PBD-Signale und Simulationen der vier S-Zustandsübergänge bei vier verschiedenen pH-Werten im Zeitbereich von 0,5 ms nach Laseranregung. Die Daten aus Abbildung 5-13 sind auf einer vergrößerten Zeitskala dargestellt.

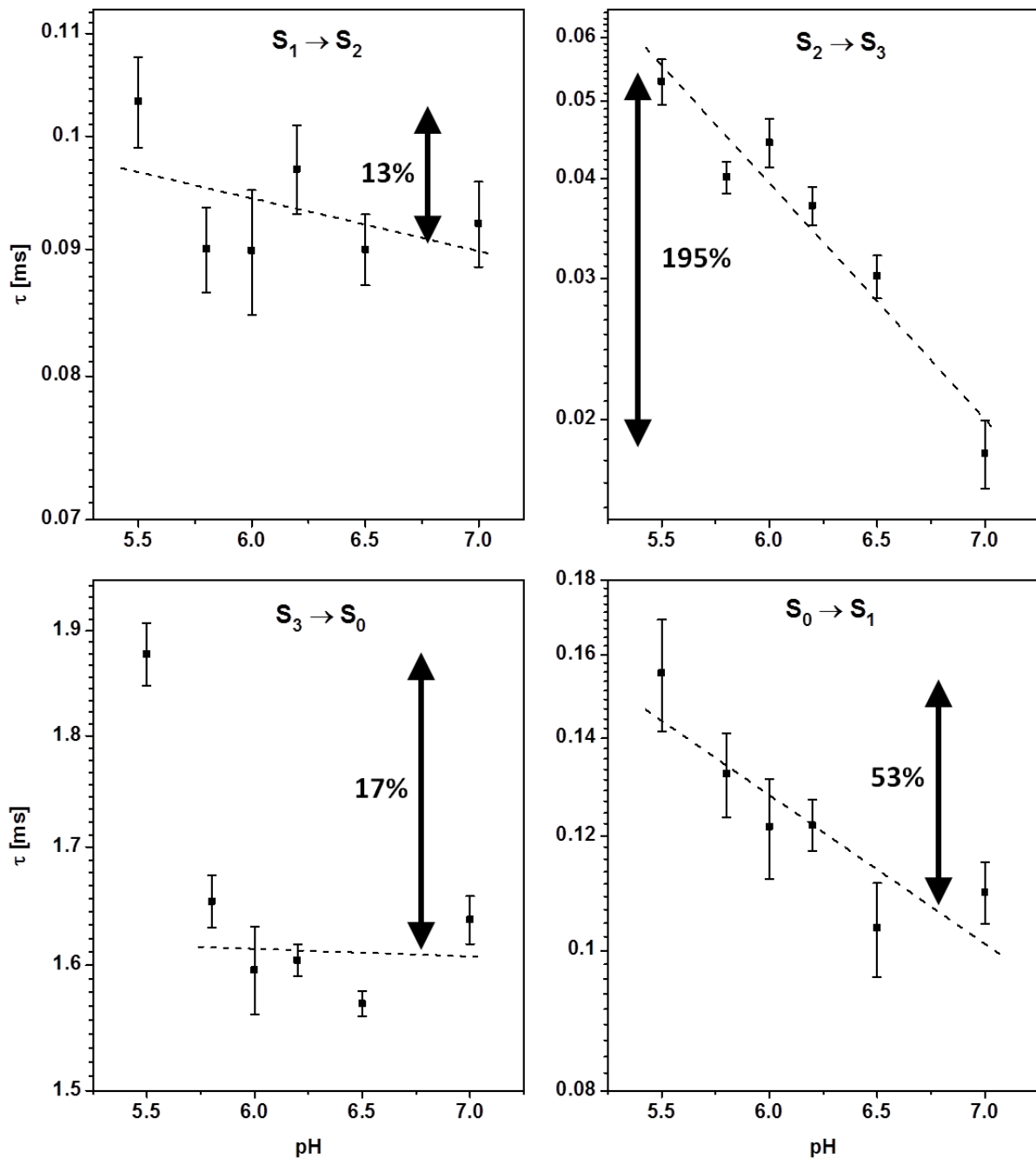
**S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>:** Eine Inaugenscheinahme der Signale in Abbildung 5-13B macht bereits Unterschiede der Signalformen bei verschiedenen pH-Werten deutlich. Die Ausprägung eines „Peaks“, der bei pH 7,0 durch einen schnellen Anstieg und einen darauf folgenden Zerfall gebildet wird, nimmt mit abnehmendem pH-Wert ab und ist bei pH 5,5 kaum noch auszumachen. Bei der Kurvenanpassung der Zeitverläufe wurde vorgegangen wie bei dem entsprechenden in D<sub>2</sub>O gemessenen Signal. Zeitkonstanten des ETs im S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>-Übergang bei

verschiedenen pH-Werten wurden der Literatur entnommen (Gerencser und Dau 2012) und der Parameter  $\tau_2$ , der bei der multiexponentiellen Simulation den ET zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  beschreibt, in der Kurvenanpassung bei diesem Wert fixiert. Eine zweite Zeitkonstante wurde auf den pH-abhängigen Wert des Akzeptorseiten-ETs (Kapitel 3.2) eingestellt und bei der Optimierung nicht verändert. Die beschriebenen Anpassungsparameter, die fix vorgegeben waren, sind in Tabelle 5-4 mit \* gekennzeichnet. In Abbildung 5-15B sind die Zeitkonstanten  $\tau_1$  des schnellen und am klarsten definierten Signalanstiegs bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Auch hier wurde eine lineare Interpolation als gestrichelte Linie eingezeichnet. Mit einer Zunahme um einen Faktor von  $\sim 3$  zwischen pH 7,0 und pH 5,5 ist eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit gegeben.

**S<sub>3</sub>→S<sub>0</sub>:** Beim Millisekunden-Anstieg der PBD-Signale, gemessen nach Blitzanregung von PSII-Proben im S<sub>3</sub>-Zustand, deuten sich in Abbildung 5-13C vor allem in der Anfangsphase qualitative Unterschiede an. So zeigt der Signalanstieg bei einem pH-Wert von 5,5 tendenziell sigmoidales Verhalten, ähnlich wie der entsprechende Anstieg in D<sub>2</sub>O (siehe Abschnitt 5.2.9). Bei pH 7,0 hingegen ist an Stelle einer Verzögerung ein sehr schneller Anstieg der Millisekunden-Phase vorangestellt. Anpassungsparameter der Simulation mit drei Exponentialfunktionen (wobei zwei Exponentialfunktionen den Signalanstieg beschreiben und eine den langsamen Signalzerfall im Bereich mehrerer 10 ms) sind in Tabelle 5-4 zusammengestellt und zeigen, dass der Verzögerungsphase (bei pH 5,5) eine Zeitkonstante von 119  $\mu\text{s}$  zugeordnet werden kann. Auch bei pH 6,0 ergibt die Simulation noch eine kleine negative Phase. Diese hat jedoch eine sehr geringe Amplitude, sodass sie mit bloßem Auge kaum auszumachen ist. Entsprechend ungenau sind die Werte der Anpassungsparameter ( $\tau_1 = 289 \pm 211 \mu\text{s}$ ).

Ein sehr schneller (25  $\mu\text{s}$ ), der Millisekunden-Phase vorgelagerter Anstieg, ähnlich dem bei pH 7,0 aufgelösten, wurde auch bei den qualitativ sehr guten Signalen unter Standardbedingungen bei pH 6,2 diskutiert (Abschnitt 5.2.6). Eine quantitative Analyse der anscheinend sehr komplexen Signalverläufe im Anfangsbereich der Millisekunden-Phase scheint bei vorhandener Datenlage nicht sinnvoll/möglich. Für den viel stärker ausgeprägten Millisekunden-Anstieg sind die ermittelten Zeitkonstanten in Abbildung 5-15C in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt. Im untersuchten pH-Intervall ist die Millisekunden-Zeitkonstante des PBD-Signals nur wenig vom pH-Wert abhängig, was in Übereinstimmung mit Untersuchungen der Sauerstoffentwicklung bzw. des ETs ist (Krohs und Metzner 1990; Rappaport et al. 1994; Haumann et al. 1997). Bei pH 5,5 nimmt die Zeitkonstante etwas zu.

Dieser Effekt deutet sich ganz ähnlich auch in den Daten von Gerencser (Gerencser und Dau 2010) für die Zeitkonstante des  $S_3 \rightarrow S_0$ -ETs an.



**Abbildung 5-15:** pH-Abhängigkeit ausgewählter  $\tau$ -Werte. Die Zeitkonstanten wurden über multiexponentielle Kurvenanpassungen an die PBD-Signale der vier S-Zustandsübergänge bestimmt (siehe Haupttext). (A) Zeitkonstanten des schnellen Zerfalls nach Blitzanregung von PSII-Membranpartikeln im  $S_1$ -Zustand. (B) Schneller Anstieg nach Blitzanregung im  $S_2$ -Zustand. (C) Millisekunden-Anstieg des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs. (D) Schneller Anstieg nach Anregung von PSII-Proben im  $S_0$ -Zustand. Gepunktete Linien stellen Ausgleichsgeraden der halblogarithmisch aufgetragenen Messwerte dar und dienen der groben Orientierung. Doppelpfeile deuten die relative Zunahme im beobachteten pH-Bereich an.

**S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub>:** Die in Abbildung 5-13D gezeigten Zeitverläufe von PBD-Signalen nach Anregung von PSII-Membranfragmenten im S<sub>0</sub>-Zustand weisen qualitativ kaum Unterschiede auf. Die durch schwarze Linien repräsentierten Simulationen bestehen aus der Summe dreier Exponentialfunktionen. Eine der Zeitkonstanten wurde auf den Wert des Akzeptorseiten-ETs eingestellt (siehe oben) und bei der Kurvenanpassung nicht variiert. Die ermittelten Werte für die Anpassungsparameter sind in Tabelle 5-4 aufgeführt, wobei die fixierten Werte mit \* gekennzeichnet sind. Die Zeitkonstanten der schnellen Anstiegsphase sind in Abbildung 5-15D gegen den pH-Wert aufgetragen. Das sich ergebende Bild ist nicht ganz eindeutig. Eine Zunahme des Wertes der Zeitkonstante bei Abnahme des pH-Wertes von 7,0 auf 5,5 lässt sich aus den Daten herauslesen (verdeutlicht durch die gestrichelt dargestellte Interpolation). Eine Verlangsamung der Anstiegsphase um etwa einen Faktor von 1,5 zwischen pH 7,0 und pH 5,5 ergibt sich, wenn man die lineare Interpolation in diesem pH-Bereich betrachtet. Zu beachten ist jedoch, dass die Zeitkonstanten in Abbildung 5-15D nicht ganz unabhängig sind von den fixierten Zeitkonstanten der langsamer ansteigenden Phasen, die Akzeptorseiten-Beiträgen zugeordnet wurden. So ergibt sich bei Standardbedingungen (pH 6,2) ein Wert von  $\tau_1 = 122 \mu\text{s}$ , wenn man die Zeitkonstante der Akzeptorseite  $\tau_3 = 900 \mu\text{s}$  vorgibt. Bei der Simulation mit komplett frei variierbaren Anpassungsparametern in Abschnitt 5.2.7 ergab sich dagegen einen Wert von  $\tau_1^{(\text{frei})} = 105 \mu\text{s}$ .

Bei zunehmender Protonenkonzentration des Lösungsmittels (Absenkung des pH-Wertes) wurde eine starke Verlangsamung (Faktor 3) der schnellen Anstiegsphase, die dem S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>-Übergang vorausgeht, beobachtet. Dies ist ein Indiz dafür, dass hier die Bildung eines Intermediatzustands beobachtet wird, der Protonentransfer und -freisetzung ins umgebende Medium beinhaltet. In der Referenz (Gerencser und Dau 2010) werden verschiedene hypothetische Mechanismen diskutiert, die die Verlangsamung der Protonenfreisetzung erklären können. Es wird geschlossen, dass die Zeitkonstante eines Protonentransfers von einer peripheren Base des Proteins zum wässrigen Puffer durch die Kollisionswahrscheinlichkeit mit einer mobilen Protonenakzeptor-Gruppe bestimmt ist und bei der identischen Pufferkonzentration, die auch hier verwendet wurde, etwa 2,5  $\mu\text{s}$  beträgt. Die im PBD-Signal beobachteten Zeitkonstanten sind mit 20  $\mu\text{s}$  bis 60  $\mu\text{s}$  deutlich langsamer, was dafür spricht, dass Deprotonierung von peripheren Gruppen nicht der ratenlimitierende Schritt der hier beobachteten Reaktion ist. Eine protonierbare Gruppe, die Teil des Protonentransferpfades bildet und deren pK-Wert im untersuchten pH-Bereich liegt, kann eine Verlangsamung des PTs um einen Faktor von 10 pro pH-Einheit verursachen, da der Transferpfad in Abhängigkeit vom Protonierungszustand versperrt wäre (Gerencser und Dau



2010). Zur Erklärung des viel kleineren hier experimentell gefundenen Werts kann man vermuten, dass die Interaktion mehrerer ionisierbarer Gruppen zu pK-Verschiebungen führt (Yang 1993; Ishikita et al. 2006) und die pH-Wert-Abhängigkeit der PT-Zeitkonstante abgemildert wird. Man kann auch annehmen, dass zwei oder mehr parallele PT-Pfade existieren (Gerencser und Dau 2010).

Auch für die Anstiegsphase im PBD-Signal, die auf den  $S_0 \rightarrow S_1$ -ET folgt, wurde eine Verlangsamung bei abnehmendem pH-Wert beobachtet. Diese fällt mit einem Faktor von 1,5 im Bereich von pH 5,5 bis pH 7,0 allerdings nur etwa halb so groß aus, wie bei der vergleichbaren, dem  $S_2 \rightarrow S_3$ -ET vorgelagerten Phase. Diese eher geringe Verlangsamung könnte auf einen indirekteren Einfluss des pH-Wertes auf den ratenlimitierenden PT-Schritt hindeuten. So könnte eine Gruppe in der Nähe des Protonenakzeptors bei niedrigem pH-Wert protoniert werden und durch elektrostatische Wechselwirkung den pK-Wert des Akzeptors stärker senken als den pK-Wert des (weiter entfernten) Donors. Da die Rate eines PTs üblicherweise von der Differenz der pK-Werte des Donors und des Akzeptors abhängt (Marcus 1968; Hammes-Schiffer 2006), kann eine leichte Verlangsamung daraus resultieren (Gerencser und Dau 2010).

Bereits in Kapitel 4.3 wurden die in den zwei letzten Absätzen diskutierten Phasen im PBD-Signal mit Prozessen in Verbindung gebracht, die zu einer Entfernung eines Protons vom Mn-Komplex führen. Zum einen spricht der hohe H/D-KIE ( $>2,5$ ) dafür, zum anderen die beobachtete Expansion, die auf eine Ladungsneutralisation hindeutet, wie sie etwa durch PT ins Lumen stattfindet. Mit der pH-Abhängigkeit kann hier ein weiteres Indiz für die Richtigkeit dieser Interpretation gegeben werden. Interessant ist, dass die Verlangsamung der wahrscheinlich protolytischen Phase nach dem  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang mit einem Faktor von 1,5 etwa halb so stark ausfällt wie die der protolytischen Phase, die dem  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang vorausgeht ( $\sim 3$ ). Nach Gerencser (Gerencser und Dau 2010) ist die pH-Wert-bedingte Verlangsamung einer protonischen Phase, die der Sauerstoffbildung vorausgeht, mit einem Faktor von  $\tau^{5,5}/\tau^{7,0} > 7$  noch einmal doppelt so stark ausgeprägt. Dies könnte ein Hinweis auf unterschiedliche PT-Pfade sein, die bei Deprotonierung des Mn-Komplexes abhängig von dessen Oxidationszustand eine Rolle spielen.

Die sehr geringe Abhängigkeit der Zeitkonstante des PBD-Signalzerfalls beim  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang vom pH-Wert bestätigt erneut die Deutung der Zerfallsphase als strukturelle Änderungen, die mit dem  $S_1 \rightarrow S_2$ -ET einhergehen. Dass die pH-Unabhängigkeit mit dem

Fehlen einer Protonenfreisetzung bei diesem S-Zustandsübergang zusammenhängt, wurde mehrfach geschlussfolgert (Schlodder und Witt 1999; Bernát et al. 2002; Suzuki et al. 2005; Gerencser und Dau 2012).

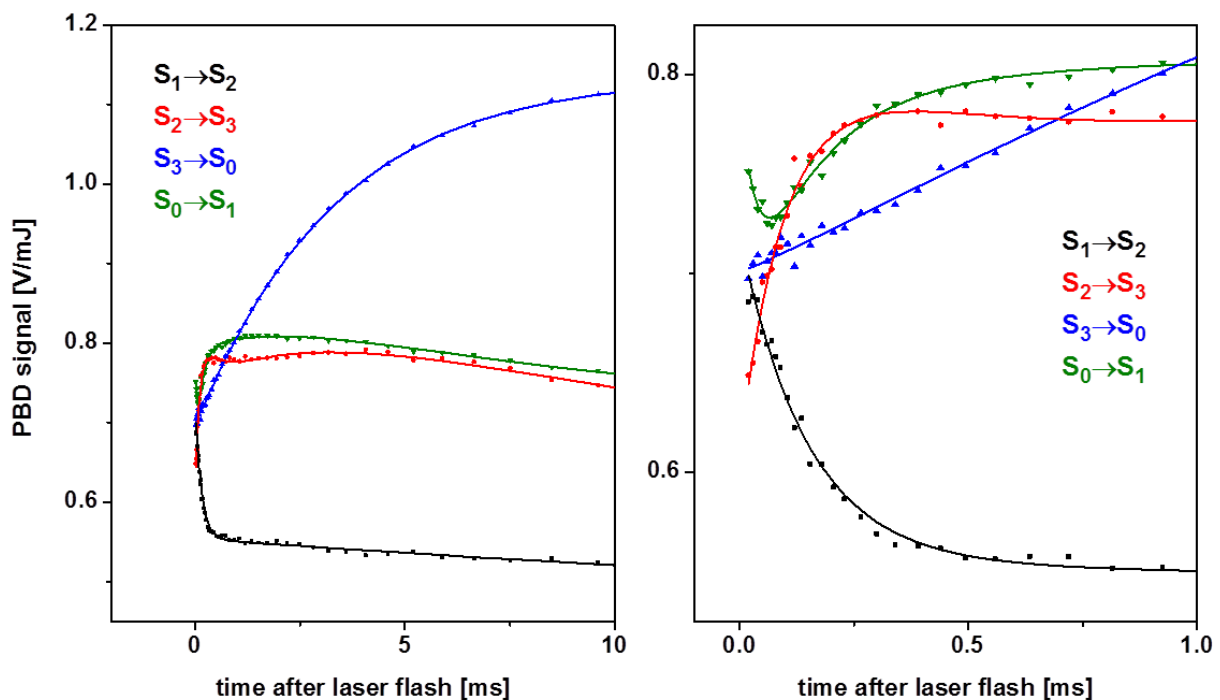
In der Referenz (Gerencser und Dau 2010) wurde berichtet, dass eine Verzögerung des sauerstoffbildenden Schritts eine starke pH-Abhängigkeit zeigte, während die Sauerstoffbildung selbst im pH-Bereich von pH 5,5 bis pH 7,0 relativ konstante Ratenkonstanten aufwies. Der leicht erhöhte  $\tau$ -Wert der Millisekunden-Phase im PBD-Signal des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs bei pH 5,5 könnte daher durch eine (wegen Überlagerung mit weiteren Anstiegsphasen) unsichtbare Verzögerungsphase bedingt sein. Belastbare Aussagen sind für die hier diskutierten PBD-Experimente jedoch nicht möglich.

**Tabelle 5-4:** Anpassungsparameter der Simulation von PBD-Signalen der vier S-Zustandsübergänge, gemessen bei vier verschiedenen pH-Werten. Simulationsfunktionen bestanden aus Summen von zwei bis vier Exponentialfunktionen und einer Sprungfunktion. Mit \* gekennzeichnete Werte wurden bei der Simulation nicht variiert. NA, nicht zugängliche Werte. \*\*, beschränkter Parameter (siehe Abschnitt 5.2.6).

	pH	$\tau_1$ [ms]	$A_1$ [V/mJ]	$\tau_2$ [ms]	$A_2$ [V/mJ]	$\tau_3$ [ms]	$A_3$ [V/mJ]	$\tau_4$ [ms]	$A_4$ [V/mJ]	$y_0$ [V/mJ]
$S_1 \rightarrow S_2$	5.5	NA	NA	$0.103 \pm 0.004$	$-0.118 \pm 0.003$	NA	NA	$52.614 \pm 9.31$	$-0.802 \pm 0.122$	$1.78 \pm 0.123$
	6.0	NA	NA	$0.090 \pm 0.005$	$-0.121 \pm 0.004$	NA	NA	$27.255 \pm 4.794$	$-0.337 \pm 0.045$	$1.84 \pm 0.045$
	6.5	NA	NA	$0.090 \pm 0.003$	$-0.118 \pm 0.002$	NA	NA	$33.043 \pm 3.432$	$-0.441 \pm 0.036$	$1.765 \pm 0.037$
	7.0	NA	NA	$0.092 \pm 0.004$	$-0.119 \pm 0.003$	NA	NA	$42.193 \pm 7.225$	$-0.503 \pm 0.072$	$1.83 \pm 0.072$
$S_2 \rightarrow S_3$	5.5	$0.053 \pm 0.003$	$0.183 \pm 0.006$	$0.300^*$	$-0.026 \pm 0.009$	$1.370^*$	$0.045 \pm 0.007$	$64.33 \pm 21.81$	$-1.147 \pm 0.328$	$1.637 \pm 0.332$
	6.0	$0.044 \pm 0.003$	$0.199 \pm 0.007$	$0.290^*$	$-0.061 \pm 0.009$	$0.990^*$	$0.038 \pm 0.006$	$1000^{**}$	$-13.248 \pm 0.174$	$1.693 \pm 0.172$
	6.5	$0.03 \pm 0.002$	$0.187 \pm 0.008$	$0.280^*$	$-0.077 \pm 0.006$	$0.870^*$	$0.042 \pm 0.006$	$36.893 \pm 5.426$	$-0.644 \pm 0.072$	$1.616 \pm 0.074$
	7.0	$0.018 \pm 0.002$	$0.21 \pm 0.024$	$0.270^*$	$-0.057 \pm 0.006$	$0.770^*$	$0.009 \pm 0.006$	$33.377 \pm 5.262$	$-0.56 \pm 0.065$	$1.669 \pm 0.067$
$S_3 \rightarrow S_0$	5.5	$0.119 \pm 0.033$	$-0.021 \pm 0.003$	$1.877 \pm 0.03$	$0.432 \pm 0.003$	NA	NA	$1000^{**}$	$-9.582 \pm 0.237$	$1.772 \pm 0.234$
	6.0	$0.289 \pm 0.211$	$-0.011 \pm 0.007$	$1.596 \pm 0.036$	$0.453 \pm 0.006$	NA	NA	$1000^{**}$	$-9.62 \pm 0.21$	$1.82 \pm 0.207$
	6.5	NA	NA	$1.569 \pm 0.01$	$0.397 \pm 0.001$	NA	NA	$1000^{**}$	$-8.958 \pm 0.117$	$1.711 \pm 0.116$
	7.0	$0.014 \pm 0.006$	$0.033 \pm 0.023$	$1.638 \pm 0.020$	$0.417 \pm 0.004$	NA	NA	$54.21 \pm 23.56$	$-0.523 \pm 0.178$	$1.762 \pm 0.183$
$S_0 \rightarrow S_1$	5.5	$0.155 \pm 0.014$	$0.061 \pm 0.002$	NA	NA	$1.370^*$	$0.027 \pm 0.005$	$42.78 \pm 10.22$	$-0.592 \pm 0.11$	$1.774 \pm 0.113$
	6.0	$0.122 \pm 0.01$	$0.082 \pm 0.003$	NA	NA	$0.990^*$	$0.032 \pm 0.005$	$59.77 \pm 17.51$	$-0.863 \pm 0.215$	$1.815 \pm 0.217$
	6.5	$0.104 \pm 0.007$	$0.088 \pm 0.003$	NA	NA	$0.870^*$	$0.034 \pm 0.003$	$1000^{**}$	$-9.694 \pm 0.126$	$1.741 \pm 0.125$
	7.0	$0.11 \pm 0.005$	$0.088 \pm 0.002$	NA	NA	$0.770^*$	$0.048 \pm 0.003$	$283.5 \pm 234.6$	$-3.491 \pm 2.797$	$1.81 \pm 2.798$

### 5.2.11 Niedrige Temperatur (4 °C)

Eine Kontrollmessung der PBD-Signale der vier S-Zustandsübergänge bei einer Temperatur von 4 °C wurde in erster Linie durchgeführt, um die Existenz einer schnellen Zerfallsphase, die den  $S_0 \rightarrow S_1$ -ET widerspiegeln könnte und die sich in Kapitel 4 angedeutet hatte, zu bestätigen. Tatsächlich ist auf dem entsprechenden Signal (grüne Symbole) in Abbildung 5-16 eine schnelle Zerfallsphase deutlich auszumachen. Die als grüne Linie gezeigte Simulationsfunktion des Zeitverlaufs besteht aus vier Exponentialfunktionen, wobei eine der vier Zeitkonstanten auf den Wert  $\tau_3 = 2,0$  ms festgesetzt wurde, ein Wert, der den ET an der PSII-Akzeptorseite widerspiegelt (Kapitel 3.2). Für den schnellen Zerfall ergibt sich nach dieser Kurvenanpassung eine Zeitkonstante von  $\tau_2 = 35 \pm 7$   $\mu$ s. Bei Annahme eines  $2\sigma$ -Fehlers liegt auch ein Wert von  $\sim 50$   $\mu$ s im Rahmen des Möglichen. Dies ist im Bereich dessen, was man für den ET des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs erwarten kann (Dekker et al. 1984a; Haumann et al. 2005a), da für diesen eine niedrige Aktivierungsenergie gefunden wurde (Renger und Hanssum 1992).



**Abbildung 5-16:** PBD-Signale der vier S-Zustandsübergänge bei einer Temperatur von 4 °C in Standard-Puffer (Symbole) und Simulationen (durchgezogenen Linien). Die rechte Grafik zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der gleichen Signale wie links.

Die anderen drei gezeigten PBD-Signale lassen sich mit denselben Modellen beschreiben wie bei Messungen unter Standardbedingungen (siehe vorherige Abschnitte). Die sich ergebenden

Werte für die entsprechenden Anpassungsparameter sind in Tabelle 5-5 zusammengefasst. Der Vergleich mit Tabelle 5-1 zeigt, dass die Zeitkonstanten wie erwartet größer sind als bei Raumtemperatur. Die Amplituden der kinetisch aufgelösten Phasen ( $A_1$ ,  $A_2$  und  $A_3$ ) haben ähnlich große oder sogar höhere Werte als bei 20 °C, was ein gutes Indiz dafür ist, dass diese Signalbeiträge nur sehr kleine thermische Beiträge aufweisen und größtenteils auf strukturelle Änderungen zurückzuführen sind. Der prompte Signalsprung hingegen, der vor allem auf prompte Wärmefreisetzung zurückzuführen ist, hat wegen der Temperaturabhängigkeit des PBD-Wärmesignals bei 4 °C eine viel kleinere Amplitude ( $\sim 0,7$  V/mJ) als bei 20 °C ( $\sim 1,7$  V/mJ).

**Tabelle 5-5:** Anpassungsparameter der Simulation von PBD-Signalen der vier S-Zustandsübergänge, gemessen bei einer Temperatur von 4 °C. Die Simulationsfunktionen bestanden aus Summen von zwei bis vier Exponentialfunktionen und einer Konstante. \*, Werte, die bei der Kurvenanpassung nicht variiert wurden. \*\*, beschränkter Parameter (siehe Abschnitt 5.2.6).

	$S_1 \rightarrow S_2$	$S_2 \rightarrow S_3$	$S_3 \rightarrow S_0$	$S_0 \rightarrow S_1$
$\tau_1$ [ms]	--	<b>0.101 ± 0.008</b>	<b>0.164 ± 0.192</b>	<b>0.151 ± 0.022</b>
$A_1$ [V/mJ]	--	0.214 ± 0.011	0.006 ± 0.003	0.134 ± 0.019
$\tau_2$ [ms]	<b>0.148 ± 0.006</b>	<b>0.400*</b>	<b>3.449 ± 0.113</b>	<b>0.035 ± 0.007</b>
$A_2$ [V/mJ]	-0.166 ± 0.003	-0.082 ± 0.019	-0.46 ± 0.009	-0.137 ± 0.016
$\tau_3$ [ms]	--	<b>2.000*</b>	--	<b>2.000*</b>
$A_3$ [V/mJ]	--	0.097 ± 0.016	--	0.069 ± 0.016
$\tau_4$ [ms]	<b>36.958 ± 32.126</b>	<b>136.1 ± 327.1</b>	<b>1000**</b>	<b>10.19 ± 3.20</b>
$A_4$ [V/mJ]	-0.14 ± 0.098	-1.322 ± 2.906	-1.472 ± 0.642	-0.160 ± 0.011
$y_0$ [V/mJ]	<b>0.72 ± 0.099</b>	<b>0.61 ± 2.914</b>	<b>0.701 ± 0.632</b>	<b>0.796 ± 0.022</b>

### 5.2.12 Manganfreies PSII

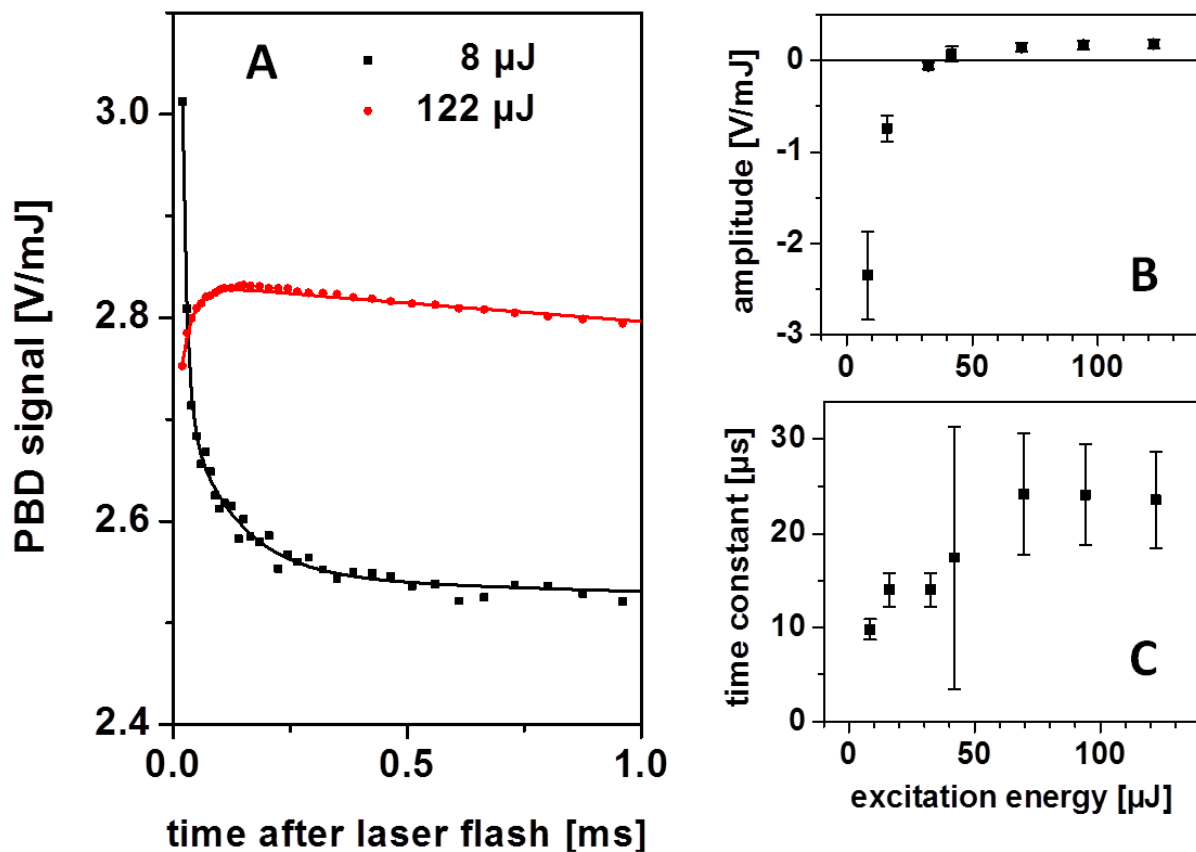
PSII-Proben, bei denen der Mn-Komplex entfernt wurde, sind nicht mehr in der Lage Wasser zu oxidieren, um nach Lichtanregung gebildetes  $Y_Z^{ox}$  zu reduzieren. PBD-Signale zeigten dementsprechend keine Abhängigkeit von der Anzahl applizierter Laserblitze. Kinetische Phasen im Zeitbereich von Mikro- und Millisekunden wiesen jedoch eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Anregungsenergie auf, wie in Abbildung 5-17 gezeigt wird. Das ausgeprägteste und am besten reproduzierbare Charakteristikum von PBD-Signalen Mn-freier PSII-Proben war eine Phase, für die bei Kurvenanpassung einer Exponentialfunktion eine Zeitkonstante von  $< 30$   $\mu$ s gefunden wurde. Bei hohen Anregungsenergien ( $> 50$   $\mu$ J) hatte

diese Phase eine positive Amplitude, und die bestimmte Zeitkonstante lag zwischen 20 und 30  $\mu\text{s}$ . In diesem Bereich hoher Laserpulsenergien blieb die auf die Anregungsenergie normierte Amplitude konstant. Das bedeutet, dass kein Sättigungsverhalten festzustellen und das Signal proportional zur Anregungsenergie war. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass diese schnelle positive Phase nicht direkt mit Reaktionen der PSII-Photochemie zusammenhängt. Vermutlich sind hier Prozesse zu beobachten, die bei der Deaktivierung von überschüssiger Anregungsenergie auftreten. Solche Prozesse umfassen etwa die Bildung und den Zerfall von Triplett-Zuständen von Carotinoiden (Witt 1971). Bei gesättigter Photochemie nimmt die potenziell für das Protein gefährliche Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Chlorophyll-Triplettzuständen und Singulett-Sauerstoff zu (Monger et al. 1976; Krieger-Liszkay 2005). Beide werden effektiv unter Triplettbildung von Carotinoiden gelöscht (Telfer 2002). Die Lebensdauer der Triplett-Carotinoiden im LHC-Antennenkomplex liegt dabei abhängig vom Sauerstoffgehalt und der Sauerstoffzugänglichkeit zwischen 2  $\mu\text{s}$  (anaerob) und 9  $\mu\text{s}$  (aerob) (Peterman et al. 1995; Siefermann-Harms und Angerhofer 1998) und ist damit zu kurz, um bei PBD-Messungen aufgelöst zu werden. Es wurde jedoch auch ein Anteil von Triplett-Chlorophyll gefunden, der eine Lebensdauer von ca. 30  $\mu\text{s}$  aufwies und als  $^3\text{P680}$  interpretiert wurde, das nicht von Carotinoiden oder Sauerstoff gelöscht wird (Schlodder und Brettel 1988). Im Zusammenhang mit Neutronenstreuexperimenten wurde spekuliert, dass konformative Relaxationen, ausgelöst durch  $^3\text{Car}$ -Bildung, eine höhere Lebensdauer haben könnten als der Triplett-Zustand selbst (Pieper und Renger 2009).

Zu kleineren Anregungsenergien hin änderte die Amplitude der schnellen Mikrosekunden-Phase das Vorzeichen. Bei 8  $\mu\text{J}$  ist in Abbildung 5-17A ein ausgeprägter Signalzerfall zu sehen. Der Vorzeichenwechsel in Abbildung 5-17B kann durch die Überlagerung einer Phase mit negativer Amplitude, die mit der PSII-Photochemie sättigt, und einer Phase ähnlicher Zeitentwicklung, deren positive Amplitude nicht sättigt, erklärt werden. Der Signalzerfall des PBD-Signals bei niedriger Anregungsenergie deutet auf eine Kontraktion mit einer Lebensdauer von  $\sim 15 \mu\text{s}$  hin. Da das Signal mit der Photochemie sättigt, kann ein Zusammenhang mit der  $\text{P680}^+$ -Reduktion vermutet werden. Es ist bekannt, dass bei Photosystemen, denen der Mn-Komplex entfernt wurde, der ET vom Tyrosin-Donor  $\text{Y}_Z$  zum  $\text{P680}^+$ -Kation abhängig vom pH-Wert stark verlangsamt ist. Anstelle von Nanosekunden-Phasen wurden bei inaktiven Chloroplasten und PSII-Kernpartikeln Zeitkonstanten der  $\text{P680}^+$ -Reduktion im Bereich von 1–44  $\mu\text{s}$  gefunden (Conjeaud und Mathis 1980; Reinman und Mathis 1981; Ahlbrink et al. 1998). Bei einem pH-Wert von 6,2 war der ET von  $\text{Y}_Z$  zu  $\text{P680}^+$  an eine Protonenverschiebung gekoppelt und wies eine Zeitkonstante von  $\sim 20 \mu\text{s}$  auf

(Ahlbrink et al. 1998). Der 15- $\mu$ s-Zerfall des PBD-Signals von Photosystemen ohne katalytisches Zentrum könnte also die stark verlangsamte  $P680^+$ -Reduktion abbilden.

Nach einer Abschätzung der resultierenden Elektrostriktion (Mauzerall et al. 2002) wäre der Übergang der positiven Ladung von  $P680^+$  zu  $Y_Z$  tatsächlich mit einer deutlichen Kontraktion verbunden, wenn man davon ausgeht, dass die Ladung bei  $P680$  auf einen Bereich mit Radius 7,5 Å und nur 2,2 Å bei  $Y_Z$  verteilt ist (Mauzerall et al. 2002). Die Protonenfreisetzung, die mit dem ET einhergeht, ist anscheinend nicht mit einer großen Volumenausdehnung verbunden. Zumindest ist sie kleiner als die Kontraktion, die mit dem ET einhergeht. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Feststellung in Abschnitt 5.2.8, dass Protonenanlagerungen an peripheren Basen nahe den Akzeptoren  $Q_A$  und  $Q_B$  nicht mit großen Volumenkontraktionen verbunden sind.



**Abbildung 5-17:** Schnelle Mikrosekunden-Komponente im PBD-Signal von manganfreien PSII-Komplexen. (A) Zeitverläufe von PBD-Signalen, gemessen bei einer Anregungsenergie von 8  $\mu$ J (schwarz) und 122  $\mu$ J (rot). (B) Auf die Anregungsenergie normierte Amplitude der schnellen Mikrosekunden-Phase, aufgetragen über der Pulsenergie des Anregungslasers. (C) Zeitkonstanten der schnellen Mikrosekunden-Phasen. Fehlerbalken geben die formale 1 $\sigma$ -Ungenauigkeit der Kurvenanpassung (durchgezogene Linien in A) wieder.

### 5.3 Zusammenfassung

Mit PBD-Messungen bei (die PSII-Photochemie) sättigender Blitzanregung konnten die Ergebnisse aus Kapitel 4 untermauert und dank des verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses neue Erkenntnisse gewonnen werden. Eine sehr große Übereinstimmung zwischen den in Kapitel 4 und den in Kapitel 5 erzielten Ergebnissen ergab sich in folgenden Punkten:

- A) Die Hauptmerkmale der PBD-Signalverläufe in Abhängigkeit vom Oxidationszustand des Mn-Komplexes wurden unabhängig von der Pulsenergie des Anregungslasers gefunden. Diese umfassen etwa:
- a. eine 100- $\mu$ s-Kontraktion nach Anregung von PSII-Membranpartikeln im  $S_1$ -Zustand,
  - b. eine schnelle Expansion ( $\sim 30 \mu$ s), die dem  $S_2 \rightarrow S_3$ -ET vorausgeht,
  - c. eine ausgeprägte Expansion, die mit dem sauerstoffbildenden Schritt einhergeht,
  - d. eine Expansion mit einer Anstiegszeit von 100  $\mu$ s, die auf den  $S_0 \rightarrow S_1$ -ET folgt.
- B) Für die kinetischen Isotopen-Effekte bei H/D-Austausch wurde übereinstimmend gefunden, dass diese klein sind ( $\sim 1,3$ ) für die Signale, die ET-Reaktionen vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{ox}$  widerspiegeln, und größer ( $> 2,5$ ), wenn sie Prozesse abbilden, die nicht direkt an den ET gekoppelt sind. Diese Bestätigung ist besonders im Falle des 100- $\mu$ s-Anstiegs als Folge der Anregung von PSII-Proben im  $S_0$ -Zustand wertvoll, da sich die Bestimmung dieses KIE-Wertes in Kapitel 4.2 als besonders schwierig erwiesen hatte.
- C) Die Amplituden der unter A) genannten Phasen nahmen weder bei Abkühlung der Probe auf 4 °C noch bei Austausch des Wassers durch  $D_2O$  deutlich ab. Da Wärmesignale bei tiefen Temperaturen oder in  $D_2O$  aufgrund der veränderten thermoelastischen Eigenschaften von Wasser aber wesentlich kleiner ausfallen (sichtbar am prompten Signalsprung mit großem Wärmebeitrag) wird in diesem Punkt die Aussage bekräftigt, dass die unter A) genannten Phasen nicht-thermischen Ursprungs sind.

Neue, das Gesamtbild abrundende Aspekte, die über die Erkenntnisse aus Kapitel 4 hinausgehen, umfassen etwa folgende Punkte:

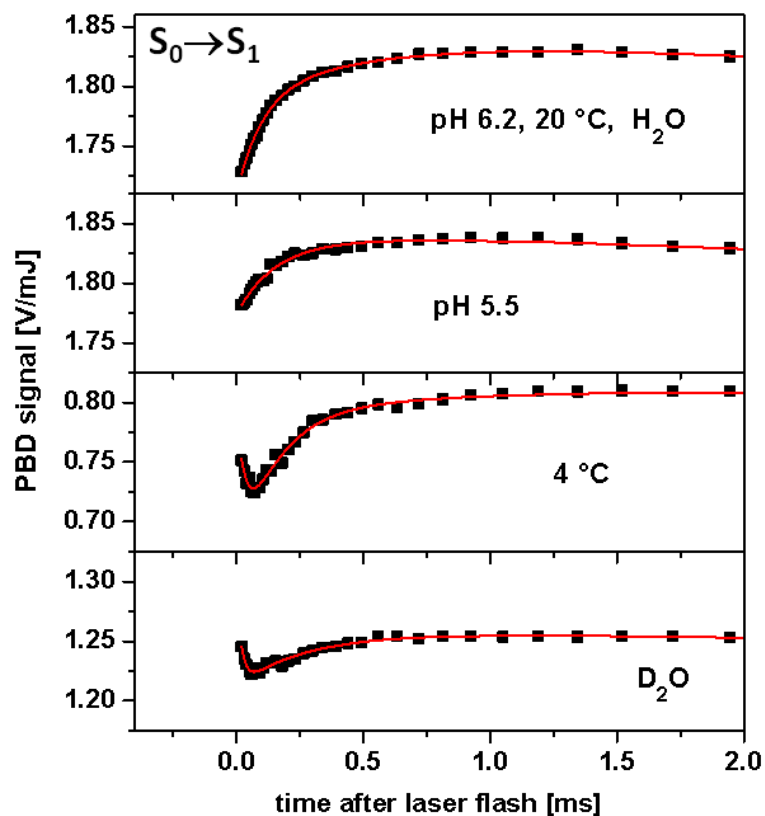


- D) Bei den qualitativ hochwertigen PSII-Präparationen stellten Artefakte (Signalbeiträge durch Prozesse, die nicht direkt mit der PSII-Photochemie zusammenhängen), wie sie bei Anregung mit sättigenden Laserpulsen vorstellbar sind, nur auf den Signalen der ersten zwei Blitzanregungen nach Dunkeladaption eine größere Rolle. Die sehr große Übereinstimmung von Ergebnissen, gewonnen bei niedriger und bei hoher Pulsenergie des Anregungslasers, bestätigt dies überzeugend.
- E) Extrabeiträge (Artefakte) in PBD-Signalen bei Blitzanregung mit dem ersten Blitz (und in geringerem Maße auch mit dem zweiten Blitz) stellen offenbar bei niedriger Anregungsenergie ein kleineres Problem dar als bei sättigender Blitzanregung. Die übereinstimmenden Ergebnisse im Hinblick auf Ratenkonstanten und H/D-KIE der PBD-Signale des  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergangs und des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs aus Kapitel 4 und Kapitel 5 deuten dies an. Die Ursache für diese Extrabeiträge im PBD-Signal der ersten zwei Blitze liegt vermutlich in defekten Reaktionszentren. Aber auch elektrostatische Effekte wären denkbar. So könnte in einem Teil der PSII-Proben nach Dunkeladaption das nicht-Häm-Eisen in oxidiertem Zustand vorliegen, wie es etwa bei Verwendung von Ferry-Cyanide als Elektronenakzeptor der Fall ist. Die Ladungstrennung als Folge der ersten Lichtanregung könnte in diesem Fall andere strukturelle Änderungen, unter anderem Protonierung des Eisenatoms, auslösen, die die Extraphase im PBD-Signal bedingen.
- F) Ein wichtiger neuer Aspekt ist, dass eine Kontraktion im Zusammenhang mit dem  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang aufgelöst werden konnte. Es zeigt sich, dass die scheinbare Kontraktion, die mit dem ET vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{\text{ox}}$  einhergeht, mit einer Strukturänderung verbunden ist, die nicht exklusiv bei dem  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang auftritt.
- G) Ansteigende Phasen mit Zeitkonstanten von mehreren hundert Mikrosekunden wurden in PBD-Signalen ausgemacht, die durch Anregung von PSII-Komplexen im  $S_2$ -Zustand und im  $S_0$ -Zustand ausgelöst wurden. Diese werden mit Reaktionen an der Akzeptorseite des PSII in Verbindung gebracht. Gerechtfertigt kann diese Zuordnung unter anderem dadurch werden, dass sich PBD-Signale, gemessen in  $H_2O$  und  $D_2O$ , bei verschiedenen pH-Werten und verschiedenen Temperaturen, immer mit Zeitkonstanten der Akzeptorseite, die durch Fluoreszenzmessungen bestimmt wurden, anpassen ließen. Außerdem ließ sich die Zweieroszillation im Blitzmuster dieser langsamen Mikrosekunden-Phase durch die Zugabe des exogenen Elektronenakzeptors DCBQ vermindern, was ein zweiter Hinweis für die Richtigkeit der Zuordnung zu Reaktionen der Akzeptorseite ist.

- H) Hinweise auf eine der Sauerstoffentwicklung vorgelagerte Phase im Zusammenhang mit protolytischen Reaktionen (Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010) waren auch bei den verbesserten PBD-Signalen nicht eindeutig. Bei Messungen in  $D_2O$  und bei pH 5,5 deutete sich ein leicht sigmoidaler Kurvenverlauf des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Signals an. Der Effekt war jedoch schwach ausgeprägt und bei höheren pH-Werten nicht mehr auszumachen.
- I) Eine schnelle Zerfallsphase ( $\sim 30 \mu s$ ) war auf den PBD-Signalen des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs zu sehen, aber ausschließlich dann, wenn die Signale bei tiefer Temperatur oder in  $D_2O$  gemessen wurden (Abbildung 5-18). Diese interessante Beobachtung ist nicht ganz leicht zu erklären. Da sowohl im Zusammenhang mit dem ET des  $S_1 \rightarrow S_2$ - als auch des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs eine Kontraktion beobachtet wurde, könnte man eine solche Zerfallsphase mit Zeitkonstante des  $S_0 \rightarrow S_1$ -ETs von  $\sim 30 \mu s$  (Dekker et al. 1984a; Haumann et al. 2005a) auch hier erwarten. Bleibt die Frage, warum eine solche Zerfallsphase in den beiden oberen Graphen in Abbildung 5-18 nicht zu sehen ist. Auffällig ist, dass der Zerfall unter Bedingungen sichtbar ist, die den thermischen Beitrag zum PBD-Signal relativ zum strukturellen Beitrag verkleinern. Man kann daher vermuten, dass unter Standardbedingungen eine strukturell bedingte Kontraktion im Zusammenhang mit dem  $S_0 \rightarrow S_1$ -ET von einer thermisch bedingten Anstiegsphase mit ähnlicher Zeitkonstante überlagert wird. Die kinetische Separierung von Phasen mit einer Zeitkonstante von  $30 \mu s$  (ET) und  $100 \mu s$  (PT) ist ohnehin nicht ganz unkritisch. Eine vollständige Auslöschung der ET-Kontraktion durch eine zusätzliche  $30\text{-}\mu s$ -Anstiegsphase ist daher durchaus vorstellbar. Diskriminierung des thermischen Anstiegs (durch Senkung der Temperatur bzw. H/D-Isotopenaustausch) führt dieser Logik folgend dazu, dass die (strukturell bedingte) Kontraktion des  $S_0 \rightarrow S_1$ -ETs im PBD-Signal sichtbar wird. Hinweise auf eine thermische  $30\text{-}\mu s$ -Anstiegsphase, wie sie hier postuliert wird, sind in PBD-Signalen des  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergangs und bei Mn-freien Proben gefunden worden. So kann man eine der Sauerstoffbildung vorausgehende  $30\text{-}\mu s$ -Phase mit Beiträgen von defekten Photosystemen zum PBD-Signal in Verbindung bringen. Das Sättigungsverhalten einer ähnlichen Phase bei Mn-freien Photosystemen deutet auf einen thermischen Ursprung dieser Phase hin. Die Unsichtbarkeit einer Kontraktion in Verbindung mit dem  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang wäre damit konsistent erklärt und es kann generell auf eine Kontraktion im Zusammenhang mit dem ET vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{ox}$  geschlossen werden. Eine Ausnahme bildet dabei

der  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang mit starken strukturellen Änderungen, der Abgabe zweier Protonen und der Sauerstoffbildung.

- J) Mit der pH-Abhängigkeit von Ratenkonstanten wird ein weiteres Indiz dafür erbracht, dass ein PT vor dem  $S_2 \rightarrow S_3$ -ET stattfindet und ein weiterer PT nach dem  $S_0 \rightarrow S_1$ -ET.



**Abbildung 5-18:** Vergleich von PBD-Signalen des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs. Oben: gemessen unter Standardbedingungen. Der jeweils variierte Parameter ist in den unteren Graphen angegeben. Durchgezogene Linien repräsentieren Simulationen, bestehend aus drei Exponentialfunktionen (obere beiden Graphen) oder aus vier Exponentialfunktionen (untere beiden Graphen). Anpassungsparameter: siehe Tabelle 5-1 bis Tabelle 5-5.

## 6. Schnelle (Sub-Mikrosekunden) Strukturänderungen an der PSII-Donorseite

Prozesse mit einer Zeitkonstante von ~350 ns, die durch Laserblitz-Anregung von PSII-Komplexen im Oxidationszustand  $S_2$  oder  $S_3$  ausgelöst werden, sind in der Vergangenheit als eine energetische Relaxation des oxidierten Tyrosins ( $Y_Z^{ox}$ ) interpretiert worden. Im folgenden Kapitel wird die Beobachtung dieser Prozesse in photoakustischen Experimenten durch die Detektion einer Druckwelle nach Laseranregung der PSII-Probe beschrieben. Es zeigt sich, dass besonders bei Anregung von PSII-Zentren im  $S_2$ -Zustand eine Strukturänderung ausgelöst wird, die zu einer Kontraktion von mindestens  $30 \text{ \AA}^3$  führt. Eine Kontraktion mit ähnlicher Zeitkonstante von 350 ns (bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), die bei Anregung von PSII-Komplexen im  $S_3$ -Zustand beobachtet wird, fällt etwa fünfmal kleiner aus. Im  $S_0$ - und  $S_1$ -Zustand können keine Volumenänderungen im 100-ns-Zeitbereich detektiert werden. Die beobachteten Volumenänderungen in den höheren Oxidationszuständen  $S_2$  und  $S_3$  werden als Reorganisation des  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplexes und seiner Proteinliganden diskutiert.

Dieses Kapitel ist im Wesentlichen eine deutschsprachige Wiedergabe der Arbeit, die in *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1817(8): 1196-1207 veröffentlicht wurde (Klauss et al. 2012b). Die Daten stammen hauptsächlich von Thomas Sikora und sind während dessen Zeit als Diplomand entstanden. In dieser Arbeit wurden ergänzende Messungen durchgeführt, und eine komplette, alle Daten umfassende Analyse erfolgte. Die Ergebnisse wurden eingeordnet und diskutiert.

### 6.1 Materialien und Methoden

#### 6.1.1 Probenvorbereitung

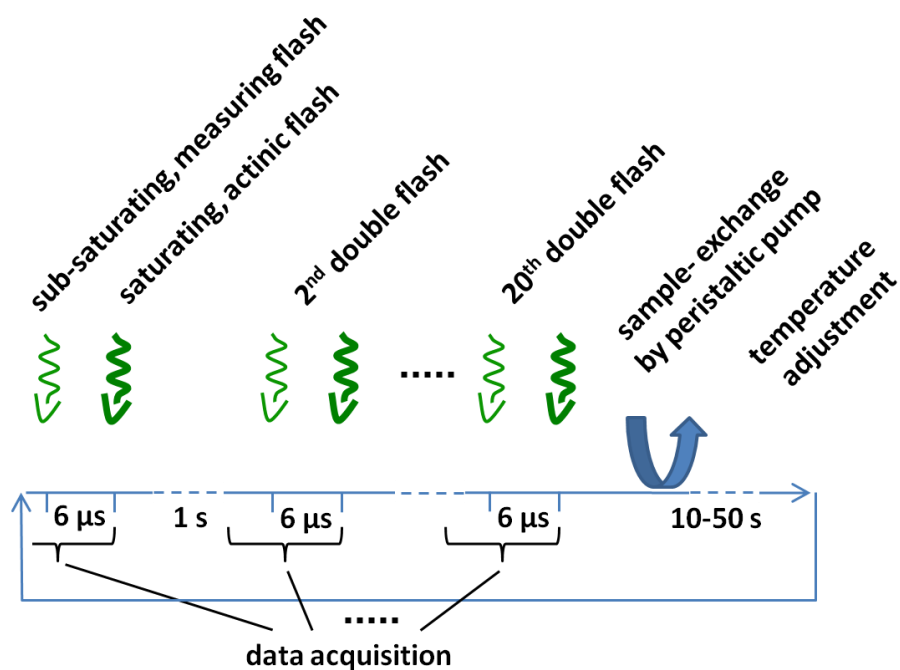
Für photoakustische Messungen wurden die hochaktiven PSII-Membranpartikel (siehe Abschnitt 2.5) für zwei Stunden auf Eis aufgetaut. Unter vorsichtigem Rühren wurde die PSII-Probe in Puffer D resuspendiert und eine Chlorophyllkonzentration von  $180 \mu\text{g/ml}$  eingestellt. Der künstliche Elektronenakzeptor DCBQ wurde in einer Konzentration von  $20 \mu\text{M}$  hinzugefügt und die Messung umgehend gestartet.

### 6.1.2 Photoakustische Messungen

Eine Prismenzelle (Autrey 1998) wurde verwendet, in der sich die Probenflüssigkeit im 0,5 mm breiten Zwischenraum zwischen zwei Prismen befindet. Das photoakustische (PA) Signal wurde durch einen Ultraschall-Transducer (2,25 MHz, V133-RM, Olympus NDT Inc., Waltham, MA) detektiert, verstärkt (HVA-10M-60-FEMTO, Berlin) und von einem Computer über eine 12-bit 7-MHz A/D-Wandlerkarte (PCI-1714U, Advantech, Taipei) aufgenommen.

Zwei Arten von Laserpulsen kamen in dem photoakustischen Experiment zur Anwendung (siehe Abbildung 6-1):

- 1.) Für die Auslösung des photoakustischen Signals kamen nicht-sättigende Mess-Laserpulse mit einer Energiedichte von  $50 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  pro Puls von einem frequenzverdoppelten gütegeschalteten Nd:YAG-Laser zur Anwendung (Continuum Minilite II, 532 nm, Pulsdauer  $\sim 5$  ns).
- 2.) Um ein vollständiges Voranschreiten der PSII-Probe im S-Zyklus zu erreichen, wurden gänzlich sättigende Blitze ( $4 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ) eines zweiten Nd:YAG-Lasers eingesetzt (Continuum Inlite, 532 nm, Pulsdauer  $\sim 5$  ns).



**Abbildung 6-1:** Experimentelles Laserblitzprotokoll. Nicht-sättigende Messlichtblitze und sättigende Laserpulse erfolgen immer als Paare in einem Abstand von 6 µs. Die Anwendung zweier Doppelblitze geschieht jeweils im Abstand von einer Sekunde. Weitere Details im Haupttext.

Die beiden verschiedenen Laserpulse wurden immer in Paaren angewendet, wobei dem nicht-sättigenden, das Signal auslösenden Puls (1) der sättigende Puls (2) in einem Abstand von  $6 \mu\text{s}$  folgte. In einem Zeitbereich von  $60 \mu\text{s}$  ( $30 \mu\text{s}$  vor dem Messblitz bis  $30 \mu\text{s}$  danach) wurde das Signal bei einer Abtastrate von  $19,5 \text{ MHz}$  aufgenommen.

Für photoakustische „Doppelblitz-Experimente“ wurden die dunkeladaptierten PSII-Membranpartikel von einer peristaltischen Pumpe (Masterflex, Cole Parmer) aus dem dunklen, auf Eis gekühlten Reservoir in die temperierte Probenzelle gepumpt. Je nachdem wie groß der Temperaturunterschied zwischen Reservoir und (der auf die gewünschte Messtemperatur temperierten) Probenkammer ausfiel, dauerte die Temperatureinstellung zwischen  $10 \text{ s}$  und  $50 \text{ s}$ . Anschließend folgte eine Serie von 20 Doppelblitzen, bestehend aus (1) dem Messblitz und um  $6 \mu\text{s}$  verzögert (2) dem sättigenden Laserpuls. Das Zeitintervall zwischen zwei Doppelblitzen betrug jeweils  $1 \text{ s}$ . Nach jeder Sequenz von 20 Doppelblitzen wurde die PSII-Probe ausgetauscht. Das Reservoir enthielt genügend Probenflüssigkeit um 25 Messzyklen (jeder bestehend aus 20 Doppelblitzen) bei jeder der sieben gewählten Temperaturen zwischen  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durchzuführen.

Als kalorimetrische Referenz wurde entweder der wasserlösliche Farbstoff BCP oder als intrinsische Referenz die PSII-Probe mit einem vollständig reduzierten Pool von Plastochinonmolekülen verwendet. Sind die Elektronenakzeptoren  $Q_A$ ,  $Q_B$ ,  $Q_C$  (Guskov et al. 2009) und weiterer in der PSII-Präparation vorhandene Plastochinonmoleküle (Krivanek et al. 2007) reduziert, wird eine weitere Reduktion der Chinon-Elektronenakzeptoren bei Lichtanregung verhindert und die Energie des Photons wird größtenteils als Wärme abgegeben. Die intrinsische Referenz wurde anstelle der Farbstoff-Referenz verwendet, um Ungenauigkeiten, die aus der starken Lichtstreuung der Membranfragmente resultieren, zu minimieren. Um die komplette Reduktion der Chinonmoleküle zu erreichen, wurde die Probe mit kontinuierlichem roten Hintergrundlicht von einer LED ( $627 \text{ nm}$ ,  $3 \text{ W}$  elektrische Leistung) beschienen. Zur Bestimmung des Referenzsignals wurde an einer – dem roten Licht ausgesetzten – Probe in der Prismenzelle 100 photoakustische Signalverläufe bei einer Blitzfrequenz des Anregungslasers von  $2 \text{ Hz}$  aufgenommen. Nach jeweils 100 Messungen erfolgte ein Austausch der Probe durch dunkeladaptierte aus dem Reservoir.

### **6.1.3 Korrektur für die Desynchronisation von S-Zuständen**

Ein *miss*-Parameter  $m$  von typischerweise  $10\%$  verhindert, dass die PSII-Probe bei Anregung mit sättigenden Laserblitzen vollständig synchron durch den Reaktionszyklus der

Wasseroxidation geschaltet wird. Da die Quantenausbeute für die Anregung eines Übergangs zwischen zwei Oxidationszuständen (S-Übergang) des Mn-Komplexes auch bei Anwendung von sättigenden Lichtblitzen kleiner als eins ist, kommt es beim Durchlaufen des S-Zyklus zu einer zunehmenden Vermischung von Zuständen in der PSII-Probe. Bei dem Korrekturansatz wurde in Analogie zum Vorgehen in Kapitel 5 davon ausgegangen, dass (i) jedes PSII nach der Dunkeladaptation im dunkelstabilen  $S_1$ -Zustand vorliegt und (ii) der Anteil  $(1-m)$  der Photosysteme bei Anregung mit einem (Doppel-)Blitz in den nächsten S-Zustand übergeht. Ein Fortschreiten um zwei S-Zustände bei der Anwendung eines Doppelblitzes ist sehr unwahrscheinlich, da  $6 \mu\text{s}$  nach der ersten Anregung der primäre Chinon-Akzeptor  $Q_A$  fast vollständig reduziert ist und eine weitere stabile Ladungstrennung bei Absorption eines weiteren Photons nicht möglich ist. ( $Q_A^-$ -Oxidation durch  $Q_B$  findet im Zeitbereich mehrerer hundert Mikrosekunden statt; siehe Kapitel 3.2.) In der Datenanalyse der Doppelblitz-Experimente konnten dementsprechend keine Hinweise auf eine bedeutende Wahrscheinlichkeit von Doppelanregungen gefunden werden.

Der im Anhang dargestellte mathematische Ansatz zur Korrektur für die Vermischung von S-Zuständen kam erneut zum Einsatz. In leichter Abwandlung zum Vorgehen in Kapitel 5 wurde der *miss*-Parameter  $m$  gesondert ermittelt. So wurden für einen Startwert von  $m$  (z.B. 10%) die reinen Signale – die dem PSII in einem seiner (semi-)stabilen Zustände ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  und  $S_0$ ) zugeschrieben werden können – aus den PA-Signalen berechnet, die beim ersten bis vierten Doppelblitz gemessen wurden (siehe auch Gleichungen A.7, A.8 und A.11 im Anhang). In einem zweiten Schritt wurden die so erhaltenen reinen PA-Signale dazu verwendet, um die PA-Signale beim fünften bis zehnten Laserblitz zu simulieren. Zur Bestimmung des optimalen Wertes des *miss*-Parameters wurde  $m$  schließlich wiederholt variiert und die Fehlersumme, berechnet aus diesen 5 PA-Zeitverläufen ausgelöst durch den fünften bis zehnten Laserblitz, minimiert.

#### 6.1.4 Quantitative Analyse von PA-Signalen

Das PA-Signal spiegelt eine Druckwelle wider, die bei Blitzanregung der PSII-Probe ausgelöst wird. Zur Bildung der Druckwelle tragen zwei Prozesse bei: (i) Ein Teil  $Q$  der Energie  $h\nu$  des absorbierten Photons wird thermisch deaktiviert und führt zur Erwärmung und Ausdehnung des Mediums. (ii) Umlagerungen auf atomarer Ebene führen zu einer nicht-thermischen Volumenänderung  $\Delta V_e$  des Proteins oder des umgebenden Lösungsmittels. Als

Summe der genannten Beiträge kann das PA-Signal wie folgt dargestellt werden (Gensch und Viappiani 2003):

$$H^S = \frac{C \cdot E_{\text{abs}}}{\kappa_T} \left( \frac{\beta}{C_P \rho} Q + \frac{\Delta V_e}{h\nu} \right), \quad (6.1)$$

wobei  $E_{\text{abs}}$  die gesamte von der PSII-Probe absorbierte Energie des Laserpulses ist. Die Konstanten  $\kappa_T$ ,  $\beta$ ,  $C_P$  und  $\rho$  sind die isothermische Kompressibilität, der kubische thermische Expansionskoeffizient, die spezifische Wärmekapazität und die Dichte der Lösung. Die instrumentelle Konstante  $C$  kann experimentell bestimmt werden, indem man ein gemessenes Signal mit dem einer kalorimetrischen Referenz vergleicht (Braslavsky und Heibel 1992; Gensch und Viappiani 2003). Die kalorimetrische Referenz zeichnet sich dadurch aus, dass 100% der absorbierten Lichtenergie in einer Zeitspanne in Wärme umgewandelt wird, die deutlich kürzer ist als die Integrationszeit des Experiments. Für das Signal der Referenz  $H^{\text{Ref}}$  gilt in Gleichung 6.1 also  $Q = 1$  und  $\Delta V_e = 0$ .

Kinetische Informationen über Intermediate von lichtinduzierten Reaktionen können in einem begrenzten Zeitfenster, gegeben durch die Integrationszeit des Druckaufbaus, aus photoakustischen Signalen gewonnen werden. Dabei kommt eine Technik zum Einsatz, die Signalfaltung und Kurvenanpassung kombiniert (Small et al. 1992), wie im Folgenden ausgeführt wird. Die zeitabhängige Pulsantwortfunktion, die die Dichte- und/oder Volumenänderungen nach Photoanregung beschreibt, wird durch eine Summe exponentieller Funktionen dargestellt:

$$H(t) = \sum_i \frac{A_i}{\tau_i} \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right), \quad (6.2)$$

wobei  $\tau_i$  die Zeitkonstante des  $i$ -ten Reaktions-Zwischenprodukts ist und  $A_i$  die zugehörige anteilige Amplitude. Das gemessene PA-Signal wird durch die Faltung der Pulsantwort  $H(t)$  mit der instrumentellen Antwort simuliert, wobei letztere durch das Referenzsignal  $H^{\text{Ref}}$  gegeben ist. Die Parameter  $A_i$  und  $\tau_i$  können dann variiert und die quadratische Fehlersumme zwischen simuliertem und gemessenem Zeitverlauf minimiert werden.

Jede Teilamplitude  $A_i$  besteht aus einem Beitrag, der durch Wärmefreisetzung  $Q_i$  ausgelöst wird, und einem, der auf strukturelle Volumenänderungen  $(\Delta V_e)_i$  zurückzuführen ist (siehe



Gleichung 6.1). Ähnlich wie bei der photothermischen Strahlablenkung können diese beiden Beiträge in wässrigen Medien durch die Variation der Temperatur voneinander unterschieden werden (Braslavsky und Heibel 1992; Gensch und Viappiani 2003). Der Faktor  $\beta/(C_p\rho)$ , der die starke Temperaturabhängigkeit des thermischen PA-Signals bedingt, beruht jedoch auf anderen thermoelastischen Eigenschaften als bei der photothermischen Strahlablenkung. In einem Temperaturbereich von 0 °C bis 30 °C lässt sich die Temperaturabhängigkeit mit einem Polynom zweiter Ordnung beschreiben. Unter der Annahme, dass strukturelle Volumenänderungen  $\Delta V_e$  und damit auch der nicht-thermische Teil des PA-Signals  $V_R$  in diesem Temperaturbereich konstant sind, lassen sich Werte für  $Q_i$  und  $V_{R,i}$  aus Gleichung 6.3 ableiten.

$$A_i(T) = (a + b \cdot T + c \cdot T^2)Q_i + V_{R,i} \quad (6.3)$$

Die Parameter  $a$ ,  $b$  und  $c$  werden in einem ersten Schritt durch die Simulation der Temperaturabhängigkeit der kalorimetrischen Referenzprobe bestimmt ( $Q^{\text{Ref}} = 1$ ,  $V_R^{\text{Ref}} = 0$ ). Unter Verwendung dieser Werte können anschließend Werte für die Teil-Wärmefreisetzung  $Q_i$  und die strukturelle Volumenänderung  $V_{R,i}$  bestimmt werden, indem man die Temperaturabhängigkeit der Amplituden  $A_i$  simuliert.

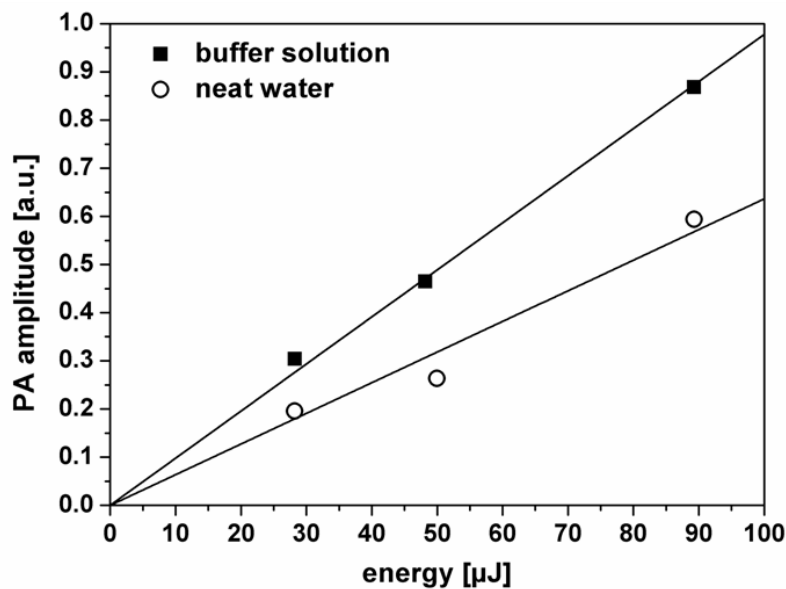
Die absolute Volumenänderung pro PSII  $\Delta V_e$  kann aus dem strukturellen Anteil des PA-Signals  $V_R$  und dem PA-Signal der Referenz  $H^{\text{Ref}}$  über Gleichung 6.4 bestimmt werden (Edens et al. 2000).

$$\Delta V_e = \frac{h\nu \cdot \beta}{\rho \cdot C_p} \frac{\kappa_T^{-8}}{\kappa_T^{20}} \frac{V_R}{H^{\text{Ref}}} = \chi \frac{V_R}{H^{\text{Ref}}} \quad (6.4)$$

Der Wert von  $\chi$  in Gleichung 6.4 beträgt  $21,8 \text{ \AA}^3$ , wenn man tabellierte Werte der thermoelastischen Eigenschaften von reinem Wasser bei 20 °C einsetzt ( $\beta = 206,6 \cdot 10^{-6} \text{ 1/K}$ ,  $C_p = 4,1819 \text{ J/g K}$ ,  $\rho = 998,23 \text{ kg/m}^3$ ,  $\kappa_T^{(20)} = 4,589 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$  (Weast 1970),  $\kappa_T^{(-8)} = 5,412 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ ). Für den hier verwendeten Puffer, der unter anderem Glycin-Betain in hoher Konzentration (1 M) enthält, wurde der Faktor  $\chi$  über eine Vergleichsmessung bestimmt (Abbildung 6-2). Dazu wurde das im Standardpuffer gemessene PA-Referenzsignal mit dem Signal, gemessen in reinem Wasser (für das die thermoelastischen Eigenschaften bekannt sind), verglichen (Jiwan et al. 1995). Die Steigungen der Ausgleichsgeraden in Abbildung 6-2 betragen  $9,0 \pm 0,2 \text{ mJ}^{-1}$  für den Puffer und  $6,4 \pm 0,4 \text{ mJ}^{-1}$  für reines Wasser. Der Fehler ergibt

sich aus dem  $1\sigma$ -Konfidenzbereich der linearen Regression. Nach Gleichung 6.1 entspricht das Verhältnis der Steigungen dem Verhältnis der  $\beta/(\kappa_T \cdot C_P \cdot \rho)$ -Werte und es zeigt sich, dass dieser im Puffer  $(1,4 \pm 0,1)$ -mal größer ist als in reinem Wasser. Eine gewisse Unsicherheit bei der Anwendung von Gleichung 6.4 bleibt mit Hinblick auf die Kompressibilität  $\kappa_T$  bei der Temperatur  $T_0$ . Für wenig konzentrierte Salzlösungen wird oft davon ausgegangen, dass ihre Kompressibilität näherungsweise identisch mit der von Wasser ist (Jiwan et al. 1995; Losi et al. 1999a). Eine 1-molare Betainlösung hat eine Kompressibilität von  $3,961 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$  bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  (Shek und Chalikian 2011). Dieser Wert liegt um etwa 10% tiefer als der entsprechende von reinem Wasser. Unter Berücksichtigung dieser zusätzlichen Unsicherheit wird für die relative Genauigkeit des Faktors 1,4 ein Wert von 20% angenommen. Für den verwendeten Messpuffer ergibt sich demnach die Bestimmungsgleichung der absoluten Volumenänderung zu:

$$\Delta V_e = 31 \pm 6 \text{ \AA}^3 \frac{V_R}{H^{\text{Ref}}}. \quad (6.5)$$



**Abbildung 6-2:** PA-Signalamplituden des Referenzfarbstoffs BCP im Standardpuffer (gefüllte Symbole) und in reinem Wasser (offene Symbole). BCP wurde in dem Standardpuffer und in Wasser, dessen pH-Wert sorgfältig auf 6,2 eingestellt war (durch Zugabe von verdünnter Salzsäure bzw. Natronlauge), gelöst und PA-Signale wurden bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  gemessen. Die jeweilige Energie der Anregungs-Laserpulse ist auf der x-Achse angegeben. Die PA-Amplitude entspricht hier dem ersten Maximum des photoakustischen Signals ( $1,90 \mu\text{s}$  nach Blitzanregung) und wurde auf die Absorption der Probe bei  $532 \text{ nm}$  (OD 0,10) normiert. Abbildung aus Klaus *et al.* (2012b).

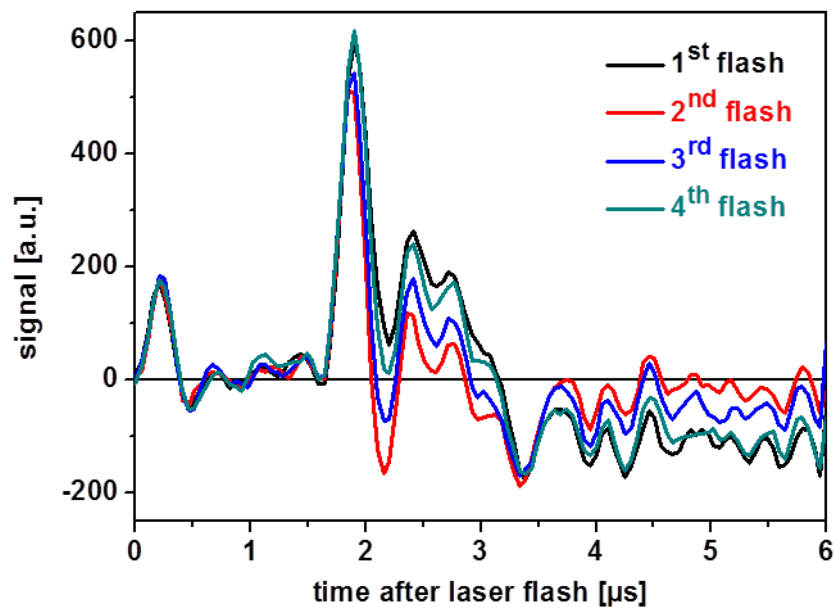
## 6.2 Ergebnisse

### 6.2.1 PA-Signale spezifischer S-Zustände

Durch die Anregung einer zunächst dunkeladaptierten PSII-Probe mit Laserblitzen (siehe Abschnitt 6.1.2) wurde diese annähernd synchron durch den S-Zustandszyklus geschaltet. PA-Signale konnten so an PSII-Proben gemessen werden, in denen vorwiegend einer der vier (semi-)stabilen S-Zustände bevölkert war. Der erste nicht-sättigende Laserblitz löste ein PA-Signal in der PSII-Probe aus, in der hauptsächlich der  $S_1$ -Zustand bevölkert war. Der folgende sättigende Laserblitz, der nur 6  $\mu$ s versetzt ausgelöst wurde, regte praktisch alle PSII-Komplexe an und verursachte die Bildung des Radikalpaars  $P680^+Q_A^-$  in all den Photosystemen, die vorher nicht von dem nicht-sättigenden Blitz getroffen worden waren. Die  $P680^+Q_A^-$ -Bildung führt zur Oxidation von  $Y_Z$  und anschließend zum  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang. Dieses ungewöhnliche Blitzprotokoll ermöglicht es auf der einen Seite PA-Signale bei nicht-sättigender Anregungsenergie zu messen und auf der anderen Seite die Wahrscheinlichkeit für das Fortschreiten um zwei Schritte im S-Zyklus („*double hits*“) bei der Anregung mit einem Doppelblitz auf vernachlässigbar kleinem Niveau zu halten. Als der zweite nicht-sättigende Blitz die PSII-Probe traf, hatten die meisten Photosysteme den  $S_2$ -Zustand erreicht und das entsprechende PA-Signal wurde aufgenommen. Mit dem dritten Doppelblitz-Paar wurde schließlich das PA-Signal von Photosystemen aufgenommen, die hauptsächlich den  $S_3$ -Zustand innehatte und ein Großteil der Photosysteme wurde in den  $S_0$ -Zustand überführt, und so weiter.

Die Druckwelle, die von jedem Laserblitz induziert wurde, brauchte etwa 1,5  $\mu$ s um den Transducer zu erreichen. In Abbildung 6-3 sind PA-Signale gezeigt, die durch den nicht-sättigenden Laserpuls in einer PSII-Probe ausgelöst wurden, wobei die Probe zuvor null, einem, zwei oder drei sättigenden Laserpulsen ausgesetzt war. Die prominente Oszillation, die 1,58  $\mu$ s nach dem Laserblitz beginnt, stellt den Anfang des vom Transducer aufgenommenen PA-Signals dar. Es ist in Abbildung 6-3 deutlich zu sehen, dass die Signale, die durch den zweiten und dritten nicht-sättigenden Blitz ausgelöst werden ( $2^{nd}$  und  $3^{rd}$  *flash*), von dem Signal des ersten Blitzes abweichen ( $1^{st}$  *flash*). Die Blitzzahlabhängigkeit des Transducersignals bei 1,95  $\mu$ s (~50 ns nach dem ersten PA-Maximum) und bei 5,95  $\mu$ s (als Maß für das Plateauniveau bei späteren Zeiten) ist in Abbildung 6-4 dargestellt. Die Amplituden zeigen eine klare Oszillation mit Periode von vier Blitzen, was darauf hindeutet,

dass die Abhängigkeit des PA-Signals von der Blitzzahl auf Reaktionen an der PSII-Donorseite zurückzuführen ist.



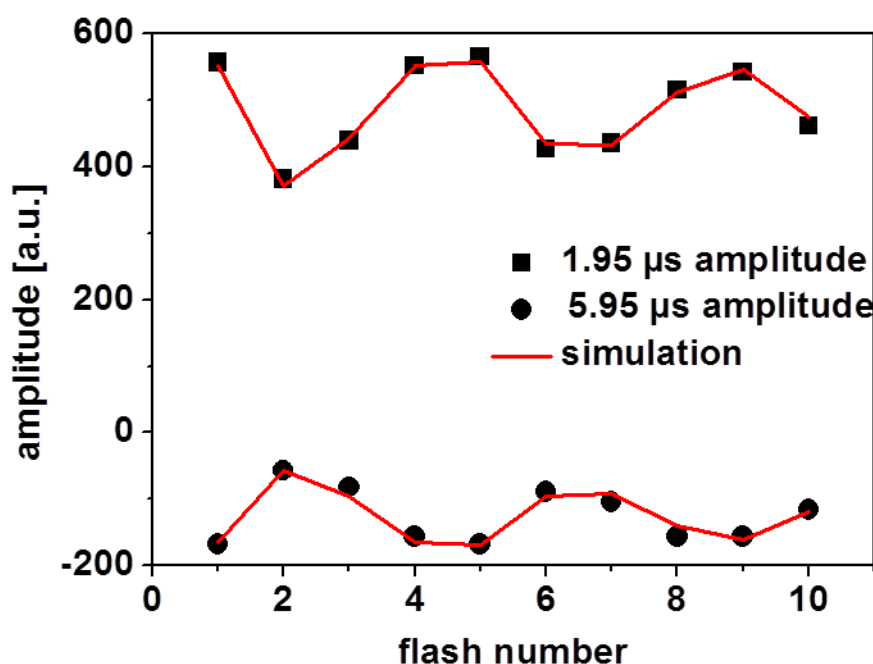
**Abbildung 6-3:** Zeitverläufe von photoakustischen Signalen des ersten bis vierten Laserblitzes. Die gezeigten PA-Signale stellen den Mittelwert aus 300 Einzelmessungen dar, bei denen jeweils eine Serie von Blitzen die zunächst ausgiebig dunkeladaptierte PSII-Probe anregte. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012b).

### 6.2.2 Streuartefakt

Eine kleinere, stark gedämpfte Oszillation ist im Tansducersignal unmittelbar nach Anregung mit dem Laserpuls auszumachen (Maximum bei  $\sim 200$  ns in Abbildung 6-3). Dieses Laserartefakt wird von gestreutem Licht verursacht, das die Transducer-Membran direkt trifft. Die dadurch ausgelöste Oszillation war stark gedämpft und wurde in der numerischen Analyse, die den Zeitbereich von  $1,59 \mu\text{s}$  bis  $6,00 \mu\text{s}$  umfasste, vernachlässigt. (Es sei angemerkt, dass das Verhältnis zwischen dem dominierenden Signalbeitrag (vom PSII) und dem Blitzartefakt bei niedrigen Temperaturen abnahm, ohne jedoch die Ergebnisse der Analyse wesentlich zu beeinflussen.) Zusätzlich wird von dem gestreuten Licht eine Druckschwankung verursacht, die an der Grenzfläche zwischen Prisma und Probenkammer reflektiert wird. Die Reflektion dieser Druckwelle ist mit einem ersten Minimum bei  $3,4 \mu\text{s}$  dem PA-Signal überlagert. Geringfügige systematische Abweichungen zwischen PA-Signal und Simulation (s.u.), die etwa  $3,3 \mu\text{s}$  nach Laseranregung auftreten, können mit Reflektionen der Artefakt-Druckwelle erklärt werden (Abbildung 6-7).

### 6.2.3 Korrektur für die Desynchronisation von S-Zuständen

Die Anwendung des oben beschriebenen Doppelblitz-Protokolls führt dazu, dass die PSII-Proben annähernd synchron durch den Reaktionszyklus schreiten. Eine gewisse Desynchronisation als Folge einer von 100% abweichenden Quantenausbeute der S-Übergänge ist jedoch unvermeidlich. Eine numerische Korrektur basierend auf dem Kok-Modell (Kok et al. 1970) wurde verwendet, um die Auswirkungen der Desynchronisation zu kompensieren (siehe Abschnitt 6.1.3). Die in Abbildung 6-5 gezeigten PA-Signalverläufe sind das Resultat dieser Korrektur und geben die „puren“ Signale für unvermischte Zustände der PSII-Probe wieder. Die Werte für den *miss*-Parameter  $m$  wurden über die Simulation von Amplitudenmustern der ersten 10 Doppelblitz-Anregungen bestimmt (Abschnitt 6.1.3). Wie erwartet (Messinger et al. 1993; Grabolle und Dau 2007) wies der *miss*-Parameter eine gewisse Temperaturabhängigkeit auf. Ein maximaler  $m$ -Wert von 12,8% ergab sich bei 0 °C. Zwischen 10 °C und 30 °C fanden sich Werte nahe 10%.

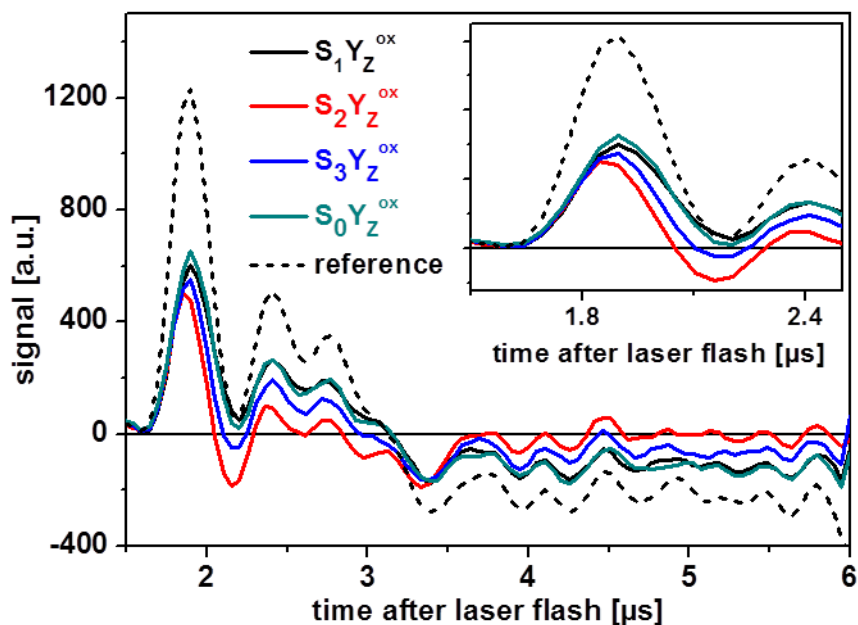


**Abbildung 6-4:** Blitzmuster der photoakustischen Signale bei 1,95 µs (Quadrate) und bei 5,95 µs (Punkte). Dunkeladaptierte PSII-Membranpartikel wurden mit einer Sequenz von 20 Doppelblitzen angeregt (bei 25 °C). Die Amplituden der PA-Signale 1,95 µs und 5,95 µs nach dem nicht-sättigenden ns-Laserblitz sind für die ersten 10 (Doppel-)Blitze gezeigt. Das Muster mit Periode von vier Blitzen ist auf den Mn-Komplex zurückzuführen und auf dessen Durchlaufen des Reaktionszyklus (S-Zyklus). Dies ist ein deutlicher Hinweis auf einen S-zustandsabhängigen Anteil des PA-Signals. Die Dämpfung der Oszillation ist eine Folge des von null verschiedenen *miss*-Parameters. Die rote Linie repräsentiert eine auf dem Kok-Modell basierende Simulation mit einem *miss*-Parameter von 10%. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012b).

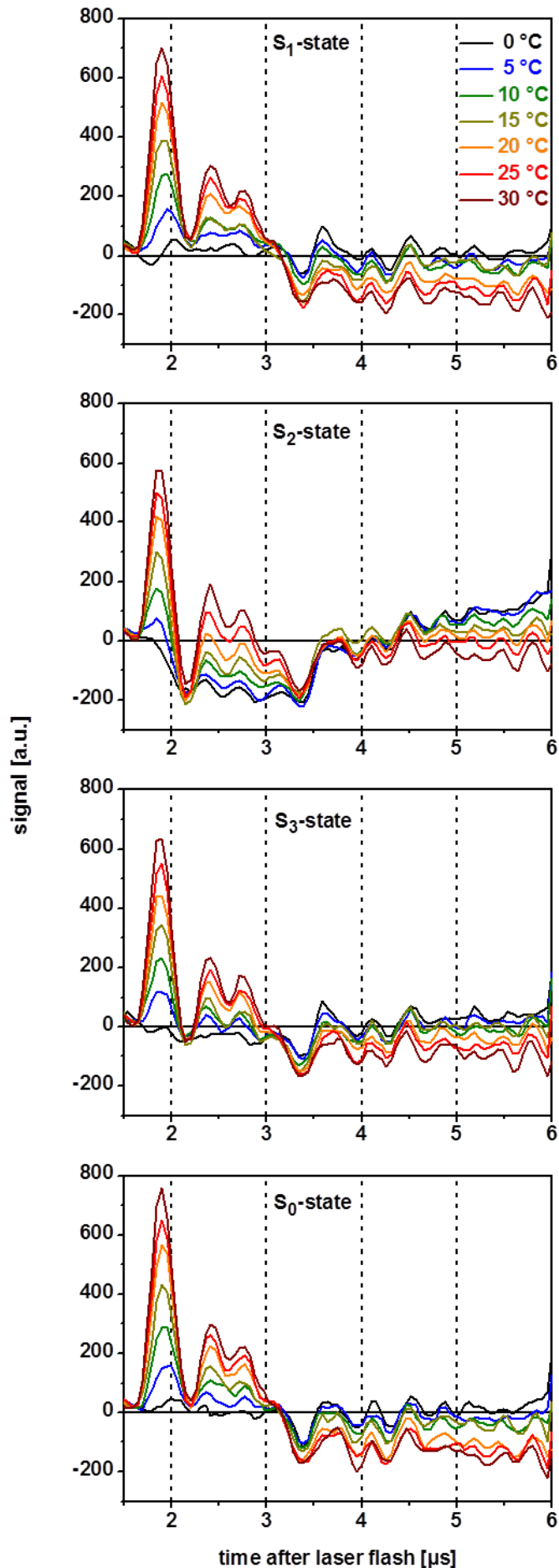
## 6.2.4 Temperaturabhängigkeit

Photoakustische Signale, die für die Desynchronisation der S-Zustände korrigiert wurden, sind in Abbildung 6-5 dargestellt. Das deutlich höhere Signal der intrinsischen Referenz (gestrichelte Linie in Abbildung 6-5) weist darauf hin, dass in allen S-Zuständen ein Teil der absorbierten Lichtenergie chemisch in der Bildung des  $Y_Z^{\text{ox}(+)}\text{Q}_A^-$ -Radikalpaars gespeichert und nicht als Wärme freigesetzt wird. Für eine genauere Analyse wurden PA-Signale in einem Temperaturbereich von 0 °C bis 30 °C aufgenommen und für die Desynchronisation der S-Zustände korrigiert. Die entsprechenden Signalverläufe sind in Abbildung 6-6 gezeigt.

Gleichung 6.3 sagt eine Abnahme des thermischen Signalbeitrags mit abnehmender Temperatur voraus, während strukturell bedingte Volumen- und Dichteänderungen temperaturunabhängig sind und daher bei niedrigen Temperaturen dominieren. Die Überlagerung von thermischen und strukturellen Beiträgen zum PA-Signal von PSII-Proben können die starken Änderungen der Signalverläufe bei abnehmender Temperatur erklären. Eine quantitative Analyse erfolgt im nächsten Abschnitt.



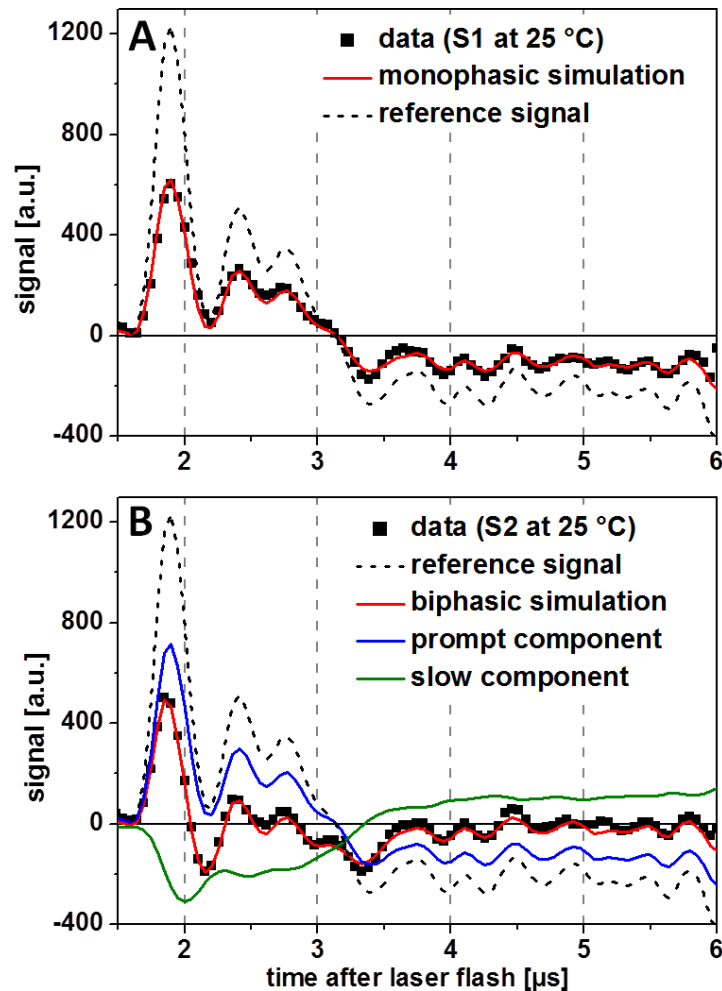
**Abbildung 6-5:** Photoakustische Signale von PSII-Proben in den Zuständen S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> und S<sub>0</sub> (S-Zustand vor Anwendung des Laserpulses). Die gezeigten Verläufe wurden für einen *miss*-Parameter von 10,0% korrigiert. Als gepunktete Linie ist das Signal einer intrinsischen Referenz gezeigt. Im „Inset“ ist die erste Oszillation des PA-Signals auf einer vergrößerten Zeitskala dargestellt. Temperatur: 25 °C. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012b).



**Abbildung 6-6:** Temperaturabhängigkeit der photoakustischen Signale von PSII-Membranpartikeln im  $S_1$ -,  $S_2$ -,  $S_3$ - und  $S_0$ -Zustand. Die gezeigten Signalverläufe wurden für „misses“ korrigiert. Der miss-Parameter betrug ungefähr 10% und zeigte eine leichte Temperaturabhängigkeit (0 °C,  $m = 12,8\%$ ; 5 °C,  $m = 11,6\%$ ; 10 °C,  $m = 9,5\%$ ; 15 °C,  $m = 10,6\%$ ; 20 °C,  $m = 9,4\%$ ; 25 °C,  $m = 10,0\%$ ; 30 °C,  $m = 10,2\%$ ). Bei jeder Temperatur wurden 300 Blitzsequenzen an jeweils dunkeladaptierten PSII-Proben durchgeführt. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012b).

### 6.2.5 Einphasige und zweiphasige Volumenänderungen

Die Ansprechfunktion (Response) von PSII-Proben auf eine Laserpuls-Anregung wurde mit der Funktion  $H(t)$  beschrieben und das PA-Signal über Faltung von  $H(t)$  mit dem Signal der intrinsischen Referenz simuliert (siehe Abschnitt 6.1.4).



**Abbildung 6-7:** Simulationen von photoakustischen Signalen von PSII-Membranpartikeln im  $S_1$ -Zustand (A) und im  $S_2$ -Zustand (B). Symbole repräsentieren die gemessenen Daten, die roten Linien eine Simulation unter Verwendung eines monophasigen Modells in (A) und eines zweiphasigen Modells in (B). Die gezeigten Daten wurden bei einer Temperatur von 25 °C gemessen. Die Kurvenanpassung erfolgte unter Verwendung einer iterativen Signalfaltungstechnik (siehe Abschnitt 6.1.4). In dem zweiphasigen Modell wurde das PA-Signal aus zwei Beiträgen zusammengesetzt: aus einer prompten Komponente (blaue Linie) und einer langsamen Komponente, die durch eine Zeitkonstante von etwa 350 ns charakterisiert war (grüne Linie). Die gestrichelte Linie zeigt das Referenzsignal, das bei der Simulation der PA-Signalverläufe als System-Antwortfunktion verwendet wurde. In (A) war ein monophasiges Modell, bestehend nur aus der prompten Komponente, ausreichend, um den PA-Signalverlauf zu beschreiben. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012b).

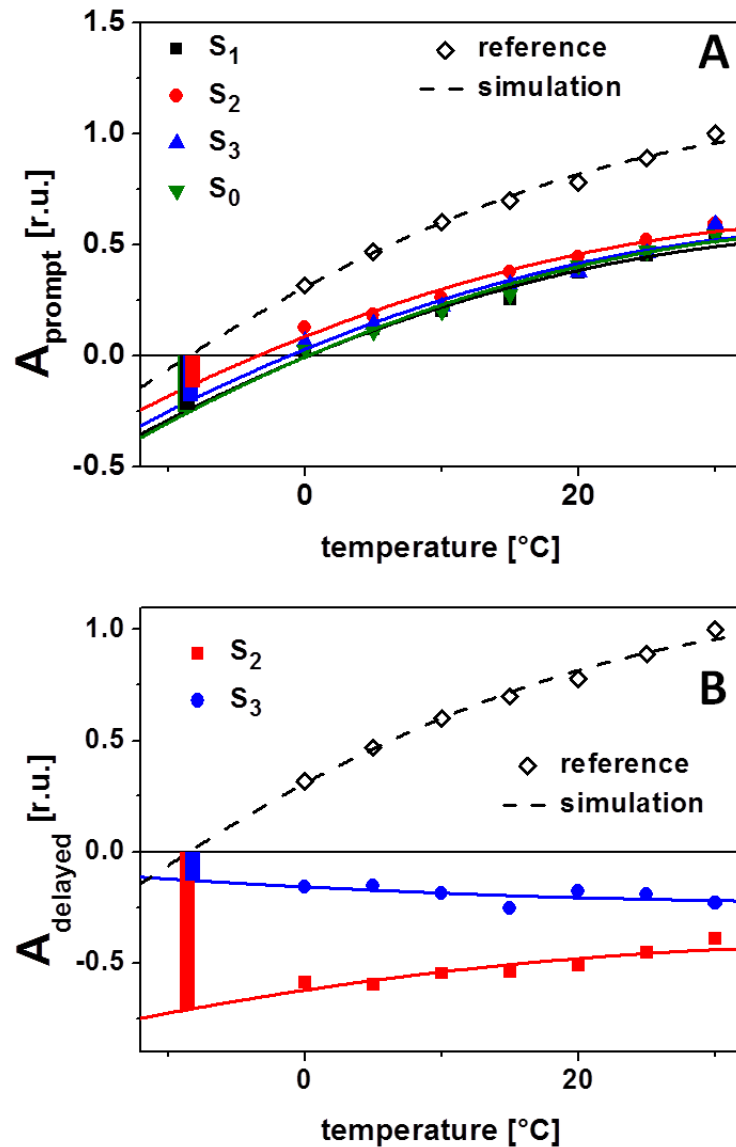


Nach Anregung von PSII-Komplexen mit einem Laserpuls zerfallen die angeregten Antennenzustände unter Re-Emission des Photons (Fluoreszenz) oder strahlungsfrei durch thermische Deaktivierung und die Auslösung von ET-Schritten, die zur Bildung des  $P680^+Q_A^-$ -Radikalpaars führen. Alle diese Prozesse sind deutlich schneller ( $\ll 10$  ns) als die Zeitauflösung des PA-Experiments. Aus numerischen Erwägungen wurde die prompte, kinetisch nicht aufgelöste Response der PSII-Probe durch eine exponentielle Komponente mit einer Zeitkonstante von 10 ns beschrieben ( $\tau_1$  in Gleichung 6.2). Bei Anregung mit einem Picosekunden-Laser ist die  $P680^+Q_A^-$ -Bildung zwar bereits nach 1 ns weitgehend abgeschlossen (Eckert et al. 1988), der  $\tau_1$ -Wert von 10 ns wurde jedoch unter Berücksichtigung der Tatsache gewählt, dass hier mit einem Nanosekunden-Laser angeregt wurde. Für die Simulation der PA-Zeitverläufe ist der genaue  $\tau_1$ -Wert vollkommen unkritisch (solange  $\tau_1$  kleiner als 30 ns ist).

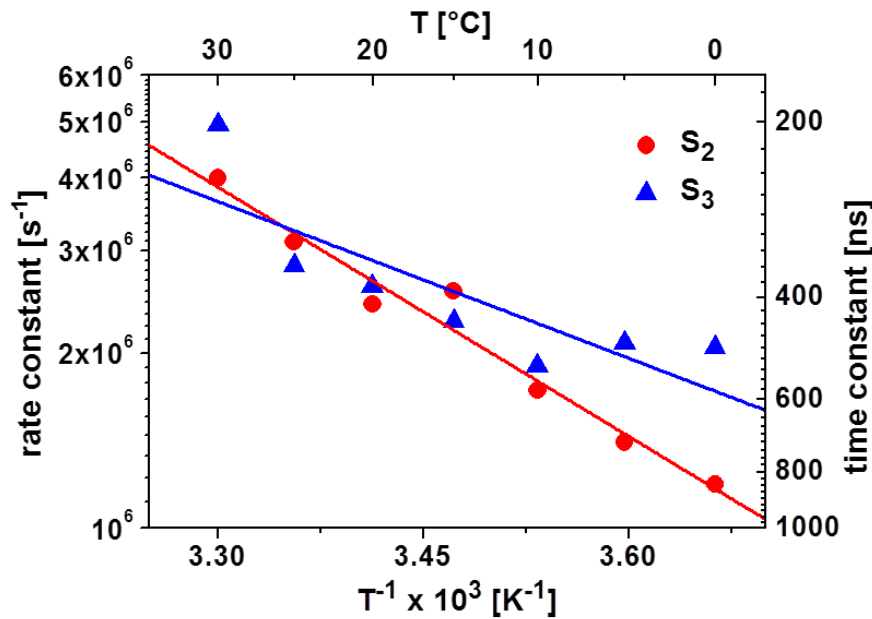
Die Simulation der PA-Signale im  $S_0$ - und  $S_1$ -Zustand mit diesem, nur die prompte (10 ns) Komponente beinhaltenden Ansatz lieferte adäquate Ergebnisse (Abbildung 6-7A), woraus geschlossen werden kann, dass der  $P680$ - $Y_Z$ -Elektronentransfer in den PA-Signalen nicht auflösbar ist. Nach passender Normalisierung stimmen das simulierte PSII-Signal (das die experimentellen Daten sehr gut beschreibt) und das Referenzsignal annähernd überein, wie es für eine schnelle (prompte) PSII-Response zu erwarten ist.

Bei PA-Signalen von PSII-Membranpartikeln im  $S_2$ - und  $S_3$ -Zustand resultiert die Beschreibung mit einer monoexponentiellen PSII-Response hingegen in deutlichen Unterschieden zwischen simuliertem und experimentellem Signal (Abbildung 6-7B). Im Minimum seiner ersten Oszillation (bei 2,2  $\mu$ s) wies der Signalverlauf im  $S_2$ - und  $S_3$ -Zustand bei allen Temperaturen einen negativen Wert auf, während das Referenzsignal (gestrichelte Linie) hier einen positiven Signalwert hatte. Dies impliziert, dass zur Simulation der PA-Signale von PSII-Proben im  $S_2$ - und  $S_3$ -Zustand eine Antwortfunktion  $H(t)$  notwendig ist, die aus zwei Komponenten mit unterschiedlichen Vorzeichen besteht. Die PSII-Response auf einen Laserpuls wurde also bi-exponentiell modelliert, wobei neben der prompten Response (10 ns) eine langsamere mit einer Zeitkonstante  $\tau_2$  von einigen hundert Nanosekunden berücksichtigt wurde. Die exakten Werte von  $\tau_2$  und den Amplituden der beiden exponentiellen Beiträge ( $A_1$  und  $A_2$  in Gleichung 6.2) wurden über Kurvenanpassung (Minimierung der Fehlerquadrate) bestimmt. Die Annahme, dass sich die PSII-Responsefunktion aus einem prompten und einem langsamen Beitrag zusammensetzt, ermöglichte qualitativ hochwertige Simulationen von PA-Signalen, die an PSII-Komplexen

im  $S_2$ - und  $S_3$ -Zustand gemessen wurden (Abbildung 6-7B). Die Werte, die durch Kurvenanpassung für die Parameter  $\tau_2$  ( $\tau_{\text{delayed}}$ ),  $A_1$  ( $A_{\text{prompt}}$ ) und  $A_2$  ( $A_{\text{delayed}}$ ) bestimmt wurden, sind in Abbildung 6-8 und Abbildung 6-9 dargestellt.



**Abbildung 6-8:** Temperaturabhängigkeit der Amplitude der schnellen (prompten) Komponente des PA-Signals (in A) und der langsamen Komponente (in B). Die Amplituden wurden über Simulationen unter Verwendung einer Signalfaltungstechnik (siehe Abschnitt 6.1.4) bestimmt. Nur für die PA-Signale von PSII-Partikeln im  $S_2$ - und  $S_3$ -Zustand war ein zweiphasiges Simulationsmodell erforderlich, das neben der prompten Komponente (in allen S-Zuständen vorhanden) eine langsame Komponente beinhaltet (200–900 ns). Die Amplituden der langsamen Komponente sind in B gezeigt; die zugehörigen Zeitkonstanten sind in Abbildung 6-9 dargestellt. Die offenen Symbole in A und B geben die Amplituden der (prompten) Antwort der intrinsischen Referenz wieder. Die Linien wurden durch Kurvenanpassung bestimmt (Gleichung 6.3 in Abschnitt 6.1.4). Die Länge der Balken ist ein Maß für die strukturelle Volumenänderung, die aus der auf  $-8$  °C extrapolierten PA-Amplitude berechnet werden kann (siehe Gleichungen 6.3 und 6.4). Abbildung aus Klauss *et al.* (2012b).



**Abbildung 6-9:** Arrhenius-Darstellung der Ratenkonstanten der langsamen Komponente in PA-Signalen von PSII-Partikeln im  $S_2$ - und  $S_3$ -Zustand. Die Ratenkonstanten (gefüllte Symbole, linke Skala) oder Zeitkonstanten (gefüllte Symbole, rechte Skala) wurden durch Simulation der in Abbildung 6-6 gezeigten PA-Signalverläufe ermittelt. Die Ausgleichsgeraden ergeben Aktivierungsenergien von  $285 \pm 50$  meV (im  $S_2$ -Zustand) und  $180 \pm 110$  meV (im  $S_3$ -Zustand). Die Fehlerangaben entsprechen dem  $2\sigma$ -Konfidenzintervall. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012b).

## 6.2.6 Thermischer und struktureller Beitrag zum PA-Signal

Die Temperaturabhängigkeit der Amplitude  $A_{\text{prompt}}$  ist in Abbildung 6-8A gezeigt. Durch Simulation nach Gleichung 6.3 kann der Anteil  $Q$  der absorbierten Energie bestimmt werden, der instantan (prompt) als Wärme abgegeben wird. Die von der intrinsischen Referenzprobe (offenen Symbole in Abbildung 6-8) instantan abgegebene Wärme entspricht dabei  $Q^{\text{Ref}} = 100\%$ . Die  $Q_{\text{prompt}}$ -Werte, die für die vier verschiedenen S-Zustände bestimmt wurden, lagen zwischen  $(70 \pm 11)\%$  und  $(77 \pm 12)\%$  und waren innerhalb der Fehlergrenzen nicht unterscheidbar (siehe Tabelle 6-1). Der nicht-thermische Beitrag zum prompten PA-Signal  $V_R^{\text{prompt}}$  hatte in allen vier S-Zuständen einen negativen Wert, was auf eine Kontraktion hinweist. Unter Verwendung von Gleichung 6.5 wurden Werte zwischen  $-6 \pm 3 \text{ \AA}^3$  und  $-10 \pm 4 \text{ \AA}^3$  bestimmt.

Abbildung 6-8B zeigt die Amplitude  $A_{\text{delayed}}$  des langsamen Anteils der PSII-Responsefunktion im  $S_2$ - und  $S_3$ -Zustand, die durch Zeitkonstanten von hunderten Nanosekunden gekennzeichnet ist. Der bei allen Temperaturen negative Wert von  $A_{\text{delayed}}$  deutet auf eine Dichtezunahme des PSII hin, die einer beträchtlichen Kontraktion entspricht.

Die für  $Q$  und  $\Delta V_e$  bestimmten Werte sind in Tabelle 6-1 zusammengefasst. Die Aktivierungsenergien der Reaktionen oder Prozesse, die nach Laserpulsanregung von PSII im  $S_2$ - und  $S_3$ -Zustand beobachtet werden, wurde über die Arrhenius-Darstellungen in Abbildung 6-9 bestimmt.

**Tabelle 6-1:** Wärmefreisetzung in Prozent der Photonenenergie ( $Q$ ) und Volumenänderung ( $\Delta V_e$ ) von PSII in den vier Oxidationszuständen  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  und  $S_0$ . Abgeleitet wurden die Werte aus der Temperaturabhängigkeit entsprechender PA-Signale. Es wurden Prozesse detektiert, die schneller als  $\sim 50$  ns sind (prompte Komponente), und solche, die im Zeitbereich hunderter Nanosekunden abliefen (langsame Komponente, „delayed“). Die Aktivierungsenergien wurden aus den Arrhenius-Darstellungen in Abbildung 6-9 bestimmt. Die angegebenen Zeitkonstanten wurden bei einer Temperatur von  $25$  °C ermittelt. Eine Korrektur der  $Q$ - und  $\Delta V$ -Werte für eine von eins verschiedene Quantenausbeute bei Anregung mit 532-nm-Photonen erfolgte nicht. Die Fehlerangabe entspricht dem  $2\sigma$ -Konfidenzintervall des entsprechenden Anpassungsparameters. Der Fehlerbereich der  $\Delta V$ -Werte beinhaltet auch die Unsicherheit des Umrechnungsfaktors  $\chi$  aus Gleichung 6.5. Tabelle adaptiert aus Klauss *et al.* (2012b).

	$S_1Y_Z^{ox}$	$S_2Y_Z^{ox}$	$S_3Y_Z^{ox}$	$S_0Y_Z^{ox}$
$Q_{prompt}$ [%]	$73.8 \pm 11.4$	$70.2 \pm 10.2$	$73.2 \pm 14.4$	$77.3 \pm 10.8$
$Q_{delayed}$ [%]	--	$27.0 \pm 11.8$	$-9.1 \pm 10.6$	--
$\Delta V_{prompt}$ [ $\text{\AA}^3$ ]	$-9.2 \pm 3.6$	$-5.5 \pm 2.9$	$-8.0 \pm 4.4$	$-9.8 \pm 3.4$
$\tau_{delayed, 25\text{ °C}}$ [ns]	--	320	350	--
$\Delta V_{delayed}$ [ $\text{\AA}^3$ ]	--	$-26.6 \pm 5.1$	$-4.8 \pm 3.2$	--
$E_A$ [meV]	--	$285 \pm 50$	$180 \pm 110$	--

## 6.3 Diskussion

### 6.3.1 Detektion einer schnellen und langsamen ( $\sim 350$ ns) Kontraktion

#### 6.3.1.1 Energiespeicherung und Quantenausbeute

Mit photoakustischen Experimenten ist es möglich den Anteil der Photonenenergie zu bestimmen, der vom Photosystem chemisch gespeichert wird. Die diesbezüglich ermittelten Ergebnisse sind mit einer relativ großen Ungenauigkeit behaftet, sollen aber der Vollständigkeit halber diskutiert werden. Der Anteil  $Q_{prompt}$  der Energie eines 532-nm-Photons, der innerhalb von  $\sim 30$  ns nach Absorption als Wärme abgegeben wird, betrug etwa 74% (wenn man den Mittelwert über die vier S-Zustände betrachtet). Bei einer

Quantenausbeute von 100% würde dies bedeuten, dass nur 26% von 2330 meV, das sind 600 meV, in dem  $[P680 \leftrightarrow Y_Z]^+ Q_A^-$ -Zustand gespeichert werden. Vergleicht man den hier für die gespeicherte Energie ( $E_{\text{stored}}$ ) bestimmten Wert von 600 meV mit dem von Delosme für die Anregung mit rotem Licht bestimmten Wert von 1100 meV (Delosme et al. 1994), so kann man zu dem Schluss kommen, dass die effektive Quantenausbeute bei Anregung mit 532 nm etwa halb so groß ist wie bei den Messungen von Delosme. Für die Ladungstrennung bei Anregung von PSII-Kernkomplexen mit rotem Licht wurde eine Quantenausbeute nahe 100% bestimmt (Hou et al. 2001); demnach läge die Quantenausbeute in dieser Arbeit bei nur 55%. Untersuchungen von Grabolle ergaben tatsächlich, dass die Quantenausbeute bei der Anregung von PSII-Membranpartikeln mit grünem Licht bis auf 50% zurückgehen könnte (Grabolle 2005), was möglicherweise mit dem ineffizienten Energietransfer von Carotinoiden zusammenhängt, die bei 532 nm angeregt werden. Dass die Anregung mit grünem Licht zu einer relativ niedrigen Quanteneffizienz führt, wurde auch schon 1943 beobachtet (Emerson und Lewis 1943). Die Vernachlässigung von Fluoreszenzemission in der PA-Analyse könnte ein weiterer Grund für den geringen Wert der chemischen Energiespeicherung sein.

### 6.3.1.2 Die schnelle Kontraktion in allen S-Zuständen

Die an PSII-Membranpartikeln gemessenen PA-Signale zeigten eine deutliche Abhängigkeit vom S-Zustand. Eine prompte Volumenkontraktion von etwa  $-8 \text{ \AA}^3$  (Tabelle 6-1) wurde in allen vier S-Zuständen beobachtet; ausgeprägte Dichteänderungen mit Lebensdauern von hunderten Nanosekunden traten hingegen nur bei Anregung von PSII-Proben im  $S_2$ - und  $S_3$ -Zustand auf. Unter der Annahme, dass die Quantenausbeute bei 55% lag, wurde für die prompte Kontraktion ein Wert von  $\Delta V_e = -15 \text{ \AA}^3$  berechnet, was in guter Übereinstimmung mit früheren Werten von  $-16 \text{ \AA}^3$  für die  $(Y_Z^{\text{ox}(+)}) Q_A^-$ -Bildung in PSII-Membranpartikeln (Delosme 2003) und  $-9 \text{ \AA}^3$  für die  $(P680^+ Q_A^-)$ -Bildung in manganfreien PSII-Kernkomplexen (Hou et al. 2001) ist. Es wurde vorgeschlagen, dass diese Kontraktion auf Elektrostriktion zurückgeführt werden kann, die aus der Entstehung von unkompensierten Ladungen an der Akzeptorseite ( $Q_A^-$ ) und an der Donorseite ( $P680^+$  oder  $Y_Z^+$ ) resultiert (Hou et al. 2001; Mauzerall et al. 2002).

### 6.3.1.3 Langsame Kontraktion in $S_2$ und $S_3$

Die Amplitude der langsamen Nanosekunden-Phase  $A_{\text{delayed}}$  der PA-Signale wies im  $S_2$ - und  $S_3$ -Zustand bei allen untersuchten Temperaturen einen negativen Werte auf (Abbildung 6-8B),

was auf eine Kontraktion des PSII im Zeitbereich hunderter Nanosekunden schließen lässt ( $\tau_{\text{delayed}} = 200\text{--}900$  ns). Diese Kontraktionen (Dichtezunahmen) waren ausschließlich bei der Anregung von PSII-Partikeln im  $S_2$ - und im  $S_3$ -Zustand zu beobachten, wobei die Volumenänderung im  $S_2$ -Zustand deutlich größer ausfiel als im  $S_3$ -Zustand. Die Entdeckung einer S-zustandsspezifischen Volumenänderung ist das zentrale Ergebnis dieser PA-Untersuchung.

Für die Wärmefreisetzung, die mit der langsamen Volumenkontraktion im  $S_3$ -Zustand einhergeht, ergibt die Datenauswertung einen Wert von -9% (Tabelle 6-1); im Rahmen des  $2\sigma$ -Fehlerintervalls ist jedoch auch ein Wert von null möglich. Die Interpretation der Temperaturabhängigkeit von  $A_{\text{delayed}}$  bei Laseranregung im  $S_2$ -Zustand wirft Fragen auf. Der für  $Q$  bestimmte Wert von +27% (Tabelle 6-1) ist unglaublich hoch. Es ist vorstellbar, dass der zugrundeliegende Prozess nicht adäquat durch eine einfache Exponentialfunktion beschrieben werden kann. Eine verfälschte Abschätzung der Zeitkonstanten, die aus einem zu einfachen Simulationsmodell resultiert, könnte die Temperaturabhängigkeit von  $A_{\text{delayed}}$  stark beeinflussen. Alternativ könnte die starke Temperaturabhängigkeit als Anzeichen dafür interpretiert werden, dass die Größe der strukturellen Volumenänderung selbst von der Temperatur abhängt. So wurde etwa für das „*Photoactive Yellow*“-Protein (PYP) eine Kontraktion im Zusammenhang mit der Bildung des pR-Zwischenzustands beobachtet, der bei 0 °C zweimal so groß war wie bei 20 °C (Takeshita et al. 2000; Takeshita et al. 2002).

Sichere Schlussfolgerungen bezüglich der Enthalpieänderungen in Verbindung mit den Volumenänderungen mit Zeitkonstanten von 350 ns (bei 25 °C) können daher nicht erfolgen. Die zentrale Aussage, dass eine Kontraktion des PSII-Proteins nach  $S_2Y_Z^{\text{ox}}$ - und  $S_3Y_Z^{\text{ox}}$ -Bildung zu beobachten ist, wird durch diese Unsicherheit jedoch nicht beeinträchtigt.

## 6.3.2 Ursprung der Kontraktionen

### 6.3.2.1 Zuordnung bekannter PSII-Prozesse

Es ist weithin anerkannt, dass die Reduktion des primären PSII-Elektronendonors P680 durch  $Y_Z$  ein multiphasiger Prozess ist, der großteils im Nanosekunden-Bereich stattfindet (Karge et al. 1996; Christen et al. 1998; Schilstra et al. 1998; Christen und Renger 1999; Christen et al. 1999; Jeans et al. 2002; Renger 2004). Absorptionsänderungen im nahen Infrarotbereich, die die  $P680^+$ -Reduktion widerspiegeln, sind durch eine schnelle Zerfallskomponente mit Lebensdauer von 20–60 ns dominiert, wenn sich die PSII-Probe im  $S_0$ - oder  $S_1$ -Zustand befindet (Brettel et al. 1984; Eckert und Renger 1988; Meyer et al. 1989). Die prompte

Kontraktion im  $S_0$ - und  $S_1$ -Zustand entsteht also aus einem  $[P680/Y_Z]^+Q_A^-$ -Zustand, in dem  $P680^+$  fast vollständig von  $Y_Z$  re-reduziert wurde. Die Kinetiken dieser schnellen Prozesse konnten im PA-Experiment nicht zeitlich aufgelöst werden. Auch wenn die Zeitkonstanten nicht bestimmt werden konnten, so war es doch möglich, den Umfang der zugehörigen Volumenänderung zu berechnen.

Für die Reduktion von  $P680^+$ , die dem  $S_2 \rightarrow S_3^-$  und dem  $S_3^- \rightarrow S_0$ -Übergang vorausgeht, zeigte sich in IR-Absorptionsdaten, dass in der multiphasigen  $P680^+$ -Reduktion zwei Phasen im Sub-Mikrosekunden-Bereich unterschieden werden können. Für die schnellere der beiden Komponenten wurde eine Zeitkonstante von  $\sim 50$  ns bestimmt, für die langsamere lag der Wert nahe 300 ns. Zur Erklärung dieses multiphasigen Verhaltens wurde vorgeschlagen, dass eine Reihe von Relaxationsprozessen das Redoxgleichgewicht zwischen  $P680^+Y_Z$  und  $P680Y_Z^{ox}$  zum zweiten Zustand hin verschiebt (Renger 2004) (siehe Abbildung 6-10). Die Zeitkonstanten bei Raumtemperatur und auch die Aktivierungsenergien, die für die langsamen Nanosekunden-Kinetiken der  $P680^+$ -Reduktion bestimmt wurden, sind den entsprechenden in PA-Experimenten gefundenen Werten der langsamen Kontraktion sehr ähnlich ( $280 \pm 50$  meV in  $S_2$ ;  $240 \pm 80$  meV in  $S_3$  (Jeans et al. 2002), siehe aber auch (Eckert und Renger 1988)). Die PA-Daten implizieren also, dass die zuvor beobachtete Relaxation, d.h. das Absenken des  $\Delta G$ -Niveaus des  $Y_Z^{ox}$ -Zustands relativ zu  $P680^+$ , mit einer nuklearen Umordnung verbunden ist, die zu einer Kontraktion des Proteins führt.

### 6.3.2.2 Schnelle Kontraktion durch Elektrostriktion

Vor der Diskussion der langsamen Relaxation (350 ns) soll der physikalisch-chemische Ursprung der schnellen Kontraktion betrachtet werden. Die Analyse der PA-Daten zeigt, dass die anfängliche Bildung des  $[P680/Y_Z]^+Q_A^-$ -Radikalpaars mit einer Kontraktion (Dichtezunahme) des PSII-Proteinkomplexes oder des ihn umgebenden Lösungsmittels um  $15 \text{ \AA}^3$  verbunden ist. Eine Volumenänderung von  $15 \text{ \AA}^3$  entspricht etwa dem halben durchschnittlichen Volumen eines Wassermoleküls ( $\sim 30 \text{ \AA}^3$  im flüssigen Wasser) und ist daher im Vergleich zum Gesamtvolumen des PSII-Komplexes sehr klein. Das Ausmaß der Kontraktion scheint im manganfreien PSII (Hou et al. 2001) und im PSII mit intaktem Mn-Komplex ähnlich zu sein (diese Arbeit und (Delosme 2003)).

Die Bildung von unkompensierter Ladung, etwa durch Elektronentransfer, führte in biologischen Photosystemen (Gensch und Viappiani 2003; Hou und Mauzerall 2011) und

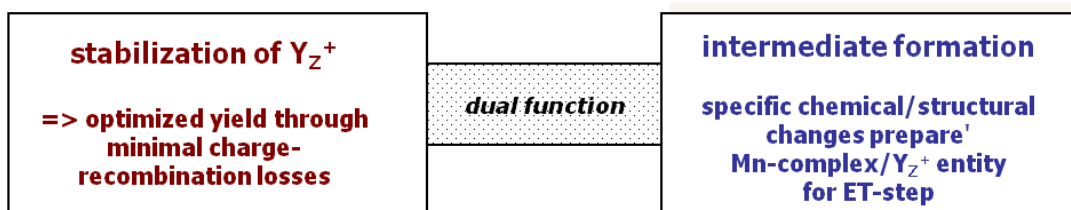
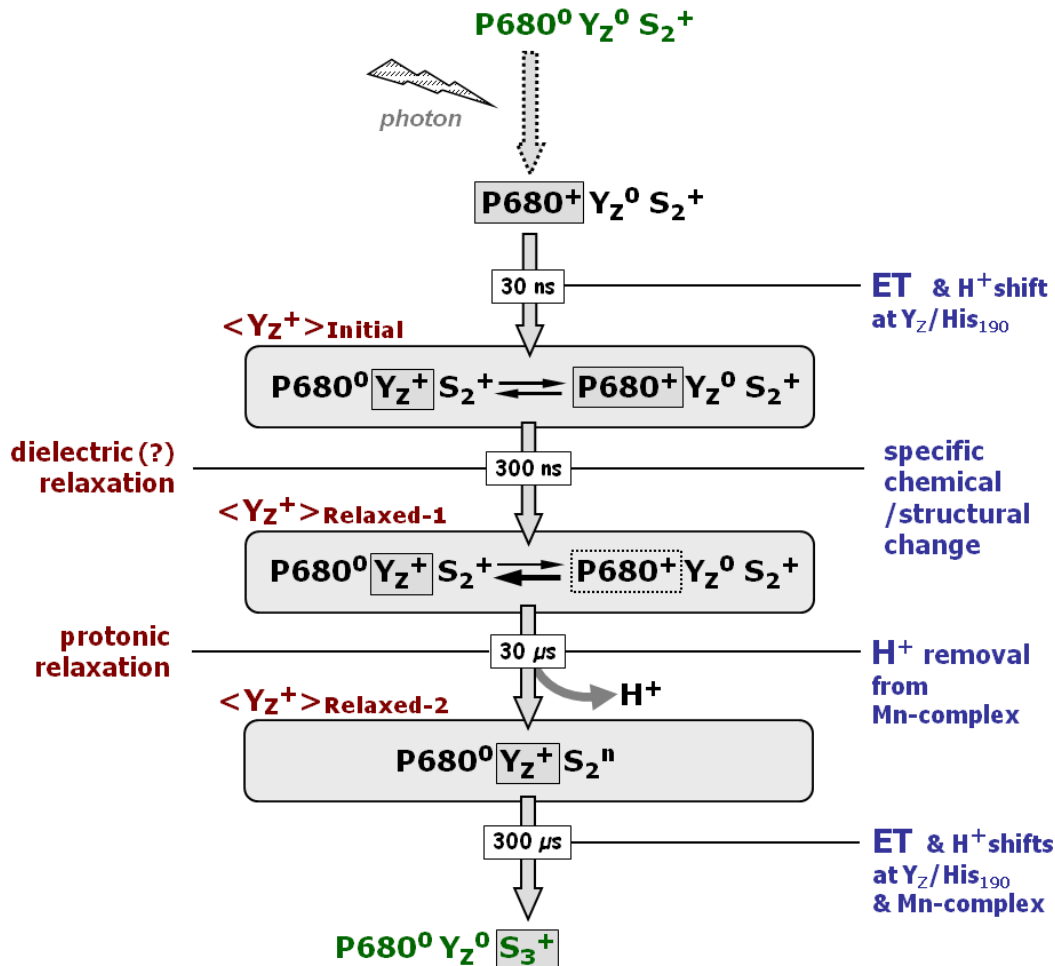
auch in synthetischen molekularen Systemen (Feitelson und Mauzerall 2002; Rizzi et al. 2008) zu einer Kontraktion, die in photoakustischen Experimenten detektiert werden konnte. Eine elektrische Ladung auf einem Molekül in wässriger Elektrolytlösung kann dazu führen, dass durch Umorientierung von umgebenden (Wasser-)Molekülen und Ionen die Lösung kompakter wird (die Dichte also zunimmt) (Drude und Nernst 1894; Borsarelli et al. 1997; Borsarelli und Braslavsky 1999; Marcus 2011). Im PSII befinden sich die aufgeladenen Cofaktoren ( $Q_A^-$  und  $P680^+$  bzw.  $Y_Z^{ox(+)}$ ) nicht in direkter Nähe der Grenzschicht zwischen Protein und Lösungsmittel, sodass ein großer Beitrag zur Volumenänderung hervorgerufen durch Umorientierungen im Lösungsmittel unwahrscheinlich erscheint. Ein ähnlicher Prozess, der im Proteininneren zu einer Verdichtung führt, etwa durch kleine Verschiebungen von geladenen oder polaren Gruppen des Proteins und den zahlreichen Wassermolekülen, die im PSII-Komplex entdeckt wurden, ist vorstellbar. Diese Verdichtung wurde mit Elektrostriktion (unter Verwendung eines Kontinuum-Modells des Proteins mit homogenen elastischen Eigenschaften) beschrieben (Arata und Parson 1981; Mauzerall et al. 2002). Auch wenn das Kontinuum-Modell nur eine grobe Annäherung darstellt, so könnten die Volumenänderungen, die mit der  $[P680/Y_Z]^+Q_A^-$ -Radikalpaarbildung einhergehen, doch qualitativ richtig durch Elektrostriktion beschrieben werden.

### 6.3.2.3 Spezifische strukturelle Änderungen

Während eine prompte Kontraktion von ähnlicher Größe bei Blitzanregung von PSII-Komplexen in allen vier S-Zuständen beobachtet wurde, zeigte die langsame Kontraktion (200-900 ns) eine deutliche Abhängigkeit vom S-Zustand. So war die langsame Kontraktion in den Zuständen  $S_0$  und  $S_1$  nicht zu detektieren, und im  $S_3$ -Zustand fiel sie viel kleiner aus als im  $S_2$ -Zustand. Relativ zum dunkelstabilen  $S_1$ -Zustand ist der Mn-Komplex in den beiden Zuständen  $S_2$  und  $S_3$  jeweils einfach positiv geladen (Lavergne und Junge 1993; Witt 1996; Junge et al. 2002; Dau und Haumann 2008), was darauf hindeutet, dass nicht der Ladungszustand des Mn-Komplexes die besonders ausgeprägte Kontraktion bei Anregung von PSII-Partikeln im  $S_2$ -Zustand verursacht. Die langsame Kontraktion im  $S_2$ -Zustand fällt mit einem Ausmaß von mehr als  $40 \text{ \AA}^3$  (nach Korrektur für die kleine Quantenausbeute) deutlich größer aus als die Kontraktion, die bei der Bildung des Radikalpaars  $[P680/Y_Z]^+Q_A^-$  möglicherweise durch Elektrostriktion verursacht wird. Die Prozesse, die der langsamen Kontraktion zugrundeliegen, sind wahrscheinlich nicht von der Art Elektrostriktion, wie sie bei der schnellen Bildung von getrennten Ladungen auf  $Q_A^-$  und  $[P680/Y_Z]^+$  diskutiert wurde. Die ausgeprägte Abhängigkeit vom S-Zustand lässt vermuten, dass die langsame Kontraktion



im  $S_2$ -Zustand und im  $S_3$ -Zustand durch nukleare Bewegungen/Umorientierungen verursacht wird und dass diese den Mn-Komplex, das Tyrosin  $Y_Z$  und das umgebende Wassernetzwerk betreffen, das schematisch in Abbildung 1-4 gezeigt ist.



**Abbildung 6-10:** Vorgeschlagnene Sequenz von Ereignissen an der PSII-Donorseite nach Blitzanregung im  $S_2$ -Zustand. Einige Schritte können einerseits als Relaxationsschritte (Beschriftung der linken Seite) und andererseits als Bildung von spezifischen Zwischenzuständen (rechte Seite) angesehen werden. Es wird vorgeschlagen, dass beide Blickwinkel komplementär sind und jeweils eine Seite der dualen Funktion des jeweiligen Prozesses beschreiben. Der Ausdruck „dielectric relaxation“ ist mit einem Fragezeichen markiert, da es missverständlich sein könnte, eine spezifische Strukturänderung als dielektrische Antwort zu bezeichnen. Abbildung aus Klauss *et al.* (2012b).

### 6.3.3 Hypothese zur $Y_Z^+$ -Relaxationsleiter

Im Jahr 2004 fasste Renger Ergebnisse von Untersuchungen der multiphasigen  $P680^+$ -Reduktion zusammen (Renger 2004). Seine Interpretation und eine komplementäre, durch photoakustische Ergebnisse motivierte Sichtweise sind in Abbildung 6-10 illustriert und im Folgenden erläutert.

- (1)  $\langle Y_Z \rangle_{\text{initial}}$ : Die schnelle Komponente der  $P680^+$ -Reduktionskinetiken ( $\sim 30$  ns) wird einem nicht-adiabatischen Marcus-ET (Marcus und Sutin 1985) vom Tyrosin  $Y_Z$  zum  $P680^+$ -Kation zugeschrieben (Renger 2004), der wahrscheinlich an eine Protonenverschiebung innerhalb einer Wasserstoffbrücke zwischen  $Y_Z$  und  $\text{His}_{190}$  gekoppelt ist (siehe Abschnitt 1.2.1 und Abbildung 1-4). Die multiphasigen  $P680^+$ -Reduktionskinetiken deuten an, dass  $\Delta G^0$  dieses schnellen 30-ns-ETs niedrig ist, sodass in dem  $\langle Y_Z^+ \rangle_{\text{initial}}$ -Zustand (Abbildung 6-10) des PSII-Ensembles  $P680^+$  in einem beträchtlicher Anteil der Photosysteme vorliegt.
- (2)  $\langle Y_Z \rangle_{\text{relaxed-1}}$ : Die langsame Nanosekunden-Komponente in den  $P680^+$ -Reduktionskinetiken ( $\sim 300$  ns) impliziert eine Verschiebung des Redoxgleichgewichts vom  $P680^+Y_Z^0$ -Zustand hin zum  $P680^0Y_Z^+$ -Zustand. Dies kann als Stabilisierung des oxidierten  $Y_Z^{\text{ox}}$  durch energetische Relaxation angesehen werden, eine Stabilisierung also, die durch Absenkung des zugehörigen Freie-Energie-Niveaus erreicht wird. Hierdurch wird der  $\langle Y_Z^+ \rangle_{\text{relaxed-1}}$ -Zustand des PSII-Ensembles erreicht. In Referenz (Renger 2004) wurde dieser Prozess als „dielektrische Relaxation“ bezeichnet und vermutet, dass diese ihren Ursprung in Proteindynamiken und Kaskaden von Relaxationsprozessen hat. Die Ergebnisse der PA-Experimente legen nun nahe, dass die energetische Relaxation mit einer Umlagerung von Kernen verbunden ist, die zu einer Kontraktion von  $\sim 50 \text{ \AA}^3$  führt. Wegen der ausgeprägten S-Zustandsabhängigkeit der langsamen Volumenänderung kann vermutet werden, dass nach der  $Y_Z^{\text{ox}}$ -Bildung eine spezifische chemische oder strukturelle Änderung stattfindet, die den Mn-Komplex und dessen Umgebung betrifft. Dieser chemische/strukturelle Schritt ist notwendigerweise energetisch abwärtsgerichtet, sodass die Freie Energie des Radikalpaars gesenkt und  $Y_Z^{\text{ox}}$  weiter stabilisiert wird. Dieser Schritt kann folglich als energetische Relaxation angesehen werden. Zusammenfassend kann der Prozess im Bereich einiger hundert Nanosekunden sowohl einer energetische Relaxation als auch einer spezifischen chemischen oder auch strukturellen Änderung zugeordnet werden. Die energetische Relaxation entspricht einer Stabilisierung von  $Y_Z^{\text{ox}}$  und reduziert

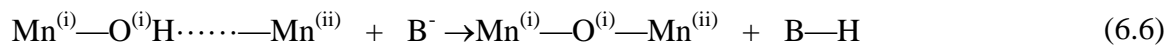
damit die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination des Kationradikals an der Donorseite mit dem  $Q_A^-$ -Anion an der Akzeptorseite des PSII (Rappaport et al. 2002; Rappaport et al. 2005; Cser und Vass 2007; Vass 2011). Durch die chemischen/strukturellen Änderungen wird ein Zwischenzustand des Mn-Komplexes und seiner Umgebung gebildet. Diese Intermediatbildung stellt einen ersten Schritt einer Sequenz dar, welche schließlich zur Entfernung eines Protons vom Mn-Komplex und dem ET zu  $Y_Z^{ox}$  führt.

- (3)  $\langle Y_Z \rangle_{relaxed-2}$ : Der nächste Relaxationsschritt in Abbildung 6-10 ist die Bildung des  $\langle Y_Z^+ \rangle_{relaxed-2}$ -Zustands. Dies wurde aus den Mikrosekunden-Komponenten der  $P680^+$ -Reduktion geschlossen. Die hier beobachteten PA-Signale geben keine Auskünfte über diesen Zeitbereich. Die „protonische Relaxation“, die zur  $\langle Y_Z^+ \rangle_{relaxed-2}$ -Bildung führt (Christen et al. 1998; Schilstra et al. 1998; Christen und Renger 1999; Renger 2004), könnte durch Deprotonierung und Entfernung eines spezifischen Protons von dem Mn-Komplex erklärt werden (Dau und Haumann 2008). Eine protolytische Reaktion mit passender Zeitkonstante von  $\sim 30 \mu s$  konnte mit den photothermischen Messungen in Kapitel 4 nachgewiesen werden. Auch hier deutet sich eine duale Rolle des Schrittes an: (i) die energetische Relaxation vermindert die Wahrscheinlichkeit von Verlusten durch Ladungsrekombination und (ii) ein chemischer Schritt (Protonentransfer) ermöglicht den folgenden ET vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{ox}$ .

Die ersten Schritte in dem  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang des PSII können auf analoge Weise beschrieben werden. Die chemisch/strukturellen Änderungen, die zur Bildung des  $\langle Y_Z^+ \rangle_{relaxed-1}$ -Zustands führen, sind jedoch andere, da die PA-Daten nahelegen, dass die Volumenänderung deutlich kleiner ist.

Die Ergebnisse der PA-Studie haben gezeigt, dass die „dielektrische Relaxation“ (Renger 2004) strukturelle Änderungen beinhaltet, die zu einer Kontraktion des PSII-Proteins führen. Genauere Informationen über Strukturänderungen auf atomarer Ebene können nicht gegeben werden. Man kann jedoch über mögliche wenn auch hoch hypothetische Szenarien bezüglich chemischer/struktureller Änderungen im  $Y_Z^{ox}S_2$ -Zustand spekulieren. So wurde auf der Grundlage von Röntgenabsorptionsstudien (Dau et al. 2001; Dau et al. 2003) vorgeschlagen, dass im  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang ein Wassermolekül oder ein Hydroxid ( $O^{(i)}H$ ), das an ein spezifisches Mn-Ion ( $Mn^{(i)}$ ) gebunden ist, deprotoniert und in eine Oxo-Brücke zwischen  $Mn^{(i)}$  und  $Mn^{(ii)}$  transformiert wird. Da gleichzeitig eine offene Koordinationsstelle des  $Mn^{(ii)}$

mit  $O^{(i)}$  besetzt wird, ändert sich die Koordinationsgeometrie des  $Mn^{(ii)}$  von fünf-koordiniert zu sechs-koordiniert (siehe Gleichung 6.6).



Von dem fünf-koordinierten  $Mn^{(ii)}$  wurde angenommen, dass es dem  $Mn^1$  in Abbildung 1-4 entspricht (Dau et al. 2008), was auch numerische Studien nahelegten (Siegbahn 2008; Pantazis et al. 2009; Schinzel et al. 2010). Die Besetzung einer offenen Koordinationsstelle von  $Mn^{(ii)}$  und die Bildung einer zusätzlichen  $\mu$ -Oxo-Brücke zwischen Mn-Ionen könnte zu einer kompakteren Struktur des  $Mn_4Ca(\mu-O)_5$ -Kerns des Mn-Komplexes führen. Um die Ergebnisse der PA-Experimente zu erklären, kann man nun annehmen, dass die Oxidation von  $Y_Z$  eine Deprotonierung von  $Mn^{(i)}-O^{(i)}H$  auslöst und das Proton an eine Base in der Nähe (z.B.  $Asp_{61}$  in Abbildung 1-4) übergeht. Aufgrund der hohen Flexibilität der Proteinstruktur könnten die Verdichtung des  $Mn_4Ca(\mu-O)_5$ -Kerns und Änderungen im Wasserstoffbrücken-Netzwerk zu einer Kontraktion des PSII-Proteins führen, die im PA-Experiment detektierbar ist.

Das beschriebene Szenario soll ausschließlich illustrieren, dass spezifische Strukturänderungen die beobachtete Kontraktion grundsätzlich erklären könnten. Weitere experimentelle und numerische Studien sind notwendig, um tiefere Einsichten auf atomarer Ebene über die sich hier andeutenden Strukturänderungen zu gewinnen.

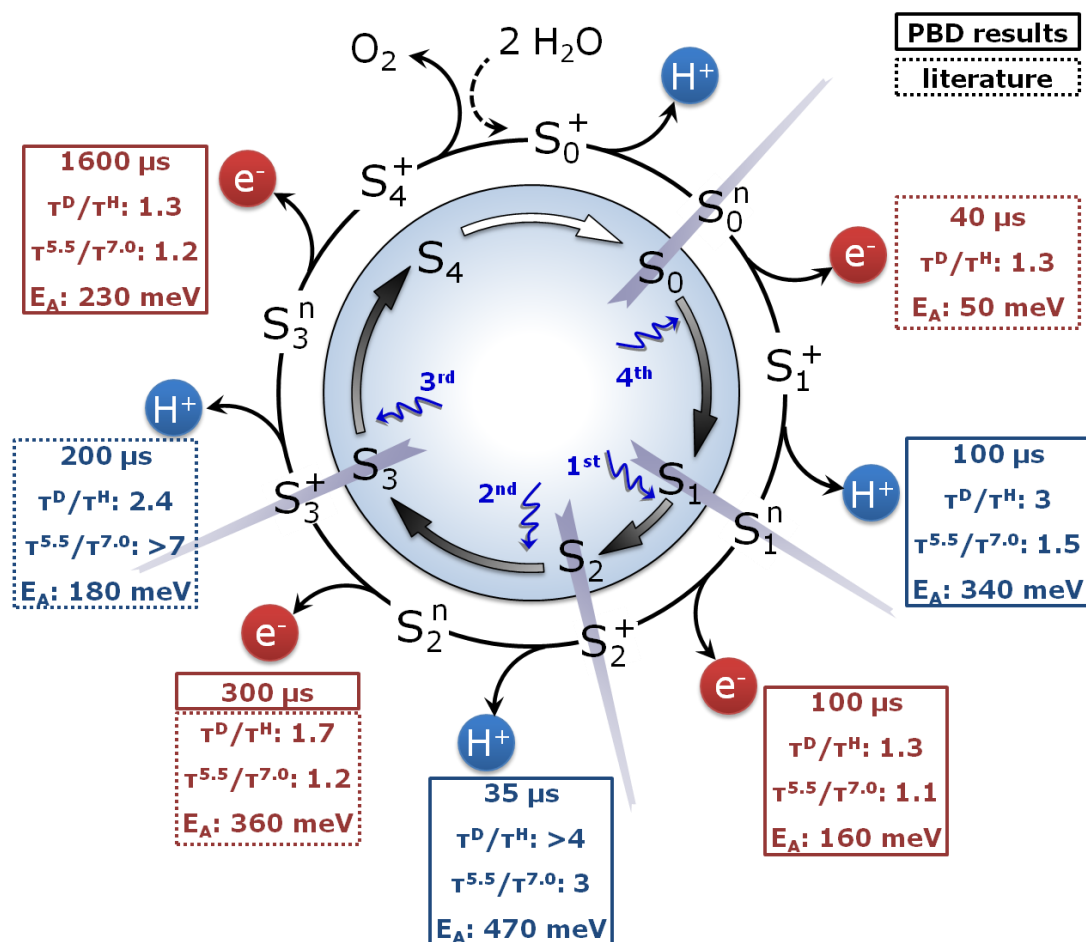
## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Mit photothermischen Experimenten war es möglich, ladungskompensierende Protonentransferschritte in den klassischen  $S_0 \rightarrow S_1$ - und  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergängen zu detektieren und kinetische Parameter dieser wichtigen Prozesse erstmals zu bestimmen (Abbildung 7-1). Diese Deprotonierungen des  $Mn_4Ca$ -Komplexes (dem katalytischen Zentrum der lichtgetriebenen Wasserspaltung) waren innerhalb des erweiterten Reaktionszyklus der PSII-Wasseroxidation, der die alternierende Entfernung von Elektronen und Protonen vom Mn-Komplex unter Bildung von 9 Intermediatzuständen vorschlägt, vorhergesagt worden (Dau und Haumann 2006; Dau und Haumann 2008) (Abbildung 7-1), waren aber in zeitaufgelösten Experimenten zuvor nicht beobachtet worden. Die photothermischen Ergebnisse dieser Arbeit liefern nun experimentelle Beweise für die Entfernung eines Protons vom Mn-Komplex nach dem ET zum oxidierten Tyrosin  $Y_Z^{ox}$  im klassischen  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang und vor dem ET im  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang. Zwei Lücken im Reaktionszyklus der PSII-Wasseroxidation konnten somit geschlossen und die grundlegende Sequenz von Ereignissen für die 7 Übergänge, die vom  $S_0^n$ -Zustand zum  $S_4^+$ -Zustand führen, etabliert werden. Diese Sequenz ist durch die strikt alternierende Entfernung von Elektronen und Protonen vom Mn-Komplex gekennzeichnet.

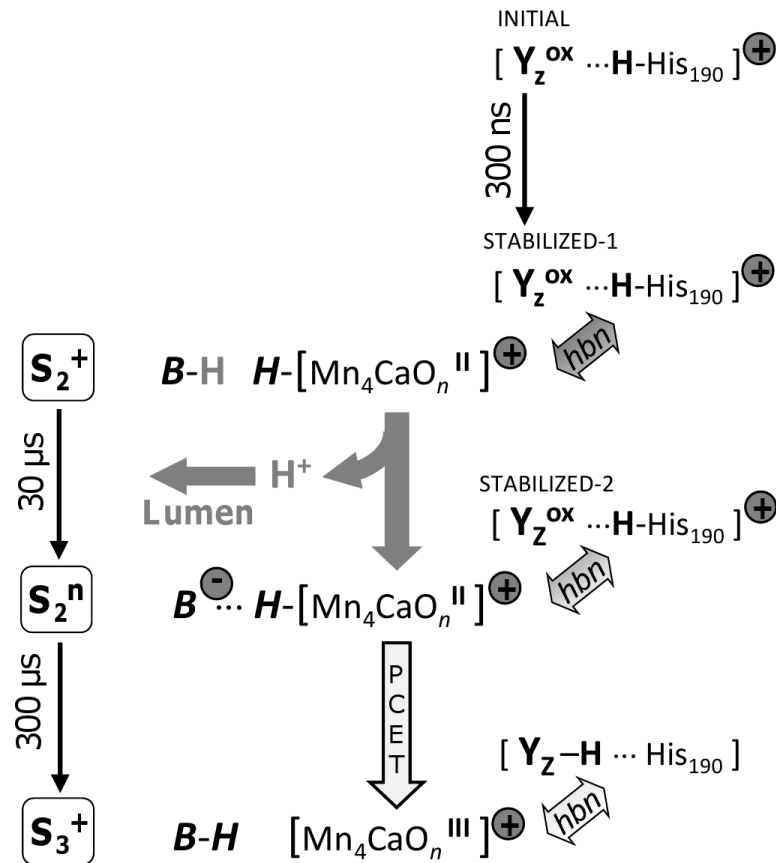
Die grundlegende Abfolge der einzelnen Schritte, die von dem am stärksten reduzierten Zustand des Mn-Komplexes  $S_0^n$  über die Akkumulation von vier Oxidationsäquivalenten zum stärksten oxidierten Zustand  $S_4^+$  führt, kann auf Grundlage der PBD-Studien und früherer Untersuchungen (siehe auch (Dau und Haumann 2008)) folgendermaßen interpretiert werden (Abbildung 7-1 und Abbildung 7-2):

- I. Ausgehend vom reduziertesten semistabilen Zustand  $S_0^n$  löst die Absorption eines Photons durch das PSII die schnelle Oxidation ( $<1 \mu s$ ) von  $Y_Z$  aus. Der folgende ET vom Mn-Komplex zu  $Y_Z^{ox}$  (Zeitkonstante von  $40 \mu s$  in Abbildung 7-1) resultiert in der Bildung des  $S_1^+$ -Zustandes. Die Oxidation eines Manganatoms im  $S_0^n \rightarrow S_1^+$ -Übergang senkt den pK-Wert eines Manganliganden, möglicherweise handelt es sich dabei um ein verbrückendes Hydroxid (Dau et al. 2001; Robblee et al. 2002; Haumann et al. 2005b), auf einen Wert von etwa 3,3 (Zaharieva et al. 2011). Die Abgabe des Protons im klassischen  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang erfolgt nach der  $S_1^+$ -Bildung. Als Reaktion auf die

- Senkung des pK-Wertes wird das Proton im  $S_1^+ \rightarrow S_1^n$ -Übergang von dem Mn-Komplex in einer Kette von elementaren PT-Schritten zum Lumen hin transportiert.
- II. Das nächste absorbierte Photon induziert erneut die Oxidation von  $Y_Z$ , die zur Mn-Oxidation ( $Mn^{III} \rightarrow Mn^{IV}$ ) im  $S_1^n \rightarrow S_2^+$ -Übergang führt. Die Oxidation des Mn-Komplexes senkt die pK-Werte ligierender Gruppen, jedoch nicht in ausreichendem Maße, um eine Deprotonierung auszulösen.
  - III. Die Oxidation des Mn-Komplexes ohne ladungskompensierende chemische Veränderungen führt zu einem Anstieg des Redoxpotentials auf ein Niveau, das eine weitere Oxidation durch  $Y_Z^{OX}$  verhindert (McEvoy und Brudvig 2006; Dau et al. 2010). Im  $S_2^+$ -Zustand verhindert diese Problematik des erhöhten Redoxpotentials zunächst eine Oxidation des Mn-Komplexes durch  $Y_Z^{OX}$ . Die Bildung der positiv geladenen  $[Y_Z^{OX} \cdots H-His_{190}(D1)]^+$ -Gruppe führt jedoch zur Senkung des pK-Wertes einer bisher nicht identifizierten Gruppe auf 3,3 (Zaharieva et al. 2011). Dabei spielen vermutlich Protonenverschiebungen innerhalb des Wasserstoffbrücken-Netzwerks, das den Mn-Komplex und  $Y_Z^{OX}$  umgibt, eine Rolle. Auf diese Weise treibt  $Y_Z^{OX}$  die Abgabe eines Protons von dem Mn-Komplex an, was in der Bildung des  $S_2^n$ -Zustandes mit einer Zeitkonstante von etwa 30  $\mu s$  resultiert. In dem  $S_2^+ \rightarrow S_2^n$ -Übergang wird möglicherweise ein Mn-Ligand direkt deprotoniert. Vorstellbar ist auch, dass eine nahegelegene Base (B in Abbildung 7-2), die Teil des Wasserstoffbrücken-Netzwerks darstellt, ein Proton abgibt. Die Seitenketten CP43-Arg<sub>357</sub>, D1-Asp<sub>61</sub> und D1-His<sub>337</sub> stellen mögliche Kandidaten für die bislang nicht identifizierte Base B dar (Umena et al. 2011). Speziell gegen das D1-Asp<sub>61</sub> sprechen jedoch Mutagenese-Experimente (Dilbeck et al. 2012). Die beschriebene Deprotonierung und wahrscheinlich auch die veränderte Koordination der verbrückenden Liganden (Haumann et al. 2005b; Siegbahn 2008) senken das Redoxpotential des Mn-Komplexes, sodass der ET zu  $Y_Z^{OX}$  stattfinden kann. Der ET im  $S_2^n \rightarrow S_3^+$ -Übergang ist möglicherweise an einen lokalen PT gekoppelt, da sein KIE deutlich größer ist als der des ETs im  $S_1^n \rightarrow S_2^+$ -Übergang (Re-Protonierung von B in Abbildung 7-2).
  - IV. In den  $S_3^+ \rightarrow S_3^n \rightarrow S_4^+$ -Übergängen mögen die beteiligten Liganden und Seitenketten andere sein, die grundlegende Sequenz von Ereignissen ist jedoch ähnlich wie die oben für die  $S_2^+ \rightarrow S_2^n \rightarrow S_3^+$ -Übergänge beschriebene. Im Vergleich zum  $S_2^n \rightarrow S_3^+$ -Übergang könnte der  $S_3^n \rightarrow S_4^+$ -Übergang an ausgeprägtere chemische Veränderungen gekoppelt sein, die die Bildung der Disauerstoffbindung initiieren.



**Abbildung 7-1:** Erweiterter Reaktionszyklus der PSII-Wasseroxidation mit kinetischen Parametern der alternierenden ET- und PT-Schritte. Der innere Zyklus stellt das klassische Kok-Modell mit dem dunkelstabilen S<sub>1</sub>- und den semistabilen S<sub>2</sub>-, S<sub>3</sub>- und S<sub>0</sub>- Oxidationszuständen dar. Nach der Akkumulation von vier Oxidationsäquivalenten (S<sub>4</sub>) wird spontan O<sub>2</sub> freigesetzt. Die Erweiterung (äußerer Zyklus) beinhaltet sowohl die Oxidation des Mn<sub>4</sub>Ca-Komplexes durch ET zu Y<sub>Z</sub><sup>ox</sup> als auch die Entfernung von Protonen vom Mn<sub>4</sub>Ca-Komplex durch Protonentransfer über längere Distanzen. (Eine Kopplung des ET-Schritts an lokale Protonenverschiebungen wird von diesem Modell nicht abgedeckt; siehe jedoch Abbildung 7-2.) Die tiefgestellten Indizes deuten die Anzahl von Oxidationsäquivalenten an, die am Mn<sub>4</sub>Ca-Komplex akkumuliert wurden. Die hochgestellten Indizes geben die Ladung relativ zum dunkelstabilen S<sub>1</sub>-Zustand an (n steht für neutral, + für positiv geladen). Mit durchgezogenen Linien umrandete Parameter sind (gerundete) Ergebnisse dieser PBD-Studie. Von oben nach unten sind die Zeitkonstante  $\tau$  bei 20 °C, der kinetisch Isotopen-Effekt bei Austausch von H<sub>2</sub>O durch D<sub>2</sub>O  $\tau^D/\tau^H$ , das Verhältnis der Zeitkonstanten bei den pH-Werten 5,5 und 7,0  $\tau^{5.5}/\tau^{7.0}$  und die Aktivierungsenergie  $E_A$  aufgeführt. Für die Protonenfreisetzungsschritte im S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub>- und im S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>-Übergang konnten diese Parameter erstmals in zeitaufgelösten Experimenten bestimmt werden. Die Parameter der Entfernung von Protonen beziehen sich dabei auf den langsamsten einer Serie von elementaren PT-Schritten, die zusammengenommen Protonenbewegung über eine längere Distanz vom Mn-Komplex in die wässrige Phase bewirken. Mit gepunkteten Linien umrandete Parameter sind der Literatur entnommen, da sie aus den PBD-Signalen nicht abgeleitet werden konnten (siehe auch Tabelle 4-2) (Dekker et al. 1984a; Renger und Hanssum 1992; Haumann et al. 1997; Haumann et al. 2005a; Gerencser und Dau 2010; Zaharieva et al. 2012). Abbildung mit Modifikationen aus Klauss *et al.* (2012a).



**Abbildung 7-2:** Sequenz von Ereignissen während des klassischen  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs. Die Oxidation von D1-Tyr<sub>161</sub> ( $Y_Z$ ) durch P680 (nicht eingezeichnet) ist wahrscheinlich an eine Protonenverschiebung zu D1-His<sub>190</sub> gekoppelt. Der  $Mn_4CaO_n$ -Kern des Mn-Komplexes und seiner Proteinumgebung sind über ein Wasserstoffbrückennetzwerk („hydrogen-bonding network“, hbn) miteinander verbunden. Der Oxidationszustand des Mn-Komplexes ist durch römische Nummern angegeben. Die Entfernung eines Protons bewirkt bis zur  $S_3^+$ -Bildung eine Stabilisierung von  $Y_Z^{ox(+)}$  gegenüber Rekombinationsreaktionen, da die Energielücke zwischen  $P680^+Y_Z$  und  $P680Y_Z^{ox(+)}$  vergrößert wird. Eine erste Stabilisierung von  $Y_Z^{ox(+)}$  durch strukturelle Änderungen im Sub-Mikrosekunden-Bereich (300 ns) konnte in PA-Experimenten beobachtet werden.

Die Intermediatzustände  $S_4^+$  und  $S_0^+$  im erweiterten Reaktionszyklus (Abbildung 7-1) bleiben vorerst hypothetisch. Die hier präsentierten PBD-Resultate konnten diesbezüglich keine neuen Erkenntnisse liefern. So konnten in der ausgeprägten Millisekunden-Anstiegsphase der PBD-Signale, die durch Anregung von PSII-Proben im  $S_3$ -Zustand ausgelöst wurden, die Freisetzung der beiden Protonen ( $S_3^+ \rightarrow S_3^n$  und  $S_0^+ \rightarrow S_0^n$ ) nicht kinetisch voneinander getrennt werden. Messungen bei verschiedenen pH-Werten und nach Austausch von  $H_2O$  durch  $D_2O$  deuten an, dass eine komplexe Überlagerung von (positiven, also Expansions-) PBD-Signalbeiträgen im klassischen  $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang vorliegt. Zu den Volumenzunahmen, bedingt



durch Ladungskompensation bei den zwei Protonenentfernungen vom Mn-Komplex, könnten weitere strukturelle Expansionen im Zusammenhang mit der Disauerstoffbildung und der Bindung von Substrat-Wassermolekülen hinzukommen. Tiefere Einsichten in die Prozesse zu gewinnen, die die Sauerstoffbildung, die Bindung von Substrat-Wassermolekülen und die Freisetzung des vierten Protons umfassen, stellt eine zentrale Aufgabe bei der zukünftigen Erforschung der PSII-Wasseroxidation dar.

Mit der photothermischen Strahlableitung wurde zur Untersuchung von Reaktionsschritten an dem katalytischen Metallzentrum des PSII eine photothermische Methode eingesetzt, die lichtinduzierte Dichteänderungen in flüssigen Proben anhand von Brechungsindexänderungen detektiert und speziell zur Beobachtung von Prozessen im Mikrosekunden- und Millisekunden-Bereich geeignet ist. Die klassische Photoakustik basiert demgegenüber auf der Detektion von Druckwellen, die als Reaktion auf die Anregung mit einem Lichtblitz in einer flüssigen Probe induziert werden. Bei direkter Kopplung eines Ultraschallmikrophons an die Probenkammer und Anregung von PSII-Proben mit Nanosekunden-Laserpulsen konnten Prozesse im Sub-Mikrosekunden-Zeitbereich photoakustisch untersucht werden. Prozesse mit Zeitkonstanten von  $\sim 350$  ns (bei  $25$  °C), die auftreten, wenn sich das PSII im Oxidationszustand  $S_2$  oder  $S_3$  befindet, waren in der Vergangenheit als energetische Relaxation des oxidierten Tyrosins  $Y_Z^{ox}$  interpretiert worden. In Kapitel 6 konnte anhand von photoakustischen Experimenten gezeigt werden, dass diese Prozesse mit Kernbewegungen und -umlagerungen verbunden sind, die insgesamt zu einer Kontraktion des Proteins und/oder des umgebenden Lösungsmittels führen. Überraschenderweise fällt diese Kontraktionen im  $S_2^+$ -Zustand um etwa einen Faktor fünf größer aus als im  $S_3^+$ -Zustand. Die beobachteten Volumenänderungen zeigen, dass der klassische  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang ein mehrstufiger Prozess ist, wobei der erste Schritt der  $Y_Z^{ox}$ -Bildung (oben rechts in Abbildung 7-2) mit schnellen Kernumlagerungen verbunden ist, die vermutlich verschiedene Zwecke erfüllen:

- i. Der Mn-Komplex wird für die folgende Abgabe eines Protons und eines Elektrons vorbereitet, indem ein Intermediatzustand spezifischer (bisher unbekannter) atomarer Struktur gebildet wird.
- ii. Die Bildung des strukturellen Intermediatzustands ist (notwendigerweise) mit einer energetischen Relaxation und daher mit einer Stabilisierung des oxidierten Tyrosins  $Y_Z^{ox}$  verbunden. Energieverluste durch Ladungsrekombination mit dem Anionradikal  $Q_A^-$  werden so minimiert.

Eine Stärke von photothermischen Methoden, auf die in dieser Arbeit kaum eingegangen wurde, ist die direkte Zugänglichkeit der Enthalpieänderungen  $\Delta H$  von lichtinduzierten Reaktionen. Die Zerlegung der Gibbs-Energie  $\Delta G$  in ihre enthalpische und entropische Komponente kann wichtige Informationen über Mechanismen mehrstufiger Reaktionen bezüglich deren Energieprofil liefern. Experimentell bestimmte  $\Delta H$ -Werte geben dabei nicht nur Auskunft über die energetische Effizienz bei Bildung von Intermediaten, sondern sie dienen auch als Bezugspunkte für quantenchemische Berechnungen über die Mechanismen der Wasseroxidation (Siegbahn 2008). In den Kapiteln 4 und 6 wurden Werte der im Zusammenhang mit Reaktionen im ns-,  $\mu$ s- und ms-Zeitbereich abgegebenen Wärme bestimmt, die korrigiert für die entsprechende Quantenausbeute des jeweiligen Prozesses der Enthalpieänderung des Reaktionsschritts entspricht. Leider konnte jedoch keine hinreichend gute Messgenauigkeit erreicht werden, um quantitative Aussagen über Enthalpieänderungen bei den photothermisch und photoakustisch beobachteten Reaktionen/Prozessen machen zu können. Nicht nur die Streuung der Datenpunkte in den gemessenen Temperaturabhängigkeiten stellt ein Problem dar, sondern auch Ungenauigkeiten bei der Quantenausbeute und bei der Separierung von thermischen und nicht-thermischen Signalbeiträgen. Die Problematik der nur ungenau bestimmten Quantenausbeute könnte prinzipiell durch Anregung mit roten Laserpulsen ( $\sim 600$  nm) vermindert werden, da Licht in diesem Wellenlängenbereich effektiver zur Bildung ladungsseparierter Zustände führt. Inwieweit die Annahme zutrifft, dass strukturell bedingte Volumenänderungen in einem Temperaturbereich von 0 °C bis 30 °C konstant sind, sollte genau überprüft werden, da bei der Bestimmung von kleinen Enthalpieänderungen bereits eine geringe Temperaturabhängigkeit von  $\Delta V_{\text{struk}}$  zu relativ großen Ungenauigkeiten der  $\Delta H$ -Werte führen kann (Takeshita et al. 2002).

Die Verwendung von PSII-Kernpartikeln (*core particle*) könnte im Vergleich zu Membranpartikeln in mehrfacher Hinsicht vorteilhaft sein, sowohl für die photothermische Strahlableitung als auch für die Photoakustik. (i) Da die Lichtstreuung in Kernpartikelproben geringer ist, kann die Absorption genauer bestimmt werden. Außerdem werden Streuartefakte vermieden. (ii) Bei gleicher Absorption ist die Anzahl von Photosystemen im gleichen Probenvolumen um einen Faktor  $\sim 5$  höher, sodass mit höherer Pulsenergie angeregt werden kann, ohne Teilsättigung der Photochemie zu erreichen. (iii) Die Homogenität der Proben und somit Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Messtage könnte bei PSII-Kernpartikelproben besser sein. Während Punkt (i) besonders bei der Bestimmung von

---

Reaktionsenthalpien eine Verbesserung der Messgenauigkeit bewirkt, könnte Punkt (ii) das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der photothermischen Signalverläufe entscheidend verbessern und somit eventuell die Beobachtung der Zustände  $S_4^+$  und  $S_0^+$  ermöglichen. Erste Testmessungen an PSII-Kernpartikeln habe ich durchgeführt, wobei sich jedoch zeigte, dass trotz des zu erwartenden verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses eine große Menge von Probenmaterials, das in seiner Produktion aufwändig und teuer ist, nötig wäre um zu neuen Erkenntnisse zu gelangen. Ferner stellt derzeit ein relativ hoher Anteil von Photosystemen ohne einen intakten Mn-Komplex ein wesentliches Problem dar. Wenn es jedoch gelänge, die erwähnten Probleme zu lösen, dann könnten Messungen an Kernpartikeln des PSII von Cyanobakterien des Wildtyp-PSII und insbesondere an genetisch modifizierten Photosystemen zu weiteren wichtigen Fortschritten führen.



---

## Literatur

- Acseente, T. (2007). "Laser diode intensity noise induced by mode hopping." Rom. Rep. Phys. **59**(1): 87-92.
- Ahlbrink, R., Haumann, M., Cherepanov, D., Boegershausen, O., Mulkidjanian, A. and Junge, W. (1998). "Function of tyrosine-Z in water oxidation by photosystem II: electrostatical promotor instead of hydrogen abstractor." Biochemistry **37**(4): 1131-1142.
- Airs, R. L. and Keely, B. J. (2000). "A novel approach for sensitivity enhancement in atmospheric pressure chemical ionisation liquid chromatography/mass spectrometry of chlorophylls." Rapid Commun. Mass Spectrom. **14**(3): 125-128.
- 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.
- Arata, H. and Parson, W. W. (1981). "Enthalpy and volume changes accompanying electron transfer from P-870 to quinones in Rhodospseudomonas sphaeroides reaction centers." Biochim. Biophys. Acta **636**(1): 70-81.
- Autrey, T. (1998). "A new angle into time-resolved photoacoustic spectroscopy: A layered prism cell increases experimental flexibility." Rev. Sci. Instrum. **69**(6): 2246.
- Barber, J. (2003). "Photosystem II: the engine of life." Q. Rev. Biophys. **36**(1): 71-89.
- Barber, J. (2009). "Photosynthetic energy conversion: natural and artificial." Chem. Soc. Rev. **38**(1): 185-196.
- Barry, B. A. and Babcock, G. T. (1987). "Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen-evolving system." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**(20): 7099-7103.
- Barry, B. A., Cooper, I. B., De Riso, A., Brewer, S. H., Vu, D. M. and Dyer, R. B. (2006). "Time-resolved vibrational spectroscopy detects protein-based intermediates in the photosynthetic oxygen-evolving cycle." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**(19): 7288-7291.
- Bernát, G., Morvaridi, F., Feyziyev, Y. and Styring, S. (2002). "pH dependence of the four individual transitions in the catalytic S-cycle during photosynthetic oxygen evolution." Biochemistry **41**(18): 5830-5843.
- Berthold, D. A., Babcock, G. T. and Yocum, C. F. (1981). "A highly resolved, oxygen-evolving photosystem-II preparation from spinach thylakoid membranes - EPR and electron-transport properties." FEBS Lett. **134**(2): 231-234.
- Berthomieu, C. and Hienerwadel, R. (2009). "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy." Photosynth. Res. **101**(2): 157-170.

- 
- Bialkowski, S. (1996). Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis. New York, J. Wiley.
- Blankenship, R. E. (2002). Molecular mechanisms of photosynthesis. Oxford, England, Blackwell Science.
- Bogershausen, O. and Junge, W. (1995). "Rapid proton-transfer under flashing light at both functional sides of dark-adapted photosystem-II particles." Biochim. Biophys. Acta **1230**(3): 177-185.
- Boichenko, V. A., Hou, J. M. and Mauzerall, D. (2001). "Thermodynamics of electron transfer in oxygenic photosynthetic reaction centers: volume change, enthalpy, and entropy of electron-transfer reactions in the intact cells of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803." Biochemistry **40**(24): 7126-7132.
- Borsarelli, C. D. and Braslavsky, S. E. (1998). "The partial molar volume of the proton in water determined by laser-induced optoacoustic studies." J. Photochem. Photobiol. B: Biol. **43**(3): 222-228.
- Borsarelli, C. D. and Braslavsky, S. E. (1999). "Enthalpy, volume, and entropy changes associated with the electron transfer reaction between the  $^3\text{MLCT}$  state of  $\text{Ru}(\text{Bpy})_3^{2+}$  and methyl viologen cation in aqueous Solutions." J. Phys. Chem. A **103**(12): 1719-1727.
- Borsarelli, C. D., Corti, H., Goldfarb, D. and Braslavsky, S. E. (1997). "Structural volume changes in photoinduced electron transfer reactions. Laser-induced optoacoustic studies of speciation during the quenching reaction of excited  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  by  $\text{Fe}(\text{III})$  in aqueous solutions." J. Phys. Chem. A **101**(42): 7718-7724.
- Bowes, J. M. and Crofts, A. R. (1980). "Binary oscillations in the rate of reoxidation of the primary acceptor of photosystem II." Biochim. Biophys. Acta **590**(3): 373-384.
- Braslavsky, S. E. (1986). "Photoacoustic and photothermal methods applied to the study of radiationless deactivation processes in biological systems and in substances of biological interest." Photochem. Photobiol. **43**(6): 667-675.
- Braslavsky, S. E. and Heibel, G. E. (1992). "Time-resolved photothermal and photoacoustic methods applied to photoinduced processes in solution." Chem. Rev. **92**(6): 1381 - 1410.
- Brettel, K., Schlodder, E. and Witt, H. T. (1984). "Nanosecond reduction kinetics of photooxidized chlorophyll-alpha-II (P-680) in single flashes as a probe for the electron pathway,  $\text{H}^+$ -release and charge Accumulation in the  $\text{O}_2$ -evolving complex." Biochim. Biophys. Acta **766**(2): 403-415.
- 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.
- Bukhov, N. G., Sridharan, G., Egorova, E. A. and Carpentier, R. (2003). "Interaction of exogenous quinones with membranes of higher plant chloroplasts: modulation of

- quinone capacities as photochemical and non-photochemical quenchers of energy in Photosystem II during light–dark transitions." Biochim. Biophys. Acta **1604**(2): 115-123.
- Callis, J. B., Parson, W. W. and Gouterman, M. (1972). "Fast changes of enthalpy and volume on flash excitation of Chromatium chromatophores." Biochim. Biophys. Acta **267**(2): 348 - 362.
- Canaani, O., Malkin, S. and Mauzerall, D. (1988). "Pulsed photoacoustic detection of flash-induced oxygen evolution from intact leaves and its oscillations." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**(13): 4725-4729.
- Carrell, G., Tyryshkin, M. and Dismukes, C. (2002). "An evaluation of structural models for the photosynthetic water-oxidizing complex derived from spectroscopic and X-ray diffraction signatures." J. Biol. Inorg. Chem. **7**(1-2): 2-22.
- Chernev, P., Zaharieva, I., Dau, H. and Haumann, M. (2011). "Carboxylate shifts steer inter-quinone electron transfer in photosynthesis." J. Biol. Chem. **286**(7): 5368-5374.
- Christen, G., Reifarth, F. and Renger, G. (1998). "On the origin of the  $\sim 35\text{-}\mu\text{s}$  kinetics' of  $\text{P680}^+$  reduction in photosystem II with an intact water oxidising complex." FEBS Lett. **429**(1): 49-52.
- Christen, G. and Renger, G. (1999). "The role of hydrogen bonds for the multiphasic  $\text{P680}^{+*}$  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.
- Christen, G., Seeliger, A. and Renger, G. (1999). " $\text{P680}^{+*}$  reduction kinetics and redox transition probability of the water oxidizing complex as a function of pH and H D isotope exchange in spinach thylakoids." Biochemistry **38**(19): 6082-6092.
- 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.
- Cohen, G. and Eisenberg, H. (1968). "Deoxyribonucleate solutions: Sedimentation in a density gradient, partial specific volumes, density and refractive index increments, and preferential interactions." Biopolymers **6**(8): 1077-1100.
- 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.
- Crofts, A. R. and Wraight, C. A. (1983). "The electrochemical domain of photosynthesis." Biochim. Biophys. Acta **726**: 149-185.
- 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.
- Dau, H. (1994a). "Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence." Photochem. Photobiol. **60**(1): 1-23.

- Dau, H. (1994b). "Short-term adaptation of plants to changing light intensities and its relation to photosystem II photochemistry and fluorescence emission." J. Photochem. Photobiol. B **26**(1): 3-27.
- Dau, H., Grundmeier, A., Loja, P. and Haumann, M. (2008). "On the structure of the manganese complex of photosystem II: extended-range EXAFS data and specific atomic-resolution models for four S-states." Phil. Trans. R. Soc. B **363**(1494): 1237-1244.
- Dau, H. and Hansen, U. P. (1989). "Studies on the adaptation of intact leaves to changing light intensities by a kinetic analysis of chlorophyll fluorescence and oxygen evolution as measured by the photoacoustic signal." Photosynth. Res. **20**(1): 59-83.
- Dau, H. and Hansen, U. P. (1990). "A study on the energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence by means of photoacoustic measurements." Photosynth. Res. **25**(3): 269-278.
- Dau, H. and Haumann, M. (2006). "Reaction cycle of photosynthetic water oxidation in plants and cyanobacteria (response letter)." Science **312**: 1471-1472.
- Dau, H. and Haumann, M. (2007a). "Eight steps preceding O-O bond formation in oxygenic photosynthesis—a basic reaction cycle of the photosystem II manganese complex." Biochim. Biophys. Acta **1767**: 472-483.
- Dau, H. and Haumann, M. (2007b). "Time-resolved X-ray spectroscopy leads to an extension of the classical S-state cycle model of photosynthetic oxygen evolution." Photosynth. Res. **92**: 327-343.
- 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." Coord. Chem. Rev. **252**(3-4): 273-295.
- Dau, H., Iuzzolino, L. and Dittmer, J. (2001). "The tetra-manganese complex of photosystem II during its redox cycle: X-ray absorption results and mechanistic implications." Biochim. Biophys. Acta **1503**(1-2): 24-39.
- Dau, H., Liebisch, P. and Haumann, M. (2003). "X-ray absorption spectroscopy to analyze nuclear geometry and electronic structure of biological metal centers—potential and questions examined with special focus on the tetra-nuclear manganese complex of oxygenic photosynthesis." Anal. Bioanal. Chem. **376**(5): 562-583.
- Dau, H., Limberg, C., Reier, T., Risch, M., Roggan, S. and Strasser, P. (2010). "The mechanism of water oxidation: from electrolysis via homogeneous to biological catalysis." ChemCatChem **2**(7): 724-761.
- 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., Schrama, T. and van Gorkom, H. J. (2001). "Secondary stabilization reactions and proton-coupled electron transport in photosystem II investigated by



- 
- electroluminescence and fluorescence spectroscopy." Biochemistry **40**(19): 5821-5834.
- de Wijn, R. and van Gorkom, H. J. (2001). "Kinetics of electron transfer from  $Q_a$  to  $Q_b$  in photosystem II." Biochemistry **40**(39): 11912-11922.
- de Wijn, R. and van Gorkom, H. J. (2002). "S-state dependence of the miss probability in Photosystem II." Photosynth. Res. **72**(2): 217-222.
- Dekker, J. and Van Grondelle, R. (2000). "Primary charge separation in photosystem II." Photosynth. Res. **63**(3): 195-208.
- Dekker, J. P., Plijter, J. J., Ouwehand, L. and van Gorkom, H. J. (1984a). "Kinetics of manganese redox transitions in the oxygen evolving apparatus of photosynthesis." Biochim. Biophys. Acta **767**: 176-179.
- Dekker, J. P., Vangorkom, H. J., Wensink, J. and Ouwehand, L. (1984b). "Absorbance difference spectra of the successive redox states of the oxygen-evolving apparatus of photosynthesis." Biochim. Biophys. Acta **767**(1): 1-9.
- Delosme, R. (2003). "On some aspects of photosynthesis revealed by photoacoustic studies: a critical evaluation." Photosynth. Res. **76**: 289-301.
- Delosme, R., Beal, D. and Joliot, P. (1994). "Photoacoustic detection of flash-induced charge separation in photosynthetic systems - spectral dependence of the quantum yield." Biochim. Biophys. Acta **1185**(1): 56-64.
- Demtröder, W. (2009). Experimentalphysik 2. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Dilbeck, P. L., Hwang, H. J., Zaharieva, I., Gerencser, L., Dau, H. and Burnap, R. L. (2012). "The mutation D1-D61N in *Synechocystis* sp. PCC 6803 allows the observation of pH-sensitive intermediates in the formation and release of  $O_2$  from Photosystem II." Biochemistry **51**(6): 1079-1091.
- Drude, P. und Nernst, W. (1894). "Über Elektrostriktion durch freie Ionen." Z. Phys. Chem. **15**: 79-85.
- Duysens, L. N. M. and Sweers, H. E. (1963). Mechanisms of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. J.S.o.P. Physiologists (ed.) Studies of Microalgae and Photosynthetic Bacteria. Tokyo, University of Tokyo Press.
- Eckert, H. J. and Renger, G. (1988). "Temperature dependence of  $P680^+$  reduction in  $O_2$ -evolving PS II membrane fragments at different redox states  $S_i$  of the water oxidizing system." FEBS Lett. **236**(2): 425-431.
- Eckert, H. J., Wiese, N., Bernarding, J., Eichler, H. J. and Renger, G. (1988). "Analysis of the electron transfer from  $Pheo^-$  to  $Q_A$  in PS II membrane fragments from spinach by time resolved 325 nm absorption changes in the picosecond domain." FEBS Lett. **240**(1-2): 153-158.

- Edens, G. J., Gunner, M. R., Xu, Q. and Mauzerall, D. (2000). "The enthalpy and entropy of reaction for formation of  $P^+Q_A^-$  from excited reaction centers of rhodospirillum rubrum." J. Am. Chem. Soc. **122**(7): 1479-1485.
- Eisenberg, H. (1965). "Equation for the refractive index of water." J. Chem. Phys. **43**(11): 3887-3892.
- Emerson, R. and Lewis, C. M. (1943). "The dependence of the quantum yield of chlorella photosynthesis on wave length of light." Am. J. Bot. **30**(3): 165-178.
- Falvey, D. E. (1997). "Photothermal beam deflection calorimetry in solution photochemistry: recent progress and future prospects." Photochem. Photobiol. **65**(1): 4-9.
- Feitelson, J. and Mauzerall, D. (2002). "Enthalpy and electrostriction in the electron-transfer reaction between triplet zinc uroporphyrin and ferricyanide." J. Phys. Chem. B **106**(37): 9674-9678.
- Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J. and Iwata, S. (2004). "Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center." Science **303**: 1831-1838.
- Fischer, H. und Wenderoth, H. (1940). "Optisch aktives Hämotricarbonsäureimid aus Chlorophyll." Justus Liebigs Annalen der Chemie **545**(1): 140-147.
- Fleming, I. A. N. (1967). "Absolute configuration and the structure of chlorophyll." Nature **216**(5111): 151-152.
- Fowler, C. F. (1977). "Proton translocation in chloroplasts and its relationship to electron transport between the photosystems." Biochim. Biophys. Acta **459**(3): 351-363.
- Gage, E. C. and Bartholomeusz, B. (1991). "Directional asymmetries due to write-laser mode hopping during optical recording." J. Appl. Phys. **69**: 569-573.
- Garbers, A., Reifarth, F., Kurreck, J., Renger, G. and Parak, F. (1998). "Correlation between protein flexibility and electron transfer from  $Q_A^{-*}$  to  $Q_B$  in PSII membrane fragments from spinach." Biochemistry **37**(33): 11399-11404.
- Garczarek, F. and Gerwert, K. (2006). "Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy." Nature **439**(7072): 109-112.
- Gensch, T. and Viappiani, C. (2003). "Time-resolved photothermal methods: accessing time-resolved thermodynamics of photoinduced processes in chemistry and biology." Photochem. Photobiol. Sci. **2**: 699 - 721.
- Gerencser, L. and Dau, H. (2010). "Water oxidation by photosystem II:  $H_2O-D_2O$  exchange and the influence of pH support formation of an intermediate by removal of a proton before dioxygen creation." Biochemistry **49**(47): 10098-10106.
- Gerencser, L. and Dau, H. (2012). "Role of protons in photosynthetic water oxidation: pH influence on the rate constants of the S-state transitions and hypotheses on the  $S_2 \rightarrow S_3$  transition." Proc. 15th Internatl. Conf. on Photosynth.: in press.

- 
- Gilchrist, M. L., Ball, J. A., Randall, D. W. and Britt, R. D. (1995). "Proximity of the manganese cluster of photosystem II to the redox-active tyrosine Y<sub>Z</sub>." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**(21): 9545-9549.
- Giorgi, L. B., Nixon, P. J., Merry, S. A. P., Joseph, D. M., Durrant, J. R., Rivas, J. D. L., Barber, J., Porter, G. and Klug, D. R. (1996). "Comparison of primary charge separation in the photosystem II reaction center complex isolated from wild-type and D1-130 mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803." J. Biol. Chem. **271**(4): 2093-2101.
- Grabolle, M. (2005). "Die Donorseite des Photosystems II: Rekombinationsfluoreszenz- und Röntgenabsorptionsstudien (thesis)." Fachbereich Physik, Freie Univ. Berlin, <http://www.diss.fu-berlin.de/2005/174/>.
- 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.
- Grabolle, M. and Dau, H. (2007). "Efficiency and role of loss processes in light-driven water oxidation by PSII." Physiol. Plant. **131**: 50-63.
- 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.
- Haddy, A. (2007). "EPR spectroscopy of the manganese cluster of photosystem II." Photosynth. Res. **92**(3): 357-368.
- Hammes-Schiffer, S. (2006). "Hydrogen tunneling and protein motion in enzyme reactions." Acc. Chem. Res. **39**(2): 93-100.
- Hatcher, E., Soudackov, A. and Hammes-Schiffer, S. (2005). "Comparison of dynamical aspects of nonadiabatic electron, proton, and proton-coupled electron transfer reactions." Chem. Phys. **319**(1-3): 93-100.
- 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. Res. **51**(3): 193-208.
- Haumann, M. and Junge, W. (1994a). "Extent and rate of proton release by photosynthetic water oxidation in thylakoids: electrostatic relaxation versus chemical production." Biochemistry **33**(4): 864-872.
- Haumann, M. and Junge, W. (1994b). "The rates of proton uptake and electron transfer at the reducing side of photosystem II in thylakoids." FEBS Lett. **347**(1): 45-50.
- Haumann, M. and Junge, W. (1996). Protons and charge indicators in oxygen evolution. Oxygenic photosynthesis: The light reactions. D. Ort and C. F. Yocum. Dordrecht, Kluwer Academic Publ.: 165-192.

- 
- Haumann, M. and Junge, W. (1999a). "Evidence for impaired hydrogen-bonding of tyrosine Y<sub>Z</sub> in calcium-depleted photosystem II." Biochim. Biophys. Acta **1411**(1): 121-133.
- Haumann, M. and Junge, W. (1999b). "Photosynthetic water oxidation: a simplex-scheme of its partial reactions." Biochim. Biophys. Acta **1411**: 86-91.
- Haumann, M., Liebisch, P., Müller, C., Barra, M., Grabolle, M. and Dau, H. (2005a). "Photosynthetic O<sub>2</sub> formation tracked by time-resolved x-ray experiments." Science **310**(5750): 1019-1021.
- Haumann, M., Müller, C., Liebisch, P., Iuzzolino, L., Dittmer, J., Grabolle, M., Neisius, T., Meyer-Klaucke, W. and Dau, H. (2005b). "Structural and oxidation state changes of the photosystem II manganese complex in four transitions of the water oxidation cycle (S<sub>0</sub> → S<sub>1</sub>, S<sub>1</sub> → S<sub>2</sub>, S<sub>2</sub> → S<sub>3</sub>, and S<sub>3,4</sub> → S<sub>0</sub>) characterized by X-ray absorption spectroscopy at 20 K and room temperature." Biochemistry **44**(6): 1894-1908.
- 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.
- Herrero, C., Quaranta, A., Leibl, W., Rutherford, A. W. and Aukauloo, A. (2011). "Artificial photosynthetic systems. Using light and water to provide electrons and protons for the synthesis of a fuel." Energy Environ. Sci. **4**(7): 2353-2365.
- Heumier, T. A. and Carlsten, J. L. (2005). "Mode hopping in semiconductor lasers." ILX Lightwave Application Note **8**: 1-10.
- Hillier, W. and Wydrzynski, T. (2008). "<sup>18</sup>O-Water exchange in photosystem II: substrate binding and intermediates of the water splitting cycle." Coord. Chem. Rev. **252**(3-4): 306-317.
- Ho, F. M. (2008). "Uncovering channels in photosystem II by computer modelling: current progress, future prospects, and lessons from analogous systems." Photosynth. Res. **98**(1-3): 503-522.
- Hoganson, C. W. and Babcock, G. T. (1997). "A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis." Science **277**(5334): 1953-1956.
- Holzwarth, A. R., Müller, M. G., Reus, M., Nowaczyk, M., Sander, J. and Rögner, M. (2006). "Kinetics and mechanism of electron transfer in intact photosystem II and in the isolated reaction center: pheophytin is the primary electron acceptor." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**: 6895-6900.
- Hou, H. J. M. and Mauzerall, D. (2011). "Listening to PS II: Enthalpy, entropy, and volume changes." J. Photochem. Photobiol. B: Biol. **104**(1-2): 357-365.
- Hou, J. M., Boichenko, V. A., Diner, B. A. and Mauzerall, D. (2001). "Thermodynamics of electron transfer in oxygenic photosynthetic reaction centers: volume change, enthalpy, and entropy of electron-transfer reactions in manganese-depleted photosystem II core complexes." Biochemistry **40**(24): 7117-7125.

- 
- Ilani, A. and Krakover, T. (1987). "Diffusion- and reaction rate-limited redox processes mediated by quinones through bilayer lipid membranes." Biophys. J. **51**(2): 161-167.
- Ishikita, H., Saenger, W., Loll, B., Biesiadka, J. and Knapp, E. W. (2006). "Energetics of a possible proton exit pathway for water oxidation in photosystem II." Biochemistry **45**(7): 2063-2071.
- 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<sub>0</sub>-S<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>-S<sub>2</sub>, and S<sub>2</sub>-S<sub>3</sub> transitions of the water oxidation cycle." Biochemistry **37**(49): 17112-17119.
- Jackson, W. B. (1981). "Photothermal deflection spectroscopy and detection." Appl. Opt. **20**: 1333 - 1344.
- 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**: 5015-5023.
- Jiwan, J.-L. H., Chibisov, A. K. and Braslavsky, S. E. (1995). "Volume changes associated with electron transfer quenching of excited Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> and Xanthene dyes. Time-resolved optoacoustic studies." J. Phys. Chem. **99**(25): 10246-10250.
- Joliot, P., Barbieri, G. et Chabaud, R. (1969). "Un nouveau modele des centres photochimiques de systeme II\*." Photochem. Photobiol. **10**(5): 309-329.
- Junge, W., Haumann, M., Ahlbrink, R., Mulkidjanian, A. and Clausen, J. (2002). "Electrostatics and proton transfer in photosynthetic water oxidation." Phil. Trans. R. Soc. B **357**(1426): 1407 - 1418.
- 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.
- Karge, M., Irrgang, K. D., Sellin, S., Feinaugle, R., Liu, B., Eckert, H. J., Eichler, H. J. and Renger, G. (1996). "Effects of hydrogen/deuterium exchange on photosynthetic water cleavage in PS II core complexes from spinach." FEBS Lett. **378**(2): 140-144.
- Klauss, A., Haumann, M. and Dau, H. (2012a). "Alternating electron and proton transfer steps in photosynthetic water oxidation." Proc. Natl. Acad. Sci. USA: published ahead of print: doi:10.1073/pnas.1206266109.
- Klauss, A., Krivanek, R., Dau, H. and Haumann, M. (2009). "Energetics and kinetics of photosynthetic water oxidation studied by photothermal beam deflection (PBD) experiments." Photosynth. Res. **102**(2-3): 499-509.
- Klauss, A., Sikora, T., Süß, B. and Dau, H. (2012b). "Fast structural changes (200–900 ns) may prepare the photosynthetic manganese complex for oxidation by the adjacent tyrosine radical." Biochim. Biophys. Acta **1817**(8): 1196-1207.

- 
- 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**: 457-475.
- Krakover, T., Ilani, A. and Mauzerall, D. (1981). "Apparent inhibition of photoredox reactions of magnesium octaethylporphyrin at the lipid bilayer-water interface by neutral quinones." Biophys. J. **35**(1): 93-97.
- Krieger-Liszkay, A. (2005). "Singlet oxygen production in photosynthesis." J Exp Bot **56**(411): 337-346.
- Krishtalik, L. I. (2000). "The mechanism of the proton transfer: an outline." Biochim. Biophys. Acta **1458**(1): 6-27.
- 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.
- Krohs, U. and Metzner, H. (1990). "Overall kinetics of photosystem-II - pK-dependence and deuterium-isotope effect." Bioelectrochem. Bioenerget. **23**(2): 141-152.
- Kruse, O., Rupprecht, J., Mussgnug, J. H., Dismukes, G. C. and Hankamer, B. (2005). "Photosynthesis: a blueprint for solar energy capture and biohydrogen production technologies." Photochem. Photobiol. Sci. **4**(12): 957-970.
- Kuzek, D. and Pace, R. J. (2001). "Probing Mn oxidation states in the OEC. Insights from spectroscopic, computational and kinetic data." Biochim. Biophys. Acta **1503**(1-2): 123-137.
- Lavergne, J. (1991). "Improved uv-visible spectra of the S-transitions in the photosynthetic oxygen-evolving system." Biochim. Biophys. Acta **1060**(2): 175-188.
- Lavergne, J. and Junge, W. (1993). "Proton release during the redox cycle of the water oxidase." Photosynth. Res. **38**: 279-296.
- Lavergne, J. and Leci, E. (1993). "Properties of inactive photosystem II centers." Photosynth. Res. **35**: 323-343.
- Lazar, D. (1999). "Chlorophyll a fluorescence induction." Biochim. Biophys. Acta **1412**: 1-28.
- Lewis, N. S. and Nocera, D. G. (2006). "Powering the planet: chemical challenges in solar energy utilization." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**(43): 15729-15735.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). "Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes." Methods Enzymol. **148**: 350-382.

- 
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X. and Chang, W. (2004). "Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution." Nature **428**: 278.
- 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.
- Losi, A., Braslavsky, S. E., Gärtner, W. and Spudich, J. L. (1999a). "Time-resolved absorption and photothermal measurements with sensory rhodopsin I from *Halobacterium salinarum*." Biophys. J. **76**(4): 2183-2191.
- Losi, A., Wegener, A. A., Engelhard, M., Gärtner, W. and Braslavsky, S. E. (1999b). "Time-resolved absorption and photothermal measurements with recombinant sensory rhodopsin II from *Natronobacterium pharaonis*." Biophys. J. **77**(6): 3277-3286.
- Losi, A., Yruela, I., Reus, M., Holzwarth, A. R. and Braslavsky, S. E. (2003). "Structural changes upon excitation of D1-D2-Cyt b559 photosystem II reaction centers depend on the beta-carotene content." Photochem. Photobiol. Sci. **2**(7): 722-729.
- Lubitz, W., Reijerse, E. J. and Messinger, J. (2008). "Solar water-splitting into H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>: design principles of photosystem II and hydrogenases." Energy Environ. Sci. **1**(1): 15-31.
- Magnuson, A., Anderlund, M., Johansson, O., Lindblad, P., Lomoth, R., Polivka, T., Ott, S., Stensjö, K., Styring, S., Sundström, V. and Hammarström, L. (2009). "Biomimetic and microbial approaches to solar fuel generation." Acc. Chem. Res. **42**(12): 1899-1909.
- Marcus, M. A. (1968). "Theoretical relations among rate constants, barriers, and Brønsted slopes of chemical reactions." J. Phys. Chem. **72**(3): 891-899.
- Marcus, R. A. and Sutin, N. (1985). "Electron transfers in chemistry and biology." Biochim. Biophys. Acta: Rev. Bioenerg. **811**(3): 265-322.
- Marcus, Y. (2011). "Electrostriction in electrolyte solutions." Chem. Rev. **111**: 2761-2783.
- Mauzerall, D., Hou, J. M. and Boichenko, V. A. (2002). "Volume changes and electrostriction in the primary photoreactions of various photosynthetic systems: estimation of dielectric coefficient in bacterial reaction centers and of the observed volume changes with the Drude-Nernst equation." Photosynth. Res. **74**(2): 173-180.
- McEvoy, J. P. and Brudvig, G. W. (2006). "Water-splitting chemistry of photosystem II." Chem. Rev. **106**(11): 4455-4483.
- Melis, A. and Homann, P. H. (1975). "Kinetic analysis of the fluorescence induction in 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea poisoned chloroplasts." Photochem. Photobiol. **21**: 431-437.
- Messinger, J. (2004). "Evaluation of different mechanistic proposals for water oxidation in photosynthesis on the basis of Mn<sub>4</sub>O<sub>x</sub>Ca structures for the catalytic site and spectroscopic data." Phys. Chem. Chem. Phys. **6**(20): 4764-4771.

- Messinger, J. and Renger, G. (1994). "Analyses of pH-induced modifications of the period four oscillation of flash-induced oxygen evolution reveal distinct structural changes of the photosystem II donor side at characteristic pH values." Biochemistry **33**(36): 10896-10905.
- Messinger, J., Robblee, J. H., Bergmann, U., Fernandez, C., Glatzel, P., Visser, H., Cinco, R. M., McFarlane, K. L., Bellacchio, E., Pizarro, S. A., Cramer, S. P., Sauer, K., Klein, M. P. and Yachandra, V. K. (2001). "Absence of Mn-centered oxidation in the S<sub>2</sub> → S<sub>3</sub> transition: implications for the mechanism of photosynthetic water oxidation." J. Am. Chem. Soc. **123**(32): 7804-7820.
- Messinger, J., Schroder, W. P. and Renger, G. (1993). "Structure-function relations in photosystem II. Effects of temperature and chaotropic agents on the period four oscillation of flash-induced oxygen evolution." Biochemistry **32**(30): 7658-7668.
- Meyer, B., Schlodder, E., Dekker, J. P. and Witt, H. T. (1989). "O<sub>2</sub> evolution and Chl a+II (P-680<sup>+</sup>) nanosecond reduction kinetics in single flashes as a function of pH." Biochim. Biophys. Acta **974**(1): 36-43.
- Meyer, T. J., Huynh, M. H. V. and Thorp, H. H. (2007). "The possible role of proton-coupled electron transfer (PCET) in water oxidation by photosystem II." Angew. Chem. Int. Ed. **46**(28): 5284-5304.
- Michler, I. and Braslavsky, S. E. (2001). "Time-resolved thermodynamic analysis of the oat phytochrome A phototransformation. A photothermal beam deflection study." Photochem. Photobiol. **74**(4): 624 - 635.
- Miller, A. F. and Brudvig, G. W. (1991). "A guide to electron paramagnetic resonance spectroscopy of photosystem II membranes." Biochim. Biophys. Acta **1056**(1): 1-18.
- Monger, T. G., Cogdell, R. J. and Parson, W. W. (1976). "Triplet states of bacteriochlorophyll and carotenoids in chromatophores of photosynthetic bacteria." Biochim. Biophys. Acta **449**(1): 136-153.
- Moore, G. F. and Brudvig, G. W. (2011). "Energy conversion in photosynthesis: A paradigm for solar fuel production." Annu. Rev. Cond. Matt. Phys. **2**(1): 303-327.
- Mulkidjanian, A. Y. (1999). "Photosystem II of green plants: on the possible role of retarded protonic relaxation in water oxidation." Biochim. Biophys. Acta **1410**(1): 1-6.
- Nabedryk, E. and Breton, J. (2008). "Coupling of electron transfer to proton uptake at the Q<sub>B</sub> site of the bacterial reaction center: A perspective from FTIR difference spectroscopy." Biochim. Biophys. Acta **1777**(10): 1229-1248.
- Nelson, N. and Yocum, C. F. (2006). "Structure and function of photosystems I and II." Annu. Rev. Plant Biol. **57**: 521-567.
- Noguchi, T. (2008). "Fourier transform infrared analysis of the photosynthetic oxygen-evolving center." Coord. Chem. Rev. **252**(3-4): 336-346.



- 
- Ort, D. and Yocum, C. F. (1996). Oxygenic photosynthesis: The light reactions. Dordrecht, Kluwer Academic Publ.
- Pantazis, D. A., Orto, M., Petrenko, T., Zein, S., Lubitz, W., Messinger, J. and Neese, F. (2009). "Structure of the oxygen-evolving complex of photosystem II: information on the S<sub>2</sub> state through quantum chemical calculation of its magnetic properties." Phys. Chem. Chem. Phys. **11**(31): 6788-6798.
- Papageorgiou, G. C. and Govindjee (2011). "Photosystem II fluorescence: Slow changes – Scaling from the past." J. Photochem. Photobiol. B: Biol. **104**(1–2): 258-270.
- Paschotta, R. (2008). Encyclopedia of laser physics and technology. Berlin, Wiley-VCH.
- Peterman, E. J., Dukker, F. M., van Grondelle, R. and van Amerongen, H. (1995). "Chlorophyll a and carotenoid triplet states in light-harvesting complex II of higher plants." Biophys. J. **69**(6): 2670-2678.
- Petermann, K. (1991). Noise characteristics of solitary laser diodes. Laser diode modulation and noise, Springer Netherlands.
- Petrouleas, V. and Crofts, A. (2005). The iron-quinone acceptor complex. Photosystem II. T. Wydrzynski, K. Satoh and J. Freeman, Springer Netherlands. **22**: 177-206.
- Pieper, J. and Renger, G. (2009). "Flash-induced structural dynamics in photosystem II membrane fragments of green plants." Biochemistry **48**(26): 6111-6115.
- Poulet, P., Cahen, D. and Malkin, S. (1983). "Photo-acoustic detection of photosynthetic oxygen evolution from leaves - Quantitative-analysis by phase and amplitude measurements." Biochim. Biophys. Acta **724**(3): 433-446.
- Rappaport, F., Blanchard-Desce, M. and Lavergne, J. (1994). "Kinetics of electron transfer and electrochromic change during the redox transition of the photosynthetic oxygen-evolving complex." Biochim. Biophys. Acta **1184**: 178-192.
- 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. and Diner, B. A. (2008). "Primary photochemistry and energetics leading to the oxidation of the (Mn)<sub>4</sub>Ca cluster and to the evolution of molecular oxygen in photosystem II." Coord. Chem. Rev. **252**(3-4): 259-272.
- 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**: 8518-8527.
- Rappaport, F., Ishida, N., Sugiura, M. and Boussac, A. (2011). "Ca<sup>2+</sup> determines the entropy changes associated with the formation of transition states during water oxidation by photosystem II." Energy Environ. Sci. **4**(7): 2520-2524.

- Rappaport, F. and Lavergne, J. (1991). "Proton release during successive oxidation steps of the photosynthetic water oxidation process: stoichiometries and pH dependence." Biochemistry **30**(41): 10004-10012.
- 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.
- Razeghifard, M. R. and Pace, R. J. (1997). "Electron paramagnetic resonance kinetic studies of the S states in spinach PSII membranes." Biochim. Biophys. Acta **1322**: 141-150.
- Razeghifard, M. R. and Pace, R. J. (1999). "EPR kinetic studies of oxygen release in thylakoids and PSII membranes: an intermediate in the S<sub>3</sub> to S<sub>0</sub> transition." Biochemistry **38**: 1252-1257.
- Reinman, S. and Mathis, P. (1981). "Influence of temperature on photosystem II electron transfer reactions." Biochim. Biophys. Acta **635**: 249-258.
- Renger, G. (2004). "Coupling of electron and proton transfer in oxidative water cleavage in photosynthesis." Biochim. Biophys. Acta **1655**: 195-204.
- Renger, G., Eckert, H., Bergmann, A., Bernarding, J., Liu, B., Napiwotzki, A., Reifarth, F. and Eichler, H. (1995). "Fluorescence and spectroscopic studies of exciton trapping and electron transfer in photosystem II of higher plants." Funct. Plant Biol. **22**(2): 167-181.
- Renger, G. and Hanssum, B. (1988). "Studies on the deconvolution of flash-induced absorption changes into the difference spectra of individual redox steps within the water-oxidizing enzyme system " Photosynth. Res. **16**(3): 243-259.
- Renger, G. and Hanssum, B. (1992). "Studies on the reaction coordinates of the water oxidase in PS II membrane fragments from spinach." FEBS Lett. **299**(1): 28-32.
- Renger, G. and Renger, T. (2008). "Photosystem II: The machinery of photosynthetic water splitting." Photosynth. Res. **98**(1-3): 53-80.
- Ricci, L., Weidemüller, M., Esslinger, T., Hemmerich, A., Zimmermann, C., Vuletic, V., König, W. and Hänsch, T. W. (1995). "A compact grating-stabilized diode laser system for atomic physics." Opt. Commun. **117**(5-6): 541-549.
- Rizzi, A. C., van Gestel, M., Liddell, P. A., Palacios, R. E., Moore, G. F., Kodis, G., Moore, A. L., Moore, T. A., Gust, D. and Braslavsky, S. E. (2008). "Entropic changes control the charge separation process in triads mimicking photosynthetic charge separation." J. Phys. Chem. A **112**(18): 4215-4223.
- Robblee, J. H., Cinco, R. M. and Yachandra, V. K. (2001). "X-ray spectroscopy-based structure of the Mn cluster and mechanism of photosynthetic oxygen evolution." Biochim. Biophys. Acta **1503**(1-2): 7-23.
- Robblee, J. H., Messinger, J., Cinco, R. M., McFarlane, K. L., Fernandez, C., Pizarro, S. A., Sauer, K. and Yachandra, V. K. (2002). "The Mn cluster in the S<sub>0</sub> state of the oxygen-evolving complex of photosystem II studied by EXAFS spectroscopy: are there three

- 
- di- $\mu$ -oxo-bridged  $Mn_2$  moieties in the tetranuclear Mn complex?" J. Am. Chem. Soc. **124**(25): 7459-7471.
- Rutherford, A. W. and Moore, T. A. (2008). "Mimicking photosynthesis, but just the best bits." Nature **453**(7194): 449.
- Sauer, K., Yano, J. and Yachandra, V. K. (2008). "X-ray spectroscopy of the photosynthetic oxygen-evolving complex." Coord. Chem. Rev. **252**(3-4): 318-335.
- 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  $S_2$ -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. A., Barnett, C. J. and Klug, D. R. (1998). "Proton/hydrogen transfer affects the S-state-dependent microsecond phases of  $680^+$  reduction during water splitting." Biochemistry **37**(11): 3974-3981.
- Schinzel, S., Schraut, J., Arbuznikov, A. V., Siegbahn, P. E. M. and Kaupp, M. (2010). "Density functional calculations of  $^{55}Mn$ ,  $^{14}N$  and  $^{13}C$  electron paramagnetic resonance parameters support an energetically feasible model system for the  $S_2$  state of the oxygen-evolving complex of photosystem II." Chem. Eur. J. **16**(34): 10424-10438.
- Schlodder, E. and Brettel, K. (1988). "Primary charge separation in closed photosystem II with a lifetime of 11 ns: Flash-absorption spectroscopy with  $O_2$ -evolving photosystem II complexes from *Synechococcus*." Biochim. Biophys. Acta **933**(1): 22-34.
- Schlodder, E. and Witt, H. T. (1999). "Stoichiometry of proton release from the catalytic center in photosynthetic water oxidation. Reexamination by a glass electrode study at pH 5.5-7.2." J. Biol. Chem. **274**(43): 30387-30392.
- Schulenberg, P. J., Gärtner, W. and Braslavsky, S. E. (1995). "Time-resolved volume changes during the bacteriorhodopsin photocycle: A photothermal beam deflection study." J. Phys. Chem. **99**: 9617 - 9624.
- Shek, Y. L. and Chalikian, T. V. (2011). "Volumetric characterization of interactions of glycine betaine with protein groups." J. Phys. Chem. B **115**(39): 11481-11489.
- Siefermann-Harms, D. and Angerhofer, A. (1998). "Evidence for an  $O_2$ -barrier in the light-harvesting chlorophyll-a/b-protein complex LHC II." Photosynth. Res. **55**(1): 83-94.
- Siegbahn, P. E. (2008). "A structure-consistent mechanism for dioxygen formation in photosystem II." Chem. Eur. J. **14**(27): 8290-8302.
- Small, J. R., Libertini, L. J. and Small, E. W. (1992). "Analysis of photoacoustic waveforms using the nonlinear least squares method." Biophys. Chem. **42**(1): 29-48.
- Stowell, M. H. B., McPhillips, T. M., Rees, D. C., Soltis, S. M., Abresch, E. and Feher, G. (1997). "Light-induced structural changes in photosynthetic reaction center: implications for mechanism of electron-proton transfer." Science **276**(5313): 812-816.

- Sun, L., Hammarström, L., Åkermark, B. and Styring, S. (2001). "Towards artificial photosynthesis: ruthenium-manganese chemistry for energy production." Chem. Soc. Rev. **30**(1): 36-49.
- Suzuki, H., Sugiura, M. and Noguchi, T. (2005). "pH dependence of the flash-induced S-state transitions in the oxygen-evolving center of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy." Biochemistry **44**(5): 1708-1718.
- Suzuki, H., Sugiura, M. and Noguchi, T. (2009). "Monitoring proton release during photosynthetic water oxidation in photosystem II by means of isotope-edited infrared spectroscopy." J. Am. Chem. Soc. **131**(22): 7849-7857.
- Taiz, L. und Zeiger, E. (2000). Physiologie der Pflanzen. Heidelberg, Spektrum Akad. Verlag.
- Takeshita, K., Hirota, N., Imamoto, Y., Kataoka, M., Tokunaga, F. and Terazima, M. (2000). "Temperature-dependent volume change of the initial step of the photoreaction of photoactive yellow protein (PYP) studied by transient grating." J. Am. Chem. Soc. **122**(35): 8524-8528.
- Takeshita, K., Imamoto, Y., Kataoka, M., Tokunaga, F. and Terazima, M. (2002). "Thermodynamic and transport properties of intermediate states of the photocyclic reaction of photoactive yellow protein." Biochemistry **41**(9): 3037-3048.
- Telfer, A. (2002). "What is  $\beta$ -carotene doing in the photosystem II reaction centre?" Philos. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B: Biol. Sci. **357**(1426): 1431-1440.
- Terazima, M. (2011). "Studies of photo-induced protein reactions by spectrally silent reaction dynamics detection methods: Applications to the photoreaction of the LOV2 domain of phototropin from *Arabidopsis thaliana*." Biochim. Biophys. Acta: Proteins Proteomics **1814**(8): 1093-1105.
- Thielen, A. P. G. M. and Van Gorkom, H. J. (1981). "Energy transfer and quantum yield in photosystem II." Biochim. Biophys. Acta **637**(3): 439-446.
- 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 **473**: 55-60.
- Vargaftik, N. B., Vinogradov, Y. K. and Yargin, V. S. (1996). Handbook of physical properties of liquids and gases: Pure substances and mixtures. Redding CI, USA, Begell House.
- Vass, I. (2011). "Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex." Physiol. Plant. **142**(1): 6-16.
- Vermaas, W. F. J., Renger, G. and Dohnt, G. (1984). "The reduction of the oxygen-evolving system in chloroplasts by thylakoid components." Biochim. Biophys. Acta **764**(2): 194-202.
- Weast, R. C., Ed. (1970). Handbook of Chemistry and Physics. Ohio, The Chemical Rubber Co.

- 
- Weiss, C. and Sauer, K. (1970). "Activation kinetics of photosynthetic oxygen evolution under 20–40 nanosecond laser flashes." Photochem. Photobiol. **11**(6): 495-501.
- Witt, H. T. (1971). "Coupling of quanta, electrons, fields, ions and phosphorylation in the functional membrane of photosynthesis. Results by pulse spectroscopic methods." Q. Rev. Biophys. **4**(04): 365-477.
- Witt, H. T. (1996). "Primary reactions of oxygenic photosynthesis." Berichte der Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie **100**(12): 1923-1942.
- Yang, A. S., Gunner, M. R., Sampogna, R., Sharp, K., and Honig, B. (1993). "On the calculation of pKas in proteins." Proteins **15**: 262-265.
- Zaharieva, I., Grabolle, M., Chernev, P. and Dau, H. (2012). "Water oxidation in photosystem II: Energetics and kinetics of intermediates formation in S<sub>2</sub>->S<sub>3</sub> and S<sub>3</sub>->S<sub>0</sub> transitions monitored by delayed chlorophyll fluorescence." Proc. 15th Internatl. Conf. on Photosynth.: in press.
- Zaharieva, I., Wichmann, J. M. and Dau, H. (2011). "Thermodynamic limitations of photosynthetic water oxidation at high proton concentrations." J. Biol. Chem. **286**: 18222-18228.
- Zhu, Z. and Gunner, M. R. (2005). "Energetics of quinone-dependent electron and proton transfers in Rhodospirillum rubrum photosynthetic reaction centers." Biochemistry **44**(1): 82-96.
- 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.

**Copyright**

All figures and tables with remark “Abbildung aus Klauss *et al.* (2012b).“ or “Tabelle adaptiert aus Klauss *et al.* (2012b).“:

Reprinted from *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, Volume 1817, Issue 8, André Klauss, Thomas Sikora, Björn Süss, Holger Dau, Fast structural changes (200-900 ns) may prepare the photosynthetic manganese complex for oxidation by the adjacent tyrosine radical, Pages 1196-1207, Copyright (2012), with permission from Elsevier.

All figures and tables with remark “Abbildung aus Klauss *et al.* (2012a).“ or “Abbildung adaptiert aus Klauss *et al.* (2012a).“ or “Tabelle adaptiert aus Klauss *et al.* (2012a).“:

Reprinted from *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, André Klauss, Michael Haumann, Holger Dau, Alternating electron and proton transfer steps in photosynthetic water oxidation, Copyright (2012), with permission from the authors.

## Anhang A: Korrektur für die Desynchronisation von S-Zuständen

Die relative Besetzung der vier (semi-)stabilen Zustände ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  und  $S_0$ ), die sich nach einer Anzahl von  $j = 0, 1, 2, \dots$  sättigenden Laserblitzen in der PSII-Probe einstellt, kann durch einen Spaltenvektor nach A.1 beschrieben werden:

$$\vec{S}(j) = \begin{pmatrix} [S_1](j) \\ [S_2](j) \\ [S_3](j) \\ [S_0](j) \end{pmatrix}. \quad (\text{A.1})$$

Die relative Verteilung der intakten Photosysteme (die  $Q_B$ -blockierten Zentren, bei denen der  $Q_A \rightarrow Q_B$ -ET nicht stattfindet, sind hier explizit ausgeschlossen) auf die S-Zustände nach  $(j+1)$  sättigenden Blitzen kann rekursiv aus der Verteilung nach  $j$  Blitzen bestimmt werden:

$$\vec{S}(j+1) = M_T \vec{S}(j). \quad (\text{A.2})$$

Die Übergangsmatrix  $M_T$  hängt nur von der *miss*-Wahrscheinlichkeit  $m$  ab, da das Fortschreiten eines Photosystems um zwei Schritte im S-Zyklus während eines Nanosekunden-Laserpulses („*double hit*“) ausgeschlossen werden kann. Eine mögliche S-Übergangs-Abhängigkeit des *miss*-Parameters (de Wijn und van Gorkom 2002) wurde hier nicht berücksichtigt.

$$M_T = \begin{pmatrix} m & 0 & 0 & 1-m \\ 1-m & m & 0 & 0 \\ 0 & 1-m & m & 0 \\ 0 & 0 & 1-m & m \end{pmatrix} \quad (\text{A.3})$$

Die in dieser Arbeit verwendeten PSII-Präparationen enthalten neben den völlig intakten Photosystemen auch einen kleinen Anteil von Reaktionszentren, bei denen der  $Q_A \rightarrow Q_B$ -ET nicht stattfindet (Lazar 1999; Grabolle und Dau 2007). Diesem  $Q_B$ -blockierten Anteil, in dem nur der Übergang  $S_1 + h\nu \rightarrow S_2$  möglich ist, wurde mit einer zweiten Matrixgleichung Rechnung getragen.

$$\vec{S}'(j+1) = M_T' \vec{S}'(j) \quad (\text{A.4})$$

Die Verteilung von  $Q_B$ -blockierten Photosystemen auf die verschiedenen S-Zustände nach  $j$  bzw.  $(j+1)$  sättigenden Blitzen wird dabei, der Nomenklatur von Gleichung A.1 folgend, in Form eines Spaltenvektors  $\vec{S}'(j)$  bzw.  $\vec{S}'(j+1)$  dargestellt. Die Übergangsmatrix für  $Q_B$ -blockierte Zentren ist in Gleichung A.5 für die vereinfachende Annahme gegeben, dass zwischen zwei Anregungsblitzen keine Rekombination aus dem  $S_2$ -Zustand in den  $S_1$ -Zustand stattfindet.

$$M'_T = \begin{pmatrix} m & 0 & 0 & 0 \\ 1 - m & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (\text{A.5})$$

Die Verteilung des gesamten PSII-Ensembles auf die S-Zustände ergibt sich schließlich als Summe der Photosysteme mit intakter Akzeptorseite und dem Anteil der  $Q_B$ -blockierten Zentren nach:

$$\vec{S}^{\text{all}}(j+1) = qM_T\vec{S}(j) - (1-q)M'_T\vec{S}'(j). \quad (\text{A.6})$$

Die gemessenen PBD-Signale in Kapitel 4 werden von einem nicht-sättigenden Mess-Laserpuls ausgelöst, der auf zunächst dunkeladaptierte PSII-Proben angewendet wird, die  $j=0, 1, 2, \dots$  sättigenden Blitzen ausgesetzt waren. Die vier Signalverläufe  $Y^{j+1}(t)$ , die nach  $j=0, 1, 2$  und  $3$  sättigenden Blitzen gemessen wurden, sind im Signalvektor  $\vec{Y}(t)$  zusammengefasst.

$$\vec{Y}(t) = \begin{pmatrix} Y^1(t) \\ Y^2(t) \\ Y^3(t) \\ Y^4(t) \end{pmatrix} \quad (\text{A.7})$$

In gleicher Weise werden die gesuchten Signalverläufe, die den vier reinen (unvermischten) S-Zustandsübergängen ( $S_n \rightarrow S_m$  ( $n = 1, 2, 3, 0$  und  $m = 2, 3, 0, 1$ )) entsprechen, durch den Vektor  $\vec{X}(t)$  beschrieben:



$$\vec{X}(t) = \begin{pmatrix} X_{1 \rightarrow 2}(t) \\ X_{2 \rightarrow 3}(t) \\ X_{3 \rightarrow 0}(t) \\ X_{0 \rightarrow 1}(t) \end{pmatrix}. \quad (\text{A.8})$$

Es kann nun zusätzlich berücksichtigt werden, dass nur der Anteil  $(1-m)$  der Photosysteme bei Anregung mit dem nicht-sättigenden Messlicht-Blitz den jeweils untersuchten S-Übergang auch vollzieht. Für die Zusammensetzung der gemessenen Signale nach 0, 1, 2 und 3 sättigenden Blitzen aus den „puren“ Signalverläufen erhält man dann folgenden Zusammenhang:

$$\vec{Y}(t) = (1 - m)M_{P4}\vec{X}(t). \quad (\text{A.9})$$

Die Matrix  $M_{P4}$  beschreibt dabei die Verteilung auf die vier S-Zustände, die sich nach 0 bis 3 sättigenden Blitzen in der PSII-Probe eingestellt hat.

$$M_{P4} = \begin{pmatrix} \vec{S}^{\text{all}}(0)^T \\ \vec{S}^{\text{all}}(1)^T \\ \vec{S}^{\text{all}}(2)^T \\ \vec{S}^{\text{all}}(3)^T \end{pmatrix} \quad (\text{A.10})$$

Der obere Index T deutet dabei an, dass die erste Reihe der Matrix  $M_{P4}$  aus den vier Elementen des transponierten Vektors  $\vec{S}^{\text{all}}(0)^T = ([S_1](0), [S_2](0), [S_3](0), [S_0](0))$  besteht, die zweite Reihe aus den Elementen von  $\vec{S}^{\text{all}}(1)^T = ([S_1](1), [S_2](1), [S_3](1), [S_0](1))$  usw.

Die Signale, die den reinen, unvermischten S-Übergängen zugeordnet werden können, lassen sich schließlich nach Gleichung A.11 über die Inverse der Matrix  $M_{P4}$  berechnen.

$$\vec{X}(t) = \frac{1}{(1 - m)}(M_{P4})^{-1} \vec{Y}(t) \quad (\text{A.11})$$

### Simulation von Blitzmustern

Um ein Blitzmuster von Signalamplituden zu simulieren, das bei einer Blitzserie von mehr als 4 Blitzen entstanden ist, kann die Matrix aus Gleichung A.10 erweitert werden, etwa auf eine  $4 \times 8$ -Matrix, die die S-Zustandsverteilung nach 0–7 sättigenden Laserpulsen wiedergibt.

---

$$M_{P8} = \begin{pmatrix} \vec{S}^{\text{all}}(0)^T \\ \vdots \\ \vec{S}^{\text{all}}(7)^T \end{pmatrix} \quad (\text{A.12})$$

Mit der entsprechend modifizierten Form von Gleichung A.9 ist es dann möglich, die Blitzabhängigkeit von gemessenen Amplituden zu simulieren.

---

## Anhang B: Zusammensetzung der Pufferlösungen

Puffer A	(pH 7,5)	
	Saccharose	400 mM
	HEPES	25 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	15 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	CaCl <sub>2</sub>	5 mM
	BSA	2 g l <sup>-1</sup>
	Natriumascorbat	1 g l <sup>-1</sup>
Puffer B	(pH 6,2)	
	MES	25 mM
	NaCl	150 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Puffer C	(pH 6,2)	
	Betain	1 M
	MES	25 mM
	NaCl	15 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	5 mM
Puffer D	(pH 6,2)	
	Betain	1 M
	MES	25 mM
	NaCl	15 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	CaCl <sub>2</sub>	5 mM



---

## Veröffentlichungen

### Teile dieser Arbeit sind in den folgenden Fachartikeln veröffentlicht:

Andre Klauss, Roland Krivanek, Holger Dau, Michael Haumann. (2009). "Energetics and kinetics of photosynthetic water oxidation studied by photothermal beam deflection (PBD) experiments." Photosynthesis Research 102(2-3): 499-509.

Andre Klauss, Thomas Sikora, Björn Süss, Holger Dau. (2012). "Fast structural changes (200–900 ns) may prepare the photosynthetic manganese complex for oxidation by the adjacent tyrosine radical." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics 1817(8): 1196-1207.

Andre Klauss, Michael Haumann, Holger Dau. (2012). "Alternating electron and proton transfer steps in photosynthetic water oxidation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; published ahead of print September 17, 2012, doi:10.1073/pnas.1206266109 .

### Verschiedene Ergebnisse wurden in den folgenden Konferenzbeiträgen präsentiert:

Andre Klauss, Roland Krivanek, Michael Haumann, Holger Dau. "Photothermal beam deflection reveals volume changes associated with proton movements." PSII Workshop, Angstrom Laboratories, Uppsala, Schweden, Mai 2008, Vortrag

Andre Klauss, Roland Krivanek, Michael Haumann, Holger Dau. "Photothermal beam deflection reveals volume changes associated with proton movements." Solar-H2 Meeting, Bochum, Mai 2008, Poster

Andre Klauss, Roland Krivanek, Michael Haumann, Holger Dau. "Photosystem II (PSII) water oxidation: Photothermal beam deflection reveals volume changes associated with proton movements." Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Biophysik, Berlin, Oktober 2008, Poster

Andre Klauss, Tania Irebo, Holger Dau, Leif Hammarström. "Volume and enthalpy changes associated with light-driven electron transfer between  $\text{Ru}(\text{Bpy})_3^{2+}$  and methyl viologen studied by photothermal beam deflection." Solar-H2 Meeting, Tarragona, März 2009, Poster

Andre Klauss, Roland Krivanek, Michael Haumann, Holger Dau. "Photosystem II (PSII) water oxidation: Photothermal beam deflection reveals volume changes associated with proton movements." Gordon Research Conference on Photosynthesis, Smithfield, Juni 2009, Vortrag

Andre Klauss, Roland Krivanek, Michael Haumann, Holger Dau. "Volume changes associated with proton movement in the reaction cycle of photosynthetic water oxidation monitored by photothermal beam deflection." Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Biophysik, Bochum, Oktober 2010, Poster

Andre Klauss, Michael Haumann, Holger Dau. "Photosynthetic water oxidation studied by photothermal beam deflection." Symposium Biological Catalysis, Berlin, November 2010, Vortrag

Andre Klauss, Thomas Sikora, Björn Süss, Michael Haumann, Holger Dau. "Time-resolved detection of sub-microsecond volume changes of photosystem II (PSII) in its different S-states by laser-induced optoacoustic spectroscopy (LIOAS)" Conference: Photosynthesis Research for Sustainability, Baku, Juli 2011, Poster

---

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Holger Dau für die umfassende Betreuung dieser Arbeit bedanken. Er hat es mir ermöglicht, im Anschluss an meine Diplomarbeit auch die Dissertation auf dem spannenden Gebiet der Laser-Biophysik und Energieforschung durchzuführen, hat stets großes Interesse an meinen Ergebnissen gezeigt und war jederzeit für lehrreiche Diskussionen offen.

Bei Prof. Dr. Joachim Heberle bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die Möglichkeit, meine Ergebnisse in seiner Arbeitsgruppe zu präsentieren.

PD Dr. Michael Haumann gilt mein Dank für sein andauerndes Interesse an den photothermischen Experimenten und für die gute Zusammenarbeit insbesondere bei der von ihm initiierten Kooperation sowie den gemeinsamen Publikationen.

Bei Thomas Sikora und Dr. Björn Süß bedanke ich mich für die gute und ergiebige Zusammenarbeit bei dem Photoakustik-Projekt, für tolle Daten und einen gelungenen Aufbau.

Alexander Grundmeier und Joachim Buchta danke ich für ihre Beteiligung am Korrekturlesen dieser Arbeit und für die gute Zeit, die wir im gemeinsamen Büro und auf den Konferenzen hatten.

Monika Fünning gilt mein Dank für die Präparation von qualitativ hochwertigen PSII-Proben, von denen ich große Mengen benötigt habe.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dau bedanke ich mich für die so wichtige gute Arbeitsatmosphäre, geprägt von Hilfsbereitschaft und Teamgeist, die über die Jahre bei ständig wechselnder Besetzung immer gegeben war. Es hat Spaß gemacht Teil dieses Teams zu sein.

Für die Kollaborationen, in denen ich mit photoaktiven Systemen jenseits des Photosystems II, mit artifizieller Photosynthese und photokatalytischer Wasserstoffproduktion in Berührung gekommen bin, danke ich Prof. Dr. Leif Hammarström und Dr. Tania Irebo von der Universität Uppsala sowie Prof. Dr. John Golbeck und Dr. Carolyn Lubner von der Pennsylvania State University.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Charlotte und Theo sowie meinen Schwestern Barbara und Miriam danken, die mich auf meinem Weg immer unterstützt und mir Rückhalt gegeben haben. Meiner kleinen Mara danke ich für die vielen wunderbaren Momente, die mich glücklich und stolz machen. Meiner lieben Anka danke ich für die Begleitung durch die intensive Zeit der Promotion. Du bist immer für mich da.



Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, 23. Juli 2012