

VI. Modellierung und Diskussion der Ergebnisse

Die Ratenkonstante k_a

Alle in diesem Kapitel diskutierten Modelle benötigen zur Erklärung einer Kinetik, die mit einer Summe von N Exponentialfunktionen gut beschrieben ist, $2 \cdot N$ Parameter. Die Auswertung der Daten in Form von Exponentialfunktionen ergibt allerdings nur $2 \cdot N - 1$ Parameter, da die Amplituden der Fluoreszenz und der Absorption nur relativ und nicht absolut bekannt sind. Das Fehlen der Information der absoluten Amplitude macht die Systeme unterbestimmt und es werden Daten gesucht, die aus anderen Messungen bekannt sind und als gegeben angenommen werden können. Einen solchen Parameter stellt der direkte Zerfall der Anregung der Antenne in den Grundzustand, die Rate k_a dar.

Die Ratenkonstante k_a wurde mit 0.3 ns^{-1} durch Fluoreszenzlebensdauer-messungen an isolierten Antennenkomplexen [Ide *et al.* (1987)] mit einer mittleren Lebensdauer von 3.3 ns bestimmt. Weiterhin zeigen Variationen von k_a bei ähnlichen Modellierungen von Fluoreszenzkinetiken von PS II in Thylakoidmembranen, wie sie hier vorgestellt werden, daß stärkere Abweichungen von diesem Wert physikalisch nicht sinnvolle Beschreibungen ergeben [Roelofs und Holzwarth (1990), Roelofs *et al.* (1992)]. Schatz *et al.* (1988) hingegen berechneten ihre Ratenkonstanten mit $k_a = 0.9$ und 1.1 ns^{-1} für offene bzw. geschlossene RZ. Für eine Vergleichbarkeit der Ratenkonstanten wurden diese für die Meßwerte von Schatz *et al.* mit $k_a = 0.3 \text{ ns}^{-1}$ neu berechnet.

VI.1 Modellierung der Fluoreszenzkinetiken

VI.1.1 Beschreibung offener Reaktionszentren

Schatz *et al.* (1988) stellten ein Modell für den Energie- und Elektronentransfer in PS II vor, das *Excited state – radical pair equilibrium* Modell: Nach der Anregung der Antenne durch Absorption eines Photons äquilibriert die Energie zwischen allen Pigmenten entsprechend einer Boltzmannverteilung. Dieser Prozeß ist viel schneller als die primäre Ladungstrennung zu $\text{P680}^+\text{Pheo}^-$. Von Pheo^- findet ein Vorwärtselektronentransfer zum Q_A statt, aber auch eine Ladungsrekombination zum angeregten Zustand ist wegen einer Gleichgewichtsreaktion möglich.¹³⁹ Andere Relaxationsprozesse – in Abbildung VI-1 gestrichelt dargestellt – wie Rekombination zum Grundzustand und Rückreaktion von $\text{P680}^+\text{Q}_A^-$ sind, da sie viel langsamer ablaufen, vernachlässigbar.

¹³⁹ Siehe Abbildung VI-1.

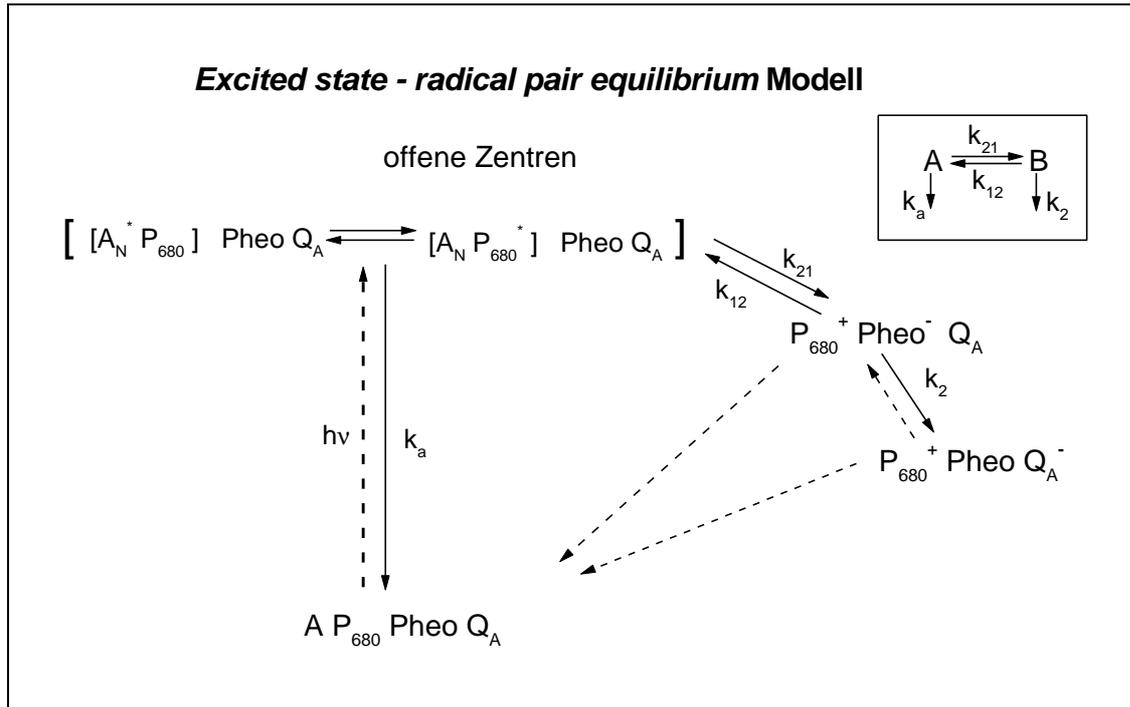


Abbildung VI-1 Schematische Darstellung des *Excited state – radical pair equilibrium* Modells [Schatz *et al.* (1988)] für offene Zentren, Inset: Struktur des Modells.

Ausgehend vom *Excited state – radical pair equilibrium* Modell werden zwei Lebensdauern erwartet, die hauptsächlich die Bildung des primären Radikalpaares $P_{680}^+ \text{Pheo}^-$ (k_{21}) und dessen Rückreaktion (k_{12}) sowie die Ladungsstabilisierungsreaktion zu $P_{680}^+ \text{Q}_A^-$ (k_2) beschreiben. Diese Prozesse sind viel langsamer als die der Energieäquilibrierung [Schatz *et al.* (1988)], so daß der Äquilibrierungsprozeß in dem Modell vernachlässigt wird. Außer der Äquilibrierungskomponente, 6–9 ps für die Spinatpräparation und 10 ps für *Synechococcus el.*, sind nur 46 ps (77 %) und 185 ps (15%) für Spinat¹⁴⁰ und 44 ps (75 %) und 230 ps (15 %) für *Synechococcus el.*¹⁴¹ zu berücksichtigen. Angewendet auf das Modell spiegelt die schnellere Komponente die Ladungstrennung und die langsamere die Ladungsstabilisierung wider.

In PS II Kernkomplexen mit offenen RZ werden noch zwei zusätzliche, langsame Komponenten (760 ps und 3.4 ns für Spinat sowie 1.2 ns und 3.0 ns für *Synechococcus el.*) aufgelöst, die hier „Verunreinigungen“ der Probe – wie PS II ohne funktionsfähiges Q_A , PS II mit geschlossenem RZ oder ungekoppelten Antennenchlorophyllen – zugeordnet werden.¹⁴²

Die Ratenkonstanten in Tabelle VI-1 wurden entsprechend dem Modell in Abbildung VI-1 berechnet. Zu erkennen ist, daß die Ratenkonstanten für die beiden Präparationen sich nur sehr gering unterscheiden. Dies führt auch zu einer identischen freien Reaktionsenthalpie für die primäre Ladungstrennung von -54 meV bzw. -53 meV. Im Vergleich zu den Ratenkon-

¹⁴⁰ Vgl. Tabelle V-2.

¹⁴¹ Vgl. Tabelle V-1.

stanten, die aus den Daten von Schatz *et al.* berechnet wurden ($k_{21} = 9.9 \text{ ns}^{-1}$, $k_{12} = 1.9 \text{ ns}^{-1}$, $k_2 = 2.3 \text{ ns}^{-1}$), ist dies eine zweifach schnellere Ladungstrennungsrate und 2.5 mal schnellere Ladungsstabilisierung, während k_{12} vergleichbar ist. Die von Schatz *et al.* errechnete freie Reaktionsenthalpie beträgt -42 meV , also einen etwas geringeren Wert.

$k_a=0.3 \text{ ns}^{-1}$, fixiert	k_{21} / ns^{-1}	k_{12} / ns^{-1}	k_2 / ns^{-1}	DG_{cs}^0 / meV	Effizienz / %
Spinat	19.2	2.0	6.1	-54	98
<i>Synechococcus el.</i>	19.4	2.4	5.1	-53	98

Tabelle VI-1 Ratenkonstanten für das *excited state radical pair equilibrium* Modell für PS II mit offenen RZ, für die Kernkomplexpräparationen aus Spinat und *Synechococcus el.* berechnet aus den Amplituden und Zeiten der Fluoreszenzkinetik, freie Reaktionsenthalpie der primären Ladungstrennung $\Delta G^0 = -k_B T \ln(k_{21}/k_{12})$; Effizienz der Ladungsstabilisierung, d. h. Ausbeute von $P^+Q_A^-$.

Zur Bildungszeit von Q_A^- wurden bisher veröffentlicht: $350 \pm 100 \text{ ps}$ [Eckert *et al.* (1988)], gemessen über die Bildung von Q_A^- mittels Absorptionsdifferenzspektroskopie bei 320 nm , 300 ps [Nuijs *et al.* (1986)] über Messung der Oxidation von Pheophytin und 500 ps [Schatz *et al.* (1987)] über kombinierte Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie. Der Vergleich zeigt, daß die hier bestimmten Ratenkonstanten zur Q_A^- -Reduktion (6.1 bzw. 5.1 ns^{-1}) bedeutend kürzere Bildungszeiten ergeben. Unter Berücksichtigung der vorgeschalteten Ladungstransferprozesse ergeben sich Bildungszeiten von $\tau_{1/2} = 180 \text{ ps}$ für Spinat¹⁴³ und 230 ps für *Synechococcus el.* Diese Werte sind immer noch etwas geringer als die bisher veröffentlichten.

Mit den ermittelten Raten können die Besetzungszahlen der einzelnen Zustände und somit auch die Effizienz der Ladungsstabilisierung, d. h. der Ausbeute von $P^+Q_A^-$ im Vergleich zur Anregung berechnet werden. Die so ermittelte Besetzungsdynamik von $(AP)^*$, P^+Pheo^- und $P^+Q_A^-$ ist exemplarisch für die Spinatpräparation in Abbildung VI-2 dargestellt. Für beide Präparationen ergibt sich eine maximale transiente Konzentration von P^+Pheo^- von 55% und eine Ladungsstabilisierungsausbeute von 98% . Dies zeigt die hohe Effizienz und Optimierung des Photosystem II.

Wie oben festgestellt wurde, sind bei der Anwendung dieses Modells die beiden längeren Fluoreszenzzeiten vernachlässigt worden. Zu beachten ist allerdings, daß auch geschlossene RZ mit einer Äquilibrierungs- und vier Zerfallskomponenten beschrieben werden, deren Amplituden im Gegensatz dazu nicht vernachlässigbar sind. Es soll versucht werden, diesen Komponenten für offene und geschlossene PS II einen gemeinsamen Ursprung zuzuordnen.

¹⁴² Siehe Abschnitt IV.2.2..

¹⁴³ Siehe Abbildung VI-2.

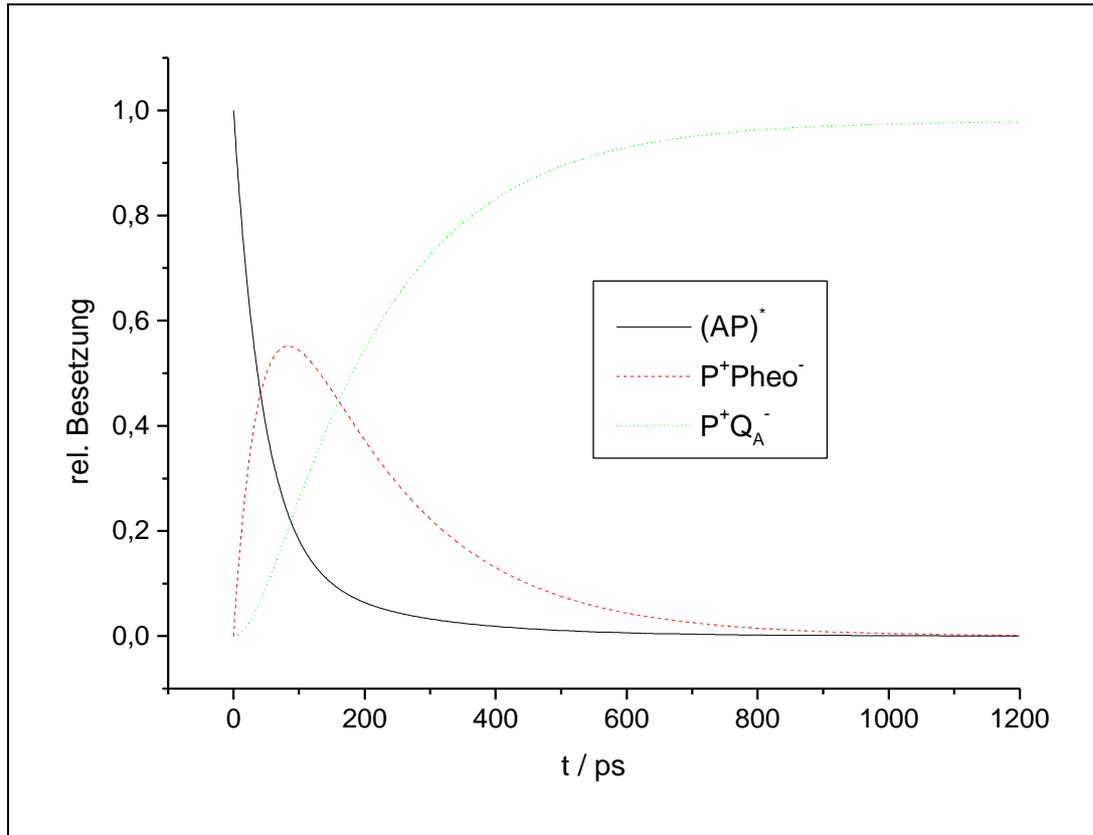


Abbildung VI-2 Besetzungsdynamik der einzelnen transienten Zustände für Spinatpräparationen mit offenen RZ, berechnet mit den Ratenkonstanten aus Tabelle VI-1.

Eine Möglichkeit ist die Annahme einer Heterogenität in der Probe. Seit langem ist bekannt, daß PS II in Thylakoidmembranen höherer Pflanzen und Grünalgen mehrere Formen der Heterogenität aufweist (Überblick z. B. in Govindjee (1990)), von denen die sogenannte α/β -Heterogenität wohl die bekannteste Form ist [Melis und Homann (1976)]. So kann die Fluoreszenzkinetik in Erbsen und Grünalgen erfolgreich mit einem α/β -heterogenen *excited state-radical pair equilibrium* Modell beschrieben werden [Roelofs *et al.* (1992)]. Es wird angenommen, daß die PS II α -Zentren sich ausschließlich in dem gestapelten Granabereich der Thylakoidmembran befinden, während PS II β in dem ungestapelten Stromabereich lokalisiert ist [Anderson und Melis (1983)].

Diese sogenannte laterale Heterogenität macht es unwahrscheinlich, daß in PS II Kernkomplex-Präparationen, die fast ausschließlich aus dem Granabereich hergestellt werden, noch ein wesentlicher Anteil an β -Zentren vorhanden ist. Außerdem wurde noch nie über eine α/β -Heterogenität in Cyanobakterien berichtet. Deshalb soll hier eine allgemeine Form der Heterogenität exemplarisch an den Spinatpräparationen getestet werden. Sie werden der Einfachheit halber mit Typ 1 und Typ 2 bezeichnet.

Zur Beurteilung der Modellannahme sollen die Anteile der Typ 1 und Typ 2 Zentren genutzt werden, da diese unabhängig von dem Redoxzustand des RZ sind. Aus den vier Zerfallskomponenten ergeben sich drei mögliche Zuordnungen der Zerfallskomponenten zu Typ 1 und 2. Tabelle VI-2 zeigt die so erhaltenen Ratenkonstanten und relativen Anteile von Typ 1 und Typ 2 Zentren.

	Zuordnung a	Zuordnung b	Zuordnung c
$k_a=0.3 \text{ ns}^{-1}$, fixiert	1: 46 ps (84%), 190 ps 2: 760 ps (50%), 3.4 ns	1: 46 ps (95%), 760 ps 2: 190 ps (79%), 3.4 ns	1: 46 ps (95%), 3.4 ns 2: 190 ps (79%), 760 ps
Anteil Typ 1 k_{21} k_{12} k_2	92 % 19 ns^{-1} 2.0 ns^{-1} 6.1 ns^{-1}	81 % 20.9 ns^{-1} 0.98 ns^{-1} 1.35 ns^{-1}	81 % 21 ns^{-1} 1.08 ns^{-1} 0.29 ns^{-1}
Anteil Typ 2 k_{21} k_{12} k_2	8% 0.49 ns^{-1} 0.52 ns^{-1} 0.28 ns^{-1}	19 % 4.0 ns^{-1} 1.08 ns^{-1} 0.29 ns^{-1}	19 % 4.2 ns^{-1} 0.66 ns^{-1} 1.5 ns^{-1}

Tabelle VI-2 Ratenkonstanten und relative Konzentration der Typ 1 und Typ 2 Zentren für unterschiedliche Zuordnung der Zerfallskomponenten zu Typ I und Typ II für PS II Kernkomplexe aus Spinat mit offenen RZ¹⁴⁴.

Diese Resultate müssen mit den Werten verglichen werden, die die Anwendung des Heterogenitätsmodells auf Kernkomplexe mit geschlossenen Zentren ergibt.¹⁴⁵

VI.1.2 Beschreibung geschlossener Reaktionszentren

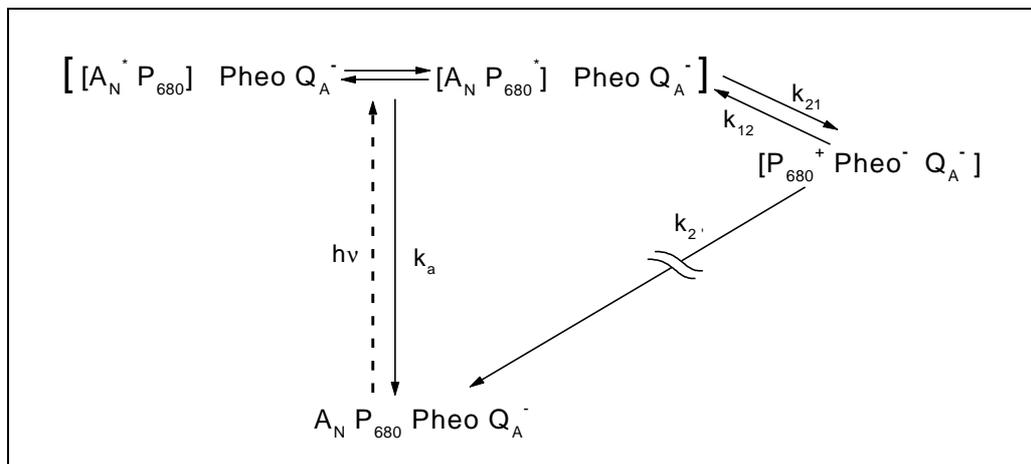


Abbildung VI-3 Einfaches *excited state - radical pair equilibrium* Modell für PS II mit geschlossenen RZ.

Äquivalent zu dem *Excited state – radical pair equilibrium* Modell für offene RZ erklärt das Modell für PS II mit geschlossenem RZ (Abbildung VI-3) nur zwei Lebenszeiten nach der Energieäquilibrierung, die die Einstellung des Gleichgewichts der Ladungstrennung und den

¹⁴⁴ Daten siehe Tabelle V-2.

¹⁴⁵ Siehe unten.

des Zerfalls über k_a und k_2 .¹⁴⁶ beschreiben. Wie oben festgestellt, wurden aber vier signifikante Zerfallskomponenten detektiert. Deshalb ist es angebracht, das Modell zu erweitern.

Eine Möglichkeit wäre, nicht nur diskrete Ratenkonstanten k_{21} und k_{12} zuzulassen, sondern eine Verteilung der beiden Ratenkonstanten anzunehmen. Diese können durch Inhomogenitäten in der Energiedifferenz zwischen (AP)* und dem Radikalpaar oder räumliche Inhomogenitäten, wie Variation der Molekülabstände, hervorgerufen werden. Ähnliche Ansätze zur Modellierung von PS II Fluoreszenzkinetiken (PS II Reaktionszentren) wurden von Kornemann *et al.* (1997) und für Absorptionsdifferenzkinetiken an PS II RZ von Klug *et al.* (1998) getestet, allerdings für nicht geeignet befunden. Eine Modellierung mit verschiedenen Verteilungsfunktionen (Gauß- und Lorentzverteilung) dieser beiden Ratenkonstanten ergab keine zufriedenstellende Beschreibung der Daten, besonders im kurzen Zeitbereich bis 300 ps (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit sind die vier beobachtbaren Zerfallszeiten nicht auf diese Art von Inhomogenitäten zu erklären.

$k_a=0.3 \text{ ns}^{-1}$, fixiert	Zuordnung a 1: 39 ps (61%), 230 ps 2: 1.7 ns (74%), 4.7 ns	Zuordnung b 1: 39 ps (41%), 1.7 ns 2: 230 ps (56%), 4.7 ns	Zuordnung c 1: 39 ps (67%), 4.7 ns 2: 230 ps (31%), 1.7 ns
Anteil Typ 1	46 %	68 %	42 %
k_{21}	17.9 ns^{-1}	11.1 ns^{-1}	17.8 ns^{-1}
k_{12}	6.7 ns^{-1}	15.2 ns^{-1}	8.9 ns^{-1}
k_2	6.6 ns^{-1}	0.97 ns^{-1}	0.17 ns^{-1}
Anteil Typ 2	54 %	32 %	58 %
k_{21}	0.19 ns^{-1}	2.4 ns^{-1}	1.5 ns^{-1}
k_{12}	0.14 ns^{-1}	2.0 ns^{-1}	2.2 ns^{-1}
k_2	0.18 ns^{-1}	0.14 ns^{-1}	1.1 ns^{-1}

Tabelle VI-3 Ratenkonstanten und relative Konzentration der Typ 1 und Typ 2 Zentren für unterschiedliche Zuordnung der Zerfallskomponenten (Daten siehe Tabelle V-4) zu Typ I und II für PS II aus Spinat mit geschlossenen RZ, Fehler der Anteile von Typ 1 und 2: $\pm 4\%$.

Ein weiteres Modell stellt die schon für offene RZ diskutierte Heterogenität der PS II Kernkomplexe dar. Zwei Arten von PS II Kernkomplexen (Typ 1 und 2) nach dem Modell in Abbildung VI-3 werden angenommen. Dabei reflektiert jeweils die kürzere Zeit im wesentlichen die Einstellung des Ladungstransfergleichgewichts und die längere Zeit Relaxations- und Rekombinationsprozesse, die mit k_a und k_2 beschrieben werden.

Tabelle VI-3 zeigt die resultierenden Ratenkonstanten und Anteile der Typ 1 und Typ 2 Zentren für unterschiedliche Zuordnungen der Zerfallszeiten für PS II Kernkomplexe aus Spinat mit geschlossenem RZ¹⁴⁷. Dabei wurde wieder $k_a = 0.3 \text{ ns}^{-1}$ gesetzt¹⁴⁸. Wie schon dis-

¹⁴⁶ k_2 ist die Ratenkonstante aller Rekombinationsschritte von P^+Pheo^- , wie z. B. Triplettbildung und Relaxation in den Grundzustand, die nicht (AP)* wiederbevölkern.

¹⁴⁷ Anregung 670 nm, vgl. Tabelle V-1.

¹⁴⁸ Siehe oben.

kutiert, muß der Anteil von Typ 1 und Typ 2 unabhängig von dem Redoxzustand des RZ sein. Ein Vergleich der Anteile dieser beiden Pools¹⁴⁹ ergibt die größte Ähnlichkeit für die Zuordnungen b und c (81 % Typ 1 und 19 % Typ 2) in offenen Zentren und für die Zuordnung b (68 % Typ 1 und 32 % Typ 2) in geschlossenen RZ. Diese Differenzen sind aber bei weitem größer als die Fehler von ca. ± 4 % in den Konzentrationsangaben. Die Typ 2 Konzentration variiert relativ zu der von Typ 1 um mehr als 50 %. Auch existieren keine weiteren Hinweise aus anderen Experimenten, die eine solche Heterogenität unterstützen. Deshalb wird dieses Modell für die PS II Kernkomplexe aus Spinat verworfen. Da ein einheitliches Modell, das die Kinetiken der Spinat- und der *Synechococcus el.* Präparationen erklärt, gesucht wird und es für keine PS II Präparationen aus *Synechococcus el.* Hinweise durch andere Experimente auf Heterogenität gibt, wird dieses Heterogenitätsmodell auch für *Synechococcus el.* verworfen.

Relaxierung des Radikalpaarzustands

Mehrere Gruppen diskutieren die Möglichkeit von wenigstens einem relaxierten primären Radikalpaarzustand (RRP), der sich durch Änderung der umgebenden Proteinmatrix in einem anderen energetischen Zustand befindet¹⁵⁰. Diese Änderung der Proteinmatrix wird als Relaxation auf Grund der geänderten Ladungszustände von P680 und Pheo betrachtet. Hillmann *et al.* (1995b) diskutieren sogar mehrere relaxierte Radikalpaarzustände auf der Grundlage von Fluoreszenzlebensdauern von bis zu 32 ns in geschlossenen PS II Kernkomplexen aus *Synechococcus el.*. Diesen Relaxationskinetiken wurden bisher nur ns Komponenten zugeordnet. Auch für Reaktionszentren von Purpurbakterien [Peloquin *et al.* (1994), Van Stokkum *et al.* (1997)] und des Photosystem II [Gatzen *et al.* (1996), Konermann *et al.* (1997), Klug *et al.* (1998)] sowie für Chromatophoren von Purpurbakterien [Peloquin *et al.* (1994)] wird das Konzept der relaxierten Radikalpaare diskutiert, hier allerdings auch für sub-ns Prozesse.

In den hier durchgeführten Messungen wurden vier signifikante Zerfallskomponenten nach der Äquilibrierung detektiert, die zumindest teilweise ihren Ursprung in der Kinetik geschlossener Zentren haben, siehe unten. Da ein Modell mit nur einem relaxierten Radikalpaar (RRP1) nur drei Zerfallszeiten vorhersagt, wird noch ein zweiter relaxierter Radikalpaarzustand (RRP2) eingeführt.

Die Zerfallskomponenten von *Synechococcus el.* werden in der folgenden Modellierung vollständig der Kinetik des geschlossenen RZ zugeschrieben, während für Spinat die 4 %-Amplitude der langen Komponente bei offenen Zentren ungekoppelten Antennen-

¹⁴⁹ Tabelle VI-2 und Tabelle VI-3.

¹⁵⁰ Siehe z. B. Schlodder und Brettel (1988).

fragmenten zugeordnet werden¹⁵¹, die von der 4.7 ns Komponente von geschlossenen Zentren abgezogen wird.

Zwei serielle relaxierte Radikalpaare

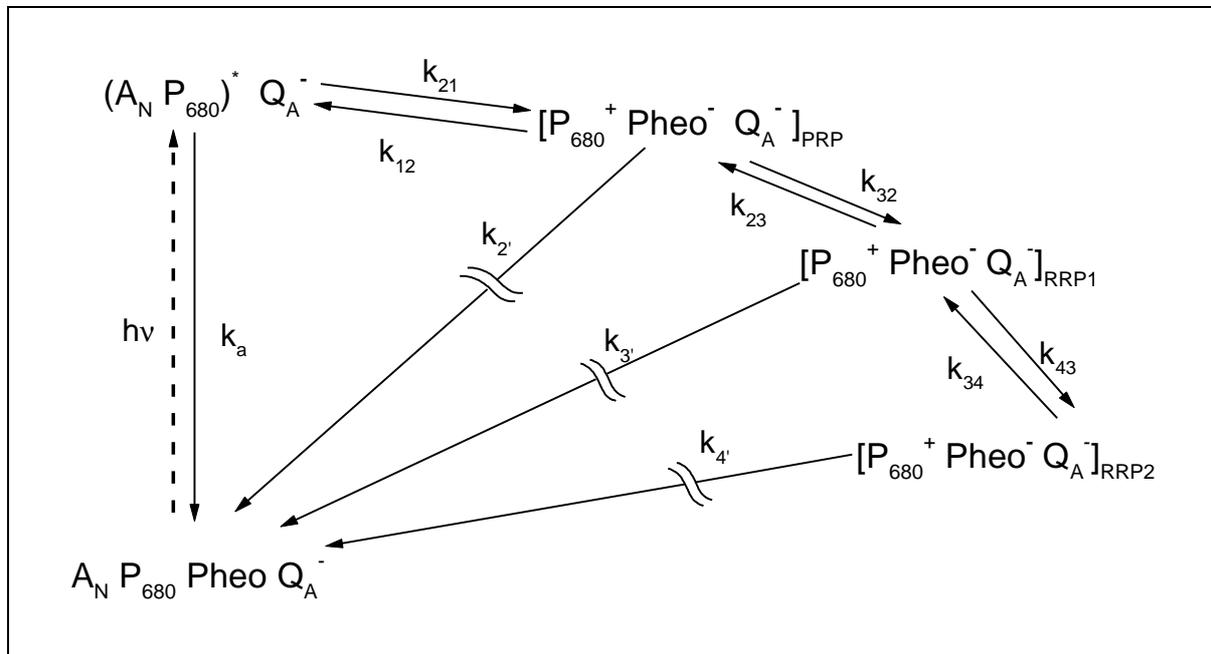


Abbildung VI-4 Modell für PS II mit geschlossenem RZ mit zwei seriellen relaxierten Radikalpaaren, erweitertes *Excited state -radical pair equilibrium* Modell.

Zuerst wird ein Modell von zwei relaxierten Radikalpaaren betrachtet, die seriell aus dem primären Radikalpaar bevölkert werden.¹⁵² Als bekannt wird wieder die Ratenkonstante $k_a = 0.3 \text{ ns}^{-1}$ angenommen. Da das Modell weiterhin unterbestimmt ist, wird die gleiche Rekombinationsrate in den Grundzustand für alle Radikalpaarzustände angenommen ($k_2' = k_3' = k_4' \equiv k_r$).

Tabelle VI-4 zeigt die Ergebnisse der Modellierung für zwei serielle RRP für die beiden Kernkomplexpräparationen aus *Synechococcus el.* und Spinat. Die Modellierung stellt für beide Datensätze eine gute Beschreibung der Kinetik dar. Zu sehen ist, daß die Ratenkonstante der primären Ladungstrennung für beide Präparationen sehr ähnlich ist. Die Ladungsrekombination verläuft etwas langsamer für die *Synechococcus el.* Präparation und der Zerfall der Radikalpaare (Rate k_r) ist um den Faktor 2 schneller.

Ein Vergleich der Ladungstrennungs- und Rekombinationsraten k_{21} und k_{12} mit denen für offene Reaktionszentren (Tabelle VI-1) ergibt für beide Präparationen eine wesentliche Änderung. Während sich aus den Daten von Schatz *et al.* mit dem einfachen Modell ohne Relaxierung mit zwei Zerfallszeiten nur eine starke Änderung in der Ladungstrennungsrate, aber na-

¹⁵¹ Siehe Abschnitt V.2.2 und V.3.2.

¹⁵² Siehe Abbildung VI-4.

hezu Unabhängigkeit der Rekombinationsrate vom Redoxzustand errechnen (für geschlossene RZ mit $k_a = 0.3 \text{ ns}^{-1}$ zu $k_{21} = 2.3 \text{ ns}^{-1}$, $k_{12} = 1.6 \text{ ns}^{-1}$, $k_{2'} = 1.2 \text{ ns}^{-1}$), ergeben die hier präsentierten Ergebnisse bei gleichen Modellannahmen für offene RZ und einem ähnlichen, aber erweiterten Modell für geschlossene RZ eine Abnahme der Vorwärtsrate um den Faktor 2.5 und eine Zunahme der Rückrate um den Faktor 7-8 für Spinat und den Faktor 5 für *Synechococcus el.*

Spinat	$k_a = 0.3 \text{ ns}^{-1}$ fix.	<i>Synecho.</i>	$k_a = 0.3 \text{ ns}^{-1}$ fix.
39 ps 29 %	$k_{21} = 8.7 \text{ ns}^{-1}$ $k_{12} = 15.6 \text{ ns}^{-1}$ $\Delta G^0_{CS} = 13.9 \text{ meV}$	45 ps 30 %	$k_{21} = 7.9 \text{ ns}^{-1}$ $k_{12} = 11.1 \text{ ns}^{-1}$ $\Delta G^0_{CS} = 8.7 \text{ meV}$
230 ps 19 %	$k_{32} = 3.2 \text{ ns}^{-1}$ $k_{23} = 2.8 \text{ ns}^{-1}$ $\Delta G^0_{r1} = -3.6 \text{ meV}$	190 ps 21 %	$k_{32} = 3.7 \text{ ns}^{-1}$ $k_{23} = 2.8 \text{ ns}^{-1}$ $\Delta G^0_{r1} = -3.8 \text{ meV}$
1.7 ns 42 %	$k_{43} = 1.0 \text{ ns}^{-1}$ $k_{34} = 0.12 \text{ ns}^{-1}$ $\Delta G^0_{r2} = -50 \text{ meV}$	760 ps 22 %	$k_{43} = 1.1 \text{ ns}^{-1}$ $k_{34} = 0.69 \text{ ns}^{-1}$ $\Delta G^0_{r2} = -11.8 \text{ meV}$
4.9 ns 10 %	$k_r = 0.20 \text{ ns}^{-1}$	2.5 ns 27 %	$k_r = 0.43 \text{ ns}^{-1}$

Tabelle VI-4 Lebensdauern, relative Amplituden und dazu korrespondierende relative Ratenkonstanten zur Beschreibung der Fluoreszenzkinetik von Spinat und *Synechococcus el.* Kernkomplexen mit geschlossenen RZ für ein PS II Modell mit zwei seriellen relaxierten Radikalpaaren. ΔG^0 wurde mit $\Delta G^0 = k_B T \ln(k_{ij}/k_{ji})$ berechnet.

Daraus folgt, daß der primäre ladungsgetrennte Zustand um 13.9 meV für Spinat bzw. 8.7 meV für *Synechococcus el.* energetisch höher liegt als der angeregte Zustand (AP)*. Das erste relaxierte Radikalpaar ist fast isoenergetisch mit dem primären Radikalpaar, während das zweite Radikalpaar 50 meV bzw. 12 meV niedriger als das erste RRP liegt. Demzufolge kann man die serielle Anordnung der relaxierten Radikalpaare als stufenweise Relaxation des primären Radikalpaares betrachten. Die Auswertung zeigt, daß die Relaxation des primären Radikalpaares in intakten PS II Systemen mit geschlossenen RZ schon im sub-ns Bereich wie in bakteriellen Systemen oder PS II RZ stattfindet, soweit die Modellannahmen des RRP korrekt sind.

Mit den ermittelten Raten können die Besetzungskinetiken der einzelnen Radikalpaarzustände und somit auch die maximale transiente Konzentration von P^+Pheo^- berechnet werden. Die so ermittelten Kinetiken von der Besetzung von (AP)*, des primären Radikalpaares (PRP) und der beiden relaxierten Radikalpaare (RRP) für die Spinatpräparation sind in Abbildung VI-5 dargestellt. Für die Präparationen ergibt sich eine maximale transiente Konzentra-

tion von P^+Pheo^- von 46 % für Spinat bzw. von 48 % für *Synechococcus el.* im Vergleich zu den 55 % in PS II Kernkomplexen mit offenen RZ¹⁵³. Damit ist sie für geschlossene RZ nur geringfügig kleiner und die Chance besteht, diesen Zustand in transienten Absorptionsmessungen detektieren zu können. Van Mieghem *et al.* (1995) berichten von einer maximalen transienten Ladungstrennung von 50 % für geschlossene PS II Kernkomplexe aus *Synechococcus el.*, das eine sehr gute Übereinstimmung mit den hier erzielten Werten darstellt, im Gegensatz zu Schatz *et al.* (1988), bei denen sich für $k_a=0.3ns^{-1}$ eine Ladungstrennungseffizienz von nur 35 % errechneten.

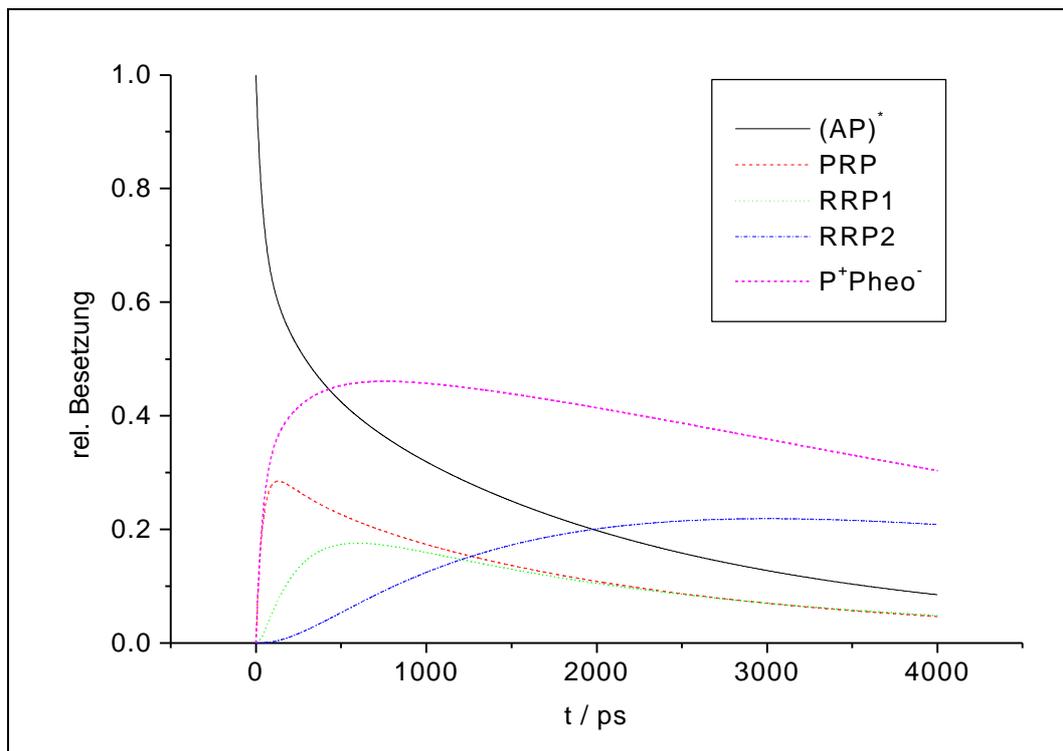


Abbildung VI-5 Besetzungskinetik der einzelnen transienten Zustände für Spinatpräparationen mit geschlossenen RZ, berechnet mit den Ratenkonstanten aus Tabelle VI-4. Die mit P^+Pheo^- gekennzeichnete Kurve ist die Summe aller Radikalpaarzustände.

Zwei parallele relaxierte Radikalpaarzustände

Wie oben diskutiert, sind zwei relaxierte Radikalpaarzustände zur Erklärung des 4-Komponenten-Zerfalls notwendig. Allerdings ist die Anordnung der relaxierten Radikalpaarzustände in serieller Reihenfolge nicht zwingend. Die Formation der beiden relaxierten Radikalpaare kann auch parallel vom primären Radikalpaar ausgehen.¹⁵⁴

¹⁵³ Siehe Abbildung VI-2.

¹⁵⁴ Siehe Abbildung VI-6.

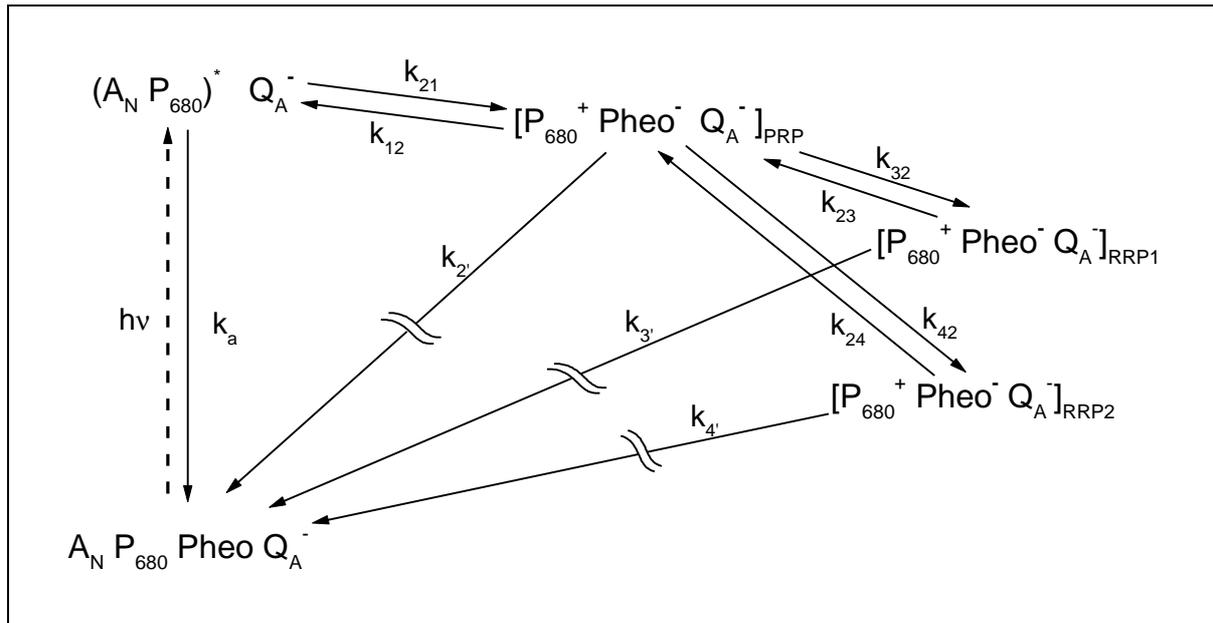


Abbildung VI-6 Modell für PS II mit geschlossenem RZ mit zwei parallelen relaxierten Radikalpaaren, erweitertes excited state - radical pair equilibrium Modell.

Spinat	$k_a=0.3\text{ns}^{-1}$ fix.	<i>Synecho.</i>	$k_a=0.3\text{ns}^{-1}$ fix.
39 ps 29.1 %	$k_{21} = 8.7 \text{ ns}^{-1}$ $k_{12} = 15.6 \text{ ns}^{-1}$ $\Delta G^0_{CS} = 13.9 \text{ meV}$	45 ps 30 %	$k_{21} = 7.9 \text{ ns}^{-1}$ $k_{12} = 11.1 \text{ ns}^{-1}$ $\Delta G^0_{CS} = 8.7 \text{ meV}$
230 ps 18.7 %	$k_{32} = 2.4 \text{ ns}^{-1}$ $k_{23} = 3.8 \text{ ns}^{-1}$ $\Delta G^0_{r1} = 11.5 \text{ meV}$	190 ps 21 %	$k_{32} = 2.4 \text{ ns}^{-1}$ $k_{23} = 4.2 \text{ ns}^{-1}$ $\Delta G^0_{r1} = 14.1 \text{ meV}$
1.7 ns 41.7 %	$k_{42} = 0.89 \text{ ns}^{-1}$ $k_{24} = 0.09 \text{ ns}^{-1}$ $\Delta G^0_{r2} = -55.2 \text{ meV}$	760 ps 22 %	$k_{43} = 1.3 \text{ ns}^{-1}$ $k_{34} = 0.48 \text{ ns}^{-1}$ $\Delta G^0_{r2} = -25 \text{ meV}$
4.7 ns 10.5 %	$k_r = 0.20 \text{ ns}^{-1}$	2.5 ns 27 %	$k_r = 0.43 \text{ ns}^{-1}$

TabelleVI-5 Lebensdauern, relative Amplituden und dazu korrespondierende Ratenkonstanten zur Beschreibung der Fluoreszenzkinetik von Spinat und *Synechococcus el.* Kernkomplexen für ein PS II Modell mit geschlossenem RZ und zwei parallelen relaxierten Radikalpaaren. ΔG^0 wurde mit $\Delta G^0 = k_B T \ln(k_{ij}/k_{ji})$ berechnet.

Tabelle VI-5 zeigt die Ergebnisse der Modellierung mit zwei parallelen relaxierten Radikalpaaren. Alle anderen Annahmen sind identisch zu dem seriellen Modell. Wie erwartet, sind die Raten der primären Ladungstrennung k_{21} und der Rekombination k_{12} nicht beeinflusst durch die Annahme von parallelen oder seriellen relaxierten Radikalpaarzuständen. Ein interessanter Aspekt ergibt sich für das energetische Niveau der relaxierten Radikalpaare. Eines von ihnen liegt 11.5 meV bzw. 14.1 meV über dem des primären Radikalpaares und ist damit kein „relaxiertes“ Radikalpaar. Bis jetzt kann dieses Modell aber nicht ausgeschlossen wer-

den. Es existieren keine experimentellen Ergebnisse oder theoretischen Argumente, die eines der beiden Modelle ausschließt. In dieser Arbeit wird der Einfachheit halber aber nur noch das serielle Relaxationsmodell weiter betrachtet.

VI. 2 Modellierung der transienten Absorptionsdaten

In diesem Abschnitt wird mit den transienten Absorptionsdaten von Spinat Kernkomplexen mit geschlossenen RZ¹⁵⁵ gezeigt, daß der erste Zustand, der aus $(AP)^*$ gebildet wird, P^+Pheo^- ist. Dabei wird die Methode der Targetanalyse genutzt um die *species-associated difference spectra* (SADS) dieser Zustände¹⁵⁶ zu ermitteln und die Zustände damit zu identifizieren.

Wie in Abschnitt V.5 wird die Analyse zweigeteilt. Zuerst wird sie in einem Fitfenster bis 300 ps wegen der dort größeren Datenpunktdichte mit einem vereinfachten Modell durchgeführt und dann auf ein 2 ns Fenster ausgedehnt.

VI.2.1 Modellierung der Daten bis 300 ps

Die Transienten wurden im Zeitbereich bis 300 ps mit einer Schrittweite von $\Delta t = 2$ ps aufgenommen. Die Analyse als Summe von Exponentialfunktionen ergab eine Rechtfertigung der Beschreibung mit 4 Komponenten: 3 ps, 57 ps, 190 ps und 2.1 ns, wobei die 3 ps Komponente dem Äquilibrierungsprozeß zugeordnet werden konnte. Bei Fits im langen Zeitbereich spaltet sich die 2.1 ns Komponente weiter in 1.7 ns und 5.4 ns auf. Das Hauptinteresse liegt aber in der Zuordnung der 57 ps Komponente, die dem gleichen Prozeß wie die 40 ps Komponente aus der Fluoreszenz zugeordnet wurde. Die 40 ps Komponente wurde als Einstellen des Gleichgewichts der primären Ladungstrennung interpretiert. Als Grundlage der Zuordnung soll das in der Fluoreszenz erfolgreich eingesetzte Modell der relaxierten Radikalpaare verwendet werden. Auf Grund der fehlenden Auflösbarkeit der beiden langsamen ns Komponenten in diesem Fitfenster wird das Modell aus Abbildung VI-4 vereinfacht und nur ein relaxiertes Radikalpaar betrachtet.¹⁵⁷

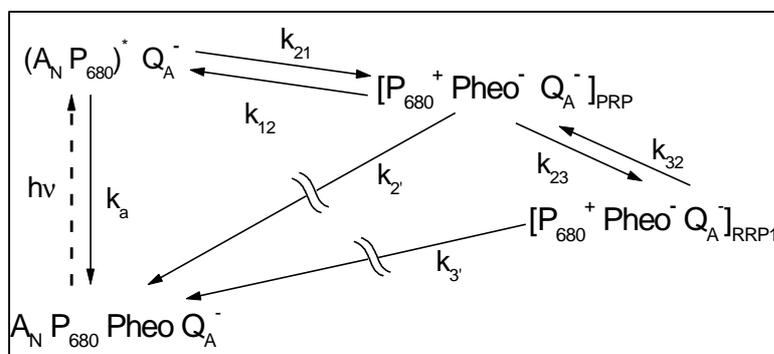


Abbildung VI-7

Vereinfachtes Modell für PS II mit geschlossenem RZ mit nur einem relaxierten Radikalpaarzustand zur Modellierung der Absorptionsdaten bis 300 ps.

¹⁵⁵ Daten siehe Abschnitt V.5.

¹⁵⁶ Siehe Abschnitt III.4.3.

¹⁵⁷ Siehe Abbildung VI-7.

Diese Vereinfachung wird zwar die Ratenkonstanten zwischen den Radikalpaarzuständen und deren relative Besetzung beeinflussen, nicht aber die Ratenkonstanten der primären Ladungstrennung und die spektrale Form der SADS.

Die Targetanalyse auf Grundlage dieses Modells sollte also die spektrale Form des Differenzspektrums von $P680^+Pheo^-/P680Pheo$ ergeben. Folgende weitere Annahmen wurden gemacht: Wie in der Modellierung der Fluoreszenzdaten wird die Relaxation von $(AP)^*$ mit $k_a = 0.3 \text{ ns}^{-1}$ festgesetzt und der Zerfall der Radikalpaare $k_2 = k_3$ gesetzt. Weiterhin wurde die Anfangsamplitude der Bildung von $(AP)^*$ zugeordnet, da nur dieser direkt angeregt wird. Aus programmtechnischen Gründen mußte auf die Einbeziehung der Äquilibration Komponente in die Modellierung verzichtet werden. Anpassungen der Daten mit Exponentialfunktionen ohne diese Komponente zeigen aber, daß der Einfluß auf Zerfallszeiten und DAS der anderen Komponenten sehr gering und diese Vernachlässigung vertretbar ist.

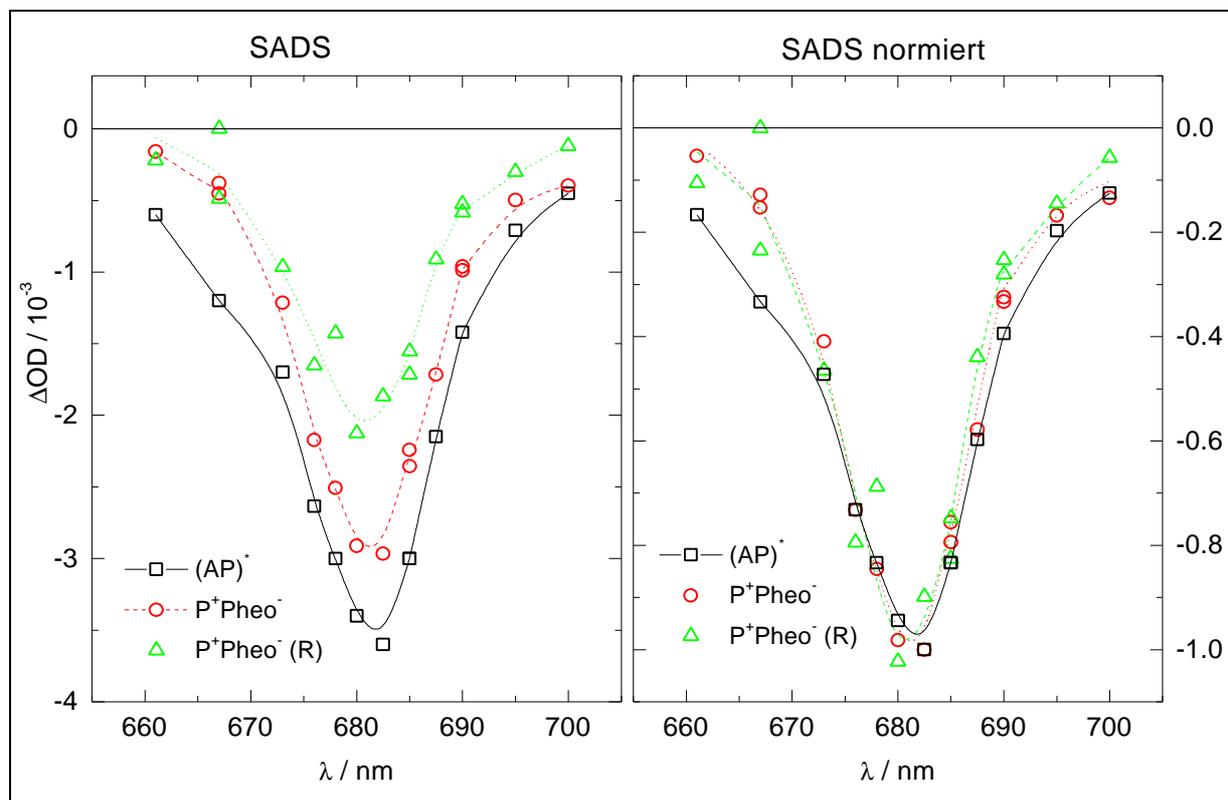


Abbildung VI-8 links: SADS der beteiligten Zustände $(AP)^*$, des primären und des relaxierten Radikalpaars, ermittelt aus der Targetanalyse der Absorptionsdaten bis 300 ps von Spinatkernkomplexen mit geschlossenem RZ auf Grundlage des oben beschriebenen Modells. rechts: SADS normiert zum Vergleich der spektralen Form

Abbildung VI-8 zeigt die so ermittelten SADS für $(AP)^*$, das primäre und das relaxierte Radikalpaar. Durch die Vereinfachung des Modells werden die relativen Besetzungszahlen der Radikalpaare verfälscht und damit auch die relativen Amplituden der SADS zueinander. Um einen Vergleich der spektralen Form der SADS vornehmen zu können, wurden sie in Abbildung VI-8 rechts normiert. Zu sehen ist, daß die spektrale Form der Radikalpaarzustände im

Rahmen der Fehlergrenzen gleich ist. Das ist nicht verwunderlich, da die elektronische Struktur der beiden Zustände sich nicht geändert hat außer einer wahrscheinlichen Proteinrelaxation. Für die beiden Zustände wird somit nicht nur die gleiche spektrale Form, sondern auch die gleiche Amplitude angenommen, die aber aus oben genannten Gründen verfälscht ist.

Deutlich sichtbar ist der Unterschied zwischen $(AP)^*$ und den Radikalpaarzuständen, besonders um 665 nm und 695 nm herum. Weiterhin ist die Bande von $(AP)^*$ um 682 nm deutlich breiter und das Maximum zu den Radikalpaarzuständen um ca. 2 nm rot verschoben. Das SADS von $(AP)^*$ hat drei wesentliche Beiträge:¹⁵⁸

- Die Absorption des angeregten Zustandes $(AP)^*$, die positiv in das ΔOD Signal eingeht. Da hier keine Vergleichdaten von *in vivo* Messungen in der Literatur vorhanden sind, wird das Spektrum von $^1Chl_a^*$ *in vitro* [Shepanski und Anderson (1981)] zum Vergleich herangezogen. Es ist relativ unstrukturiert für $\lambda > 500$ nm mit $\epsilon < 4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und trägt somit nicht zur Form des SADS bei. Dies steht in guter Übereinstimmung mit ΔOD Spektren aus dem S_1 Zustand von Tetraphenylporphyrinen [Rimke (1996)] und theoretischen ab initio Berechnungen der Oszillatorstärken von Metallporphyrinen [Tobita *et al.* (1984)].
- Die Grundzustandsabsorptionsbleichung, verursacht durch die geringere Besetzung des Grundzustandes und damit geringerer Absorption. Sie hat einen negativen Beitrag zu ΔOD . Deren spektraler Verlauf und Extinktionskoeffizienten sind dem des Grundzustandsabsorptionsspektrums identisch.
- Die stimulierte Emission aus dem angeregten Singulettzustand stimmt mit ihrem spektralen Verlauf dem des stationären Fluoreszenzspektrums überein. Der Emissionsquerschnitt berechnet sich nach Gleichung (II-16). Sie geht negativ in das ΔOD Spektrum ein, da sie das Meßlicht verstärkt und ist der dominante Beitrag des negativen Signals im langwelligen Bereich der Messung.

Grundzustandsabsorptionsbleichung und stimulierte Emission dominieren das SADS von $(AP)^*$ im gemessenen Spektralbereich zwischen 661 und 700 nm, das durchweg eine negative Amplitude hat. Das Maximum ist bei 682 nm, also klar rotverschoben zum Grundzustandsabsorptionsmaximum von 674 nm und blauverschoben zum Maximum der stationären Fluoreszenz bei 684 nm.

Das SADS von P^+Pheo^- hat nur Beiträge der Grundzustandsabsorptionsbleichung von $P680$ und $Pheo$ und von dem Absorptionsspektrum des Zustandes P^+Pheo^- . Stimulierte Emission kann es aus diesem Zustand nicht geben. Ein naheliegender Versuch wäre, dieses Spektrum

als Zusammensetzung der ΔOD Spektren von $P680^+/P680$ [z. B. Schlodder *et al.* (1984), Nuijs *et al.* (1986), Hillmann und Schlodder (1995a)] und von $Pheo^-$ [Klimov und Krasnovskii (1982)] zu betrachten. Doch Ganago *et al.* (1982) und Breton (1990) zeigten einen starken Einfluß von elektrochromen Shifts auf das $Pheo^-/Pheo$ ΔOD -Spektrum, den sie $P680^+$ zuordneten. Ähnliche Einflüsse von elektrochromen Shifts, z. B. durch $Pheo^-$, sind für die veröffentlichten $P680^+/P680$ Spektren zu erwarten.

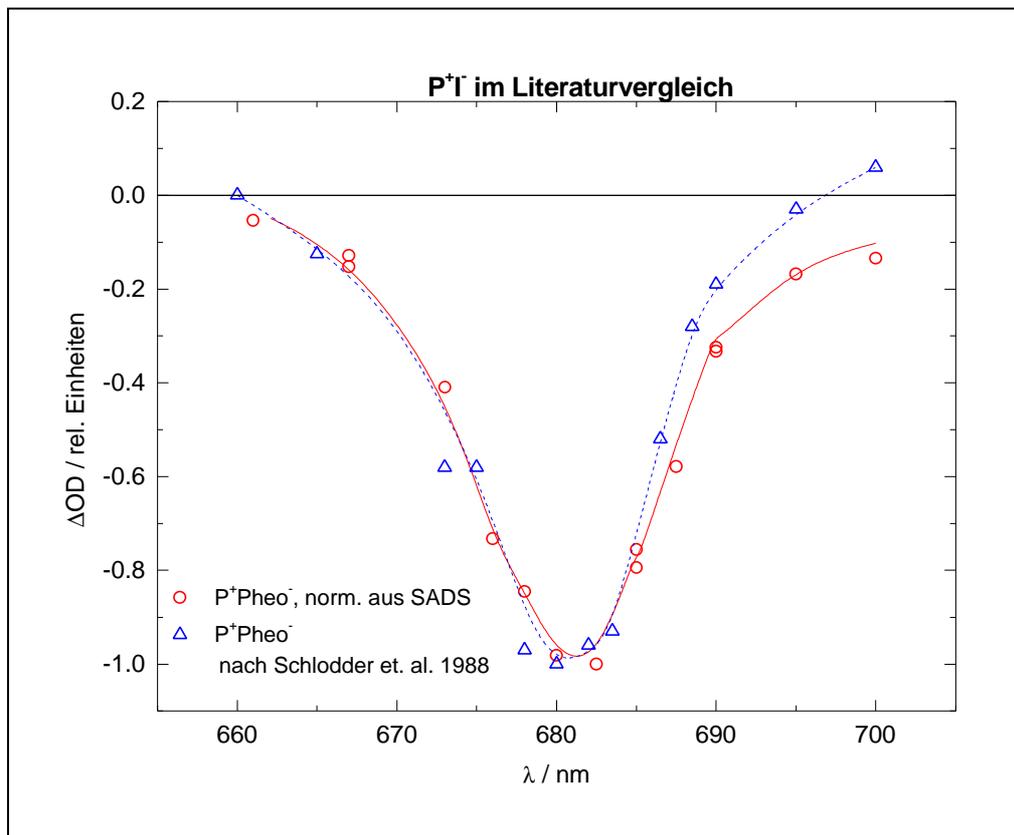


Abbildung VI-9 Vergleich des SADS des primären Radikalpaares aus der Analyse bis 300 ps mit P^+Pheo^- Absorptionsdifferenzspektrum aus *Synechococcus el.* Kernkomplexen nach Schlodder und Brettel (1988).

Deshalb ist eine Zerlegung des gemessenen Spektrums und Vergleich mit den Literaturwerten in dieser Art nicht möglich. Somit ist die einzige Möglichkeit der direkte Vergleich mit anderen Spektren von P^+Pheo^- , die mit unabhängigen Methoden ermittelt wurden, wie z. B. Schlodder und Brettel (1988), die den Zerfall einer 16 ns Komponente in geschlossenen Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* P^+Pheo^- zuordnen. P^+Pheo^- Spektren wurden auch aus transienten Absorptionsmessungen an isolierten PS II Reaktionszentren [z. B. Durrant *et al.* (1993), Müller *et al.* (1996)] ermittelt. Da die PS II Reaktionszentrumpräparationen nicht mehr vollständig intakt sind, ist es nicht ausgeschlossen, daß die dort ermittelten Spektren von denen in den voll funktionsfähigen PS II Kernkomplexen abweichen. So fehlt u. a. Q_A^- , das

¹⁵⁸ Vgl. Gleichung II-13.

einen elektrochromen Shift in den P^+Pheo^- -Spektren induzieren könnte. Deshalb werden sie nicht zum Vergleich herangezogen.

Abbildung VI-9 zeigt den Vergleich des SADS des primären Radikalpaares mit dem ΔOD Spektrum von $P^+Pheo^-/P\ Pheo$ ermittelt durch Schlodder und Brettel (1988). Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung der Spektren zwischen 661 nm und 685 nm. Für $\lambda > 685$ nm gibt es Unterschiede in den Spektren, die noch nicht geklärt werden konnten. Trotzdem läßt sich aus diesem Vergleich und dem mit dem Spektrum von $(AP)^*$ mit großer Sicherheit der hier gemessene Zustand zu $P^+Pheo^-/P\ Pheo$ zuordnen.

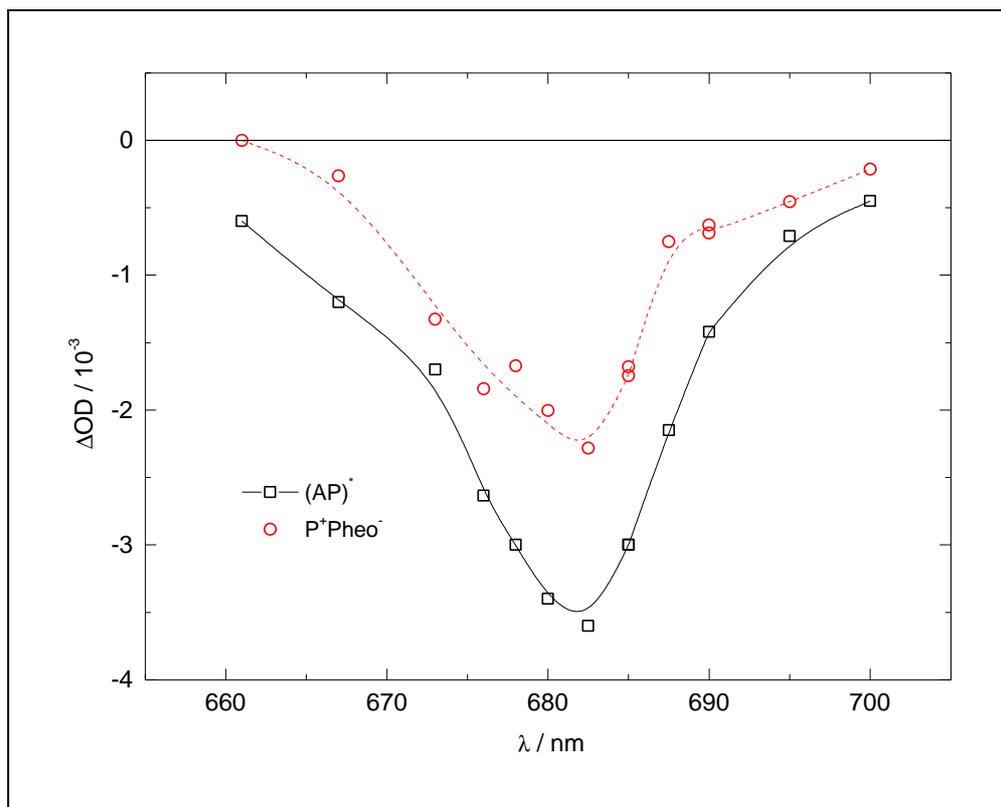


Abbildung VI-10 SADS von $(AP)^*$ und des Radikalpaares erhalten aus einer Targetanalyse der Absorptionsdaten in einem 2 ns Fenster mit dem Modell der zwei seriellen relaxierten Radikalpaarzustände. Die SADS der drei Radikalpaarzustände wurden gleich gesetzt, siehe Text.

Die ermittelten Ratenkonstanten aus der Targetanalyse für die primäre Ladungstrennung und die Rekombination sind $k_{21} = 8.7 \text{ ns}^{-1}$ und $k_{12} = 13.0 \text{ ns}^{-1}$. Im Vergleich dazu sind die Ratenkonstanten ermittelt aus der Fluoreszenz am gleichen System¹⁵⁹ $k_{21} = 8.7 \text{ ns}^{-1}$ und $k_{12} = 15.6 \text{ ns}^{-1}$. Dies stellt eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Ergebnisse dieser komplementären Meßmethoden dar. Es konnte nachgewiesen werden, daß die schnelle Zerfallskomponente von 40-45 ps in der Fluoreszenz und 57 ps in der Absorption tatsächlich dem primären Ladungstransfer in PS II mit geschlossenen RZ zuzuordnen ist. Somit ist dies eine

¹⁵⁹ Siehe Abschnitt VI.1.2.

vergleichbare apparente Einstellzeit des Gleichgewichts zwischen dem angeregten Zustand und der primären Ladungstrennung wie in PS II mit offenen RZ (45 ps).

VI.2.2 Auswertung der Absorptionsdaten im 2 ns Fenster

Wie im letzten Abschnitt diskutiert, ist in dem Fitfenster bis 300 ps zwar eine Auswertung der schnellen Prozesse mit großer Genauigkeit möglich, insgesamt mußten aber Vereinfachungen im Vergleich zum in der Fluoreszenz diskutierten Modell von zwei relaxierten Radikalpaarzuständen gemacht werden. Um hier eine Konsistenz in der Beschreibung der Daten zu erreichen, wird das Fitfenster auf 2 ns ausgedehnt und das Modell der zwei seriellen relaxierten Radikalpaare¹⁶⁰ für die Auswertung angewandt. Wie diskutiert, ist in dem langen Zeitbereich die Meßpunktdichte und damit die Zuverlässigkeit der Daten geringer.

Es konnte in Abschnitt VI.2.1 gezeigt werden, daß sich die spektrale Form der SADS der relaxierten Radikalpaare in dem vereinfachten Modell einander ähneln und diskutiert, daß die SADS nahezu identisch zueinander sein müßten, da außer Relaxation der Proteinumgebung keine Änderung des Systems erwartet wird. Daher wird das Modell der zwei seriellen relaxierten Radikalpaare verwendet und die SADS der drei Radikalpaarzustände gleichgesetzt, um die Freiheitsgrade des Fits einzuschränken. Abbildung VI-10 zeigt die SADS von (AP)^{*} und die der drei Radikalpaarzustände von P⁺Pheo⁻. Dabei ist die Fläche unter dem SADS von (AP)^{*} um den Faktor 1.8 größer als die unter P⁺Pheo⁻. Der Hauptgrund für diesen starken Unterschied ist die stimulierte Emission, die in (AP)^{*} zur Verstärkung des Signals beiträgt und dessen Emissionsquerschnitt vergleichbar mit dem Absorptionsquerschnitt der Grundzustandsabsorption der Q_y Bande ist. Eine kurze Abschätzung soll dies verdeutlichen: Die Dipolstärke von Pheo, Pheo⁻, Chl⁺ und Chl^{*} betragen relativ zu Chl in der Q_y Bande 60 %, 26 % [Fujita *et al.*(1978)], 28 % [Chauvet und Viovy (1981)] und 35 % [Shepanski und Anderson (1981)]. Das ergibt für das ΔOD von Chl^{*} (mit Grundzustandsabsorptionssättigung, induzierter Absorption und stimulierter Emission) eine negative Bande von ca. $1 - 0.35 + 1 = 1.65$ fache der Absorptionssättigung des Grundzustandes. Für P⁺Pheo⁻ mit P⁺ als Chl⁺ berechnet sich $((1 - 0.28) + (0.60 - 0.26)) = 1.06$ der Grundzustandsabsorptionssättigung von Chl. Zusammen ergibt dies 1.6 und entspricht damit annähernd dem gemessenen Flächenverhältnis der beiden SADS bei der Q_y Bande. Dies ist eine weitere Unterstützung für die Zuordnung der SADS zu P⁺Pheo⁻. Das SADS von P⁺Pheo⁻ ist weiterhin im Rahmen des Signal/Rausch Verhältnisses in seinem spektralen Verlauf identisch zu dem, das in dem 300 ps Fenster ermittelt wurde.

¹⁶⁰ Siehe Abbildung VI-4.

Tabelle VI-6 zeigt die aus der Targetanalyse ermittelten Ratenkonstanten für das Modell mit zwei relaxierten Radikalpaaren.¹⁶¹ Verglichen mit den Ratenkonstanten der primären Ladungstrennung k_{21} und der Rekombination k_{12} aus dem vereinfachten Modell des Fits bis 300 ps zeigt eine Übereinstimmung, so daß der Ansatz der Zweiteilung der Auswertung gerechtfertigt ist.

Raten / ns ⁻¹	k_{21}	K_{12}	k_{32}	k_{23}	k_{43}	k_{34}	k_a (fix)	k_r
	8.7	13.0	3.6	1.3	1.7	0.40	0.30	0.38

Tabelle VI-6 Ratenkonstanten für das PS II Modell für geschlossene RZ mit zwei seriellen relaxierten Radikalpaaren für Absorption.

Die Schlußfolgerung aus der Modellierung der Absorptionsdifferenzdaten ist, daß das Zerfallsprodukt des schnellen Zerfalls von (AP)^{*} in geschlossenen PS II dem primären Radikalpaar zugeordnet werden kann. Eine hohe Konsistenz der Ergebnisse aus zeitaufgelösten Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen wurde erreicht, die abschließend im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

Die in der transienten Absorption detektierten 16 ns und der für die bis 100 ns durchgeführten Messungen konstante Hintergrund haben zusammen ca. 20 % Anteil an der Gesamtamplitude bei 680 nm, die durch das Modell der zwei relaxierten Radikalpaare nicht erklärt werden. Ein Modell, das auch diese Effekte beschreibt, müßte um mindestens dieses relaxierte Radikalpaar erweitert und auch die Bildung des Triplets ³P680 berücksichtigt werden. Der in 100 ns nicht zerfallende Hintergrund von 4.5 % der Anfangsamplitude bei 680 nm ist nach 2.4 µs auf 1.0 % abgefallen. Hierbei könnte es sich um das Triplet oder eine weitere Radikalpaarrelaxation handeln. Für den weiteren Ausbau des Modells fehlen allerdings die genaueren Meßdaten im ns bis µs Zeitbereich. Für Modelle zur Erklärung der ns bis µs Kinetik an geschlossenen PS II Kernkomplexen für langsame relaxierte Radikalpaare siehe Schlodder und Brettel (1988), und für die Tripletbildung und Zerfall siehe Van Mieghem *et al.* (1995).

VI.3 Diskussion und Interpretation der Modellierung

Trap Limitierung

Es wurden annihilationsfreie zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an PS II Kernkomplexen aus *Synechococcus el.* und Spinat mit offenen und geschlossenen RZ bei verschiedenen Anregungs- und Detektionswellenlängen und Absorptionsdifferenzmessungen an PS II Kernkomplexen aus Spinat mit geschlossenen RZ bei verschiedenen Detektionswellenlängen durchgeführt und die Kinetiken modelliert. Die Fluoreszenzmessungen stellen die erste Studie der

¹⁶¹ Siehe Abbildung VI-4.

Anregungswellenlängenabhängigkeit der Fluoreszenzkinetik von PS II Kernkomplexen dar. Dabei konnte zum ersten Mal eine Energietransferkomponente für alle Fluoreszenz- (6-10 ps) und Absorptionsdifferenzmessungen (3 ps) detektiert werden. Sie ist über den Anstieg der Akzeptorfluoreszenz und den Abfall der Fluoreszenz des Donators zur gleichen Zeit, bzw. Anstieg und Abfall der Grundzustandsabsorptionsbleichung identifizierbar. In der Fluoreszenz haben alle DAS langsamerer Komponenten eine spektral gleiche Form unabhängig von der Anregungswellenlänge und dem Redoxzustand der Probe. Daraus läßt sich schließen, daß die Fluoreszenz von 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 und die Zerfallsprozesse unabhängig von der Anregungswellenlänge sind, ist die Ladungstrennungskinetik nicht *transfer*-limitiert¹⁶². Eine mögliche Limitierung stellt die *transfer-to-the-trap* Limitierung dar. Sie besagt, daß die 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 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 bestätigt werden.

Konsequenzen aus der Modellierung der gemessenen Kinetiken

Das *excited state-radical pair equilibrium* Modell von Schatz et al. (1988)¹⁶³, das auf einer *trap* Limitierung der Ladungstrennung und einem Gleichgewicht zwischen dem angeregten Zustand (AP)^{*} und dem primären ladungsgetrennten Zustand P⁺Pheo⁻ beruht, wird auf die Fluoreszenzkinetik offener RZ erfolgreich angewandt, da nur zwei signifikante Fluoreszenzzerfallskomponenten detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist eine Erweiterung des Modells um zwei relaxierte Radikalpaare für geschlossene RZ notwendig, um vier signifikante Fluoreszenzkomponenten erklären zu können. Diese vier Zerfallskomponenten und das erweiterte Modell führen auch zu einer adäquaten Beschreibung der Absorptionsdifferenzkinetiken. Die Messungen an geschlossenen RZ ergeben erstmals eine schnelle 40-45 ps Komponente

¹⁶² Siehe Abschnitt I.1.3.

¹⁶³ Siehe Abbildung VI.1.

(30 %) in der Fluoreszenz und 57 ps in der Absorption, die vergleichbar mit der 45 ps Komponente (75-78 % in der Fluoreszenz) in offenen RZ ist. Die Targetanalyse der Absorptionsdifferenzmessungen an geschlossenen PS II Kernkomplexen aus Spinat zeigt, daß diese Komponente eindeutig der Einstellung des Gleichgewichts zwischen (AP)^{*} und P⁺Pheo⁻ zuzuordnen ist¹⁶⁴. Weiterhin sind die SADS der Targetanalyse eine Bestätigung des angewandten Modells der relaxierten Radikalpaare für geschlossene RZ.

Primäre Ladungstrennung

	Offene RZ		Geschlossene RZ		
	<i>Synechococcus el.</i>	Spinat	<i>Synechococcus el.</i>	Spinat	Spinat, Absorption
k_{21} / ns^{-1}	19.4	19.2	7.9	8.7	8.7
k_{12} / ns^{-1}	2.4	2.0	11.1	15.6	13.0
$\Delta G^0 / \text{meV}$	-53	-54	8.7	13.9	10.6

Tabelle VI-7 Ratenkonstanten der primären Ladungstrennung und Rekombination sowie die sich daraus ergebende freie Reaktionsenthalpie ΔG^0 für offene und geschlossene RZ von *Synechococcus el.*- und Spinatpräparationen. Die Ratenkonstanten wurden aus den Modellierungen der Fluoreszenz- und der Absorptionsdifferenzkinetiken gewonnen.

Tabelle VI-7 zeigt die berechneten Ratenkonstanten der primären Ladungstrennung und Rekombination aus den Modellierungen der Fluoreszenz- und Absorptionskinetiken für offene und geschlossene RZ. Der Vergleich der Ratenkonstanten der Ladungstrennung k_{21} ergibt starke Übereinstimmung zwischen den beiden Präparationen aus *Synechococcus el.* und Spinat für jeweils offene und geschlossene Systeme. Dies gilt auch für die Rekombinationsrate k_{12} in offenen RZ, während in geschlossenen RZ k_{12} für *Synechococcus el.* 30 % kleiner als für Spinat ist.

Die intrinsische Ladungstrennungsrate k_{CS} kann unter bestimmten Modellannahmen über den Charakter von P680^{*} mit den Gleichungen I-8 und I-9 näherungsweise aus der apparenten Ladungstrennungsrate berechnet werden. Über eine Gaußbandenzerlegung der 5 K- Absorptionsspektren der PS II Kernkomplexe aus Spinat und *Synechococcus el.*¹⁶⁵ berechnet sich (Gleichung I-8) die effektive Antennengröße $N_{\ddot{A}q}$ bei Raumtemperatur zu 37 Chl für *Synechococcus el.* und 33 Chl für Spinat. Daraus folgt bei einem monomeren Charakter von P680^{*} für die intrinsische Ladungstrennungsrate offener RZ $k_{CS} = k_{21} * N_{\ddot{A}q}$ (nach Gleichung I-9) $(1.4 \text{ ps})^{-1}$ für *Synechococcus el.* und $(1.7 \text{ ps})^{-1}$ für Spinat. Für die Annahme einer dimeren Struktur von P680^{*} mit doppeltem Extinktionskoeffizienten im Vergleich zu Chl ist k_{CS} mit $(2.9 \text{ ps})^{-1}$ bzw. $(3.3 \text{ ps})^{-1}$ nur halb so groß.

Beim Schließen der RZ findet sowohl eine starke Verringerung der Ladungstrennungsrate k_{21} um den Faktor 2.5 als auch ein starker Anstieg in der Ladungsrekombinationsrate k_{12} um

¹⁶⁴ Siehe Abbildung VI-9.

¹⁶⁵ Siehe Abb. IV-2.

den Faktor 7-8 für Spinat und den Faktor 5 in *Synechococcus el.* statt. Bisher veröffentlichte Messungen und Modellierungen der Kinetik zeigen auf Grund eines geringeren Signal/Rausch Verhältnisses nur eine starke Änderung der Ladungstrennungsrate k_{21} und kaum Einfluß auf die Ladungsrekombination (k_{12}) [Schatz *et al.* (1988)]. Die hier erzielten Ergebnisse haben eine grundsätzlich neue Interpretation der Fluoreszenzeigenschaften von PS II zur Folge¹⁶⁶. Aus dem Verhältnis der Ratenkonstanten k_{21} und k_{12} ergibt sich nach Gleichung II-8 die freie Reaktionsenthalpie der Ladungstrennungsreaktion. Danach ändert sich mit Schließen der Reaktionszentren die energetische Lage des primären ladungsgetrennten Zustands relativ zu der von $(AP)^*$ um 65-68 meV für Spinat und um 63 meV für *Synechococcus el.* Dabei verschiebt sich die energetische Lage des primären ladungsgetrennten Zustandes so weit, daß sie über der von $(AP)^*$ liegt.

Der Einfluß des Redoxzustandes von Q_A auf die Rate und Ausbeute der Bildung von P^+Pheo^- wird als Folge des elektrischen Feldes diskutiert, das bei geschlossenen RZ durch die Ladung auf Q_A^- aufgebaut wird. Eine einfache Abschätzung soll die Energiedifferenz durch das Coulombpotential, aufgebaut von der negativen Ladung auf Q_A^- , über Annahmen von Punktladungen berechnen. Da noch keine detaillierten Strukturinformationen über PS II vorhanden sind, werden folgende Daten verwendet: Der Abstand zwischen P680 und Q_A wurde über ESEEM-Messungen der Spindichtezentren des ladungsgetrennten Zustands $P680^+Q_A^-$ mit 27 Å [Hara *et al.* (1997)] bzw. 27.7 Å [Zech *et al.* (1999)] bestimmt. Auf Grund der angenommenen Strukturanalogien zwischen dem bakteriellen RZ und dem von PS II wird der Abstand $d_{PheoQ_A} = 17$ Å aus der Struktur der bakteriellen RZ [Deisenhofer *et al.* (1984)] verwendet. Mit einer homogenen relativen Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 4.5$, ermittelt über Membrankapazität und -dicke [Schatz *et al.* (1988)], berechnet sich eine Differenz der freien Reaktionsenthalpie für die primäre Ladungstrennung offener und geschlossener RZ von $\Delta E = 70$ meV. Schnelle Photovoltaikmessungen an PS II Membranen [Trissl und Leibl (1988)] ergeben andere (dielektrisch gewichtete) Abstände: für P680Pheo 58 % und für Pheo Q_A 42 % des Abstandes P680 Q_A , allerdings projiziert auf die Membrannormale. Daraus würde sich ein $\Delta E = 160$ meV ergeben. Prinzipiell haben beide Ergebnisse die richtige Größenordnung für die hier ermittelte Änderung der freien Reaktionsenthalpie aus den Kinetiken der PS II Kernkomplexe. Eine sehr gute Übereinstimmung wird mit der Annahme von $d_{PheoQ_A} = 17$ Å erzielt. Es muß aber betont werden, daß sowohl der Wert für ϵ als auch für den Abstand Pheo Q_A nur Näherungswerte sind. Trotzdem kann aus der Abschätzung geschlossen werden, daß das elektrische Feld ausgehend von Q_A^- die wesentliche Ursache für die Än-

¹⁶⁶ Siehe unten.

derung der Ratenkonstanten der primären Ladungstrennung und des Anstiegs der Fluoreszenzintensität bei Schließen der RZ ist.

Die starke Änderung der Raten k_{21} und k_{12} beim Schließen der RZ kann somit mit dem Coulombfeld, das von Q_A^- aufgebaut wird, erklärt werden. Durch diese elektrostatische Abstoßung ist ein starker Einfluß auf Vor- und Rückrate der primären Ladungstrennung zu erwarten. Der große Anstieg der stationären Fluoreszenzintensität für geschlossene Zentren ist demnach nicht, wie nach Schatz *et. al.* (1988), nur auf die prompte Fluoreszenz der Antenne wegen der stark verringerten Ladungstrennungseffizienz zurückzuführen. Die Einteilung in prompte und verzögerte Fluoreszenz ist inadäquat, da sich sowohl k_{21} als auch k_{12} stark ändern und damit der Fluoreszenzanstieg nicht auf einen der beiden limitierenden Fälle zurückzuführen ist.

Radikalpaarrelaxation

Die Auswertung der Kinetiken von geschlossenen PS II zeigt, daß die Relaxation des Radikalpaares in intakten PS II Systemen mit geschlossenen RZ schon im sub-ns Bereich wie in bakteriellen Systemen oder PS II RZ stattfinden. Weiterhin ist ersichtlich, daß das Einstellen des Gleichgewichts zwischen primärem Radikalpaar und erster Relaxationsstufe mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit wie die Ladungsstabilisierung ($P^+Pheo^-Q_A \rightarrow P^+PheoQ_A^-$) in offenen RZ stattfindet. Obwohl in offenen RZ andere elektrische Felder als in geschlossenen RZ herrschen, sind auch dort ähnlich Relaxationen des primären Radikalpaares wie in geschlossenen RZ nicht ausgeschlossen. Bisher wurden solche Relaxationen in offenen RZ nicht diskutiert, da in PS II nur ns Komponenten den Relaxationen des primären Radikalpaares zugeschrieben wurden, die weit langsamer als die der Ladungsstabilisierung sind. Allerdings geben die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen an offenen RZ Hinweise auf schnelle Relaxationsprozesse in diesem Zeitbereich. Wie in Abschnitt VI.1.1 diskutiert, läuft der Prozeß, der mit der Ladungsstabilisierung in Verbindung gebracht wird, etwas schneller ab (180-230 ps) als die in der Literatur diskutierten Zeiten von 350 ± 100 ps [Eckert *et al.* (1988)], gemessen über die Bildung von Q_A^- mittels Absorptionsdifferenzspektroskopie bei 320 nm, und 250-300 ps [Nuijs *et al.* (1986)] über Messung der Reoxidation von $Pheo^-$. Eine Erklärung dafür wäre ein schnelle Relaxierung des primären Radikalpaars, die die Kinetik der Ladungsstabilisierungsreaktion überlagert.

Vergleich von Fluoreszenz- und Absorptionsmodellierung

Tabelle VI-8 zeigt die aus der Targetanalyse ermittelten Ratenkonstanten für das Modell für geschlossene RZ mit zwei seriellen relaxierten Radikalpaaren,¹⁶⁷ ermittelt aus Absorptiondifferenz- und Fluoreszenzkinetiken der Spinatpräparation. Für die Ratenkonstanten der primären Ladungstrennung k_{21} , der Rekombination k_{12} und zum ersten relaxierten Radikalpaar k_{32} besteht eine sehr gute Übereinstimmung der aus den beiden Meßmethoden gewonnenen Daten. Für die anderen Ratenkonstanten ist die Abweichung relativ groß, was mit dem verwendeten Modell erklärt werden kann.

	Raten / ns ⁻¹ aus Absorption (2 ns Fenster)	Raten / ns ⁻¹ aus Fluoreszenz
k_{21}	8.7	8.7
k_{12}	13.0	15.6
k_{32}	3.6	3.2
k_{23}	1.3	2.8
k_{43}	1.7	1.0
k_{34}	0.4	0.12
k_a (fix)	0.3	0.3
k_r	0.38	0.20

Tabelle VI-8 Vergleich der Ratenkonstanten für das PS II Modell für geschlossene RZ mit zwei seriellen relaxierten Radikalpaaren, berechnet aus Absorptiondifferenz- und Fluoreszenzkinetiken von PS II Kernkomplexen aus Spinat.

Das benutzte Modell mit zwei relaxierten Radikalpaaren stellt eine sehr gute Beschreibung der Fluoreszenzdaten dar, da hier nur die Bevölkerung von $(AP)^*$ sichtbar ist. Die Absorptiondifferenzmessungen im längeren ns Zeitbereich¹⁶⁸ zeigen aber mindestens eine dritte Relaxationsstufe des Radikalpaares mit einer Lebensdauer von 16 ns. Durch die große Energiedifferenz zwischen diesem relaxierten Radikalpaarzustand und $(AP)^*$ ist die Wiederbevölkerung von $(AP)^*$ gering und die entsprechend kleine Amplitude einer solchen Komponente in der Fluoreszenz in einem Fenster von 5 ns nur schwer detektierbar. Die Schlußfolgerung daraus ist, daß das Modell für geschlossene RZ zur Beschreibung der ns Kinetik weiter ausgebaut werden muß. Die Erweiterung des Modells für die Absorptiondifferenzkinetiken hätte auch Auswirkungen auf vorhergehende Ratenkonstanten. Eine Möglichkeit ist die von Pelouquin *et al.* (1994) vorgeschlagene *time-dependent thermodynamics* als kontinuierliche Beschreibung statt einer immer weiter ausgebauten Relaxationsleiter für die Relaxierdynamik von P^+Pheo^- .

Ausblick

Die transienten Absorptionmessungen konnten nur an den PS II Kernkomplexen aus Spinat mit geschlossenen Zentren durchgeführt werden, die auf Messungen an offenen RZ ausgedehnt werden sollten. Ein Ziel der Messungen an offenen RZ ist die Detektion von Radikal-

¹⁶⁷ Siehe Abbildung VI-4.

¹⁶⁸ Siehe Abschnitt V.5.1.

paarrelaxationen, die möglicherweise in Konkurrenz zur Ladungsstabilisierung auftreten. Die PS II Kernkomplexpräparationen aus *Synechococcus el.* sind für diese Untersuchung geeignet. Weiterhin ist eine kombinierte Fluoreszenz- und Absorptionsdifferenzstudie an PS II Kernkomplexen mit doppelt reduziertem und protoniertem Q_AH_2 sinnvoll. P^+Pheo^- wird hier ungehindert gebildet, lebt aber lange, weil keine Ladungsstabilisierungsreaktion stattfinden kann und die Rekombinationsrate klein ist. Es gibt hier schon Hinweise auf Relaxationsprozesse im sub-ns Bereich aus zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen auf Grund multiexponentieller Zerfälle in diesem Zeitbereich. Transiente Absorptionsmessungen zur Bestätigung der Relaxationsprozesse in Proben mit Q_AH_2 wurden bisher aber nicht durchgeführt.

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 \AA wurden erzielt. Die Phasenbestimmung steht jedoch noch aus. Somit ist in den nächsten Jahren mit detaillierten Strukturinformationen zu rechnen, die die Lokalisierung der Chlorophylle und später dann auch die Orientierung der Molekülebenen und der Dipolmomente enthalten. Mit diesen Informationen wäre eine strukturgestützte Modellierung der Energietransferprozesse möglich, wie dies z. B. in PS I, für das eine Auflösung der Struktur von 4 \AA vorliegt [Schubert *et al.* (1997), Klukas *et al.* (1999)], für die Fluoreszenzkinetik durchgeführt wird [Byrdin *et al.* (1999), Gobets *et al.* (1998)]. Die kinetischen Modellierungen an PS I könnten auch Grundlage für PS II sein, da die Struktur der Reaktionszentrendomäne von PS I signifikant analoge Strukturen zu dem bakteriellen RZ aufweist [Schubert *et al.* (1998)], das eng verwandt mit dem von PS II ist.