

V. Zeitaufgelöste Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen an PS II Kernkomplexen

V.1 Meßbedingungen der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen

Alle zeitaufgelösten Fluoreszenzuntersuchungen wurden mit der Technik der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung durchgeführt. Die Laseranregungsfrequenz betrug 800 kHz. Die Anregungsintensität wurde so gewählt, daß unabhängig von der Anregungswellenlänge immer die gleiche Anzahl von PS II Kernkomplexen pro Puls angeregt wird. Für die Anregung bei 670 nm waren es sowohl für offene als auch für geschlossene RZ $\sim 3 \text{ nJ}/(\text{cm}^2 \cdot \text{Puls})$. Dies entspricht einer Anregung alle 10 ms pro PS II.

Die Fluoreszenzwellenlänge wurde mit einem Doppelmonochromator mit einer Auflösung von 4 nm für geschlossene Reaktionszentren und 8 nm für offene RZ selektiert. Der Grund für die geringe spektrale Auflösung für Messungen von Kernkomplexen mit offenen RZ ist die geringe Fluoreszenzquantenausbeute und die Beschränkung in der Anregungsenergie. Da die Probe relativ schnell deaktiviert, kann dies auch nicht mit längeren Akkumulationszeiten kompensiert werden. Für Fluoreszenzzerfallskurven und Apparatefunktionen (*Instrument Response Function*, IRF) wurden jeweils 30000 Ereignisse im Maximumkanal akkumuliert. Da das Aufnehmen von Fluoreszenzzerfallskurven je nach Detektionswellenlänge bis zu einer Stunde dauert, wurden hintereinander zwei Messungen mit jeweils nur 15000 Ereignissen im Maximum durchgeführt. Vor und nach jeder Messung wurde eine IRF aufgenommen. So erhält man für jede Wellenlänge zwei Zerfallskurven, die addiert werden, und drei IRF, deren Mittelwert gebildet wird. Dadurch konnten Proben Degradationen besser beobachtet und Laser- sowie Elektronikinstabilitäten besser korrigiert werden. Die typische Halbwertsbreite der IRF betrug 40 ps. Das Zeitintervall pro Detektionskanal wurde auf 5 ps festgesetzt.

Für die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wurden die Proben auf 5 μM Chlorophyll mit im Abschnitt IV.1 beschriebenen Puffern für *Synechococcus el.*- und Spinat Kernkomplexe verdünnt. Ein Probenansatz von 20 ml pro Messung wurde verwendet. Messungen an PS II Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* wurden bei Raumtemperatur ($\sim 293 \text{ K}$) und aus Spinat bei 4 °C (277 K) durchgeführt.

V.2 Charakterisierung von PS II Kernkomplexen mit offenen RZ mittels zeitaufgelöster Fluoreszenz

Um an PS II Kernkomplexen mit offenen Reaktionszentren zu messen, wurden die Probe mit einer Peristaltikpumpe mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml/min durch eine Küvette

mit 4 mm² Grundfläche ($v=12$ cm/s) unter der Zugabe von 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ (Kaliumferri- cyanid, FeCy) als Elektronenakzeptor gepumpt.

Es wurde in Anwesenheit von FeCy das F_{max}/F_0 Verhältnis bei unterschiedlichen Anregungsintensitäten gemessen. F_0 , d.h. offene RZ, sollten durch schnelles Pumpen und F_{max} (geschlossene RZ) durch eine stationäre Probe erreicht werden. Wird die Anregungsintensität für Messungen von offenen RZ zu hoch gewählt, ist die Probenaustauschgeschwindigkeit nicht mehr groß genug und es liegt ein Gemisch an offenen und geschlossenen Zentren vor, so daß das F_{max}/F_0 Verhältnis sinkt. Über diese Methode wurde die maximale Anregungsintensität bestimmt, bei denen die RZ sich im offenen Zustand befinden.

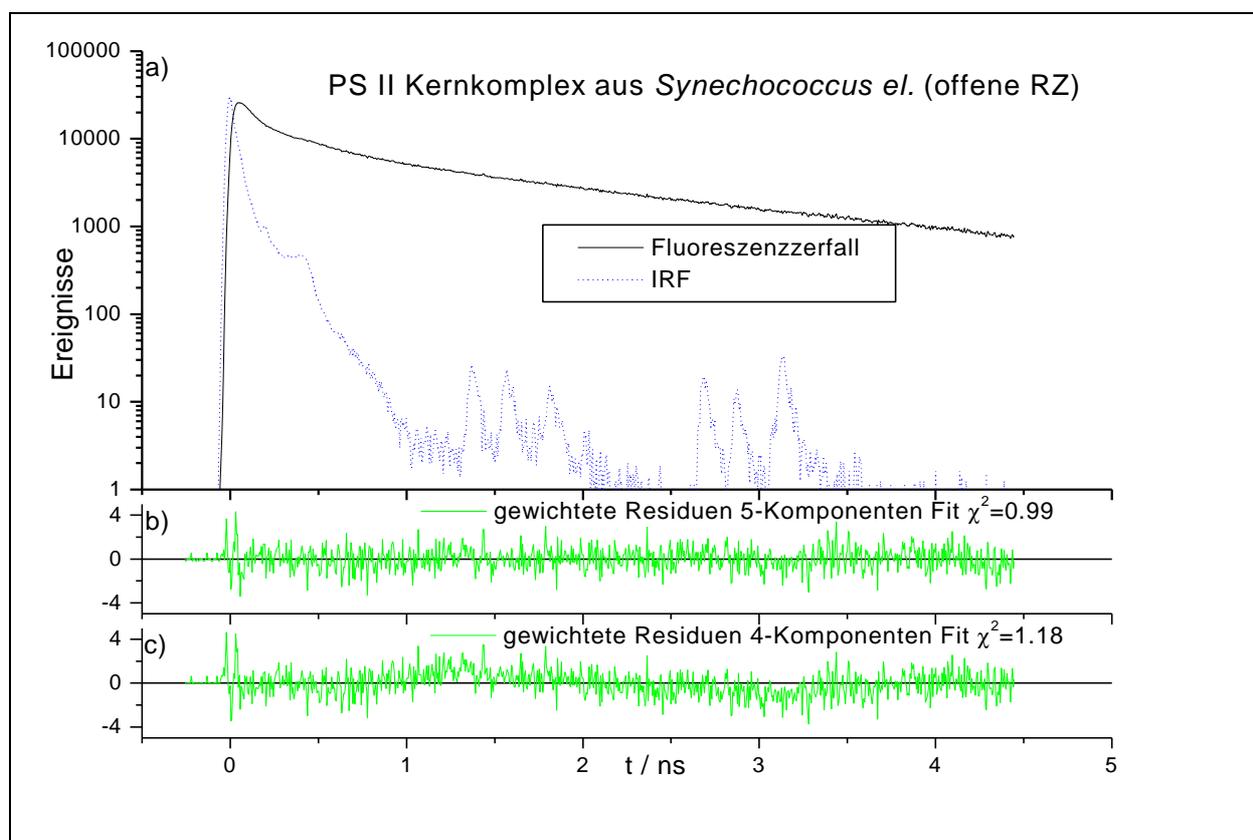


Abbildung V-1 Fluoreszenzzerfall von PS II Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* mit offenen RZ
 a) Zerfallskurve 670 nm Anregung, 702 nm Detektion (—) und zeitliche Systemantwortfunktion (····);
 b) gewichtete Residuen für einen Fit mit einer Summe von 5 Exponentialfunktionen, globales $\chi^2=0.99$;
 c) gewichtete Residuen für einen Fit mit einer Summe von 4 Exponentialfunktionen, globales $\chi^2=1.18$ mit folgenden Ergebnissen: 9 ps, 53 ps (74 %), 340 ps (15 %), 1.9 ns (11 %)

Mit dem Verhältnis der stationären Fluoreszenzintensität verfügt man somit über einen guten Monitor des Redoxzustandes der Probe. Über diese Methode wurde die Anzahl der Kernkomplexe mit offenen RZ mit 97 % bei der verwendeten Anregungsintensität abgeschätzt. Desaktivierte Proben zeichnen sich u. a. durch das nicht wieder Öffnen der Zentren oder durch Ablösung von Antennenfragmenten aus, das sich in einer Erhöhung der Fluoreszenzquantenaus-

beute der offenen Zentren auswirkt und demzufolge sich das F_{\max}/F_0 Verhältnis verringert. Diese Probedegradationen wurden nach jeder Messung eines Fluoreszenzzerfalls durch Messung der F_{\max}/F_0 Verhältnisses bei 683 nm kontrolliert.

V.2.1 PS II Kernkomplexe mit offenen RZ aus *Synechococcus el.*

Fluoreszenzzerfälle für PS II Kernkomplexe mit offenen RZ aus *Synechococcus el.* wurden bei jeweils drei bis vier Detektionswellenlängen pro Anregungswellenlänge aufgenommen. Zur Anregung wurden 3 Wellenlängen ausgewählt: 670 nm, 690 nm und 700 nm. Für eine gute Beschreibung der Daten durch eine Summe von Exponentialfunktionen in einem 4.5 ns Fenster werden 5 Komponenten gebraucht¹⁰⁵. Tabelle V-1 zeigt die Ergebnisse der globalen Lebensdaueranalyse der Datensätze für die jeweilige Anregungswellenlänge.

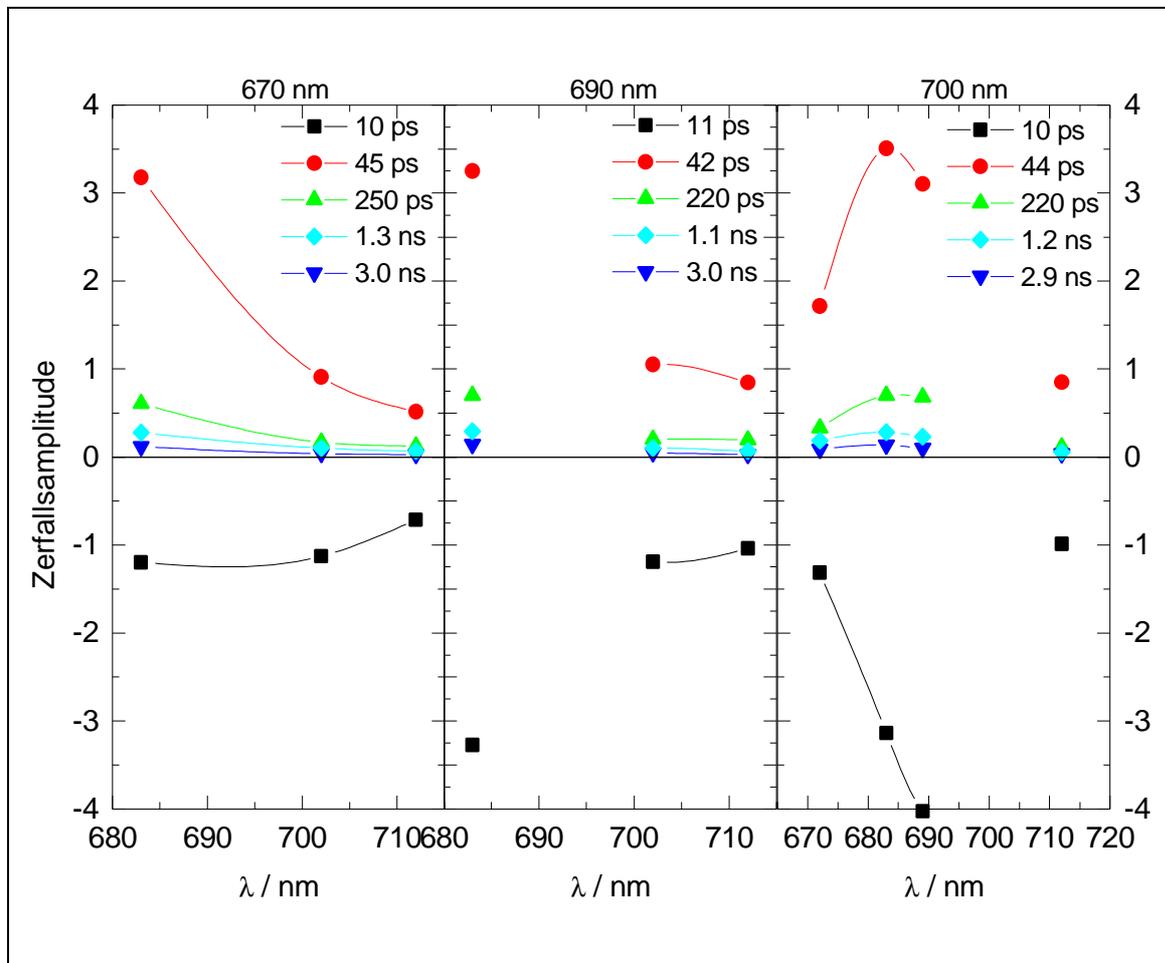


Abbildung V-2 DAS von PS II Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* mit offenen Reaktionszentren, angeregt bei 670 nm, 690 nm und 700 nm (von links nach rechts)

¹⁰⁵ Siehe Abbildung V-1 für einen typischen Zerfall und die Anpassung mit 4 bzw. 5 Komponenten.

Der spektrale Verlauf der Amplituden (DAS) ist in Abbildung V-2 dargestellt. Die gefundenen Lebensdauern sind 10 ps, 44 ps (75 %), 230 ps (15 %), 1.2 ns (6.7 %) und 3.0 ns (3.3 %). Die Lebensdauern und deren Amplituden – außer die der 10 ps Komponente – sind offensichtlich unabhängig von der Anregungswellenlänge, wie die DAS und Tabelle V-1 zeigen. Dies legt eine doppelt globale Lebensdaueranalyse für alle Anregungs- und Detektionswellenlängen nahe.

Die 10 ps Komponente ist die einzige Komponente mit einer negativen Amplitude. Während die Amplituden aller anderen zeitlichen Komponenten in einem festen Verhältnis zueinander unabhängig von Anregungs- und Detektionswellenlänge stehen, ist hier eine Abhängigkeit der Amplituden vorhanden.

$\Sigma A_i \tau_i$ gibt die mittlere Lebensdauer der Fluoreszenz an und ist proportional zur Fluoreszenzquantenausbeute. Die mittlere Lebensdauer beträgt 250 ps und sollte mit der mittleren Fluoreszenzlebensdauer für geschlossene RZ im gleichen Verhältnis wie die stationären Fluoreszenzintensitäten von offenen und geschlossenen RZ stehen. Sie stellt damit eine Kontrollgröße der Datenqualität dar.

	670 nm	690 nm	700 nm	alle Anregungen
τ_1	10 ps (8 – 14 ps)	11 ps (9 – 15 ps)	10 ps (8 – 13 ps)	10 ps (9 – 12 ps)
τ_2	45 ps (42 – 50 ps)	42 ps (36–47 ps)	44 ps (40 – 48 ps)	44 ps (40 – 49 ps)
A_2	74 % (± 3 %)	75 % (± 2.5 %)	76 % (± 2.8 %)	75 % (± 2.9 %)
τ_3	250 ps (220 – 280 ps)	220 ps (170 – 240 ps)	220 ps (180 – 250 ps)	230 ps (190 – 250 ps)
A_3	15 % (± 1.6 %)	16 % (± 1.4 %)	15 % (± 2.0 %)	15 % (± 1.9 %)
τ_4	1.3 ns (0.91 – 1.72 ns)	1.1 ns (0.67 – 1.41 ns)	1.2 ns (0.80 – 1.62 ns)	1.2 ns (711 – 1620 ps)
A_4	7.8 % (± 1.3 %)	6.2 % (± 0.5 %)	6.3 % (± 1.1 %)	6.7 % (± 1.3 %)
τ_5	3.0 ns (2.3 – 3.8 ns)	3.0 ns (2.6 – 3.7 ns)	2.9 ns (2.6 – 3.5 %)	3.0 ns (2.4 – 3.8 ns)
A_5	3.2 % (± 0.5 %)	3.1 % (± 0.5 %)	3.2 % (± 0.5 %)	3.3 % (± 0.4 %)
$\Sigma A_i \tau_i$	260 ps	230 ps	230 ps	250 ps
Global reduziertes χ^2	0.99	1.09	1.13	1.11

Tabelle V-1 Lebensdauer und relative Amplituden (10 ps Komponente nicht mit einbezogen) der globalen Analyse der PS II Fluoreszenzkinetik von Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* mit offenen RZ für 670 nm, 690 nm und 700 nm Anregungswellenlänge.

Die letzte Spalte zeigt die Ergebnisse einer doppelt globalen Analyse über alle Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Die in Klammern angegebenen Fehler der Zeiten sind über eine *exhaustive search* Analyse ermittelt worden.

Der Fehler in der Amplitude stellt die Standardabweichung der Amplituden der einzelnen Zerfälle dar.

V.2.2 PS II Kernkomplexe mit offenen RZ aus Spinat

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen wurden an PS II Kernkomplexen aus Spinat mit offenen RZ wie bei *Synechococcus el.* mit verschiedenen Anregungswellenlängen durchgeführt, um eventuelle Anregungswellenlängenabhängigkeiten detektieren zu können. Bei der Anregung in der Q_y -Bande der Chlorophylle bei 670 nm und 700 nm wurden an jeweils 5 Detektionswellenlängen die Fluoreszenzkinetiken aufgenommen. Abbildung V-3 zeigt einen typischen Zerfall und die Residuen von globalen Fits mit 4 bzw. 5 Komponenten, wobei deutlich die Notwendigkeit von mindestens 5 Zerfallszeiten im gemessenen 4.2 ns Fenster erkennbar ist.

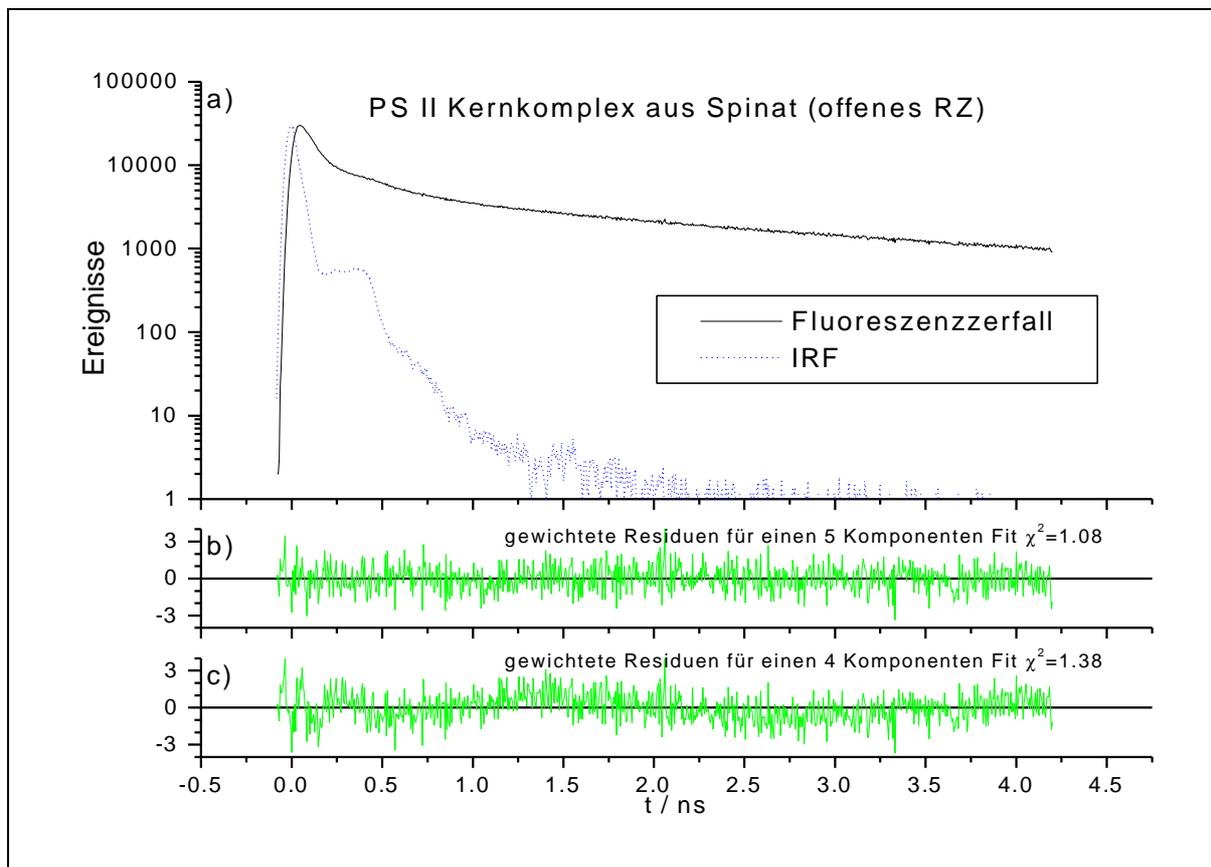


Abbildung V-3 Fluoreszenzzerfall von PS II Kernkomplexen aus Spinat mit offenen RZ

- Zerfallskurve 670 nm Anregung, 683 nm Detektion (—) und zeitliche Systemantwortfunktion (---);
- gewichtete Residuen für einen Fit mit einer Summe von 5 Exponentialfunktionen, globales $\chi^2=1.08$;
- gewichtete Residuen für einen Fit mit einer Summe von 4 Exponentialfunktionen, globales $\chi^2=1.38$ mit folgendem Ergebnis: 2 ps, 56 ps (81 %), 330 ps (12 %) und 2.8 ns (7%).

Die DAS der Komponenten sind in Abbildung V-4 dargestellt. Außer der schnellen 6 – 9 ps Komponente ist keine Amplitudenabhängigkeit von der Anregungswellenlänge erkennbar. Alle Zeiten stimmen innerhalb ihres Fehlerbereiches überein.¹⁰⁶ Dies legt eine doppelt globale

¹⁰⁶ Siehe Tabelle V-2.

Analyse über sämtliche Anregungs- und Detektionswellenlängen nahe. Sie hat folgende Ergebnisse: 9 ps, 46 ps (77 %), 190 ps (15 %), 760 ps (4 %) und 3.4 ns (4 %). Dabei ist die Amplitude der 9 ps Komponente wegen ihrer starken Wellenlängenabhängigkeit nicht in die Berechnung der relativen Amplituden einbezogen worden.

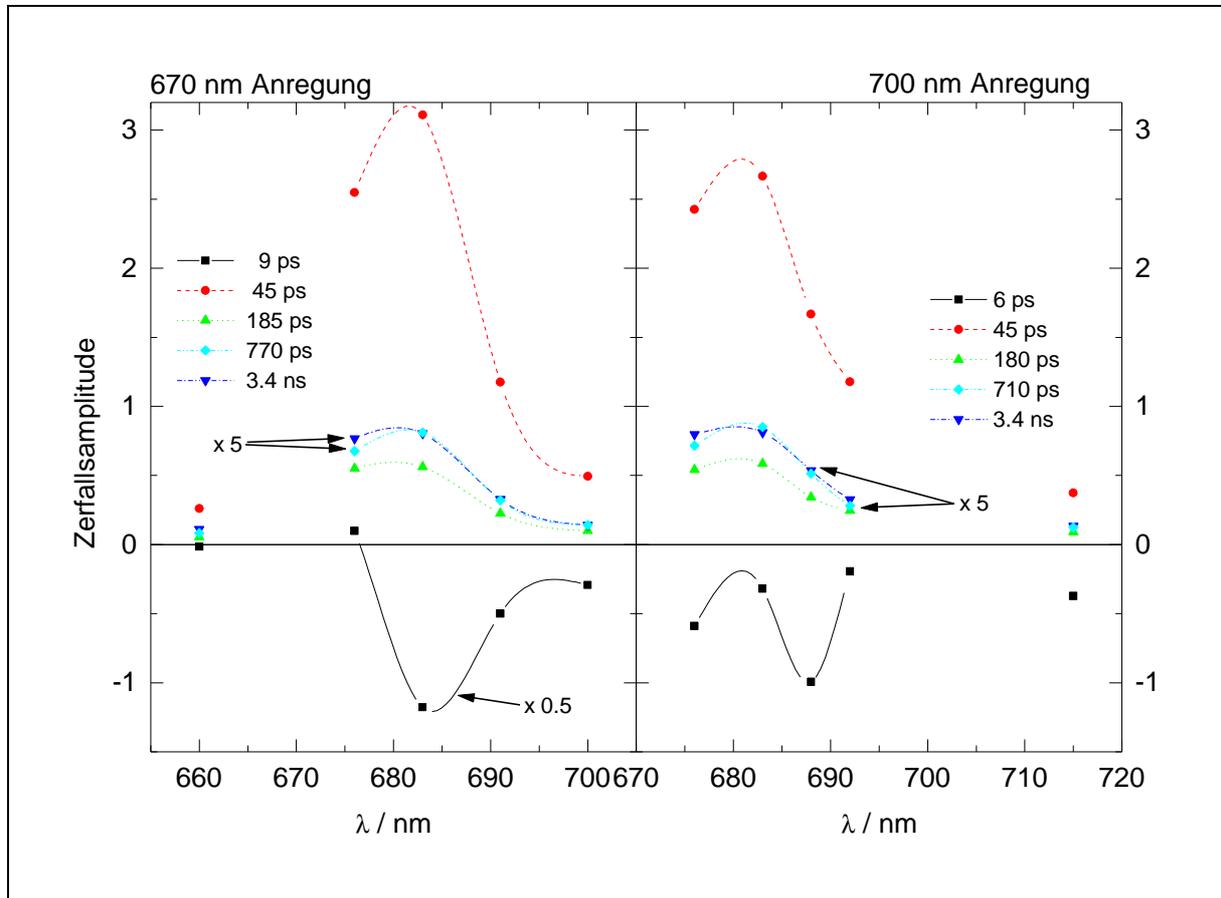


Abbildung V-4 DAS der Globalanalyse der Fluoreszenzzerfallskurven von PS II Kernkomplexen aus Spinat mit offenen RZ, angeregt bei 670 nm (links) und 700 nm (rechts)

links: Die Amplituden für 770 ps und 3.4 ns sind um den Faktor 5 vergrößert und die für 9 ps um den Faktor 2 verkleinert dargestellt;

rechts: Die Amplituden für 710 ps und 3.4 ns sind um den Faktor 5 vergrößert dargestellt. Der Datenpunkt bei 676 nm bei 670 nm Anregung wurde mit einer Auflösung von 4 nm aufgenommen.

Für die 3.4 ns Komponente läßt sich eine leichte Blauverschiebung des Spektrums im Vergleich zu den Amplituden der anderen Zerfallszeiten¹⁰⁷ erkennen. Auf Grund von nur 5 gemessenen Detektionswellenlängen ist dies zwar nicht sehr signifikant, kann aber durch die Fluoreszenzanteile entkoppelter Antennenfragmente wie LHC II erklärt werden, die ein blauverschobenes Fluoreszenzspektrum aufweisen¹⁰⁸. Auch die Lebensdauer von 3.4 ns ist vergleichbar mit den veröffentlichten 3.3 ns für LHC II Komplexe [Ide et.al. (1987)]. Das Vor-

¹⁰⁷ Außer der schnellen 6-9 ps Komponente.

¹⁰⁸ Z. B. Nakayama und Mimuro (1994).

handensein dieser entkoppelten Antennenfragmente ist auch ersichtlich aus den stationären Fluoreszenzspektren von Spinat-Kernkomplexen mit offenen und geschlossenen RZ¹⁰⁹.

	670 nm Anregung	700 nm Anregung	beide Anregungen
τ_1	9 ps (6-18 ps)	6 ps (2-24 ps)	9 ps (3 - 20 ps)
τ_2 A_2	45 ps (40-52 ps) 77 % (± 1.6 %)	46 ps (31-59 ps) 76 % (± 1.3 %)	46 ps (40 - 52 ps) 77 % (± 1.5 %)
τ_3 A_3	185 ps (130-230 ps) 15 % (± 0.8 %)	180 ps (120-220ps) 15 % (± 0.7 %)	185 ps (140 - 230 ps) 15 % (± 0.8 %)
τ_4 A_4	770 ps (510 ps-1.4 ns) 4 % (± 0.3 %)	710 ps (500 ps-1.2 ns) 4.5 % (± 0.5 %)	760 ps (520 ps - 1.4 ns) 4 % (± 0.5 %)
τ_5 A_5	3.4 ns (3.1-4.5 ns) 4 % (± 0.5 %)	3.4 ns (3.0-4.0 ns) 4.5 % (± 0.4 %)	3.4 ns (3.1 - 4.3 ns) 4 % (± 0.4 %)
$\Sigma A_i \tau_i$	230 ps	250 ps	230 ps
global reduzier- tes χ^2	1.04	1.02	1.03

Tabelle V-2 Lebensdauer und relative Amplituden (6 – 9 ps Komponente nicht mit einbezogen) der globalen Analyse der PS II Fluoreszenzkinetik von Spinat Kernkomplexen mit offenen RZ für 670 nm und 700 nm Anregungswellenlänge.

Die letzte Spalte zeigt die Ergebnisse einer doppelt globalen Analyse über alle Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Die in Klammern angegebenen Fehler der Zeiten sind über eine *exhaustive search Analyse* ermittelt worden.

Der Fehler in der Amplitude stellt die Standardabweichung der Amplituden der einzelnen Zerfälle dar.

$\Sigma A_i \tau_i$ beträgt für offene RZ der Spinatpräparationen 230 ps und ist damit vergleichbar mit der mittleren Lebensdauer der *Synechococcus el.* Präparationen¹¹⁰.

V.2.3 Vergleich der Fluoreszenzzerfälle von offenen PS II Kernkomplexen

Die Fluoreszenzzerfälle der offenen PS II Kernkomplexe aus Spinat und *Synechococcus el.* zeigen starke Ähnlichkeiten. Bei beiden Präparationen zeigt sich eine deutliche schnelle Komponente mit 6-9 ps bzw. 10 ps mit fast durchweg negativer Zerfallsamplitude. Diese Amplitude hat als einzige eine starke Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge λ_{exc} und der Detektionswellenlänge λ_{det} und wird, wenn nicht immer positiv, so doch kleiner in der Nähe der Anregungswellenlänge. Dies deutet auf einen Energietransfer der Anregung zwischen den spektral unterschiedlichen Pigmenten der Antenne und des Reaktionszentrums hin. Um genauere Informationen über die Äquilibration zu erhalten, ist eine bedeutend bessere Zeitauflösung notwendig. Eine Beschreibung dieses Vorgangs mit einer einzigen Zeitkomponente ist nur eine sehr grobe Näherung, aber für die hier erhaltene zeitliche Auflösung eine adäquate Beschreibung. Weiterhin muß gesagt werden, daß bis heute noch keine Fluores-

¹⁰⁹ Siehe Abschnitt IV.2.

zenzdaten von PS II Kernkomplexen im Gegensatz zu Messungen an PS II Membranfragmenten und Thylakoidmembranen mit einer Zeit von 10–20 ps¹¹¹ veröffentlicht wurden, die diese Komponente auflösen. Eigentlich ist für solche Energietransferkomponenten eine positive Amplitude in der Nähe der Anregungswellenlänge und eine negative bei der Detektion bei Wellenlängen mit größerem spektralen Abstand zur Anregungswellenlänge λ_{exc} zu erwarten, da ein Transfer der Anregungsenergie ausgehend vom angeregten Pigment zu den anderen Pigmenten erfolgt. Daß dies bei den hier gezeigten Messungen nicht immer der Fall ist, liegt zum einen an der geringen spektralen Auflösung (8 nm) und der daraus folgenden Überlagerung der Fluoreszenz verschiedener Wellenlängen und zum anderen am Mindestabstand von 10 nm zwischen Anregungs- und Detektionswellenlänge, der bei dieser spektralen Auflösung eingehalten werden muß, um keine Beiträge vom Streulicht zu erhalten. Bei $\lambda_{\text{exc}} = 670$ nm bei den Spinatpräparationen wurde eine Messung mit einer spektralen Auflösung von 4 nm bei 676 nm durchgeführt. Dort ist die schnelle 9 ps Komponente in der Tat positiv.

Die Spektren der drei mittleren Komponenten sind sowohl untereinander als auch dem stationären Emissionsspektrum ähnlich. Die Schlußfolgerung daraus ist, daß die Fluoreszenz nur noch aus einer gleichbleibenden Anregungsverteilung der Antenne stattfindet. Die beobachtete Energietransferkomponente spiegelt somit die Energieäquilibrierung in der Antenne wieder. Die dominierende Komponente des Fluoreszenzzerfalls von ca. 45 ps hat bei beiden Probenpräparationen eine sehr große Amplitude von 74 – 77 %. Die nächstlängere Komponente von 230 ps (*Synechococcus el.*) bzw. 185 ps (Spinat) mit jeweils 15 % ist auch noch vergleichbar. Stärker unterscheiden sich die beiden Präparationen in den beiden langen Zeitkomponenten, die allerdings mit einer Gesamtamplitude von ≤ 10 % einen relativ geringen Beitrag haben. Ihre Ursache könnten Probenverunreinigungen wie ungekoppelte Antennenfragmente oder Kernkomplexe ohne Q_A sein. Ein Hinweis bei Spinat-Kernkomplexen darauf ist die leichte Blauverschiebung der langlebigen 3.4 ns Komponente¹¹². Allgemein läßt sich für die Ergebnisse an Kernkomplexen mit offenen RZ sagen, daß außer in der Äquilibrierungskomponente keine Anregungswellenlängenabhängigkeit detektierbar ist. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß die primäre Ladungstrennung in PS II Kernkomplexen für offene RZ nicht *transfer*-limitiert ist, das heißt, daß die Energieäquilibrierung schnell gegenüber allen nachfolgenden Zerfallskomponenten – die im Kapitel VI den Ladungstransferreaktionen zugeordnet werden – ist.

¹¹⁰ Siehe Tabelle V-2.

¹¹¹ Z. B. Roelofs *et al.* (1992), Dau *et al.* (1996), McCauley *et al.* (1989).

Ein Vergleich dieser Daten mit bisher veröffentlichten ausführlichen zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen an PS II Kernkomplexen von Hodges und Moya (1988) (Spinat, *C. reinhardtii*, Erbsen), Van Mieghem *et al.* (1992) (Spinat) und Schatz *et al.* (1987) (*Synechococcus el.*) zeigt zuerst, daß keiner von ihnen auflösungsbedingt eine schnelle Äquilibriumskomponente detektierte. Schatz z. B. berichtete nur von 3 Komponenten mit 80 ps (72 %), 520 ps (20 %) und 1.8 ns (8 %). Die Unterschiede sind im Wesentlichen durch eine bessere Zeitauflösung und ein besseres Signal/Rausch Verhältnis in den hier präsentierten Ergebnissen zu erklären. Weiterhin benutzten Schatz *et al.* Präparationen mit größeren Antennen¹¹³, was auch zu längeren Zerfallszeiten führt. Die publizierten DAS stimmen im Wesentlichen mit den hier gezeigten Ergebnissen überein.

Die Daten von Hodges und Moya wurden mit einem 4-Komponenten Fit ausgewertet, dessen Zeiten für alle drei Präparationen sehr ähnlich den hier präsentierten sind, außer der nicht aufgelösten Äquilibriumskomponente. Gleiches läßt sich auch für die Messungen von Van Mieghem *et al.* sagen. Damit stehen diese Messungen nicht im Widerspruch zu bisher publizierten, stellen vielmehr eine Erweiterung dieser Ergebnisse wegen der besseren Zeitauflösung und der Verwendung von mehr als nur einer Anregungswellenlänge dar.

V.3 Charakterisierung von PS II Kernkomplexen mit geschlossenen RZ mittels zeitaufgelöster Fluoreszenz

Geschlossene Kernkomplexe wurden mittels Zugabe von 10 μM DCMU¹¹⁴ zur Verhinderung der Reoxidation von Q_A^- und unter quasistatischen Meßbedingungen – d. h. Pumpgeschwindigkeit < 1 ml/min – erzielt. Die Proben wurden somit durch das Meßlicht geschlossen. Durch den sehr langsamen Austausch wurde gleichzeitig die Doppelreduktion von Q_A verhindert. Versuche, die Reduktion der Probe mit schnellem Pumpen und schwachem aktinischen Licht vor dem Eintreten der Probe in die Fluoreszenzküvette zu erreichen, führten zu identischen Ergebnissen. Allerdings verringerte sich die Probenstabilität drastisch. Traten bei der Methode der quasistatischen Messungen erst nach 90 min merkliche Änderungen in der Fluoreszenzintensität und in der Kinetik auf, so war dies bei Anwendung aktinischen Lichts schon nach ca. 30 min der Fall. Stabilitätsuntersuchungen wurden sowohl für die Präparationen von *Synechococcus el.* als auch für Spinat durch das wiederholte Aufnehmen von Fluoreszenzzerfällen bei einer Wellenlänge durchgeführt. Während der Aufnahme der Fluoreszenzzerfälle bei verschiedenen Wellenlängen wurde die Änderung der Halbwertsbreite des Zerfalls und zwischen den Messungen die stationäre Fluoreszenzintensität bei 683 nm als Monitor für Pro-

¹¹² Siehe oben.

¹¹³ 60-80 Chlorophylle im Gegensatz zu 50-55 Chlorophyllen in den hier verwendeten Proben.

¹¹⁴ 3-(3,4-dichlorphenyl)methylurea.

bendegradation benutzt. Bei Veränderung einer der beiden Parameter um mehr als 10 % ist ein neuer Probenansatz verwendet worden.

Unter der Annahme, daß bei stationärer Probe bei Anwesenheit von DCMU alle RZ geschlossen sind und unter Kenntnis der Fluoreszenzintensitäten von offenen und geschlossenen Kernkomplexen, ließ sich der Anteil an PS II Kernkomplexen mit geschlossenem RZ für die Messung mit > 96 % abschätzen.

V.3.1 PS II Kernkomplexe mit geschlossenen RZ aus *Synechococcus el.*

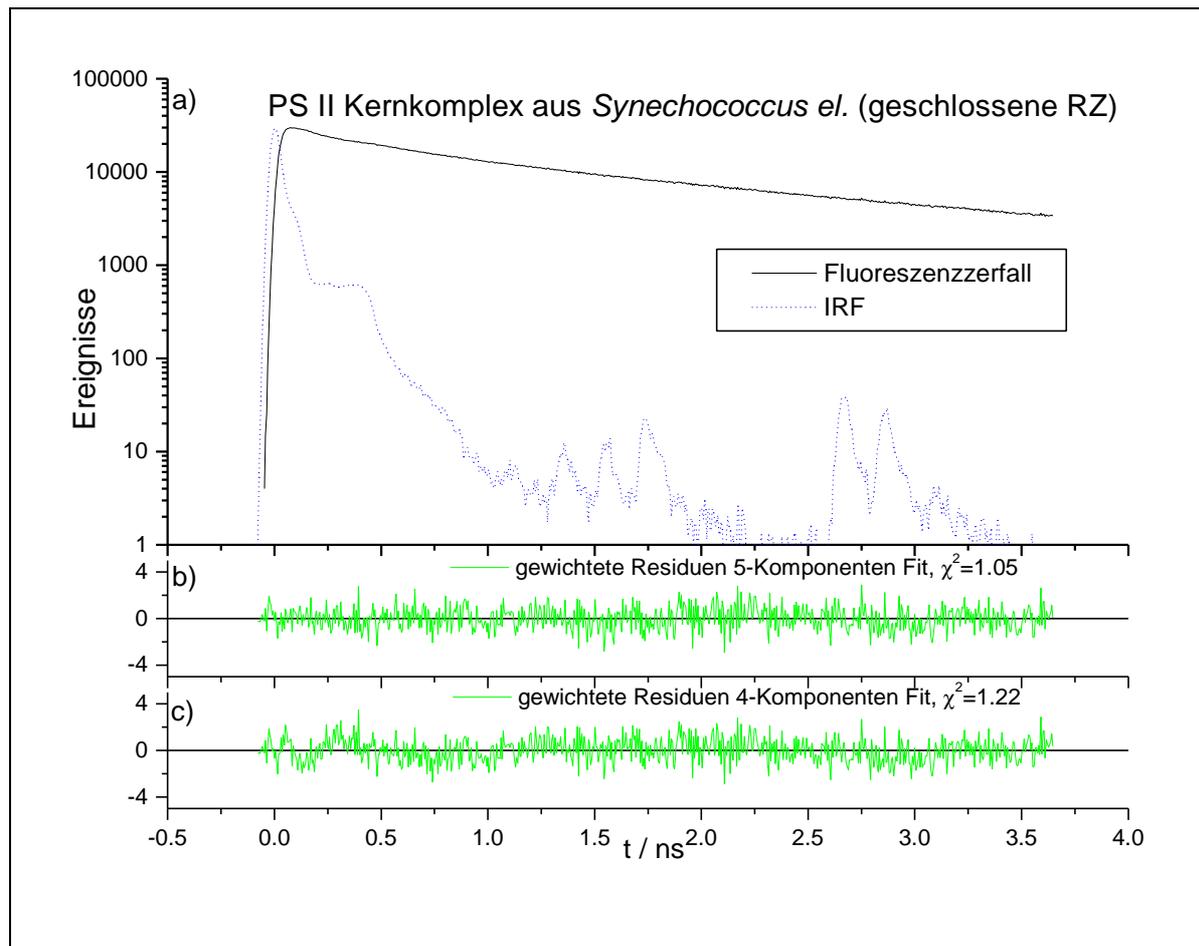


Abbildung V-5 Typischer Fluoreszenzzerfall von PS II Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* mit geschlossenen RZ

- Zerfallskurve 670 nm Anregung, 695 nm Detektion (—) und zeitliche Systemantwortfunktion (---);
- gewichtete Residuen für einen Fit mit einer Summe von 5 Exponentialfunktionen, globales $\chi^2=1.04$;
- gewichtete Residuen für einen Fit mit einer Summe von 4 Exponentialfunktionen, globales $\chi^2=1.22$ mit folgendem Ergebnis: 4 ps, 89 ps (40 %), 540 ps (25 %) und 2.2 ns (35 %)

Die Fluoreszenzzerfälle von PS II Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* mit geschlossenen RZ wurden äquivalent zu den Kinetiken an offenen RZ bei verschiedenen Anregungswellenlängen in der Q_y -Bande von Chl *a* (670 nm und 700 nm) bei jeweils 5 Detektionswellenlängen aufgenommen. Wie Abbildung V-5 zeigt, ist in einem 3.7 ns Fenster eine Sum-

me von 5 Exponentialfunktionen notwendig, um die Kinetik in einem globalen Fit zu beschreiben. Die Ergebnisse sind in Tabelle V-3 und der spektrale Verlauf der Amplituden in Abbildung V-6 dargestellt. Alle Zerfallszeiten sind innerhalb ihres Fehlerbereiches unabhängig von der Anregungswellenlänge. Das gleiche gilt für die Amplituden, mit Ausnahme die der 6 ps Komponente. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde eine doppelt globale Analyse über alle Anregungs- und Detektionswellenlängen durchgeführt. Folgende Ergebnisse konnten ermittelt werden: 6 ps, 45 ps (30 %), 190 ps (21 %), 760 ps (22 %) und 2.5 ns (27 %).

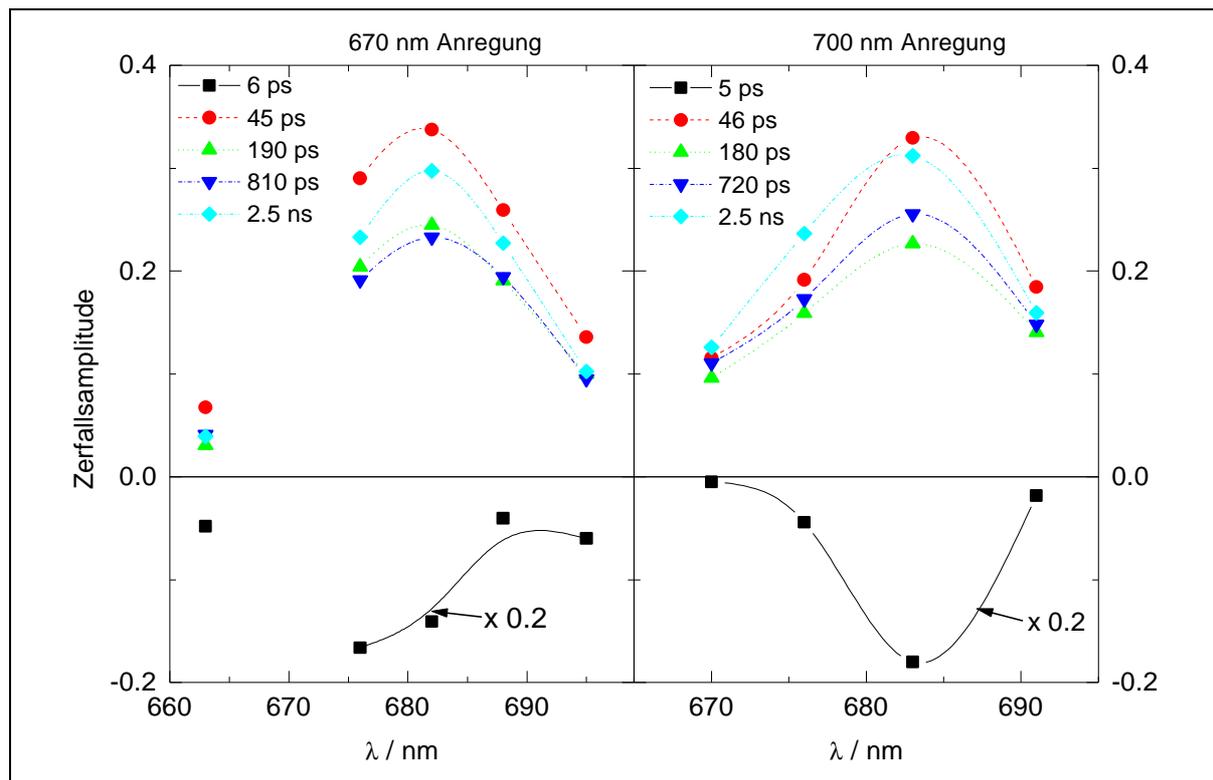


Abbildung V-6 DAS von PS II Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* mit geschlossenen RZ, angeregt bei 670 nm (links) und bei 700 nm (rechts).

Das DAS der 5 bzw. 6 ps Komponente wurde um den Faktor 5 verkleinert.

Die 6 ps Komponente ist die einzige Komponente mit einer negativen Amplitude. Während die Amplituden aller anderen zeitlichen Komponenten in einem relativ festen Verhältnis zueinander unabhängig von Anregungs- und Detektionswellenlänge stehen, ist hier eine Abhängigkeit vorhanden¹¹⁵, wie die DAS zeigen.

Zur Verdeutlichung der in Tabelle V-3 angegebenen Fehlergrenzen für die Zerfallszeiten sind die Schnitte in der χ^2 -Oberfläche für die jeweiligen Zeiten für die Globalanalyse der Zerfallskurven bei 670 nm Anregung in Abbildung V-7 dargestellt. Sie wurden mit Hilfe einer *exhaustive search* Analyse ermittelt, indem die jeweiligen Parameter schrittweise von dem Wert entfernt wurden, bei dem das χ^2 als Parameter für die Güte des Fits das globale Mini-

¹¹⁵ Siehe Abbildung V-6.

mum hat, und die anderen Parameter dies kompensieren ließ. Die durchgezogene Linie stellt den Vertrauensbereich dar, innerhalb der die Werte mit 67 % Wahrscheinlichkeit liegen, siehe Kap. III.4.4. Deutlich zu sehen ist die Asymmetrie in den angegebenen Fehlergrenzen der Zerfallszeiten. Weiterhin ist erkennbar, daß bei Veränderung eines Parameters auf Grund der Kompensation durch die anderen Zeiten und Amplituden die Fehlerbereiche recht groß sind. Für die Fehlergrenzen der 5 ps (> 2 ps) und der 46 ps Komponente (< 67 ps) bei 700 nm Anregung konnte nur eine untere bzw. eine obere Grenze angegeben werden, da bei der *exhaustive search* Analyse beim Übergang der einen Zeit in die andere die Grenzen für den Vertrauensbereich von 67 % ($\chi^2 = 1.09$) nicht überschritten werden.

	670 nm Anregung	700 nm Anregung	beide Anregungen
τ_1	6 ps (2 – 11 ps)	5 ps (>2 ps)	6 ps (2 – 12 ps)
τ_2 A_2	45 ps (30 – 64 ps) 32 % (± 3.2 %)	46 ps (< 67 ps) 28 % (± 2.1 %)	45 ps (29 – 67 ps) 30 % (± 2.4 %)
τ_3 A_3	190 ps (150 – 265 ps) 21 % (± 1.2 %)	180 ps (110 – 270 ps) 21 % (± 0.7 %)	190 ps (150 – 270 ps) 21 % (± 1.0 %)
τ_4 A_4	810 ps (0.66 – 1.03 ns) 21 % (± 1.2 %)	720 ps (0.57 – 1.21 ns) 23 % (± 1 %)	760 ps (0.62 – 1.19 ns) 22 % (± 1.3 %)
τ_5 A_5	2.5 ns (1.8 – 3.8 ns) 25 % (± 2.1 %)	2.4 ns (1.7 – 3.9 ns) 28 % (± 2 %)	2.5 ns (1.8 – 3.9 ns) 27 % (± 2.3 %)
$\Sigma A_i \tau_i$	860 ps	900 ps	890 ps
global χ^2	1.044	1.07	1.06

Tabelle V-3 Lebensdauer und relative Amplituden (5 – 6 ps Komponente nicht mit einbezogen) der globalen Analyse der PS II Fluoreszenzkinetik von Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* mit geschlossenen RZ für 670 nm und 700 nm Anregungswellenlänge. Die letzte Spalte zeigt die Ergebnisse einer doppelt globalen Analyse über alle Anregungs- und Emissionswellenlängen. Die in Klammern angegebenen Fehler der Zeiten sind über eine *exhaustive search Analyse* ermittelt worden. Der Fehler in der Amplitude stellt die Standardabweichung der Amplituden der einzelnen Zerfälle dar.

Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer $\Sigma A_i \tau_i$ von 890 ps für geschlossene RZ ergibt mit den 250 ps für offene RZ ein F_{\max} / F_0 Verhältnis von 3.6. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem aus der stationären Fluoreszenzintensität gewonnenen Verhältnis von 3.5-4.5.

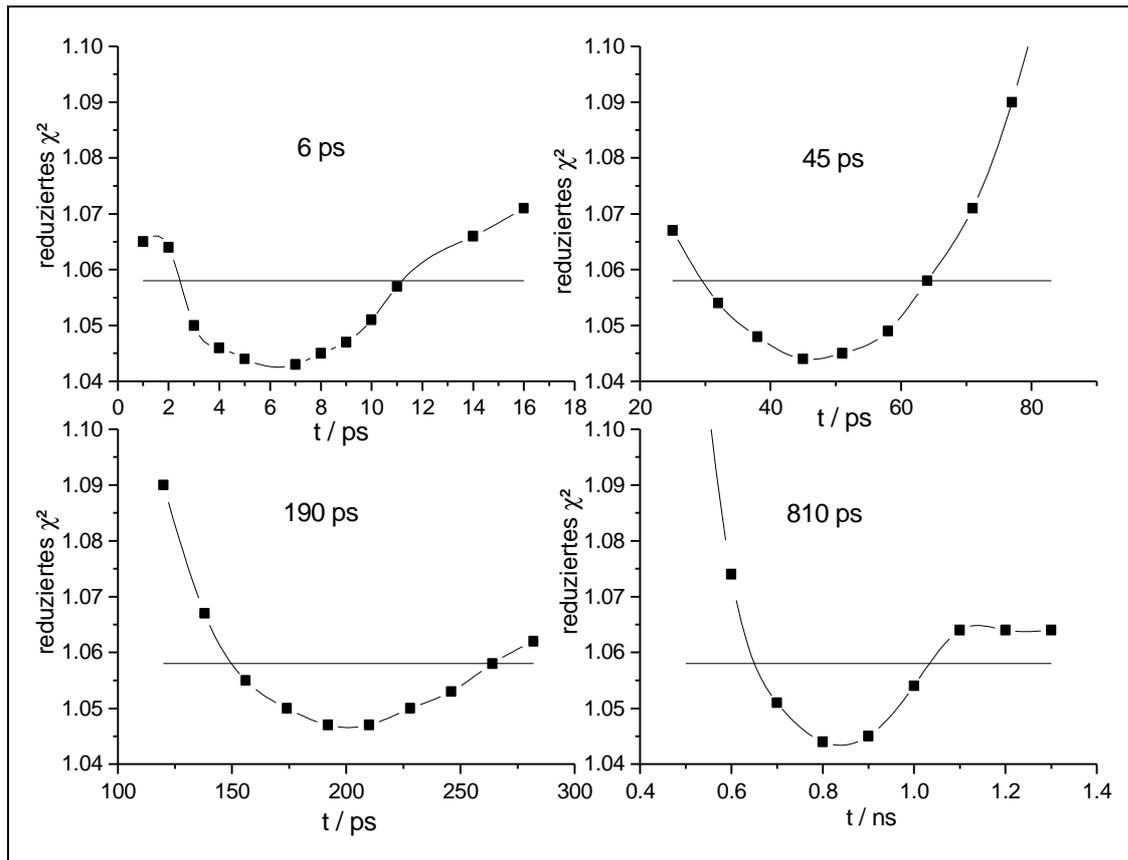


Abbildung V-7 Schnitt durch die χ^2 -Oberfläche berechnet bei der *exhaustive search* Analyse, der Fehleranalyse des 5-Komponenten Fits des Fluoreszenzzerfalls von PS II Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* mit geschlossenen RC ($\lambda_{exc} = 670$ nm), Ergebnisse siehe Tabelle V-3; (—) – $\chi^2 = 1.058$ ist die Grenze des Vertrauensbereiches von 67 % für $\chi^2_{min} = 1.044$.

V.3.2 PS II Kernkomplexe mit geschlossenen RZ aus Spinat

PS II Fluoreszenzzerfälle für PS II Kernkomplexe mit geschlossenen RZ aus Spinat wurden äquivalent zu den Messungen an *Synechococcus el.* bei fünf bzw. 6 Detektionswellenlängen pro Anregungswellenlänge aufgenommen. Es wurden zwei Meßreihen mit Anregung bei 670 nm und 700 nm durchgeführt, um mögliche Anregungswellenabhängigkeiten in der Fluoreszenzkinetik detektieren zu können. Für eine gute Beschreibung der Daten mit einer Summe von Exponentialfunktionen in einem 4 ns Fenster werden wie für offene RZ 5 Komponenten gebraucht, siehe Abbildung V-8 für einen typischen Zerfall mit Anpassung mit 4 bzw. 5 Komponenten. Tabelle V-4 zeigt die Ergebnisse der globalen Lebensdaueranalyse der Datensätze für die jeweilige Anregungswellenlänge. Der spektrale Verlauf der Amplituden ist in Abbildung V-9 dargestellt. Die gerundeten Lebensdauern sind 8 ps, 39 ps (28 %), 230 ps (18 %), 1.7 ns (40 %) und 4.7 ns (14 %) für die Anregung bei 670 nm. Die Lebensdauern sind wie bei *Synechococcus el.* unabhängig von der Anregungswellenlänge, was eine doppelt globale Lebensdaueranalyse für alle Anregungs- und Detektionswellenlängen rechtfertigt. Im Gegensatz dazu bestehen größere Unterschiede in den Amplituden der einzelnen Zerfalls-

komponenten bei der Anregung bei 670 nm und 700 nm, was weder bei offenen RZ von *Synechococcus el.*- und Spinatpräparationen noch bei geschlossenen RZ von *Synechococcus el.* auftritt. So ist für 700 nm Anregung die Amplitude der 230 ps Komponente größer als die der 42 ps Zerfallszeit, im Gegensatz zur Anregung bei 670 nm. Weiterhin ändert sich die Form der 42 ps Amplitude und ähnelt nicht mehr dem spektralen Verlauf der 230 ps und 1.7 ns Komponente. Für diesen Effekt ist bisher keine Erklärung gefunden worden. Um in Konsistenz mit den anderen Zerfallskinetiken zu bleiben, werden in der Auswertung nur die Amplituden bei 670 nm Anregung berücksichtigt. Wiederum ist die 8 ps Zerfallszeit die einzige Komponente mit einer negativen Amplitude und starker Anregungswellenlängenabhängigkeit.

	670 nm Anregung	700 nm Anregung	beide Anregungen
τ_1	8 ps (5-20 ps)	8 ps (>3 ps)	8 ps (4-20 ps)
τ_2	39 ps (24-55 ps)	42 ps (< 49 ps)	41 ps (22-54 ps)
A_2	28 % (± 4.4 %)	19 % (± 3.1 %)	
τ_3	230 ps (200-260 ps)	230 ps (200-270 ps)	230 ps (200-260 ps)
A_3	18 % (± 1.3 %)	22 % (± 1.2 %)	
τ_4	1.7 ns (1.3-2.1 ns)	1.7 ns (1.4-2.1 ns)	1.7 ns (1.4-2.0 ns)
A_4	40 % (± 3.8 %)	41 % (± 3.1 %)	
τ_5	4.7 ns (3.7-5.2 ns)	4.4 ns (3.8-5.1 ns)	4.5 ns (3.8-5.1 ns)
A_5	14 % (± 1.3 %)	18 % (± 1.1 %)	
$\Sigma A_i \tau_i$	1.34 ns	1.54 ns	
global reduziertes χ^2	1.09	1.04	1.07

Tabelle V-4 Lebensdauer und relative Amplituden (8 ps Komponente nicht mit einbezogen) der globalen Analyse der PS II Fluoreszenzkinetik von Kernkomplexen aus Spinat mit geschlossenen RZ bei 670 nm und 700 nm Anregungswellenlänge.

Die letzte Spalte zeigt die Ergebnisse einer doppelt globalen Analyse über alle Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Die in Klammern angegebenen Fehler der Zeiten sind über eine *exhaustive search Analyse* ermittelt worden.

Der Fehler in der Amplitude stellt den Vertrauensbereich von 67 % der Amplituden der einzelnen Zerfälle dar.

Die DAS der drei mittleren Zeiten sind sich und dem stationären Emissionsspektrum bei einer Anregung von 670 nm ähnlich, während das DAS der langen 4.5 ns Komponente wie bei offenen Zentren eine leichte Blauverschiebung zu den anderen Spektren aufweist. Letzteres gilt auch für 700 nm Anregung. Eine Erklärung für diesen Effekt ist hier wie für offene Zentren ein Beitrag von ungekoppelten LHC II Antennenkomplexen. Ihr Beitrag in offenen Zentren betrug 4 % der Fluoreszenzamplitude mit einer Zerfallszeit von 3.4 ns. Da diese Zeit der langen Zerfallszeit von 4.5 ns ähnlich und die Amplitude relativ klein ist, kann sie in einem solch kurzen Fitfenster nicht explizit aufgelöst werden, sondern vermischt sich mit der langen Zerfallskomponente.

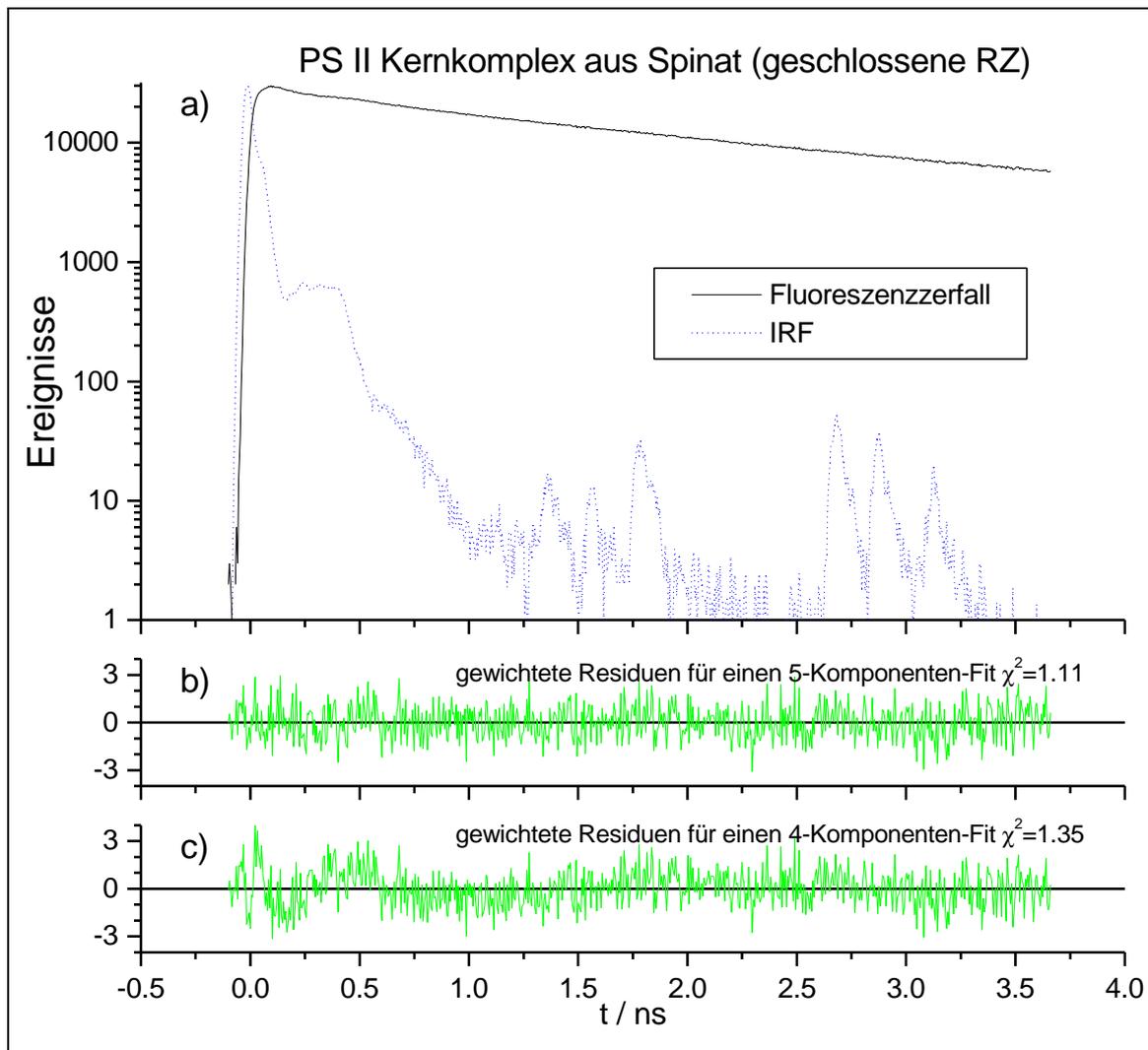


Abbildung V-8 Fluoreszenzzerfall von PS II Kernkomplexen aus Spinat mit geschlossenem RC
 a) Zerfallskurve 670 nm Anregung, 685 nm Detektion (—) und zeitliche Systemantwortfunktion (.....);
 b) gewichtete Residuen für einen Fit mit einer Summe von 5 Exponentialfunktionen, globales $\chi^2=1.11$;
 c) gewichtete Residuen für einen Fit mit einer Summe von 4 Exponentialfunktionen, globales $\chi^2=1.35$ mit 3 ps, 145 ps (34 %), 1.3 ns (33 %) und 3.4 ns (33 %) bei 670 nm Anregung.

Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer von 1.3 bzw. 1.5 ns für geschlossene RZ ergibt im Vergleich zu 230 ps für offene RZ ein Verhältnis der Fluoreszenzquantenausbeute von 5.8 bzw. 6.7, was sehr gut mit dem Faktor 6-7 aus stationären Fluoreszenzmessungen übereinstimmt.¹¹⁶

Wie für die Fehleranalyse der Zerfallszeiten bei geschlossenen PS II Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* sind in Abb. V-10 Schnitte der χ^2 Oberfläche entlang der einzelnen Zerfallskomponenten gezeigt, wie sie bei der *exhaustive search* Analyse berechnet werden. Auch hier sind die Fehlerbereiche deutlich asymmetrisch um das reduzierte χ^2 -Minimum verteilt.

¹¹⁶ Siehe Abschnitt IV-2.2.

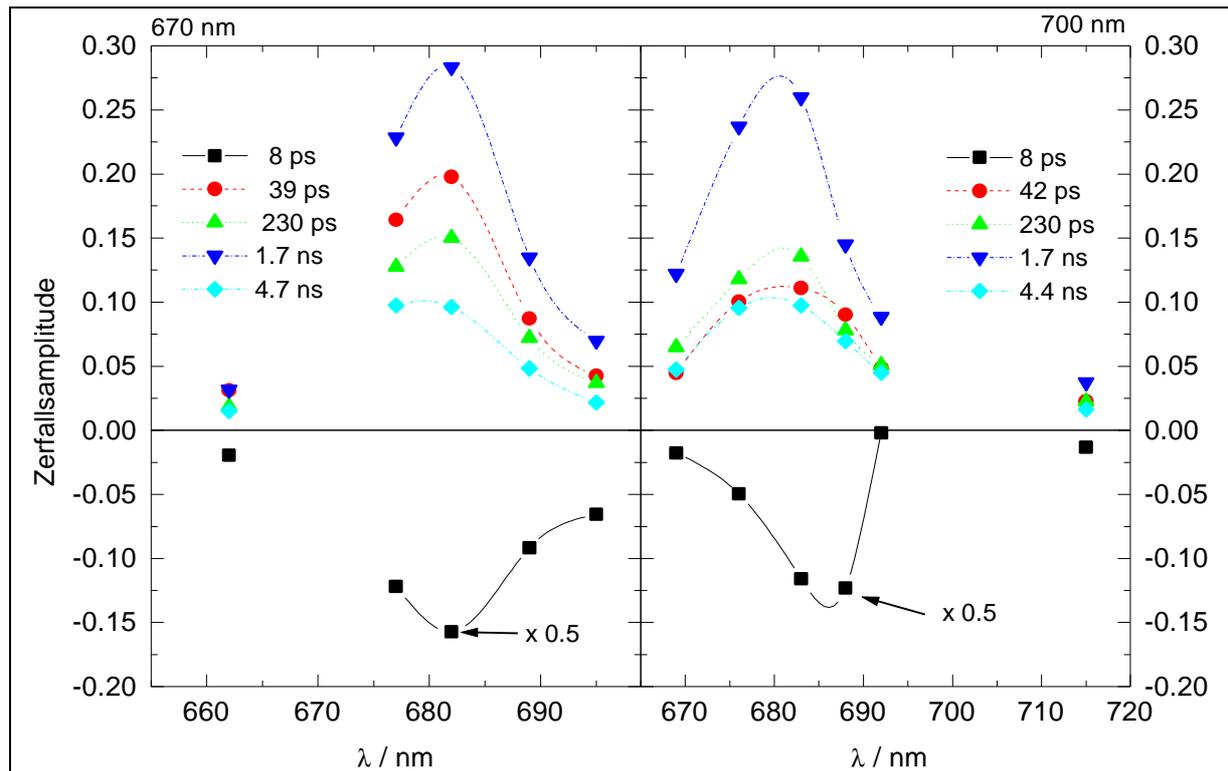


Abbildung V-9 Zerfallsassoziertes Spektrum (DAS) der Fluoreszenzzerfälle von PS II Kernkomplexen aus Spinat mit geschlossenen RZ bei 670 nm Anregung (links) und 700 nm Anregung (rechts). Die 8 ps Komponente für beide Anregungswellenlängen wurde um den Faktor zwei verkleinert dargestellt.

V.3.3 Vergleich der Fluoreszenzzerfälle von geschlossenen PS II Kernkomplexen unterschiedlicher Spezies

Ähnlich wie für offene Reaktionszentren sind die Zerfallszeiten offensichtlich unabhängig von der Anregungswellenlänge. Die Formen der DAS – mit Ausnahme der schnellen 6-8 ps Komponente und der langen Zerfallskomponente in Spinatpräparationen – sind unabhängig von der Anregungswellenlänge und ähneln dem stationären Fluoreszenzspektrum. Für die Messungen an *Synechococcus el.* gilt auch die Unabhängigkeit der relativen Zerfallsamplituden von der Anregungswellenlänge. Die Ursache für die gemessenen Unterschiede in der Amplitude der Zerfallskomponenten bei den Spinatpräparationen für 670 nm und 700 nm konnte nicht geklärt werden. Da auch Probleme mit der spektralen Form der 42 ps Komponente bei 700 nm Anregung aufgetreten sind, werden für die Auswertung der Spinatdaten nur die der 670 nm Anregung verwendet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen an Kernkomplexen mit offenen RZ haben alle benötigten 5 Zerfallskomponenten eine nicht vernachlässigbare Amplitude. Demzufolge sind vier Zerfallskomponenten nach der Äquilibration bei der Auswertung zu berücksichtigen.

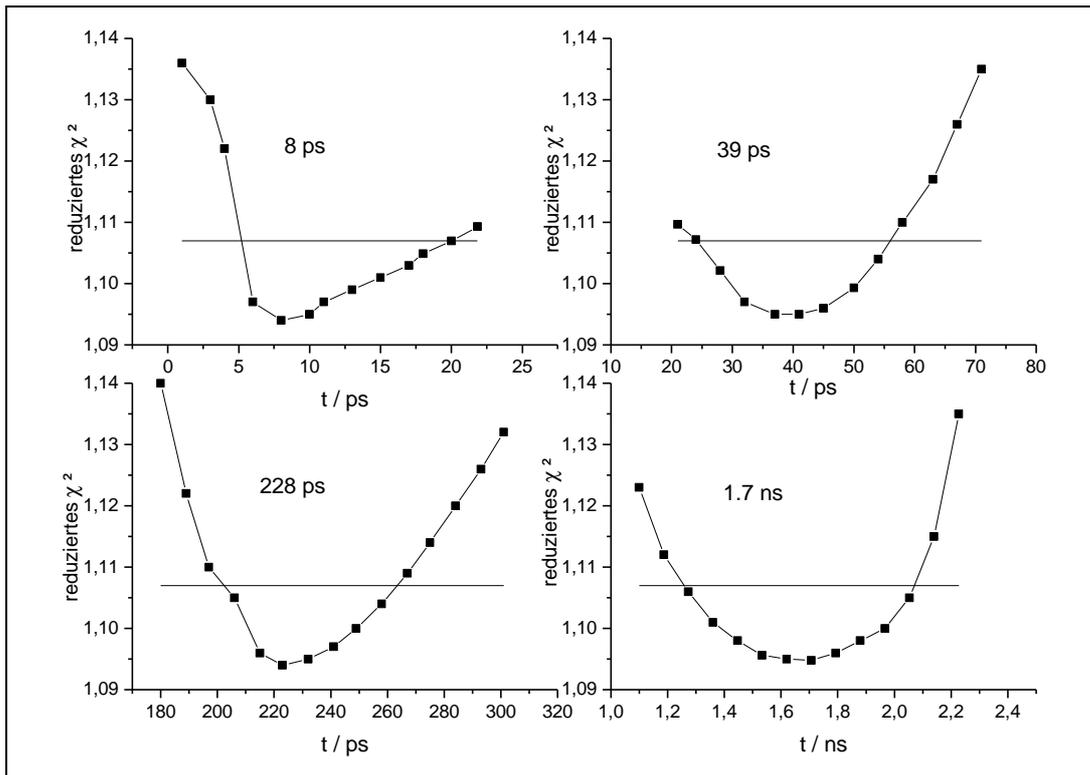


Abbildung V-10 Schnitt durch die χ^2 -Oberfläche

berechnet bei der *exhaustive search* Fehleranalyse des 5-Komponenten Fits des Fluoreszenzzerfalls von PS II Kernkomplexen mit geschlossenen RZ ($\lambda_{\text{exc}} = 670 \text{ nm}$); Ergebnisse siehe Tabelle V-4; (—) $\chi^2 = 1,107$ ist die Grenze des Vertrauensbereiches von 67 % für $\chi^2_{\text{min}} = 1,09$.

Die 6-8 ps Komponente in beiden Präparationen zeigt wiederum eine fast überall negative Amplitude, was auf einen schnellen Energietransfer zwischen den ursprünglich angeregten und spektral unterschiedlichen Pigmenten hinweist. Diese Energietransferkomponente konnte auch bei offenen RZ detektiert werden. Sie ist über den Anstieg der Akzeptorfluoreszenz und den Abfall der Fluoreszenz des Donators zur gleichen Zeit identifizierbar. Alle DAS langsamerer Komponenten haben eine spektral gleiche Form unabhängig von der Anregungswellenlänge und dem Redoxzustand der Probe. Daraus läßt sich schließen, daß die Fluoreszenz aus einer Antenne ausgeht, deren Anregungsenergieverteilung über die Pigmente äquilibriert ist. Somit stellt die detektierte Energietransferkomponente eine der langsamsten Anregungsenergie-Äquilibrierungskomponenten dar.

Da die Gleichgewichtseinstellung viel schneller als alle Zerfallsprozesse abläuft, ist die Ladungstrennungskinetik nicht transfer-limitiert¹¹⁷. Eine weitere mögliche Limitierung stellt die *transfer-to-the-trap* Limitierung dar, die besagt, daß Anregung innerhalb der Antenne schnell äquilibriert, aber der limitierende Schritt nicht die Ladungstrennung des primären Donators sondern der Energietransfer zum primären Donator darstellt. Allerdings ist dieses Modell nicht vereinbar mit dem starken Anstieg der Fluoreszenz bei Schließen der RZ. Durch die

¹¹⁷ Siehe Abschnitt I.1.3.

Limitierung des Energietransfers zum und vom primären Donator wäre die Populationsdynamik der Antennenchlorophylle durch den Redoxzustand des RZ und der daraus folgenden Ladungstransferdynamik kaum beeinflusst. Daher muß P680 an dem schnellen Äquilibrierungsprozeß der Antenne beteiligt und kann der Energietransfer zum und vom primären Donator nicht limitierend sein. Somit kann für PS II Kernkomplexe eine *trap* Limitierung angenommen werden.

Vergleiche mit Fluoreszenzmeßdaten von anderen Arbeitsgruppen zeigen wieder, daß die schnelle Äquilibrierungskomponente bisher noch nicht erwähnt wurde. Weiterhin ist in den meisten Publikationen die schnellste berichtete Zerfallszeit bedeutend länger als die hier gemessene 39 ps (28 %) bzw. 45 ps (30 %) Komponente. Sie reichen von 100 ps [Van Mieghem *et al.* (1992) und Hillmann *et al.* (1995b)] bis 220 ps [Schatz *et al.* (1987)] und 300 ps [Liu *et al.* (1993)]. Nur Hodges und Moya (1988) berichten eine ähnlich schnelle Komponente für *C. reinhardtii* (38 ps, 52 %) und für Erbsen (30 ps, 61 %), die mit so großer Amplitude typisch für die Kinetik von PS II Kernkomplexen mit doppelreduziertem Q_A sind [Van Mieghem *et al.* (1992)]. Eine weitere Erklärung wäre die Mischung der hier gemessenen 39 bzw. 45 ps Komponente mit der Äquilibrierungskomponente, die nicht aufgelöst wurde.

Da die schnelle 39 bzw. 45 ps Komponente in dieser Art bei geschlossenen RZ erstmalig detektiert wurde, muß eine ausführliche Untersuchung der Zuordnung dieser Komponente stattfinden. Wegen des gleichen spektralen Verlaufs dieser Komponente und der anderen Zerfallskomponenten wird darauf geschlossen, daß diese Fluoreszenzkomponente dem PS II zuzuordnen und nicht auf Verunreinigungen zurückzuführen ist. Folgende PS II Modifikationen können zu dem beobachteten schnellen Zerfall führen:

- PS II Kernkomplexe mit offenen RZ
- PS II Kernkomplexe mit doppelt reduziertem und nachfolgend protoniertem Q_A
- PS II Kernkomplexe ohne funktionsfähiges Q_A .

Würde man diese Komponente offenen PS II Reaktionszentren zuschreiben, käme man auf eine Konzentration von über 1/3 der Kernkomplexe im offenen Zustand. Wie in Abschnitt V.3 beschrieben, wird der geschlossene Zustand der Reaktionszentren durch ein quasi statisches Meßregime unter der Zugabe von 10 μ M DCMU erreicht und die Anzahl an offenen Zentren mit ≤ 4 % durch den Vergleich mit der stationären Fluoreszenzintensität einer stehenden Probe – d. h. bei ausgeschalteter Pumpe – abgeschätzt. Daher können offene RZ als Ursache für die schnelle Komponente ausgeschlossen werden.

In der Literatur ist der Effekt der Doppelreduktion von Q_A diskutiert, was speziell für PS II Kernkomplexe aus höheren Pflanzen erreicht wurde [Van Mieghem *et al.* (1992), Vass *et al.*

(1993)]. In der Gegenwart von Dithionit bildete sich der doppelreduzierte Zustand im dunklen mit einer Effizienz von 30 %. Eine verstärkte lichtinduzierte Doppelreduktion von Q_A ist möglich [Van Mieghem *et al.* (1989)]. Die Doppelreduktion von Q_A in *Synechococcus el.* Kernkomplexen ist schwieriger zu erreichen als bei vergleichbaren Spinatpräparationen [Van Mieghem *et al.* (1995)].

Vermutlich folgt der Doppelreduktion von Q_A eine Protonierung, die zu dem ungeladenen Zustand Q_AH_2 führt. Dieser Zustand ist allerdings nicht in der Lage, Elektronen von $Pheo^-$ aufzunehmen. Die Fluoreszenzkinetik von PS II Kernkomplexen mit Q_AH_2 zeigt sowohl eine schnelle Zerfallskomponente von 75 ps (~50 %) [Van Mieghem *et al.* (1992)] bzw. 80 ps (67 %) [Hillmann (1997)], die der Bildung von P^+Pheo^- zugeschrieben wird, als auch eine langsame 7-10 ns Komponente (2-7 %), die die Rekombination des primären Radikalpaares in den Zustand (AP)^{*} widerspiegeln soll. In der Literatur gibt es Angaben über die Fluoreszenzquantenausbeute dieses Zustandes, die 50 bis 70 % der Quantenausbeute in PS II Präparationen mit geschlossenen RZ betragen [Van Mieghem *et al.* (1992), Vass *et al.* (1993)]. Es ist bekannt, daß auch geschlossenes PS II längere ns Fluoreszenzkomponenten aufweist [Hillmann *et al.* (1995b)], die aber bedeutend geringere Amplituden als die der ns Komponenten von doppelt reduziertem PS II haben.

Um zu testen, ob Doppelreduktion eine Erklärung für die 41 ps bzw. 45 ps in geschlossenem PS II sein könnte, d. h. ob in den hier präsentierten Messungen Doppelreduktionen aufgetreten sind, wurden die Daten komprimiert und damit das Fitfenster von 4 ns auf 15 ns erweitert¹¹⁸, welches die Identifizierung einer möglichen 7-10 ns Komponente mit einer Amplitude > 0.5 %¹¹⁹ möglich machen sollte. Bei den Spinatpräparationen wurden weiterhin verschiedene Methoden für das Schließen der Reaktionszentren getestet. Nur bei einer Methode, mit DCMU als Inhibitor und intensivem aktinischen Licht (2x150 W Kaltlichtlampen), konnte eine 9 ns Komponente (Amplitude 2 %) detektiert werden. Für die anderen Messungen ist nur eine allgemeine Verlängerung aller Zerfallszeiten im 15 ns Fitfenster zu beobachten. Eine längere Komponente als 5.7 ns wurde nicht detektiert und damit kein Hinweis auf eine Doppelreduktion gefunden.

Die Untersuchung des Fluoreszenzzerfalls von geschlossenen Kernkomplexen in einem 15 ns Fenster ergab für *Synechococcus el.* eine Aufspaltung der langen, 2.5 ns (100 %) Komponente in 2.0 ns (87 %) und 5.4 ns (13 %) sowohl für 670 nm als auch für 700 nm Anregung. Auch hier ist kein Hinweis auf Doppelreduktion von Q_A zu detektieren.

¹¹⁸ Das Zeitintervall pro Kanal betrug danach 15 ps statt 5 ps.

¹¹⁹ Vgl. z.B. Roelofs *et al.* (1992).

DOD(750 nm)	$t_1 = 131 \mu\text{s}$	$t_2 = 1.0 \text{ ms (fix)}$	$t_3 = \text{---}$
anaerob	4.4×10^{-4}	2.1×10^{-4}	–
aerob	$1. \times 10^{-3}$	2.2×10^{-4}	1.75×10^{-4}

Tabelle V-5 Optische Dichte des Probenansatzes; Kinetik und Amplitude der Absorptionstransienten bei 750 nm unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

Die dritte Ursache für die schnelle Zerfallskomponente in geschlossenen PS II könnten Zentren ohne funktionsfähiges Q_A ¹²⁰ sein. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurde die Triplettausbeute von P680 in diesen PS II Kernkomplexen aus Spinat mit offenen RZ¹²¹ durchgeführt. Die Triplettausbeute wurde mit Hilfe der Blitzphotolyse im NIR mit sättigenden Anregungsblitzen gemessen.¹²² Für D1/D2/cyt *b*559 Komplexe (kein Q_A) wurden 32 % Quantenausbeute bei Raumtemperatur berichtet [Takahashi *et al.* (1987)]. Unter anaeroben Bedingungen lebt der Tripletzustand ~1 ms [Den Blanken *et al.* (1983)], bei Vorhandensein von Sauerstoff nur ca. 30 μs [Durrant *et al.* (1990)]. Um zusätzliche Einflüsse des P/P⁺-Spektrums diskriminieren zu können, das in diesem Wellenlängenbereich auch einen Beitrag hat [Hillmann und Schlodder (1995a), Mathis und Sétif (1981)], wurden die Messungen unter anaeroben und aeroben Bedingungen durchgeführt und die Differenz der Absorptionstransienten ausgewertet.

Die Daten wurden mit einem zweifach exponentiellen Fit ausgewertet, bei dem die lange 1.0 ms Zeit festgehalten wurde, siehe Tabelle V-5. Für die Messung an der anaeroben Probe konnte eine 1.0 ms Komponente detektiert werden. Da aber auch die aerobe Messung die gleiche Amplitude der 1 ms Komponente zeigt, ist die Zuordnung der Komponente zu ³P680 nicht gerechtfertigt. Sie ist wahrscheinlich auf P680⁺ zurückzuführen. Es konnte somit kein Triplet detektiert werden. Da die Detektionsgrenze bei einer Konzentration von ca. 1-2 % ³P680 liegt, kann die maximale Zentrenzahl mit inaktiven Q_A mit < 9 % abgeschätzt werden. Dies stimmt überein mit berichteten 6.3 % inaktivem Q_A aus unabhängigen Methoden [Cattucci *et al.* (1998)] an vergleichbaren Präparationen. Die obere Grenze von 9 % würde zu einer maximal 5 %en relativen Amplitude der schnellen Fluoreszenzkomponente führen und kann damit auch als Ursache der schnellen Fluoreszenzkomponente ausgeschlossen werden.

Zusammengefaßt ergibt dies, daß die 40-45 ps Komponente zum Fluoreszenzzerfall geschlossener PS II Kernkomplexe gehört. Diese Komponente wird in der Diskussion und Modellierung der Daten¹²³ dem Einstellen des Gleichgewichts zwischen angeregtem Zustand und

¹²⁰ Entweder Q_A nicht vorhanden oder beschädigter Q_A Bindungsplatz.

¹²¹ In Anwesenheit von 1mM FeCy und 100 μM DCBQ.

¹²² $\Delta\epsilon = 8000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 750 nm für ³P680 [Mathis und Sétif (1981)].

¹²³ Kapitel VI.

primärem Radikalpaar zugeordnet. Sie ist damit vergleichbar mit der in offenen RZ. Da bisher in der Literatur für geschlossene Reaktionszentren bedeutend langsamere Zeiten als für offene RZ diskutiert werden [Schatz *et al.* (1988)], hat diese schnelle Einstellzeit des Gleichgewichts weitreichende Folgen auf Ratenkonstanten der Ladungstrennung und -rekombination und damit auf die Beschreibung der Energetik der Radikalpaarbildung. Um diese These zu untermauern, wurden Zwei-Farben transiente Absorptionsmessungen in der Q_y -Bande durchgeführt, die im nächsten Abschnitt beschrieben werden.

V. 4 Meßbedingungen der zeitaufgelösten transienten Absorption

Die transienten Absorptionsmessungen wurden mit der im Abschnitt III.2 ausführlich vorgestellten, hochempfindlichen und hochrepetitiven transienten Absorptionsanlage durchgeführt. Auf Grund von Beschränkungen in der Probenverfügbarkeit konnten bisher nur Messungen an den PS II Kernkomplexen aus Spinat erfolgen. Da diese Präparationen in dem verwendeten Puffer selbst bei Zugabe von 1 mM FeCy eine sehr lange Zeit von mehreren Sekunden zur vollständigen Reoxidation von Q_A benötigen¹²⁴, ist das Messen an offenen Zentren bei Benutzung der Rotationsküvette mit einer Wiedereintrittszeit von ~ 0.2 s nicht möglich. Der Einsatz von Pumpsystemen zum Probenaustausch, die eine längere Zeit bis zum Wiedereintritt in das Meßvolumen ermöglichen, erfordert eine so große Probenmenge¹²⁵, deren präparativer Aufwand nicht vertretbar ist¹²⁶. Eine Messung offener Zentren an den Präparationen von *Synechococcus el.* wäre mit dem Einsatz der Rotationsküvette möglich, da diese in Bezug auf die Reoxidation von Q_A intakter als die Spinatpräparationen sind.

Die Anregung der Probe fand für alle Messungen bei 670 nm statt, während die Detektionswellenlänge von 660 nm bis 700 nm durchgestimmt wurde. Wie für die Fluoreszenzmessungen wurde die Probe durch das Licht der Pumpulse geschlossen und eine zwischenzeitliche Reoxidation von Q_A durch die Zugabe von 10 μ M DCMU verhindert. Die Laserwiederholrate betrug 400 kHz und die Rotationsfrequenz 42 Hz, das einer Probenaustauschgeschwindigkeit von 12 m/s entspricht. Bei einem Strahldurchmesser von 160 μ m ergibt dies einen vollständigen Probenaustausch alle 5.3 Pulse. Die Rotationsküvette wurde nur gedreht und der Hub der Küvette nicht eingesetzt, so daß ein Wiedereintritt der Probe in den Strahlengang nach 24 ms stattfand. Diese Zeit ist klein gegen die Reoxidationszeit von Q_A bei Vorhandensein von 10 μ M DCMU, die 2.8 s beträgt, wobei Q_A^- im Wesentlichen mit dem S_2 Zustand des wasserspaltenden Komplexes rekombiniert [Vermaas *et al.* (1984)], aber

¹²⁴ Siehe Abschnitt IV.1.

¹²⁵ Probenmenge: 100 ml bei 70 μ M Chl entspricht ca. 7 mg Chl

¹²⁶ Der Aufwand für PS II Kernkomplexe aus Spinat mit 1 mg Chl beträgt ca. 2-3 Manntage

groß gegen die Rekombinationszeit von P^+Pheo^- , die innerhalb weniger 10 ns abgeschlossen ist [Schlodder und Brettel (1988)]. Die Triplettlebensdauer von 3P680 beträgt für PS II mit geschlossenen RZ bei 20 K 1.5 μ s und 15 μ s (1:1) für *Synechococcus el.* bzw. 2.5 μ s und 20 μ s (3:2) für Spinat Membranfragmente [Hillmann *et al.* (1995b)]. Sowohl Rekombination als auch Triplettzerfall sind bedeutend schneller als die Wiedereintrittszeit der Probe. Somit konnte ein nicht vollständiges Schließen der Reaktionszentren ausgeschlossen und die Wiederherstellung des Ausgangszustandes garantiert werden. Tests mit zusätzlichem schwachen aktinischen Licht zum Schließen der RZ wurden durchgeführt, die die gemessene Absorptionsdifferenzkinetik nicht beeinflusst haben, dafür aber die Probenstabilität stark heruntersetzten. Deshalb wurde auf die Anwendung zusätzlichen aktinischen Lichtes verzichtet. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den aus den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen erworbenen Erkenntnissen.¹²⁷

Die transienten Absorptionsmessungen wurden mit einer Probenkonzentration von 70 μ M Chl in einer Rotationsküvette der Schichtdicke von 2 mm durchgeführt. Dies ergibt eine optische Dichte von 0.92 bei der Anregungswellenlänge von 670 nm. Alle Messungen wurden mit einer Polarisation der Pumpulse relativ zu den Testpulsen von 54.7° (magischer Winkel) durchgeführt, um Anisotropieeffekte zu unterdrücken.

Die Messungen wurden im Gegensatz zur Fluoreszenz bei Raumtemperatur (~20 °C) aufgenommen, da keine Möglichkeit zur Kühlung der Rotationsküvette vorhanden war. Die Probenstabilität erlaubte es nur, die Probe maximal 45 min zu vermessen. Damit reicht die Zeit für die Aufnahme des Zeitverlaufs der Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge, wofür zwei bis drei Scans über den gesamten Zeitbereich mit je 8 Messungen pro Verzögerungszeit notwendig sind, und einer anschließenden Kontrollmessung bei 680 nm Detektion. Die Kontrollmessung bei 680 nm erfüllt zwei Aufgaben. Erstens ist sie ein Indikator der Probenstabilität, d. h. eine Kontrolle, ob die Kinetik der Absorptionsänderung mit einer Referenzmessung bei 680 nm übereinstimmt, da die Kinetik bei dieser Detektionswellenlänge ausführlich charakterisiert wurde. Zum zweiten dient die Kontrollmessung als Intensitätsskalierung des Δ OD-Signals bei der jeweiligen vorher gemessenen Wellenlänge. Dies ist notwendig, da sich Anregungsintensität und Probenkonzentration nicht fehlerfrei reproduzieren lassen.

Das Hauptinteresse der Absorptionsdifferenzmessungen an geschlossenen PS II Kernkomplexen in dieser Arbeit war die Aufklärung des Ursprungs der 41-45 ps Komponente, die in der Fluoreszenzkinetik gefunden wurde. Durch die geringe Probenstabilität und der daraus folgenden geringen Meßdauer wurde daher besondere Beachtung auf den Zeitbereich bis

¹²⁷ Vgl. Abschnitt V.3.

300 ps (Schrittweite $\Delta t = 2$ ps) gelegt. Für 300 – 500 ps betrug $\Delta t = 10$ ps und für 500 ps – 3 ns $\Delta t = 50$ ps. Mit diesen Schrittweiten wurden alle Messungen durchgeführt.

V.4.1 Anregungsintensität und Annihilation

Wie in Abschnitt II.1.3 beschrieben, treten bei gekoppelten Chromophorsystemen bei höheren Anregungsintensitäten Annihilationseffekte auf, hier insbesondere die Singulett-Singulett Annihilation. Eine weitere Form des Lösches der Anregungsenergie bei Mehrfachanregung der Antenne kann nach erfolgter Ladungstrennung durch P680⁺ erfolgen, das eine langwellige Absorptionsbande aufweist. Da die Annihilation ein Prozeß zweiter Ordnung in Bezug auf die Konzentration von Chl* ist, läßt deren Kinetik sich nicht mit einer Summe von Exponentialfunktionen beschreiben und verfälscht dadurch die Kinetik der zu untersuchenden Prozesse. Demzufolge ist eine annihilationsfreie Messung unabdingbar. Um die maximale Anregungsintensität dafür zu ermitteln, wurden intensitätsabhängige Absorptionsdifferenzmessungen bei $\lambda_{\text{ex}} = 670$ nm und $\lambda_{\text{det}} = 680$ nm durchgeführt. Die Untersuchungen zeigen wie erwartet, daß Annihilationseffekte die transienten Absorptionskinetiken schneller abklingen lassen. Deshalb wurden die Halbwertsbreiten der Absorptionstransienten in Abhängigkeit von der Anregungsintensität bestimmt.¹²⁸ Bis zu einer Anregungsintensität von $2 \mu\text{J}/(\text{Puls} \cdot \text{cm}^2)$ ist $\tau_{1/2} = 1330$ ps und keine Abhängigkeit zu erkennen. Für höhere Anregungsintensitäten hingegen verkürzt sich die Halbwertsbreite wesentlich. Zur Überprüfung der Annihilationsgrenze wurden alle Kinetiken mit einer Anregungsintensität $I \leq 2 \mu\text{J}/(\text{Puls} \cdot \text{cm}^2)$ global mit 4 Komponenten gefittet und deren relative Amplituden miteinander verglichen¹²⁹. Dabei zeigte sich für diese Transienten keine Anregungsintensitätsabhängigkeit der Amplituden, d. h. die Messungen mit $I \leq 2 \mu\text{J}/(\text{Puls} \cdot \text{cm}^2)$ sind annihilationsfrei.

Schatz *et al.* (1987) ermittelten eine obere Grenze von $3 \mu\text{J}/(\text{Puls} \cdot \text{cm}^2)$ für annihilationsfreie Messungen an *Synechococcus sp.* Kernkomplexen mit offenen RZ und einer Antennengröße von 60 – 80 Chl pro RZ im Gegensatz zu den 50 – 55 Chl/RZ in den hier verwendeten Spinatpräparationen. Die verwendeten PS II Kernkomplexe von Schatz *et al.* waren nicht als Monomere bzw. Dimere charakterisiert. So ist anzunehmen, daß in den Probenpräparationen ein Gemisch von Monomeren und Dimeren vorlag. Die hier verwendeten PS II Kernkomplexe aus Spinat sind Dimere, über deren Konnektivität der Antennen bisher keine detaillierten Informationen vorhanden sind. Die niedrigere Obergrenze für annihilationsfreie Messungen trotz kleinerer Antenne bei den Spinatpräparationen könnte als Hinweis auf die Konnektivität der Antennen der beiden Dimerhälften gedeutet werden.

¹²⁸ Siehe Abbildung V-11a.

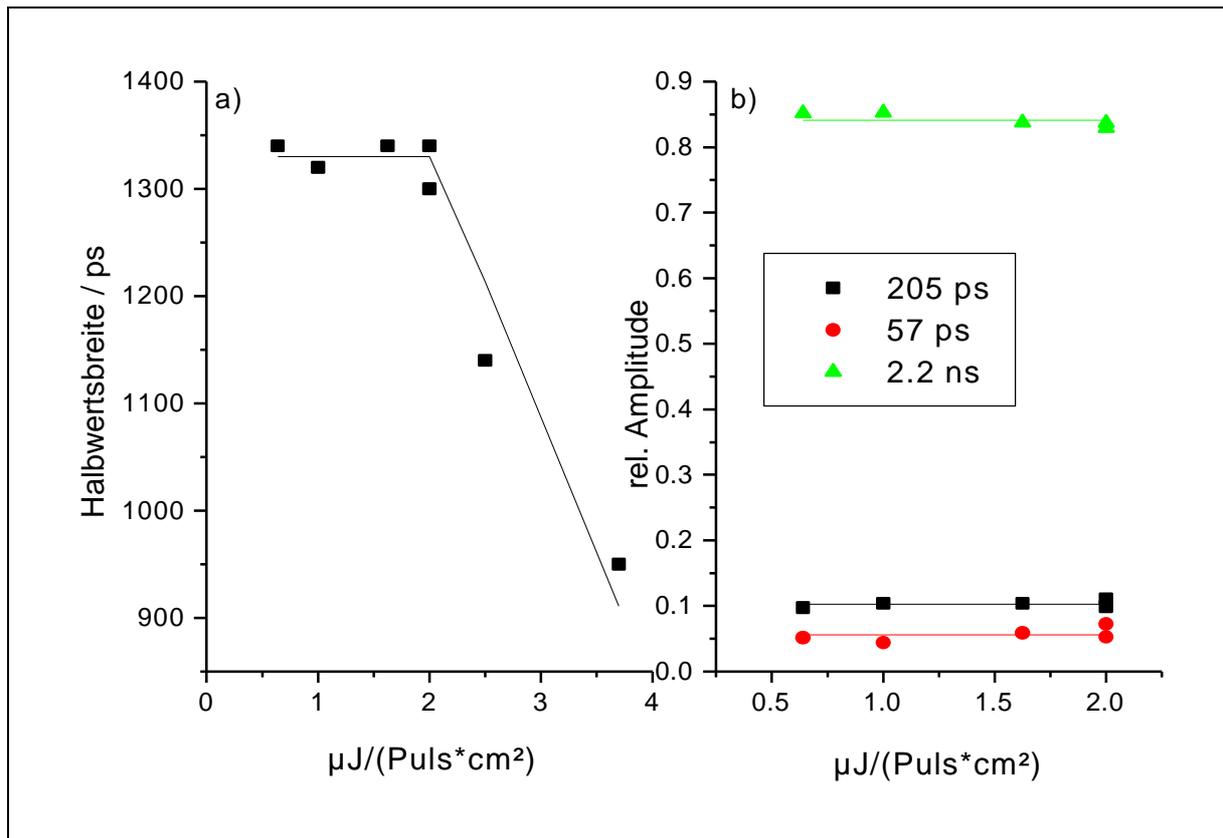


Abbildung V-11 a) Intensitätsabhängigkeit der Halbwertsbreite der transienten Absorptionskinetik

($\lambda_{\text{exc}} = 670 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 680 \text{ nm}$)

b) rel. Amplitude der Zerfallskomponenten von geschlossenen PS II Kernkomplexen aus Spinat aus der Globalanalyse für einen 4-fach exponentiellen Zerfall (3 ps Komponente nicht gezeigt) bei Anregungsenergien zwischen 0.65 und 2 $\mu\text{J}/(\text{Puls}\cdot\text{cm}^2)$, Erläuterung siehe Text.

Als Schlußfolgerung aus der intensitätsabhängigen Studie der Absorptionsdifferenzkinetik wurde eine Anregungsintensität $I = 1.6 \mu\text{J}/(\text{Puls}\cdot\text{cm}^2)$ bei 670 nm Anregung, entspricht $5.4 \cdot 10^{12}$ Photonen/ $(\text{Puls}\cdot\text{cm}^2)$, für alle Messungen gewählt, um Annihilation ausschließen zu können. Nach Gleichung (III-9) ergibt sich für die Anregungswahrscheinlichkeit $P = \sigma \cdot I$, mit einem Absorptionsquerschnitt von $1.4 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2$ eines PS II Kernkomplexes bei 670 nm¹³⁰ ein Wert von 7.5 %, bei der Berücksichtigung des Dimercharakters als Obergrenze 15 % Anregung pro Pumpimpuls unter Annahme vollständiger Konnektivität.

V.5 Ergebnisse der transienten Absorptionsmessungen an geschlossen PS II Kernkomplexen aus Spinat

Annihilationsfreie Zwei-Farben-Absorptionsdifferenzmessungen an PS II Kernkomplexen aus Spinat mit geschlossenen RZ wurden mit einer Anregungswellenlänge von 670 nm ($1.6 \mu\text{J}/(\text{Puls}\cdot\text{cm}^2)$) und Detektionswellenlängen von 661 nm bis 700 nm durchgeführt. Abbildung V-12 zeigt die Absorptionsdifferenztransienten für 661 nm, 673 nm und 680 nm. Zu sehen ist, daß alle Transienten ein rein negatives ΔOD aufweisen. Aus der Gleichung (II-4) ist

¹²⁹ Abbildung V-11b.

¹³⁰ Vgl. Abschnitt III.2.1.

demzufolge zu schlußfolgern, daß Anteile der Grundzustandsabsorptionsbleichung und der stimulierten Emission überwiegen. Dies stimmt mit den Daten von Schatz *et al.* (1987) überein.

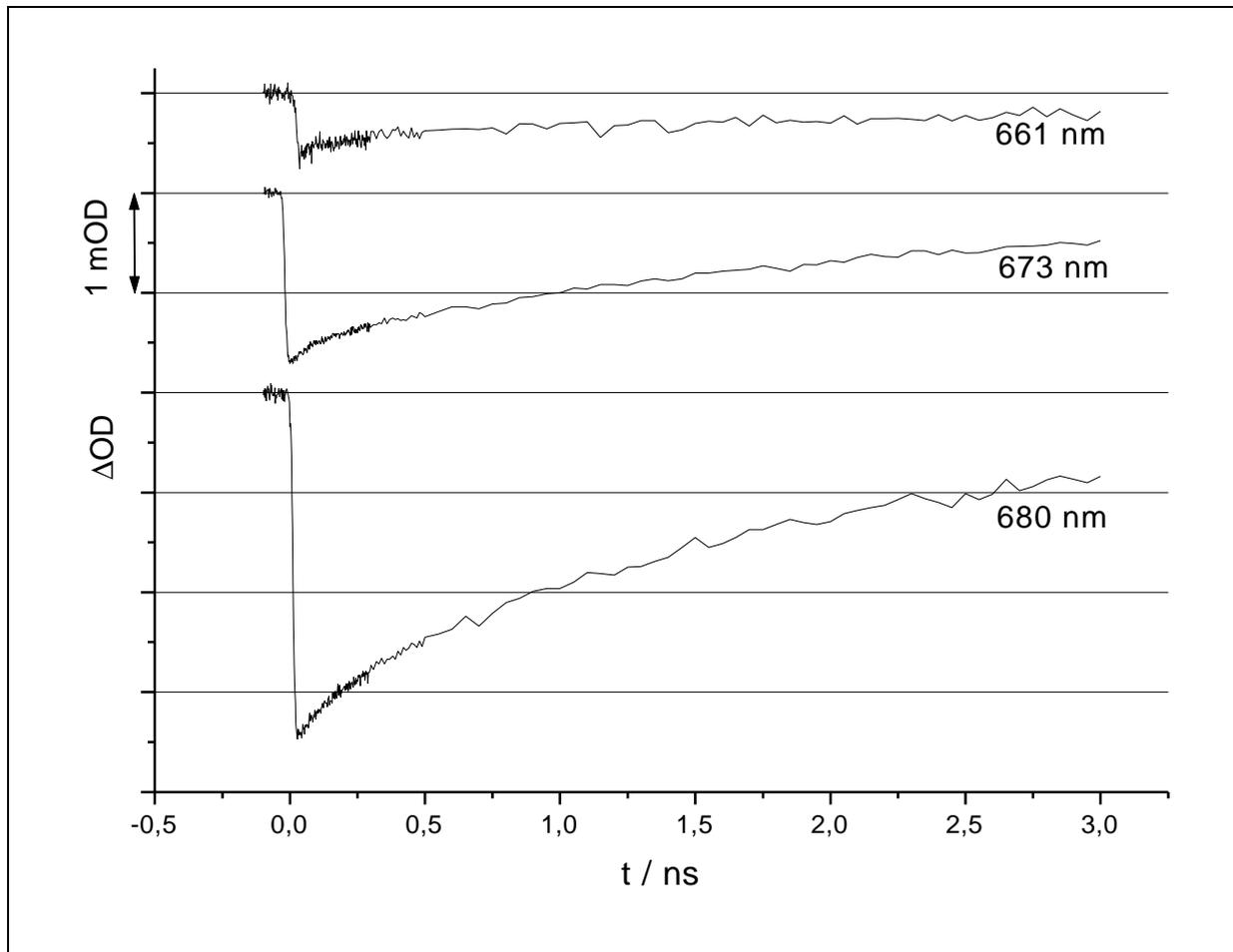


Abbildung V-12 Absorptionsdifferenzkinetiken von PS II Kernkomplexen bei 670 nm Anregung, detektiert bei 661 nm (oben), 673 nm (mitte) und 680 nm (unten).

Weiterhin ist zu erkennen¹³¹, daß im Gegensatz zur Fluoreszenz eine deutliche Abhängigkeit der Kinetik der normierten ΔOD -Signale von der Detektionswellenlänge besteht, da die beteiligten Spezies unterschiedliche ΔOD -Spektren aufweisen.

Wie in Abschnitt II.2 erläutert und in Abbildung V-12 ersichtlich, sind die transienten Absorptionsdifferenzspektren den zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren im Signal/Rausch Verhältnis unterlegen. Da die Identifizierung einer ~ 45 ps Komponente im Vordergrund steht, konzentriert sich die Auswertung zuerst auf die ersten 300 ps nach der Anregung. Ein dreifach exponentieller globaler Fit der Daten¹³² mit einer Äquilibrierungskomponente von 3 ps, einer intermediären 86 ps Komponente und einer 1.8 ns Komponente, die in dem Fitfenster bis 300 ps die langen Komponenten zusammenfaßt, ergibt eine befriedigende Beschreibung

¹³¹ Abbildung V-13.

der gemessenen Kinetik.¹³³ Vergleiche mit den zeitaufgelösten Fluoreszenzdaten würden 4 Komponenten erwarten lassen: eine Äquilibriumskomponente, eine schnelle sub 100 ps Komponente, eine Zerfallszeit um 200 ps und eine lange Zeit, die die ns Komponenten beschreibt. Diese Zeiten müssen auch intrinsisch in den Absorptionsdaten vorhanden sein, zumindest in der Kinetik der stimulierten Emission, die proportional zur Besetzungsdichte der Anregung in der Antenne ist. Daher wurde auch ein Fit mit 4 Komponenten versucht.

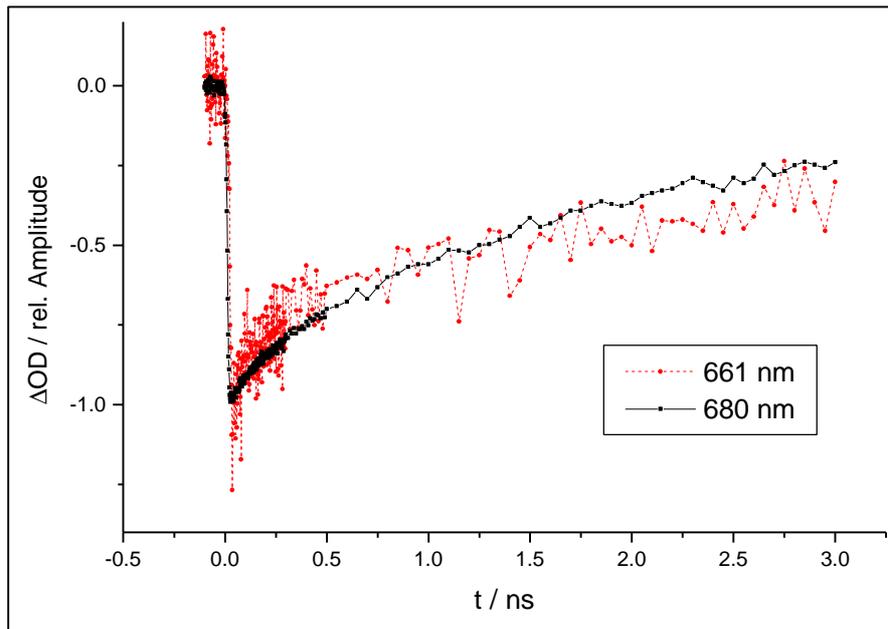


Abbildung V-13 Vergleich der Kinetik der normierten Absorptionstransienten, aufgenommen bei 661 und 680 nm.

Abbildung V-14 zeigt das Ergebnis der globalen Analyse mit 4 Exponentialfunktionen im Vergleich zu der mit 3 Komponenten am Beispiel eines Transienten bei 673 nm. Es ergibt keine signifikante Verbesserung des χ^2 als Beurteilungsgrundlage der Fitqualität. Die Verbesserung von χ^2 ist geringer als die Obergrenzen des durch χ^2 bestimmten Vertrauensbereichs. Die Globalanalyse führt andererseits zu stabilen Fitergebnissen. Auch die Differenz der Residuen in Abbildung V-14 zeigt eine systematische Verbesserung der Fitqualität, beginnend mit der Anregung¹³⁴. Für den Zeitbereich vor der Anregung sind keine systematischen Unterschiede zwischen den beiden Fits zu erwarten, wie auch in Abbildung V-14 zu sehen ist. Somit kann festgestellt werden, daß durch die Einführung einer vierten Komponente eine konsistente Beschreibung der ΔOD - und Fluoreszenzdaten möglich ist.

¹³² 14 Transienten bei 12 Detektionswellenlängen.

¹³³ Vgl. Abbildung V-14.

¹³⁴ Die Stufigkeit der Differenz der Residuen ist eine Folge des Datenformats der Ausgabe aus dem Fitprogramm. Intern findet die Berechnung mit größerer Genauigkeit statt.

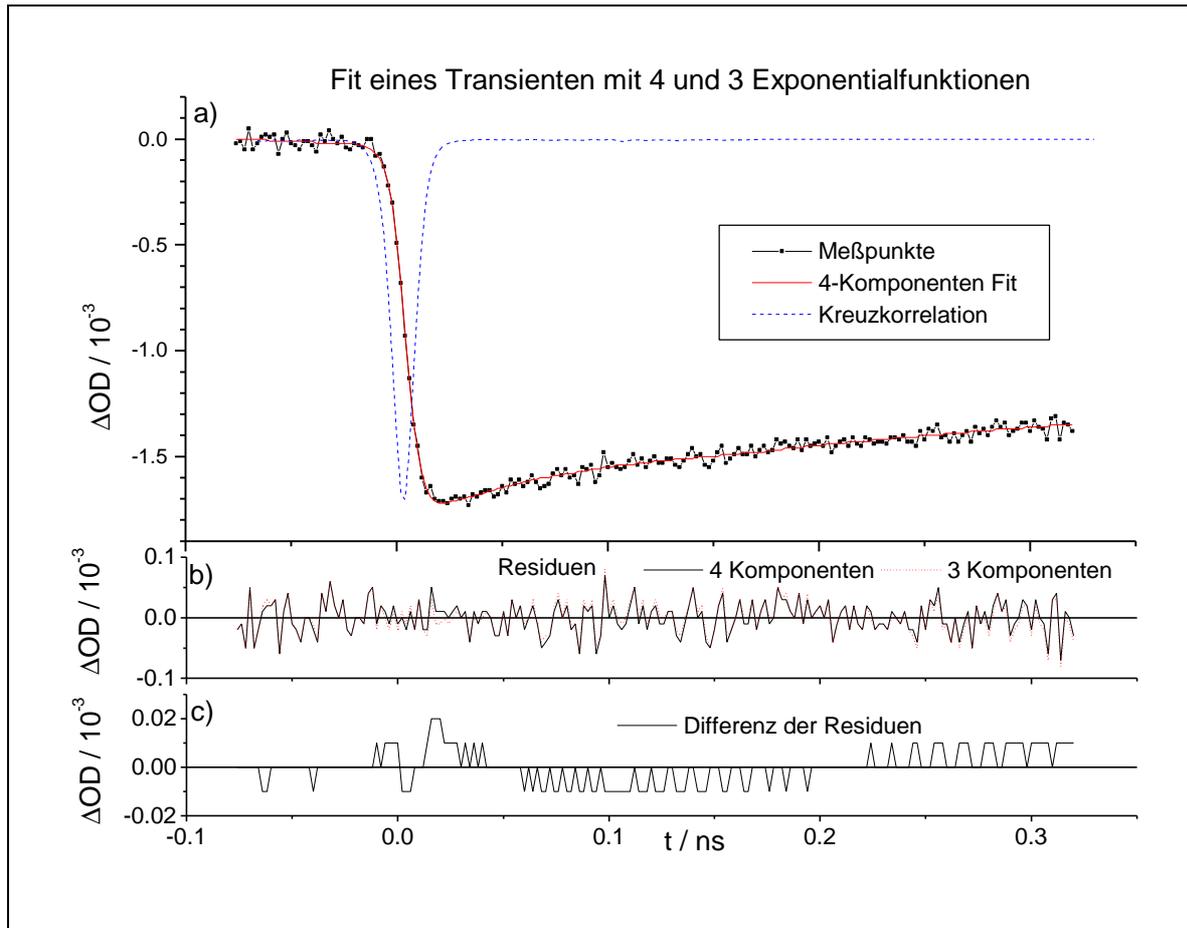


Abbildung V-14 Absorptionsdifferenzkinetik ($\lambda_{\text{exc}}=670$ nm, $\lambda_{\text{det}}=673$ nm) von PS II Kernkomplexen aus Spinat mit geschlossenen RZ mit einem Fit von $-100 - 300$ ps mit 4 (3 ps, 57 ps, 190 ps, 2.1 ns) bzw. 3 Komponenten (3 ps, 86 ps, 1.8 ns)

- a) Meßpunkte, Kreuzkorrelation und Fit mit 4 Komponenten;
 b) Residuen der Fits mit 4 und 3 Komponenten;
 c) Differenz der Residuen aus b).

Die Ergebnisse der 4-Komponenten Analyse sind als Zerfallsassoziertes Absorptionsdifferenzspektrum (DADS) in Abbildung V-15 dargestellt. Es wurden folgende Zerfallszeiten gefunden: 3 ps, 57 ps, 191 ps und 2.13 ns. Diese Werte sind vergleichbar mit denen ermittelt aus der zeitaufgelösten Fluoreszenz mit 8 ps, 41 ps, 230 ps und zwei ns Komponenten mit 1.7 und 4.5 ns, die sich in der 2.1 ns Komponente widerspiegeln. Auf Grund der geringen Verbesserung der Fitqualität durch die Anwendung von vier Zerfallszeiten ist keine *exhaustive search* Analyse der Fehlerbereiche möglich.

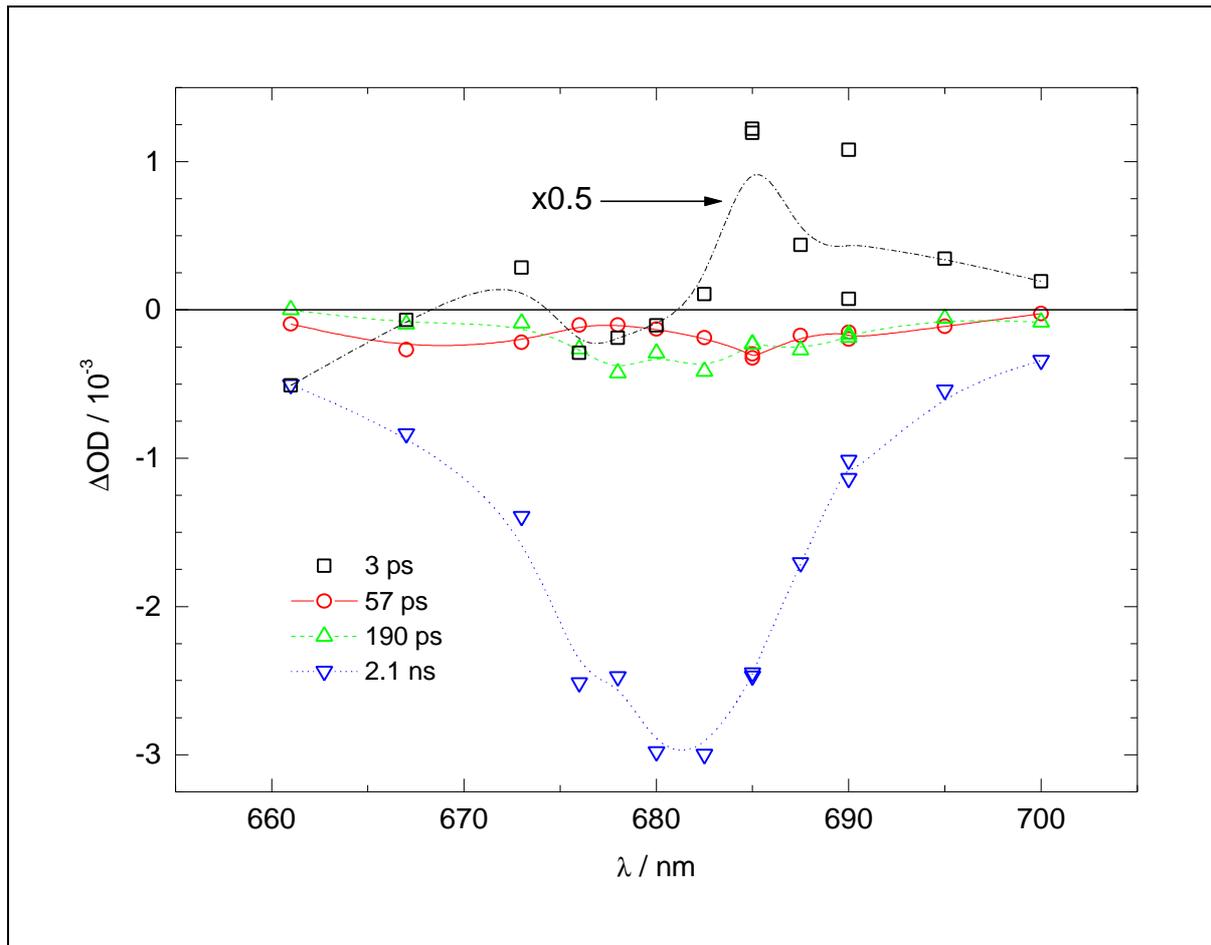


Abbildung V-15 Zerfallsassoziertes Absorptionsspektrum (DADS) aus der Globalanalyse der Absorptionsdifferenzkinetiken (-100 – 300ps) mit einem 4-Komponenten Zerfall (die 3 ps Komponente wurde um den Faktor 2 verkleinert).

Das DADS der 3 ps Komponente, obwohl relativ stark fehlerbehaftet¹³⁵, da an der unteren Grenze der möglichen Zeitauflösung, zeigt den qualitativ typischen Verlauf einer Äquilibriumskomponente mit einem schnellen Zerfall (neg. Vorzeichen) in der Nähe der Anregungswellenlänge von 670 nm und ein verzögertes Anwachsen der Gesamtamplitude (pos. Vorzeichen der 3 ps Komponente) weiter entfernt von der Anregungswellenlänge. Ein analoges Verhalten ist auch bei den Fluoreszenzdaten mit einer Zeitkonstante von 8 ps sichtbar. Diese Komponenten stellen nur einen Mittelwert der langsamen Energieäquilibrierungsprozesse im ps Zeitbereich innerhalb der Antenne dar, da auf Grund der Zeitauflösung schnellere Schritte nicht detektierbar sind und die Zeitauflösung auch nicht ausreicht, um die langsameren Prozesse zu trennen. Die Prozesse werden durch die beiden Meßmethoden unterschiedlich gewichtet, so daß ein direkter Vergleich der beiden Zeitkonstanten der Energieäquilibrierung nicht möglich ist. Durch den spektralen Verlauf der Komponenten lassen sich aber beide dem gleichen Prozeß, der der Energieäquilibrierung, zuordnen.

¹³⁵ Vgl. 690 nm in Abbildung V-15 als Extremfall.

Weiterhin ist festzustellen, daß der spektrale Verlauf der 57 ps Komponente wesentlich von denen der 190 ps und der der 2.1 ns Amplitude abweicht, während diese beiden einen im Rahmen der Fehlergrenzen ähnlichen spektralen Verlauf aufweisen.

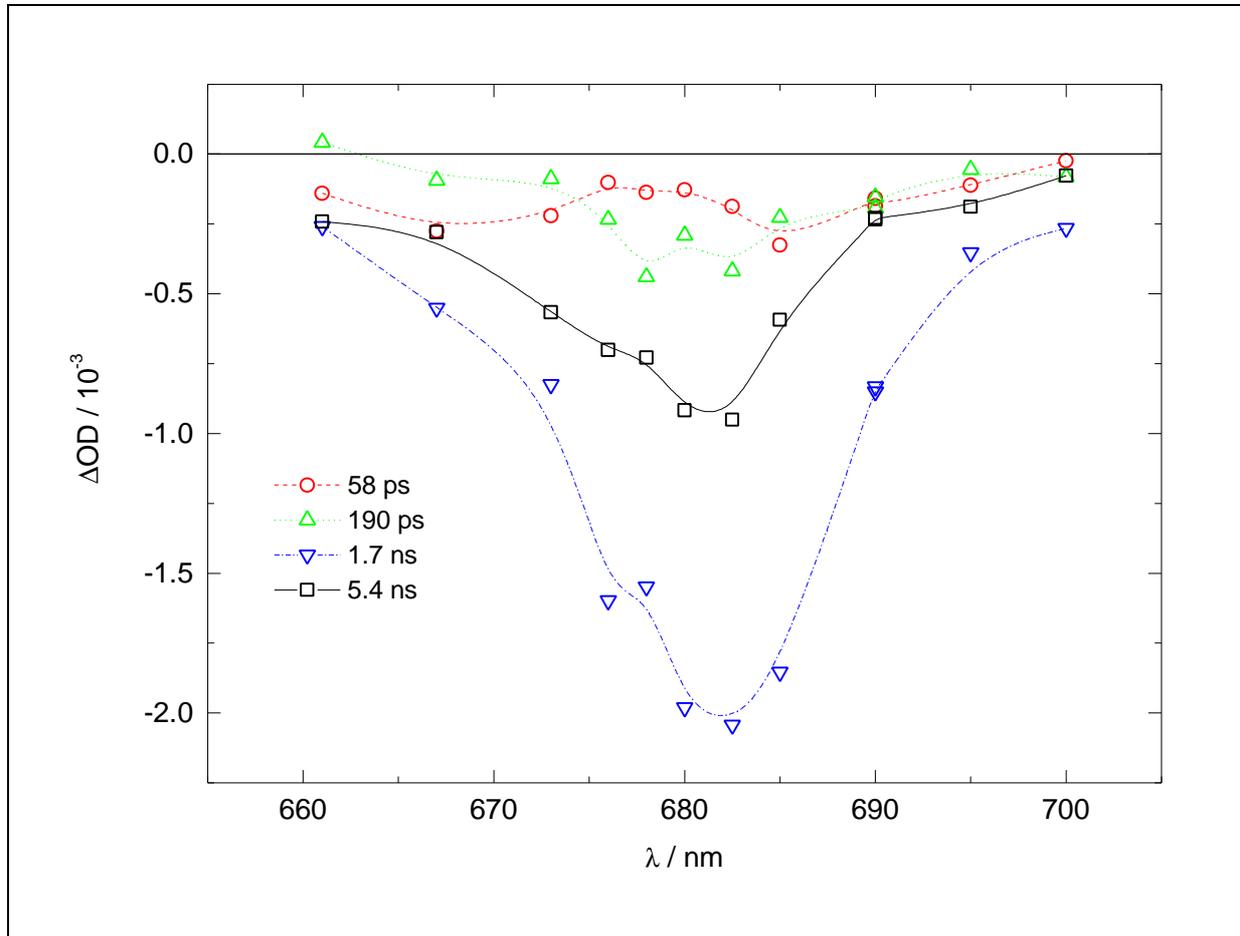


Abbildung V-16 Zerfallsassoziertes Absorptionsspektrum (DADS) aus der Globalanalyse der Absorptionsdifferenzkinetiken (bis 2 ns) mit einem 5-Komponenten Zerfall (3 ps Komponente hier nicht gezeigt).

Wie diskutiert, wird ein Aufspalten der 2.1 ns Komponente erwartet, wenn der Fitbereich über die 300 ps ausgedehnt wird. Dabei müssen zwei Punkte berücksichtigt werden: Die Schrittweite der Meßpunkte verringert sich auf $\Delta t = 10$ ps (300 – 500 ps) und $\Delta t = 50$ ps (500 ps – 3 ns) und es kann bedingt durch die eingesetzte Auswertesoftware nur eine Analyse der Daten mit Vorwärtsfaltung von –0.1 bis 1.9 ns erfolgen. Trotzdem ist eindeutig die Auflösung zweier ns Komponenten von 1.7 ns und 5.4 ns bei einem 5 Komponenten Fit möglich. Die DADS der Globalanalyse sind in Abbildung V-16 gezeigt. Die 1.7 ns aus den Absorptionmessungen stimmt sehr gut mit den 1.7 ns ermittelt aus der Fluoreszenz überein. Die Bestimmung der 5.4 ns Komponente ist in Anbetracht eines Fitfensters bis 1.9 ns immer noch gut mit den 4.5 ns aus den Fluoreszenzdaten verträglich. Eine Analyse des Zeitbereiches bis 3 ns ohne

Entfaltung ergibt für die beiden langen Komponenten 1.8 ns und 3.8 ns.¹³⁶ Die relative Ähnlichkeit des spektralen Verlaufs der drei langsameren Komponenten, von denen sich die DADS der 57 ps Komponente stark unterscheidet, lassen ähnliche, diesen Komponenten zugrunde liegende Prozesse vermuten.

Die diskutierte Kompatibilität der Zerfallszeiten ermittelt aus zeitaufgelöster Fluoreszenz- und Absorptionsdifferenzspektroskopie für geschlossenen PS II Kernkomplexe aus Spinat rechtfertigt einen gemeinsamen globalen Fit aller Kinetiken aus Fluoreszenz und Absorption. Als Ergebnis erhält man folgende gemeinsame Zerfallszeiten: 6 ps, 50 ps, 240 ps, 1.8 ns und 4.5 ns.

V.5.1 Untersuchung des langen ns Zeitbereiches

Wie in Abschnitt III.2.1 beschrieben, ist es mit der hier aufgebauten transienten Absorptionsanlage möglich, Verzögerungszeiten zwischen Pump- und Testpuls von bis zu 4 ns optisch, aber darüber hinaus längere Verzögerungszeiten im 12 ns Abstand elektronisch einzustellen. Diese Möglichkeit wurde genutzt, um das Abklingen der Absorptionsdifferenzspektren im langen Zeitbereich bei $\lambda_{\text{pump}} = 670$ nm und $\lambda_{\text{test}} = 680$ nm zu messen. Abbildung V-17 stellt die Messungen bis 100 ns dar, die mit einem einfach exponentiellen Fit mit einer Lebensdauer von 16 ± 2 ns (rel. Amplitude 18 %) und einem konstanten Untergrund von 4.5 % der Maximalamplitude bestimmt wurde. Nach $2.4 \mu\text{s}$, also kurz vor dem nächsten Anregungspuls ist noch eine Amplitude von 1.0 % der Maximalamplitude zu detektieren.

Aus Absorptionsdifferenzmessungen an geschlossenen *Synechococcus el.* Kernkomplexen [Schlodder und Brettel (1988)] im ns Zeitbereich ist eine langsame Zerfallskinetik von P^+Pheo^- mit 16 ns bekannt, mit zeitaufgelöster Fluoreszenz [Hillmann *et al.* (1995b)] wurden an ähnliche Präparationen 12 ns (1.5 %) und sogar eine 36 ns Komponente mit sehr schwacher Amplitude (0.1 %) detektiert. An PS II Kernkomplexen aus Spinat wurden mittels zeitaufgelöster Fluoreszenz u. a. 15 ns (0.7 %) [Liu *et al.* (1993)] gemessen. Die hier ermittelten 16 ns stehen in guter Übereinstimmung mit den aus der Literatur ermittelten Daten für einen langsamen Radikalpaarzerfall. Die als konstanter Hintergrund gemessene Amplitude von 4.5 %, die nach $2.4 \mu\text{s}$ noch 1.0 % beträgt, könnte der Bildung des $^3\text{P680}$ Zustandes entsprechen, der in PS II mit geschlossenen RZ in wenigen μs zerfällt [Vermaas *et al.* (1984)].

¹³⁶ DADS nicht gezeigt.

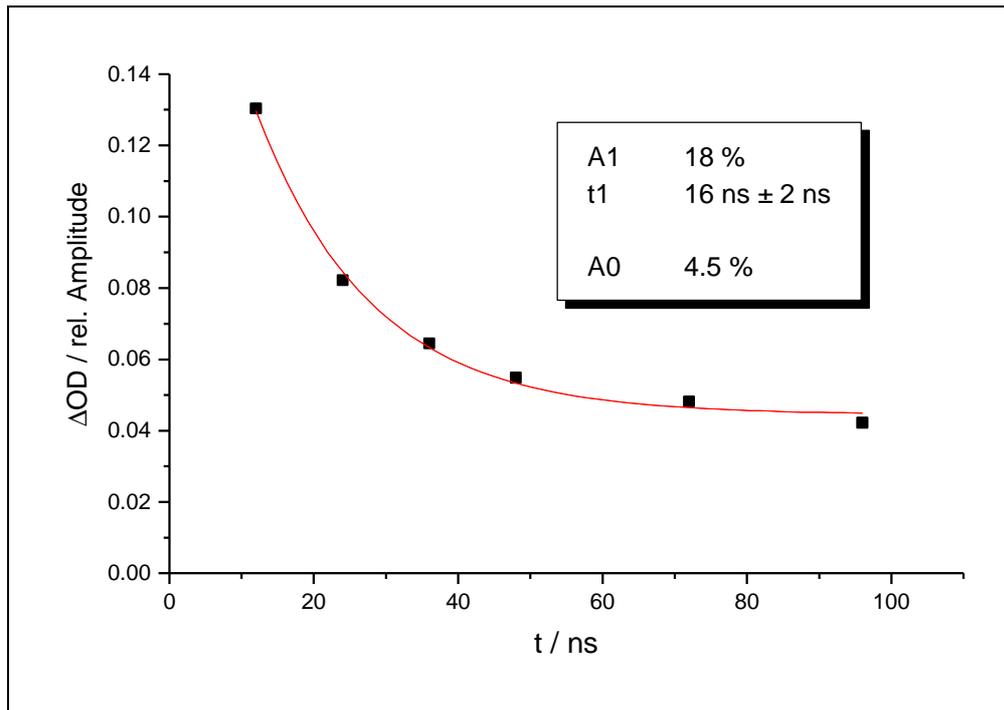


Abbildung V-17 Transient der ns Amplitude (rel. zur Maximalamplitude) von PS II Kernkomplexen, angeregt bei 670 nm, detektiert bei 700 nm und einfach exponentieller Fit.

V.5.2 Vergleich der Messung mit bisher veröffentlichten Daten

Bisher wurden nur zwei Arbeiten mit annihilationsfreien Absorptionsdifferenzmessungen an PS II Kernkomplexen publiziert. Schatz *et al.* (1987)¹³⁷ untersuchten PS II Kernkomplexe aus *Synechococcus el.* mit offenen und geschlossenen RZ mit Zwei-Farben-Absorptionsdifferenzspektroskopie mit der Polarisation von Anregungs- und Detektionspuls im magischen Winkel, während Schelvis *et al.* (1995) Ein-Farben-Absorptionsdifferenzspektroskopie an Systemen aus Spinat mit geschlossenen RZ mit Polarisation von Anregungs- und Detektionspuls sowohl waagrecht als auch senkrecht durchführte. Beide Apparaturen sind in der Zeitauflösung und dem Rauschniveau vergleichbar mit der hier eingesetzten. Schatz *et al.* berichten von nur zwei aufgelösten Zerfallszeiten für geschlossene RZ von 170 – 260 ps und 1.6 – 1.75 ns bei einer verringerten Anregungsenergie von 0.7 $\mu\text{J}/(\text{Puls}\cdot\text{cm}^2)$ im Vergleich zu offenen RZ (2 $\mu\text{J}/(\text{Puls}\cdot\text{cm}^2)$) und einem Zeitbereich bis 1.5 ns. Die starke Reduzierung der Anregungsenergie um den Faktor 3 für geschlossene RZ wird mit einer um den Faktor 3 – 4 längeren Anregungslebensdauer und daraus folgender um diesen Faktor höheren Annihilationswahrscheinlichkeit begründet. Dies erscheint jedoch aus mehreren Gründen fraglich. Die mittlere Anregungslebensdauer für die dort verwendeten Systeme mit offenen RZ betrug 175 ps, war also groß gegenüber der Pulslänge des Anregungspulses von 10 ps. Innerhalb der Anregung findet somit kein merklicher Anregungszerrfall statt und unterscheidet sich damit

¹³⁷ Siehe auch [Brock (1988)].

nicht von Systemen mit geschlossenen RZ. Somit ist die Wahrscheinlichkeit von mehreren Anregungen in einem Kernkomplex durch die Anregung mit einem Puls für offene und geschlossene RZ gleich groß. Selbst wenn es nicht zu einer Singulett-Singulett Annihilation kommt, wenn die dazu konkurrierende primäre Ladungstrennung schneller stattfindet, führt die zweite Anregung auf der Antenne des Kernkomplexes zu einer Verfälschung der gemessenen Kinetik. In diesem Fall befindet sich die Anregung auf einem Komplex mit $P^+Pheo^-Q_A^-$, auf dem eine Ladungstrennung ausgeschlossen ist.

Bei einer verwendeten Pulswiederholfrequenz von 400 kHz, also nach einem Pulsabstand von 2.5 μ s ist, unabhängig vom Zustand des Reaktionszentrums, die Anregung auf der Antenne vollständig abgeklungen und $P680^+$ wieder reduziert, so daß keine Annihilationseffekte im Zusammenhang mit einer Anregung aus dem vorhergehenden Puls auftreten können. Daraus folgt, daß die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Annihilationseffekten nur von der Anregungsintensität und nicht vom Redoxzustand des Reaktionszentrums abhängt.

Messungen von Schatz *et al.* mit 2 μ J/(Puls*cm²) ergaben als kleinste Zerfallszeit 110 ps, was wiederum kompatibel mit den hier ermittelten 86 ps für einen Drei-Komponenten-Fit ist. Diese Werte wurden jedoch von ihnen wegen Inkompatibilität mit ihren Fluoreszenzdaten verworfen. Durch die starke Reduzierung der Anregungsenergie auf 0.7 μ J/(Puls*cm²) ist auch das Signal/Rausch-Verhältnis gesunken. Weiterhin wurde mit einer optischen Dichte bei der Anregungswellenlänge von nur 0.3 OD im Vergleich zu 0.92 OD in dieser Arbeit gemessen. Damit ist ein maximales Δ OD von 0.4 mOD bei 682 nm im Vergleich zu 3.6 mOD der hier präsentierten Messungen erreicht worden. Bei gleichem Rauschniveau entspricht dies einem um eine Größenordnung schlechteren Signal/Rausch-Verhältnis der Messungen von Schatz *et al.*, womit im Wesentlichen die Unterschiede zwischen den Ergebnissen erklärt werden können. Die spektrale Form der ns Komponente ist der hier ermittelten vergleichbar, während die 250 ps Komponente der Summe aus den hier gemessenen 57 ps und 190 ps Komponenten ähnelt.

Schelvis *et al.* ermittelten in ihrem Ein-Farben-Absorptionsdifferenzexperiment an Kernkomplexdimeren aus Spinat mit geschlossenen RZ bis 1 ns (668-706 nm) und einer Anregungsenergie von 2.5 μ J/(Puls*cm²) Zeiten von 21 ps, 80-200 ps und 1.5 ns. Dabei zeigte die 80-200 ps Komponente eine Anregungswellenlängenabhängigkeit derart, daß die Zerfallszeit für $\lambda > 690$ nm von 200 ps auf 80 ps abfiel. Diese Zeit wird von ihnen mit der Ladungstrennung assoziiert. Die gemessene Abhängigkeit der Kinetik von der Anregungswellenlänge war die Motivation der Untersuchung der Fluoreszenzkinetik bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen in dieser Arbeit. Dabei konnte keine Abhängigkeit festgestellt werden, siehe

oben. Eine Erklärung für einen Artefakt schlagen die Autoren mit einer möglichen PS I Kontamination selbst vor. Denkbar wäre auch ein nicht vollständiges Schließen der RZ bei $\lambda > 690$ nm, da PS II Kernkomplexe dort nur noch eine sehr schwache Absorption aufweisen und die Anregungsenergie für alle Wellenlängen konstant gehalten wurde.

Betrachtet man die 21 ps Komponente als Mischung aus der Äquilibrierungs- und der hier gemessenen 57 ps Komponente, besteht eine gute Übereinstimmung der Zerfallszeiten für Anregungswellenlängen < 690 nm. Da es sich um ein Ein-Farben-Experiment handelt, sind die DADS nicht vergleichbar.

Als Schlußfolgerung aus dem Vergleich kann festgestellt werden, daß die hier präsentierten Absorptionsdifferenzmessungen an geschlossenen PS II Kernkomplexen die bisher detaillierteste annihilationsfreie Untersuchung dieser Art darstellt. Es konnte in Übereinstimmung mit den Fluoreszenzmessungen eine schnelle 57 ps Komponente detektiert werden, die in der Modellierung der Absorptionsdifferenzkinetiken eindeutig der primären Ladungstrennung P^+Pheo^- zugeordnet wird¹³⁸.

¹³⁸ Siehe Abschnitt VI.2.