

# I Einleitung

## I.1 Die Photosynthese

Der in dieser Arbeit zu untersuchende Forschungsgegenstand ist ein Teilaspekt der Photosynthese. Die herausragende Stellung der Photosynthese für das Leben auf der Erde ist hinlänglich bekannt. Doch bevor die Vorstellung und Diskussion der Ergebnisse beginnt, soll ein kurzer Exkurs in die grundlegenden Prozesse der Photosynthese stehen.<sup>1</sup>

Die Photosynthese ist der wichtigste Energieumwandlungsprozeß auf der Erde, auf der das gesamte Leben höherentwickelter Organismen beruht. Dieser Prozeß wandelt die Strahlungsenergie der Sonne um und speichert sie in Form chemischer Bindungsenergie. Dabei spielt die oxygene Photosynthese, die in höheren Pflanzen, eukariotischen Algen und einigen prokariotischen Bakterien stattfindet, eine herausragende Rolle, da sie H<sub>2</sub>O und CO<sub>2</sub> unter Nutzung der Strahlungsenergie in molekularen Sauerstoff und Glukose als Energiespeicher umgewandelt, deren Gesamtreaktion sich mit



ausdrücken läßt. Sie ist verantwortlich für die Produktion des atmosphärischen Sauerstoffs, den Verbrauch von CO<sub>2</sub> und dessen Bindung in Kohlehydraten, also letztlich in Biomasse. Somit ist dieser Prozeß nicht nur Ausgangspunkt allen höheren Lebens, sondern auch notwendig für die Existenz von Flora und Fauna.

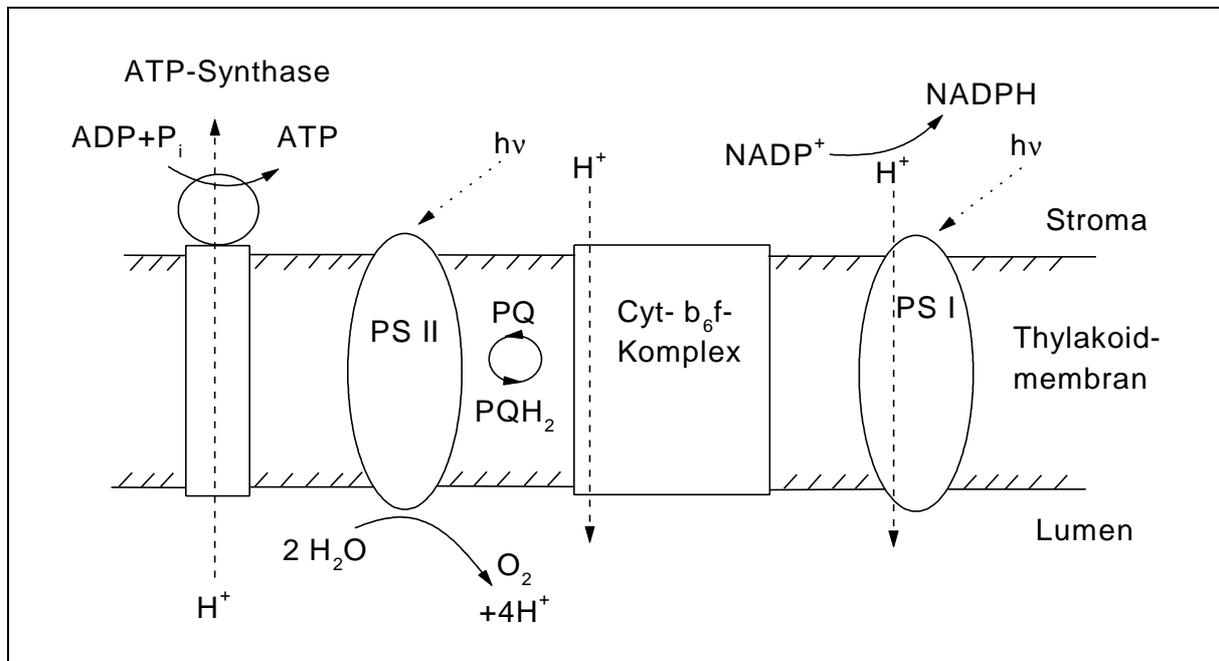
Der Gesamtprozeß der Photosynthese läßt sich in Licht- und Dunkelreaktionen unterteilen, die in räumlich getrennten Bereichen und auf unterschiedlichen Zeitskalen stattfinden. Die Lichtreaktionen finden in Thylakoidmembranen statt, die aus 5-7 nm dicken Lipiddoppelschichten bestehen und in sich geschlossen sind. Die Thylakoidmembranen grenzen eine innere Phase, das Lumen von einer äußeren, dem Stroma, ab. Die an der Lichtreaktion beteiligten Komponenten sind Membranproteinkomplexe, die in der Thylakoidmembran eingebettet sind.<sup>2</sup> In den Pigment-Protein-Komplexen, den photosynthetischen Reaktionszentren in der Thylakoidmembran, wird die Lichtenergie zum Aufbau eines elektrochemischen Potentials über die Thylakoidmembran und zur Bildung von NADPH genutzt. Die Gesamtgleichung der als Lichtreaktion zusammengefaßten Einzelprozesse beinhaltet die Spaltung von Wasser, die

---

<sup>1</sup> Eine grundlegende Einführung in die Prozesse der Photosynthese und einen geschichtlichen Abriß der Forschung findet sich u. a. in [Clayton (1980), Lawlor (1990), Stryer (1995)].

<sup>2</sup> Siehe Abbildung I-1.

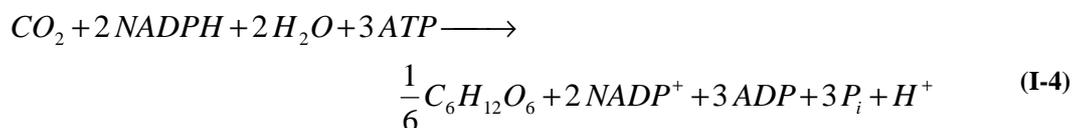
Reduktion von  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}$  und die über den Protonengradienten getriebene Bildungsreaktion von  $\text{ATP}$  und lautet:



**Abbildung I-1** Schematischer Aufbau der Thylakoidmembran

PS I, PS II – Photosystem I bzw. II; PQ – Plastochinonpool; Cyt- $b_6f$ -Komplex – Cytochrom- $b_6f$ -Komplex, NADP – Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat; ATP – Adenosin-Triphosphat.

Mit den beiden Verbindungen  $\text{ATP}$  und  $\text{NADPH}$  als Produkt der Lichtreaktion wird in der Dunkelreaktion  $\text{CO}_2$  im sogenannten Calvin-Zyklus zu Kohlehydraten reduziert [Stryer (1995)].



### I.1.1 Die Elektronentransportkette der Photosynthese

In der Lichtreaktion der oxygenen Photosynthese arbeiten zwei unterschiedliche Photosysteme, die Photosysteme I und II (PS I und PS II), in Reihe, um den Elektronentransport vom Wasser zu  $\text{NADP}^+$  zu ermöglichen.

Der prinzipielle Aufbau der beiden Photosysteme ähnelt sich: Außen befinden sich die pigmenthaltigen Antennenkomplexe, in höheren Pflanzen Chlorophyll-Proteinkomplexe mit  $\text{Chl } a$ ,  $\text{Chl } b$  und Carotinoiden als Pigmente, in Cyanobakterien auch Phycobilliproteine mit

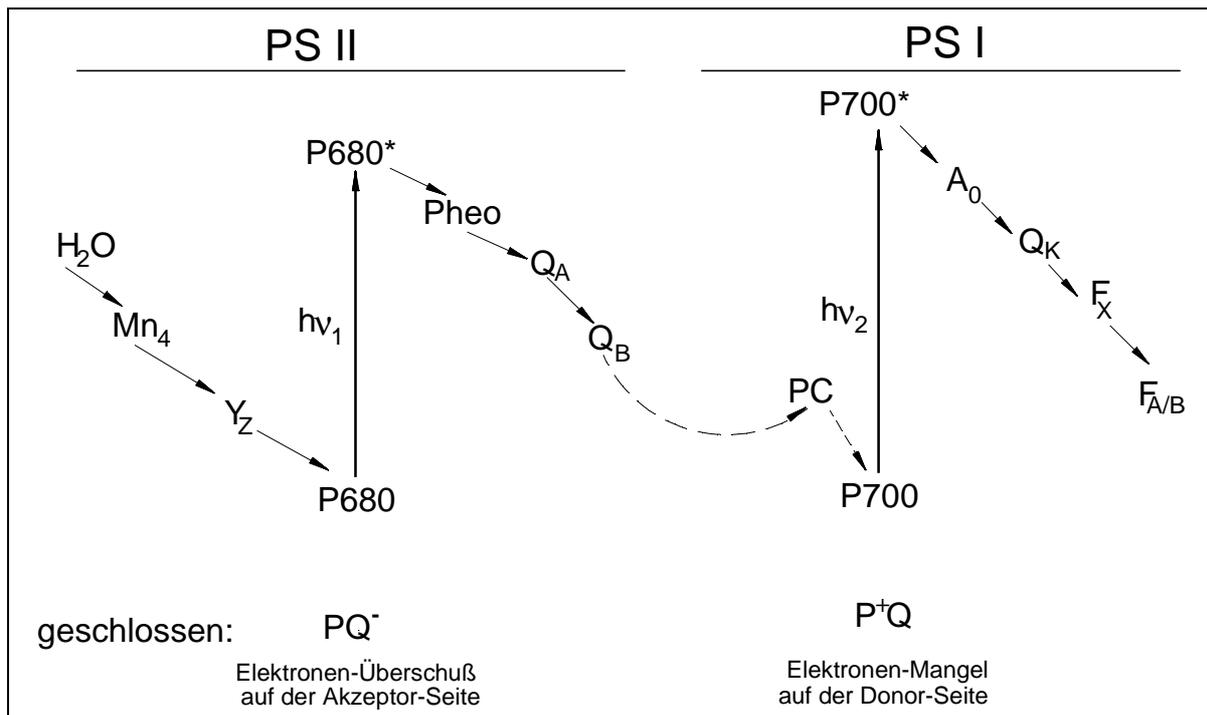
offenkettigen Tetrapyrrolringen (Phycobilline), die das Licht absorbieren und die Anregungsenergie zum Reaktionszentrum (RZ) weiterleiten. Im RZ ist ein primärer Donator (P680 in PS II und P700 in PS I), der bei Anregung ein Elektron an einen primären Akzeptor abgeben kann. Das Elektron wird dann über eine Kette von weiteren Elektronentransferschritten räumlich vom primären Donator getrennt, so daß die Rekombinationswahrscheinlichkeit des Radikalpaars gering bleibt. Abbildung I-2 zeigt den prinzipiellen Verlauf des Elektronentransports durch die beiden Photosysteme im sogenannten Z-Schema: Durch Lichtanregung und Weiterleitung der Anregung zum RZ kommt es bei P680 zur primären Ladungstrennung. Das Elektron wird vom primären Akzeptor Pheophytin aufgenommen, zu  $Q_A$  und weiter zu  $Q_B$  geleitet.  $Q_B$  nimmt zweimal ein Elektron auf und wird schrittweise zu  $Q_BH_2$  reduziert, das dann gegen  $Q_B$  ausgetauscht wird.  $Q_BH_2/Q_B$  bewirken den mobilen Elektronentransport zu Cytochrom  $b_6f$ ,<sup>3</sup> das durch Oxidations / Reduktionszyklen von  $Q_BH_2/Q_B$  Protonen aus dem Stroma in den luminalen Bereich pumpt. Das oxidierte  $P680^+$  wird über ein Tyrosin 161 ( $Y_Z$ ) reduziert, das wiederum durch den wasserspaltenden Mn-Komplex reduziert wird.

Von Cyt  $b_6f$  werden mittels Plastocyanin die Elektronen zu  $P700^+$ , dem primären Donator von PS I, transportiert. Dieser wurde vorher im Primärschritt durch Absorption eines Photons durch die Antenne, die Weiterleitung der Anregung zu P700 und durch den Elektronentransfer zum primären Akzeptor  $A_0$ , einem Chlorophyll  $a$ , oxidiert. Über eine Elektronentransportkette von  $Q_K$  über drei Eisen-Schwefel-Zentren wird Ferredoxin reduziert, das so  $NADP^+$  reduzieren kann. Bei diesem Vorgang findet weiterhin ein gerichteter Protonentransport vom Stroma zur luminalen Seite statt. Die durch den Protonengradienten entstandene Potentialdifferenz wird zur ATP-Synthese genutzt.

Der Zyklus kann erst wieder gestartet werden, wenn alle beteiligten Kofaktoren wieder im Ausgangszustand sind. Der limitierende Schritt in PS II ist die Reoxidation von  $Q_A$  und in PS I die Reduktion von  $P700^+$ . Das heißt, beschränkend in PS II ist ein Elektronenüberschuß auf der Akzeptorseite (Zustand:  $P680\ Pheo\ Q_A^-$ ) und ein Elektronenmangel in PS I auf der Donorseite (auf P700, Zustand:  $P700^+\ Chl\ Q_K$ ). Reaktionszentren in diesem Zustand werden geschlossene RZ genannt.

---

<sup>3</sup> Siehe Abbildung I-1.



**Abbildung I-2** Z-Schema der Elektronentransportkette der oxygenen Photosynthese  
 P680, P700 – primäre Elektronendonatoren der Photosysteme; Pheo, A<sub>0</sub> – primäre Akzeptoren;  
 Y<sub>Z</sub> – Tyrosin 161; Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub> – Plastochinone, PC – Plastocyanin; Q<sub>K</sub> – Phyllochinon; F<sub>X</sub>,  
 F<sub>A/B</sub> – Eisen-Schwefel-Zentren.

### I.1.2 Photosystem II

Die funktionelle Einheit des PSII, bestehend aus Kernkomplex und äußeren Antennen, beinhaltet *in vivo* etwa 25 Polypeptide [Barber *et al.* (1997)] mit einer großen Zahl von prosthetischen Gruppen und Kofaktoren und einer molekularen Masse von 700 kDa [Boekema *et al.* (1995)]. Auf die Funktionsweise von PS II, besonders die des Kernkomplexes, soll jetzt näher eingegangen werden. Deshalb findet eine Unterteilung in die wichtigsten funktionellen Unter-einheiten, die Antennenkomplexe, den wasserspaltenden Komplex und das Reaktionszentrum statt.

#### *Der wasserspaltende Komplex (OEC)*

Da Wasser nahezu unbegrenzt zur Verfügung steht, ist die Verwendung von Wasser als ultimativer Elektronendonator in der oxygenen Photosynthese ein offensichtlicher Vorteil gegenüber anderen Substanzen wie z. B. H<sub>2</sub>S als Elektronendonator der Archebakterien. Sowohl die zur Spaltung von H<sub>2</sub>O notwendige Energie, die Stabilität als auch die möglichen reaktiven Intermediate der Spaltung stellen jedoch extreme Anforderungen an ein System, das zur Nutzung dieser Quelle fähig ist. Einen wichtigen Hinweis auf die Funktionsweise der Wasserspaltung in PS II gab die Beobachtung von Joliot, daß die Sauerstoffentwicklung von Chloroplasten, mit einzelnen Lichtblitzen induziert, zu einem Oszillationsmuster der Periodizität vier führt [Joliot und Joliot (1968), Joliot *et al.* (1969)]. Es werden lichtgetrieben vier Oxida-

tionsäquivalente akkumuliert, um zwei Wassermoleküle in einem Schritt zu oxidieren [Kok *et al.* (1970)]. Die einzelnen Redoxzustände in diesem Modell tragen die Bezeichnungen  $S_0$  bis  $S_4$ . Die Indizes zeigen die Anzahl der akkumulierten Redoxäquivalente an. Der wasserspaltende Komplex besteht aus einem proteingebundenen Cluster von 4 Mn-Atomen. In der pflanzlichen Photosynthese sind außerdem die extrinsischen Proteine mit einem Molekulargewicht von 33 kDa, 24 kDa und 18 kDa beteiligt.

### *Die Antennenkomplexe*

Die Antennenkomplexe bestehen aus chromophorhaltigen Proteinen, deren Funktion die effektive Absorption von Licht unterschiedlicher Wellenlängen und die effiziente Weiterleitung der Anregungsenergie zum Reaktionszentrum ist.

Der Antennenkomplex kann vereinfacht in eine innere und eine äußere Antenne unterteilt werden. Die innere Antenne, auch Kernantenne genannt, besteht aus den Chl *a* haltigen Proteinen CP43 und CP47. Ihre Sequenz ist zu einem hohen Grad in allen PS II Systemen aus Pflanzen und Cyanobakterien konserviert. Die Kernantenne ist an das Reaktionszentrum gekoppelt, so daß die CP43 und CP47 Komplexe in allen sauerstoffentwickelnden PS II Präparationen enthalten sind. Ihre Aufgabe ist, neben der Funktion als Lichtsammelkomplex, die optimale Weiterleitung der Anregungsenergie von den äußeren Antennenkomplexen zum Reaktionszentrum.

Die äußeren Antennen, Chromophor-Protein-Komplexe, absorbieren bei anderen Wellenlängen als Reaktionszentrum und Kernantenne und vergrößern so die nutzbare spektrale Bandbreite. Der Aufbau und die Funktionsweise der äußeren Antennen in höheren Pflanzen und Cyanobakterien unterscheidet sich wesentlich. Cyanobakterien besitzen Phycobillosome, Proteinkomplexe mit offenkettigen Tetrapyrrolen als Pigmenten. Diese Proteinkomplexe sind räumlich wie folgt angeordnet: Phycoerythrin (Absorptionsmaximum  $\lambda_{\max} = 567$  nm) außen, Phycoyanin ( $\lambda_{\max} = 620$  nm) weiter innen und Allophycocyanin ( $\lambda_{\max} = 650$  nm) im Zentrum ganz in der Nähe der Kernantenne [Glazer (1984)]. Sie bilden eine Art Trichter, in dem ein gerichteter Energietransfer von den äußeren Billiproteinen zur Kernantenne stattfindet. Im Gegensatz dazu sind die äußeren Antennen höherer Pflanzen Chl *a* und Chl *b* bindende Proteine. LHC II<sup>3</sup> ist dabei der wichtigste Bestandteil der äußeren Antenne mit 8 Chl *a* und 7 Chl *b* [z. B. Nakayama und Mimuro (1994)] bzw. 9 Chl *a* und 6 Chl *b* [z. B. Mullineaux *et al.* (1993)], sowie Xantophyll als Carotenoid. Die Proteinstruktur ist bis zu einer Auflösung von 3.4 Å durch Elektronenbeugung an 2D-Kristallen aufgelöst [Kühlbrandt *et al.* (1991) und

---

<sup>3</sup> Light harvesting complex II.

(1994)]. Die Porphyrinringe sind in zwei Ebenen nahezu senkrecht zur Thylakoidmembran ausgerichtet. Durch sehr kleine Abstände zwischen den Chlorophyllen (Abstand zwischen den zentralen Mg-Atomen: 9-14 Å [Kühlbrandt und Wang (1991)]) treten sehr schnelle Energietransferprozesse im fs- und ps-Bereich auf<sup>4</sup>. Sie ermöglichen eine schnelle Energieäquilibrierung der Anregung zwischen den Pigmenten. Zwischen den LHC II Komplexen und der Kernantenne findet diese binnen 10-20 ps statt, wie Fluoreszenzuntersuchungen an PS II Membranfragmenten (BBY) [Dau und Sauer (1996)] und Thylakoidmembranen [McCauley *et al.* (1989), Roelofs *et al.* (1992)] zeigen.

### *Das Reaktionszentrum*

Die Proteine D1, D2 und Cyt b559 bilden das sogenannte Reaktionszentrum, das von CP43 und CP47 umschlossen ist. Dort befinden sich die wesentlichen Kofaktoren, die an der primären Ladungstrennung beteiligt sind. Der primäre Donator P680 bildet eine effiziente, aber flache Falle für die Anregung, d. h. seine energetische Lage ist mit anderen Chlorophyllen des Reaktionszentrums und der Kernantenne vergleichbar, so daß eine Anregung von P680 nicht zwangsläufig zur Ladungstrennung führt, sondern auch zu anderen Chlorophyllen übertragen werden kann. Die Delokalisierung von P680\* ist bisher nicht eindeutig geklärt. Auf Grund von vielen Gemeinsamkeiten zwischen PS II und dem bakteriellen RZ wird ein schwach gekoppeltes *special pair*, ein exzitonisch gekoppeltes Dimer, aus zwei eng benachbarten Chl *a* diskutiert, z. B. [Van der Vos *et al.* (1992)]. Andererseits deuten viele Experimente darauf hin, daß sowohl P680<sup>+</sup> als auch <sup>3</sup>P680 in monomerer Form vorliegen. Die geringe Rotverschiebung der Q<sub>y</sub>-Bande zu den Antennenchlorophyllen sind Hinweise auf eine monomere Form von P680\* [Hoff (1987), Lösche *et al.* (1988)]. In letzter Zeit werden aber auch Modelle mit einer delokalisierten Anregungsenergie über drei oder mehr Pigmente der im RZ enthaltenen 6 Chl *a* und 2 Pheophytine vorgeschlagen [Klug *et al.* (1998)]. Intrinsische Ladungstrennungsraten zu P<sup>+</sup>Pheo<sup>-</sup> von (2 ps)<sup>-1</sup> bis (21 ps)<sup>-1</sup> aus Messungen an isolierten Reaktionszentrenkomplexen und aus intakteren Präparationen werden diskutiert [Van Grondelle (1994), Diner und Babcock (1996)]. Der Elektronentransport weiter zum Q<sub>A</sub> dauert ca. 250-500 ps [Eckert *et al.* (1988), Nuijs *et al.* (1986), Schatz *et al.* (1987)]. Da in isolierten RZ-Präparationen Q<sub>A</sub> nicht mehr vorhanden ist, hat dies auch Einfluß auf die Rekombinationskinetik der primären Ladungstrennung. Unter bestimmten Umständen kann in intakteren PS II Präparationen Q<sub>A</sub> doppelt reduziert werden, das daraufhin doppelt protoniert wird (zu Q<sub>A</sub>H<sub>2</sub>). Die Situation ist dann vergleichbar mit der in isolierten RZ, da keine abstoßende Kraft wie in geschlossenen PS II wegen des Elektrons auf Q<sub>A</sub><sup>-</sup> wirkt, aber auch keine Ladungsstabilisierungs-

<sup>4</sup> Siehe z. B. Eads *et al.* (1989), Kwa *et al.* (1992) und Van Grondelle *et al.* (1994).

reaktion stattfinden kann. Daher ergibt sich ein schneller Ladungstransfer und eine lange Lebensdauer von  $P^+Pheo^-$ .

### *PS II Kernkomplexe*

Die hier verwendeten photosynthetischen Proben sind PS II Kernkomplexe, gewonnen aus Spinat und dem Cyanobakterium *Synechococcus el.* PS II Kernkomplexe sind die kleinsten PS II Präparationen, die noch zur Wasserspaltung fähig und somit voll funktionsfähig sind. Sie bestehen aus den oben einzeln diskutierten Komponenten Kernantenne, wasserspaltendem Komplex und Reaktionszentrum.

Einen ausführlichen Vergleich der biochemischen Eigenschaften von cyanobakteriellen und pflanzlichen PS II Kernkomplexen findet man in [Barry *et al.* (1994)]. Abbildung I-3 zeigt schematisch die wichtigsten Proteine und die Elektronentransportkette des cyanobakteriellen Kernkomplexes. Die Polypeptide – sowohl in pflanzlichen als auch in cyanobakteriellen Kernkomplexen vorhanden – sind: CP47 (47 kDa), CP 43(43 kDa), D1 (32 kDa), D2 (34 kDa), das extrinsische 33 kDa-Protein und die beiden Untereinheiten  $\alpha$  (9 kDa) und  $\beta$  (4 kDa) des Cyt b559 Proteins. Weiterhin gibt es in pflanzlichen Präparationen zwei extrinsische Proteine von 18 und 24 kDa, die in cyanobakteriellen Präparationen fehlen. Deren Abwesenheit führt in pflanzlichen Präparationen zur Verringerung der Sauerstoffproduktion, soweit keine hohe Konzentration von  $Ca^{2+}$  und  $Cl^-$  zur Verfügung steht. In cyanobakteriellen Kernkomplexen hingegen wurden zwei andere Proteine detektiert, ein 9 oder 12 kDa Protein und ein Cytochrom  $c_{550}$ , deren Funktion noch nicht geklärt sind.

PS II Kernkomplexe sind etwa 236 kDa (Monomere) bzw. 430 kDa (Dimere) groß [Hankamer *et al.* (1997a)], im Vergleich zu den 700 kDa der Kernkomplexe mit äußeren Antennen. In der Literatur finden sich viele Hinweise auf eine dimere Natur des PS II *in vivo* [Zheleva *et al.* (1996), Hankamer *et al.* (1997a/b) und Rögner *et al.* (1996)].

In letzter Zeit wurden große Fortschritte zur Züchtung von 3D-Kristallen zur Untersuchung der Struktur mittels Röntgenbeugung gemacht [Zouni *et al.* (1998)]. Beugungsreflexe bis zu 5 Å wurden erzielt. Die Phasenbestimmung steht jedoch noch aus. Mit einer Grobstruktur, die die Lage der Helizes und des Mn- Komplexes enthält, kann im Laufe des nächsten Jahres gerechnet werden. Ein Strukturmodell mit einer Auflösung von 8 Å wurde mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen an 2D-Kristallen von RZ / CP47 Kernkomplexen erreicht [Rhee *et al.* (1997) und (1998)], die aber keine Lokalisierung der Kofaktoren und der Antennenchlorophylle zulassen. Jedoch ermöglichen diese und elektronenmikroskopische Einzelmole-

külanalysen mittlerweile eine Zuordnung der verschiedenen Proteine in der Elektronendichtekarte [Eijkelhoff *et al.* (1997), Boekema *et al.* (1998)].

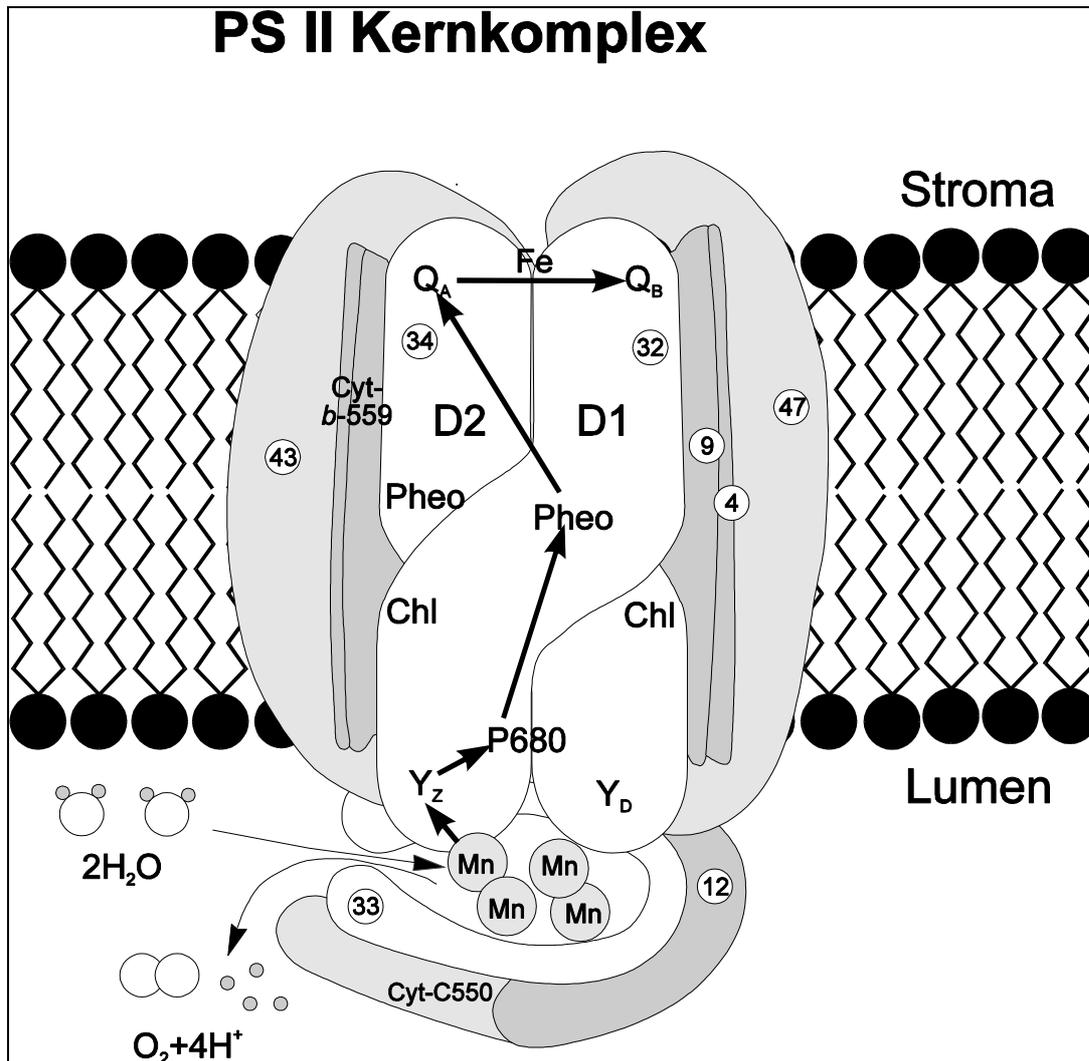


Abbildung I-3 Schematische Darstellung des PS II Kernkomplexes von Cyanobakterien  
– die umkreisten Zahlen geben das Gewicht der beteiligten Proteine in kDa an.

### I.1.3 Kinetische Modelle und Limitierungen

#### *Migration und Einfang*

Die Voraussetzung für die hohe Quantenausbeute der Radikalpaarbildung von > 90 % ist ein schneller Transfer der Anregungsenergie von der lichtabsorbierenden Antenne zum Reaktionszentrum und eine schnelle primäre Ladungstrennung. Die Zeit von der Absorption des Photons bis zur primären Ladungstrennung, die Gesamteinfangzeit  $1/k_{\text{trap}}$ , wird wegen des sequentiellen Ablaufs der beiden Prozesse beschrieben mit:

$$1/k_{\text{trap}} = 1/k_{\text{Ant}} + 1/k_{\text{RZ}} \quad (\text{I-5})$$

Die für einen statistischen, diffusiven Energietransfer zu einem, dem RZ benachbarten Pigment benötigte Zeit  $1/k_{\text{Ant}}$  läßt sich für eine 2-dimensionale regelmäßige Anordnung von N näherungsweise iso-energetischen Pigmenten angeben zu [Pearlstein (1982)]:

$$k_{\text{Ant}} = 2 k_{\text{hop}} / N c(N) \quad (\text{I-6})$$

Dabei ist  $c(N)$  ein von der räumlichen Struktur der Antenne abhängiger Faktor, N die Gesamtzahl der Pigmente der Antenne und des RZ und  $k_{\text{hop}}$  die Rate für den Transfer zwischen zwei benachbarten Pigmenten (Förster Energietransfer<sup>5</sup>). Ist der Betrag von  $k_{\text{Ant}}$  klein gegenüber  $k_{\text{RZ}}$ , spricht man von *diffusion*-limitierter Kinetik.

Der zweite Beitrag in Gleichung I-5, die sog. Einfangrate  $k_{\text{RZ}}$  im Reaktionszentrum, die den Transfer der Energie von einem Nachbarpigment und die Ladungstrennung beinhaltet, wird unter Annahme eines monomeren Charakters des primären Donators beschrieben durch [Van Grondelle *et al.* (1994)]

$$\frac{1}{k_{\text{RZ}}} = \frac{N_{\text{Äq}}}{k_{\text{T}}} \left[ \frac{1}{z} + \frac{k_{-\text{T}}}{k_{\text{CS}}} \right] \quad (\text{I-7})$$

mit

$$N_{\text{Äq}} = \sum_{i=1}^N \exp[-(E_i - E_p) / k_B T] \quad (\text{I-8})$$

$k_{\text{T}}$  – Rate des Energietransfers von einem der unmittelbaren Nachbarpigmente zum Donator P;  
 $k_{-\text{T}}$  – Rate des Energietransfers von P zurück zu einem der unmittelbaren Nachbarpigmente;  
 $z$  – Zahl der unmittelbaren Nachbarpigmente;  $k_{\text{CS}}$  – Rate der Ladungstrennung von  $^1\text{P}^*$  ausgehend;  
 $N_{\text{Äq}}$  – effektive Antennengröße, nach Einstellung einer Boltzmannverteilung der Anregungsenergie über die Gesamtantenne;  $E_i$  – Energieniveau des ersten angeregten Singulettzustandes des  $i$ -ten Pigments.

Für den Fall, daß  $k_{\text{RZ}} \ll k_{\text{Ant}}$  gilt, bietet es sich an, zwei limitierende Fälle zu unterscheiden. Im ersten Fall sind die Raten für den Energietransfer zu und von P vergleichbar und viel schneller als die Ladungstrennungsrate  $k_{\text{CS}}$  (d. h.  $k_{\text{T}} \approx k_{-\text{T}} \gg k_{\text{CS}}$ ). Für diesen sogenannten *trap*-limitierten Fall vereinfacht sich Gleichung (I-3) zu:

$$k_{\text{RZ}} = \frac{k_{\text{CS}}}{N_{\text{Äq}}} \quad (\text{I-9})$$

Hier skaliert also die experimentell zugängliche apparente Ladungstrennungsrate  $k_{\text{RZ}}$  gegenüber der intrinsischen Ladungstrennungsrate  $k_{\text{CS}}$  mit der effektiven Zahl der Antennenpigmente  $N_{\text{Äq}}$ .

---

<sup>5</sup> Siehe Kap. II.1.

Im zweiten Grenzfall sind die Raten für den Energietransfer zu und von P wesentlich kleiner als die intrinsische Ladungstrennungsrate ( $k_T \approx k_{-T} \ll k_{CS}$ ). Für diesen sog. *transfer-to-trap*-limitierten Fall läßt sich  $k_{RZ}$  vereinfacht ausdrücken mit:

$$k_{RZ} = z k_T / N_{Äq} \quad (\text{I-10})$$

Die in diesem Fall beobachtbare Einfangzeit  $\tau_{RZ} = 1/k_{RZ}$  beinhaltet somit keine Information über den Ladungstrennungsprozeß von  $^1P^*$ , sondern reflektiert lediglich den Energietransfer von den unmittelbaren Nachbarpigmenten zu P, also den Transfer zur Energiesenke (*trap*).

Die Untersuchungsmethoden zur Messung dieser Kinetiken sind zeitaufgelöste Fluoreszenz- und Absorptionsexperimente. Im Fall von PS I ist die Interpretation der beobachteten Kinetiken in der Literatur kontrovers mit der Annahme der Grenzfälle der *trap*-Limitierung [Holzwarth *et al.* (1993), Turconi *et al.* (1993)] und *transfer-to-trap*-Limitierung [Gobets *et al.* (1998), Valkunas *et al.* (1995)] bis zu Mischformen dieser Extremfälle. Neuere Ergebnisse deuten jedoch auf eine Transferkinetik hin, die sich nicht mit den Grenzfällen beschreiben läßt [Byrdin *et al.* (1999)].

In PS II scheint die Sachlage hingegen geklärt. Sowohl für die Kinetik von PS II Membranfragmenten höherer Pflanzen als auch für PS II Kernkomplexe ist das Modell der *trap*-Limitierung [Schatz *et al.* (1988), Holzwarth (1992), Van Grondelle (1994)] im Allgemeinen anerkannt.

#### *Das excited state – radical pair equilibrium Modell der Ladungstrennung in PS II*

Das weitgehend anerkannte Modell für die Dynamik angeregter Zustände in PS II, das *excited state – radical pair equilibrium* Modell [Schatz *et al.* (1988), Roelofs *et al.* (1992), Review: Dau (1994)] beruht auf einer *trap*-limitierten Kinetik sowie der Reversibilität des primären Ladungstrennungsschrittes [Van Grondelle (1985)]. Es sagt eine biexponentielle Zerfallskinetik voraus. Die wichtigsten Merkmale dieses Modells sind:

1. Die Anregungsenergie äquilibriert innerhalb 10 – 20 ps über alle Pigmente der Antenne und P.
2. Dadurch ist dieser äquilibrierte Anregungszustand energetisch abgesenkt und die Energiedifferenz zum primären Radikalpaar ausreichend klein, um ein Gleichgewicht zwischen beiden Zuständen zu bewirken.
3. Dieses Gleichgewicht wird in offenem PS II ( $Q_A$  oxidiert) hauptsächlich durch Stabilisierung der Ladungstrennung mit Elektronentransfer zum sekundären Akzeptor  $Q_A$  entvölkert; in geschlossenem PS II ( $Q_A$  vorreduziert) hingegen kommen Ladungsrekombination

zum Grundzustand oder angeregten Triplettzustand von P sowie strahlende und strahlungslose Relaxation der angeregten Zustände zum Tragen.

Weiterhin verschiebt sich in geschlossenem PS II durch die negative Ladung auf  $Q_A$  das Gleichgewicht vom ladungstrennten zum angeregten Zustand, was sich in einem starken Anstieg der stationären Fluoreszenzintensität zeigt. In der Literatur werden zwei Extremfälle zur Erklärung dieser stark erhöhten Fluoreszenz diskutiert: Klimov und Krasnowski (1982) erklären den starken Fluoreszenzanstieg ausschließlich mit der verzögerten Fluoreszenz aus der Rekombination von  $P^+Pheo^-$ . Im Gegensatz dazu berechneten Schatz *et al.* (1988) aus ihren Fluoreszenz- und Absorptionskinetiken auf Grundlage des *excited state – radical pair equilibrium* Modells, daß es sich um einen starken Anstieg der spontanen Emission handle: die Ladungstrennungsrates sinkt beim Schließen des RZ stark, die Rückrate bleibt hingegen fast unbeeinflusst.

Erweiterungen des *excited state – radical pair equilibrium* Modells speziell für geschlossenes PS II [Schlodder und Brettel (1988), Hillmann *et al.* (1995)] wurden notwendig, da Radikalpaarrelaxationen und multiphasische Zerfallskinetiken im ns Bereich beobachtet wurden.

## I.2 Zielsetzung und Gliederung der Arbeit

Folgende Fragestellungen zur Anregungs- und Ladungstransferkinetik von PS II Kernkomplexen sollen in dieser Arbeit behandelt werden:

- Die diskutierten Erklärungen für die höhere Fluoreszenzquantenausbeute in geschlossenem PS II sind unbefriedigend. Beide Grenzfälle, die verzögerte Fluoreszenz und die prompte Emission stellen Extremfälle dar. Wenn  $Q_A$  negativ geladen ist, wird allgemein ein Einfluß auf die Ratenkonstante sowohl der primären Ladungstrennung als auch der -rekombination erwartet und nicht, wie in den Extremfällen, nur Auswirkungen auf eine der beiden Ratenkonstanten.
- Die Ergebnisse an PS II mit doppelreduziertem  $Q_A$ , dessen Fluoreszenzkinetik eine Komponente von 0.3–0.5 ns aufweist [Van Mieghem *et al.* (1992), Vass *et al.* (1993)], lassen die Frage offen, ob in diesem Zeitbereich schon eine Relaxation des primären Radikalpaars auftritt. Dies soll am PS II mit offenem und geschlossenem RZ (einfach reduziertes  $Q_A$ ) untersucht werden.
- In Bezug auf die systematische Untersuchung der Anregungswellenlängenabhängigkeit der Einfangkinetik in intaktem PS II (insbesondere im Bereich der  $Q_Y$ -Bande) sind in der Literatur kaum Daten vorhanden. Das allgemein akzeptierte *excited state – radical pair equilibrium* Modell läßt eine Unabhängigkeit erwarten, doch stehen dem die Ergebnisse

von Schelvis *et al.* (1995) gegenüber. In Ein-Farbe Pump-Probe Absorptionsexperimenten an PS II Kernkomplexen aus Spinat wurde die Einfangzeit in geschlossenem PS II nach Anregung bei 670 nm mit 200 ps charakterisiert, die sich auf 80 ps bei Anregung  $\geq 700$  nm verkürzt [Schelvis *et al.* (1995)]. Die erste systematische Studie zur Anregungswellenlängenabhängigkeit der Fluoreszenzkinetik für offene und geschlossene RZ wird hier vorgestellt.

- Die PS II Kernkomplexe von Cyanobakterien und höheren Pflanzen weisen eine starke strukturelle Homologie auf. Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Anregungskinetiken von Präparationen aus Spinat und *Synechococcus el.* sollen herausgearbeitet werden.

Als experimentelle Techniken sollen die zwei-Farben-transiente Absorption und die Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC<sup>6</sup>) im ps Zeitbereich zum Einsatz kommen. Die dazu notwendige hochrepetitive und hochempfindliche Apparatur für die transiente Absorption mußte aufgebaut und die TCSPC-Anlage optimiert werden. Besonders der Aufbau der transienten Absorptionsanlage zur annihilationsfreien Messung gekoppelter Multichromophorsysteme erforderte einen hohen technischen und zeitlichen Aufwand. Die Meßapparaturen werden zusammen mit der Datenauswertung im Kapitel III der Arbeit vorgestellt.

Eine ausführliche Charakterisierung der eingesetzten PS II Kernkomplexe mit Standardtechniken findet sich im Kapitel IV, bevor im Kapitel V die kinetischen Untersuchungen vorgestellt und im Kapitel VI ausgewertet, Modelle diskutiert und erweitert werden.

Zum Abschluß werden im Abschnitt VI.3 die Ergebnisse der Arbeit aus den Fluoreszenz- und Absorptionsdifferenzmessungen gemeinsam diskutiert, verglichen und Schlußfolgerungen gezogen.

---

<sup>6</sup> TCSPC- time-correlated single photon counting.