

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Modifikationen am
Photosystem II-Reaktionszentrum:
Untersuchungen zu Austausch und
Rekonstitution von Chlorinkofaktoren**

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Andrea Zehetner

im Januar 2003

- 1. Berichtstatter: Prof. Dr. H. Scheer**
- 2. Berichtstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger**

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 2003

Endlich, Endlich, Endlich, Endlich, Endlich!
(Gabriel Baryli, Literat)

Wird auch Zeit!
(Frank T. Piller, Ökonom)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts der Ludwigs-Maximilians-Universität unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hugo Scheer durchgeführt. Ihm danke ich neben der Überlassung des Themas für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die motivierende Anleitung und wertvolle Anregung sowie die Freiheit bei der Ausgestaltung dieser Arbeit. Nicht zuletzt wegen ihm werde ich meine Zeit in der „Botanik“ sehr gut in Erinnerung behalten.

Ein besonderer Dank geht auch an meinen Kooperationspartner Herrn Dr. Frantisek Vacha (Südböhmische Universität, Budweis) für die Überlassung „seiner“ Reaktionszentren, die konstruktive Diskussion und die sehr freundliche Aufnahme in seinem Labor während mehrerer Forschungsaufenthalte. Mein herzlichster Dank geht auch an Herrn Dr. Pavel Siffel (Südböhmische Universität, Budweis), mit dem ich forschte, diskutierte und russische Zigaretten rauchte. Wir werden ihn vermissen.

Ebenso geht mein Dank an die Herren Prof. Avigdor Scherz (Weizman Institut in Rehovot, Israel) und Prof. Jean-Luc Popot (CNRS, Paris), die mich im Rahmen meiner Forschungsaufenthalte sehr freundlich in ihre Labore aufnahmen.

Für die vielfältige fachliche und moralische Unterstützung bedanke ich mich bei allen Kollegen – ausgenommen einem gewissen Paar – von denen viele Freunde geworden sind. Zu nennen sind Nina Kälin (jetzt Nina Kammhuber und stolze Mama vom Anton), Beate Ücker (die bald Dr.ücker sein wird), Heike Snigula (mein Lieblings-Heikel, die sich in manchen Stunden am Liebsten in der Ecke versteckte), Max Storf (der die Kunst des vorwürflichen Schwitzens beherrscht und so schön Löwe und Zitrone machen kann), Brigitte Wilhelm (die mit dem Cha-Cha-Bären und der Neigung, Schmuck in der Isar zu versenken), Ines Haame (immer zweifelnd und zweifelsohne besonders), Claudia Bubenzer-Hange (der Labor-Stileguide), Adela Garcia (der spanische Sonnenschein), Bernhard Gall (der den Strand bis ans Meer gehen läßt), Ingrid Simonin (die Tiger-TA mit ihrer lustigen und herzlichen Art) und Shinta (die „flotte Biene“).

Und ohne meiner Familie und meinen moralischen Stützen Friederike, Markus, Maria, Alrun, Susi und Frank gäbe es mit Sicherheit ein weiteres unvollendetes Werk ... Danke!

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	VI
A Einleitung	10
1 Die oxygene Photosynthese	10
2 Das Photosystem II.....	12
2.1 Proteine des Reaktionszentrums	13
2.2 Kofaktoren und Pigmente des Reaktionszentrums	15
2.2.1 Anzahl der Kofaktoren und Pigmente.....	15
2.2.2 Lage und Funktion der Pigmente	16
2.3 Energietransferwege im Reaktionszentrum	19
2.4 Modifizierungen am Reaktionszentrums des Photosystems II	21
3 Ziel der Arbeit.....	23
B Material und Methoden.....	24
1 Allgemeine Angaben	24
2 Spektroskopische Methoden.....	26
2.1 Allgemeine Bedingungen und Geräte	26
2.2 Messung der photochemischen Aktivität	27
3 Isolierung und Charakterisierung von 6-Chl PS II-RC.....	28
3.1 Isolierung	28
3.2 Proteinzusammensetzung	32
3.1.1 Denaturierende Polyacrylamidgel Elektrophorese	32
3.1.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese	33
3.1.3 Färbung der Proteingele	34
4 Modifikation der Reaktionszentren von Photosystem II	35
4.1 Pigment austausch an 6-Chl PS II-RC.....	35
4.2 Pigmentrekonstitution an 5-Chl PS II-RC.....	35
4.3 Aufreinigung nach Modifikation.....	36
4.3.1 Säulenchromatographische Aufreinigung	36
4.3.2 Aufreinigung durch Saccharose-Dichtegradienten- Zentrifugation	36
4.4 Pigmentextraktion und HPLC-Analyse.....	37
4.4.1 Pigmentextraktion.....	37
4.4.2 Pigmentanalyse.....	37

5 Stabilitätsuntersuchungen von 6-Chl PS II-RC in Amphipol	38
5.1 Allgemeines	38
5.2 Bestimmung der benötigten Amphipolmenge	39
5.3 Solubilisierungstest.....	39
5.3.1 Detergenzaustausch durch Verdünnen.....	39
5.3.2 Detergenzaustausch durch Biobeads	40
5.4 Messung der Langzeitstabilität	40
C Ergebnisse	41
1 Analytik und Spektroskopie an PSII-RC	41
1.1 Proteinzusammensetzung	41
1.2 Pigmentanalyse	43
1.2.1 Trennsystem.....	43
1.2.2 Kalibrierung des Trennsystems.....	46
1.2.3 Quantifizierung	50
1.3 Absorptionsspektroskopie.....	51
1.4 Fluoreszenzspektroskopie	54
1.5 Aktivitätsmessungen.....	57
1.5.1 Phe ⁻ -Akkumulierung	57
1.5.2 P680 ⁺ -Akkumulierung.....	58
1.6 CD-Spektroskopie.....	60
2 Verwendete Pigmente	61
2.1 Übersicht.....	61
2.2 Eichung der HPLC-DAD	67
3 Pigmentaustausch an 6-Chl PS II-RC.....	69
3.1 Transmetallierten Chlorophyllen	69
3.1.1 [Zn ²⁺]-Chlorophyll <i>a</i> und [Zn ²⁺]-Methylchlorophyllid <i>a</i>	69
3.1.1.1 Aufreinigung	69
3.1.1.2 Charakterisierung	74
3.1.2 [Ni ²⁺]-Chlorophyll <i>a</i>	79
3.2 Peripher modifizierte Chlorophyllen.....	81
3.2.1 [3-Acetyl]-chlorophyll <i>a</i> – Einfachaustausch	81
3.2.2 [3-Acetyl]-chlorophyll <i>a</i> -Doppelaustausch	85
3.2.3 [3-Acetyl]-Demethoxycarbonyl-Chlorophyll <i>a</i>	87
3.3 Bakteriochlorine und Porphyrine.....	89
3.3.1 [3-Vinyl]-bakteriochlorophyll <i>a</i> und Bakteriochlorophyll <i>a</i>	89
3.3.2 Protochlorophyll <i>a</i>	91
4 Pigmentrekonstitution an 5-Chl PS II-RC	94
4.1 Allgemeines	94
4.2 Chlorophyll <i>a</i>	95
4.2.1 Pigmentanalyse.....	95
4.2.2 Spektroskopie	96

Inhaltsverzeichnis

4.3 [Ni ²⁺]-Chlorophyll a, [3-Acetyl]-chlorophyll a und [Zn ²⁺]-Chlorophyll a	101
4.3.1 Pigmentanalyse.....	101
4.3.2 [Ni ²⁺]-Chlorophyll a rekonstituierte RC	103
4.3.3 [3-Acetyl]-chlorophyll a und [Zn ²⁺]-Chlorophyll a rekonstituierte RC	107
5 Aktivität und Stabilität von 6-Chl PS II-RC in Amphipolen	109
5.1 Allgemeines	109
5.2 Bedingungen des Detergenzaustauschs	111
5.3 Aktivitätsentwicklung.....	113
5.3.1 Allgemeines.....	113
5.3.2 Entwicklung der Aktivität bei 4 °C	114
5.3.3 Entwicklung der Aktivität bei 20 °C	115
5.3.4 Korrelation von „%P680“ und Phe ⁻ -Akkumulierungsrate	117
D Diskussion.....	119
1 „5- und 6-Chlorophyll Reaktionszentren“ von Photosystem II	119
1.1 Proteinzusammensetzung	119
1.2 Pigmentzusammensetzung.....	120
2 Austausch von Kofaktoren im 6-Chl PS II-RC.....	124
2.1 „eins-zu-eins“ Austausch	126
2.2 Kein Austausch.....	131
3 Rekonstitution der 5-Chl PS II-RC	132
4 Vergleich der Austausch- mit den Rekonstitutionsversuchen.....	136
5 Energieäquilibrierung und –transfer in modifizierten PS II-RC	137
6 Stabilität und Aktivität von PS II-RC in Amphipol.....	141
E Zusammenfassung	146
Literaturverzeichnis	148
Lebenslauf	160

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

5-Chl PS II-RC	Reaktionszentren des Photosystem II mit einem Pigmentgehalt von 5 Chlorophyll <i>a</i> pro 2 Pheophytin <i>a</i>
6-Chl PS II-RC	Reaktionszentren des Photosystem II mit einem Pigmentgehalt von 6 Chlorophyll <i>a</i> pro 2 Pheophytin <i>a</i>
Ac-Chl	[3-Acetyl]-chlorophyll <i>a</i>
Ac-Py-Chl	[3-Acetyl]-Demethoxycarbonyl-Chlorophyll <i>a</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphat –Synthase
BChl	Bakteriochlorophyll <i>a</i>
Car	β-Carotin
CD	Circulardichroismus
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Chl	Chlorophyll <i>a</i>
CMC	Kritische micellare Konzentration (critical micelle concentration)
Cyt <i>b</i> ₅₅₉	Cytochrom <i>b</i> ₅₅₉ -Komplex
D1-118H	Histidin 118 am D1-Protein des PS II-RC
DM	<i>n</i> -Dodecyl-β-D-maltosid
g	Erdbeschleunigung (9,81 m•s ⁻²)
HPLC-DAD	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatographie) kombiniert mit einer Diodenarray Detektion (Diode Array Detection)
kDa	Kilo Dalton
LHC II	Hauptantenne des Photosystems II (light harvesting complex)
Cyt <i>b</i> _{6f}	Cytochrom <i>b</i> _{6f} -Komplex
M	Molarität [mol•L ⁻¹]
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-Adenosin-Dinukleotid-Phosphat
Ni-Chl	[Ni ²⁺]-Chlorophyll <i>a</i>
OD	Optische Dichte
P680	Primärer Donor des Photosystem II Reaktionszentrum („Special Pair“)
P680 ⁺	Radikalkation des Primären Donors (P680)

Abkürzungsverzeichnis

PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
pb-RC	Reaktionszentrum der Purpurbakterien
Phe	Pheophytin <i>a</i>
Phe ^{•-}	Radikalanion des Pheophytins
PQ	Plastoquinon
Proto-Chl	Protochlorophyll <i>a</i>
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
PS II-RC	Reaktionszentrum des Photosystem II
RC	Reaktionszentrum
SDS	Natriumdodecylsulfat
SiMo	Silikomolybdat
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TX-100	Triton X-100
v/v	Volumen/Volumen
Vi-BChl	[3-Vinyl]-bakteriochlorophyll <i>a</i>
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
Zn-Chl	[Zn ²⁺]-Chlorophyll <i>a</i>
Zn-Me-Chlid	[Zn ²⁺]-Methylchlorophyllid

A Einleitung

1 Die oxygene Photosynthese

Der photosynthetische Gesamtprozess wird in Licht- und Dunkelreaktionen eingeteilt. In den Lichtreaktionen werden die zum Aufbau von Biomasse benötigten Energie- und Reduktionsäquivalente (ATP und NAD(P)H) erzeugt. Diese werden anschließend in der Dunkelreaktion zur Fixierung von CO₂ und der Synthese von Kohlenhydraten verwendet. Die Primärschritte der Lichtreaktionen (Lichtsammlung, Ladungstrennung und Aufbau eines Membranpotentials) erfolgen in der oxygenen wie der anoxygenen Photosynthese in den Photosystemen. Diese bestehen aus Pigmentproteinkomplexen, die entsprechend ihrer Funktion in Lichtsammlerkomplexe und Reaktionszentren eingeteilt werden. In ersteren, den sog. Antennenkomplexen, wird das Licht absorbiert und die Anregungsenergie an die Reaktionszentren¹ weitergeleitet, wo dann die Ladungstrennung stattfindet. An der oxygenen Photosynthese sind für die Lichtreaktion - im Gegensatz zur anoxygenen Photosynthese² - zwei in Serie geschaltete Photosysteme (PS) beteiligt, das PS I und PS II³, die unabhängig voneinander Lichtenergie zur Ausbildung eines ladungsgetrennten Zustands nutzen können. Diese Pigmentprotein-Komplexe sind in Thylakoidmembranen eingebettet, die sich je nach Organismus in unterschiedlichen Zellbereichen befinden: In den Cyanobakterien sind sie an der Zellmembran lokalisiert, während sie bei höheren Pflanzen und Algen in den Chloroplasten, d.h. eigenen Zellorganellen, zu finden sind.

Die photosynthetischen Pigment-Proteinkomplexe sind inhomogen über das Thylakoidsystem verteilt, wobei das Photosystem II (PS II) und dessen peripherer Lichtsammlerkomplex (LHC II) vorwiegend in den Granathylakoiden und das Photosystem I (PS I) mit dessen Antennenkomplex (LHC I) sowie die ATP-Synthase (ATPase) in den Stromalamellen lokalisiert sind [1]. Ein Schema zum Aufbau und Funktionsweise der in der Membran lokalisierten photosynthetischen Komplexe ist in Abb. 1 dargestellt.

¹ Die Reaktionszentren können wiederum in zwei Gruppen eingeteilt werden: Typ I besitzt Eisen-Schwefel-Zentren als finale Elektronenakzeptoren, Typ II Quinone. Beim Typ I ist außerdem die sog. Kernantenne ins RC integriert.

² In der anoxygenen Photosynthese ist für die Lichtreaktion nur ein Photosystem (PS) notwendig, das PS I-artig (in grünen Bakterien und Heliobakter) oder PS II-artig (in Purpurbakterien) sein kann.

³ Die Nummerierung I und II bezieht sich nur auf die Reihenfolge der Entdeckung und nicht auf die Stellung in der Reaktionskette.

A Einleitung

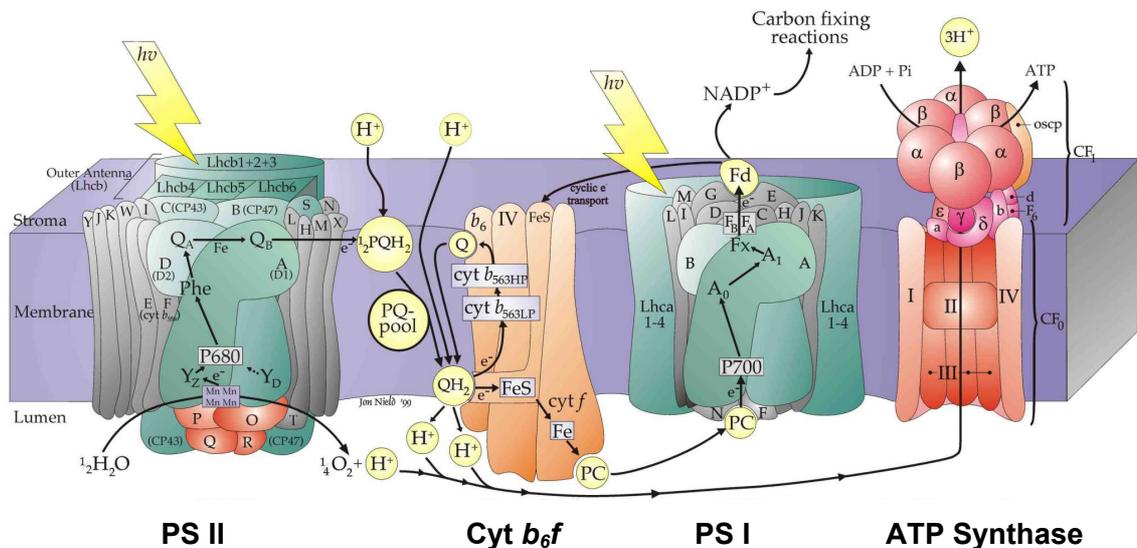


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Thylakoidmembran höherer Pflanzen [Nield, J. und Barber, J. (1999) entnommen aus <http://www.bio.ic.ac.uk/research/barber/photosystemII.html>].

Zu sehen sind die vier membranständigen Proteinkomplexe: das Photosystem I und II (PS I und II), der Cytochrom b_6/f -Komplex (Cyt b_6/f) und die ATP Synthetase. Der Nettoelektronenfluss verläuft von links nach rechts, der Protonenfluss von oben nach unten, jeweils den Pfeilen folgend.

Die beiden Photosysteme (PS I und II) sind in Serie geschaltet und erzeugen mit Hilfe kleiner mobiler Carriermoleküle einen linearen Elektronenfluss. Die grundlegenden Funktionsweisen der hintereinander geschalteten Photosysteme sollen hier nur grob skizziert werden: Initiiert durch die Absorption eines Lichtquants in der PS II-Antenne wird im Reaktionszentrum des PS II (PS II-RC) am Primären Donor (P680) ein Elektron freigesetzt, wodurch das Radikalpaar $P680^{+}Phe^{-}$ entsteht. Das hohe Redoxpotential des neu entstandenen Kationradikals erlaubt diesem nun - katalysiert und vermittelt vom wasserspaltenden Apparat - Wasser zu oxidieren, wobei Sauerstoff, Protonen und Elektronen frei werden. Durch die Migration eines freigewordenen Elektrons kehrt das $P680^{+}$ in den Grundzustand zurück. Das durch Licht freigewordene Elektron wandert vom Akzeptor (Pheophytin) zu einem auf der anderen Membranseite lokalisierten mobilen Träger, dem Plastoquinon (PQ). Dieses verlässt (nach zweimaliger Reduktion und Protonierung) als Hydrochinon den Bindungsort und diffundiert zum ebenfalls elektrogenen Cytochrom b/c bzw. b_6/f -Komplex, an das es seine Elektronen überträgt. Von dort wird ein Elektron über Plastocyanin oder Cytochrom zum PS I weitertransportiert, wo es eine Elektronenlücke am oxidierten Primären Donor des PS I (P 700) füllt.

A Einleitung

Diese Lücke entstand aus der Absorption eines Lichtquants im PS I mit anschließender Ladungstrennung. Das dort freigewordene Elektron reduziert ein Ferredoxin-Molekül (bzw. Flavodoxin), welches dann mittelbar NADP^+ zu NADPH reduziert (katalysiert durch die NADP^+ -Reduktase). Gleichzeitig mit den Elektronen werden vom Plastochinon und Cyt *b6/f*-Komplex auch Protonen über die Membran transportiert, wodurch ein elektrochemischer Potentialgradient aufgebaut wird, der die ATP-Synthase treibt.

Trotz intensiver Bemühungen sind viele Details und Mechanismen der pflanzlichen Photosynthese bis jetzt auf molekularer Ebene immer noch nicht vollständig verstanden, und wesentliche Aspekte der Primärreaktionen sind nach wie vor umstritten [2]. Nachdem kürzlich die Strukturanalyse eines cyanobakteriellen Photosystems I [3] in einer sehr guten Auflösung erhalten wurde, ist zu erwarten, dass in der nächsten Zeit noch weitere offene Fragen über die mechanistischen Details innerhalb des PS I geklärt werden können. Anders verhält sich die Situation beim PS II, dem Ort, an dem die Wasserspaltung stattfindet. Hier konnte etwa zeitgleich zum PS I eine Struktur veröffentlicht werden, deren Auflösung aber mit 3,6 Å noch immer nicht atomar ist. Jedoch ist sie geeignet, Einblicke in den Aufbau des PS II zu erhalten.

2 Das Photosystem II

In der Röntgenstrukturanalyse des cyanobakteriellen PS II [4] konnten mindestens 17 Protein-Untereinheiten, davon 14 membranständige, identifiziert werden. Das kristallisierte PS II liegt dabei als Homodimer vor. Die folgenden Proteine konnten innerhalb einer monomeren photosynthetischen Einheit eindeutig identifiziert werden: Die Proteine des Reaktionszentrums D1 (Psb A) und D2 (Psb D), der inneren Antennen CP 43 (Psb C) und CP 47 (Psb B), der α - und β -Untereinheiten des Cytochrom *b₅₅₉* (Psb E und F) und die kleineren Untereinheiten Psb H, Psb I, Psb J, Psb K, Psb L, Psb M, Psb N, Psb X. In dem cyanobakteriellen PS II befindet sich zusätzlich das extrinsische Cytochrom *c 550* (Psb V) und das Protein Psb O des wasserspaltenden Apparats (Abb. 2).

Beim Vergleich der Struktur des PS II höherer Pflanzen mit der Struktur des cyanobakteriellen PS II ergeben sich folgende Übereinstimmungen bzw. Differenzen, wobei zu beachten ist, dass die Struktur des PS II höherer Pflanzen nur in wesentlich geringerer Auflösung vorliegt [5;6]: Lage und Anordnung der transmembranen Helices

A Einleitung

der im Kern des PS II vorhandenen Proteinkomplexe (D1, D2, Cyt b_{559} , CP 43, CP 47) waren in den cyanobakteriellen und pflanzlichen Komplexen gleich. In der pflanzlichen Struktur wurde eine zusätzliche Helix identifiziert, die an die D-Helix des D1-Proteins assoziiert ist (vgl. Abb. 2). In der cyanobakteriellen Struktur in der Nähe des CP 43 konnten weiterhin vier Helices identifiziert werden, von denen nur eine in der pflanzlichen Struktur vorhanden ist. Das PS II von Cyanobakterien und das höherer Pflanzen unterscheidet sich danach nur in der Anzahl und Lage der kleinen, sog. low-molecular-weight- (LMW-) Proteine voneinander. Die Erkenntnisse zum zentralen Geschehen, die aus der cyanobakteriellen Struktur gezogen werden, sollten deshalb auch auf höhere Pflanzen übertragen werden können [7].

2.1 Proteine des Reaktionszentrums

Das PS II-RC, auch D1-D2-Cyt b_{559} Komplex genannt, besteht im Wesentlichen aus den Proteinuntereinheiten D1 und D2 sowie der α - und β -Untereinheit des Cytochrom b_{559} . An diesen Komplex sind eine variable Anzahl kleinerer Proteine (Psb H, Psb I, Psb J, Psb K, Psb L, Psb M, Psb N) assoziiert (Überblick in [7]). Die D1- und D2-Proteinuntereinheiten, die zusammen das sog. Heterodimer bilden, werden von jeweils fünf transmembranen α -Helices gebildet. Sie entsprechen sowohl in der Anzahl als auch in der Anordnung denen der analogen purpurbakteriellen Untereinheiten (L und M). Dieser Befund bestätigt das bereits sehr früh entwickelte Konzept der Homologie zwischen dem bakteriellen und dem pflanzlichen Typ II-RC. Beide besitzen etwa 15 Prozent Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen des Heterodimers D1/D2 (verglichen mit L/M des pb-RC aus *Rhodospseudomonas viridis*) [8-11]. Genauso wie bei den bakteriellen RC bilden jeweils zwei transmembrane Helices (jeweils D und E, Abb. 2 a) der Hauptuntereinheiten D1 und D2 (analog zu den Untereinheiten L bzw. M der pb-RC) einen inneren Bereich.

In diesem inneren Bereich, dem „Kern“, sind die redoxaktiven Kofaktoren – gemäß einer pseudo C-2 Symmetrie - angeordnet. Dieses Motiv ist auch in der von Rhee et al. [5] in einer geringeren Auflösung publizierten Struktur bereits gesehen worden. Sie konnten zeigen, dass sich das Proteinarrangement (Anordnung der Helices untereinander und in der Membran) der pflanzlichen und der bakteriellen Typ II-RC sehr stark ähneln.

A Einleitung

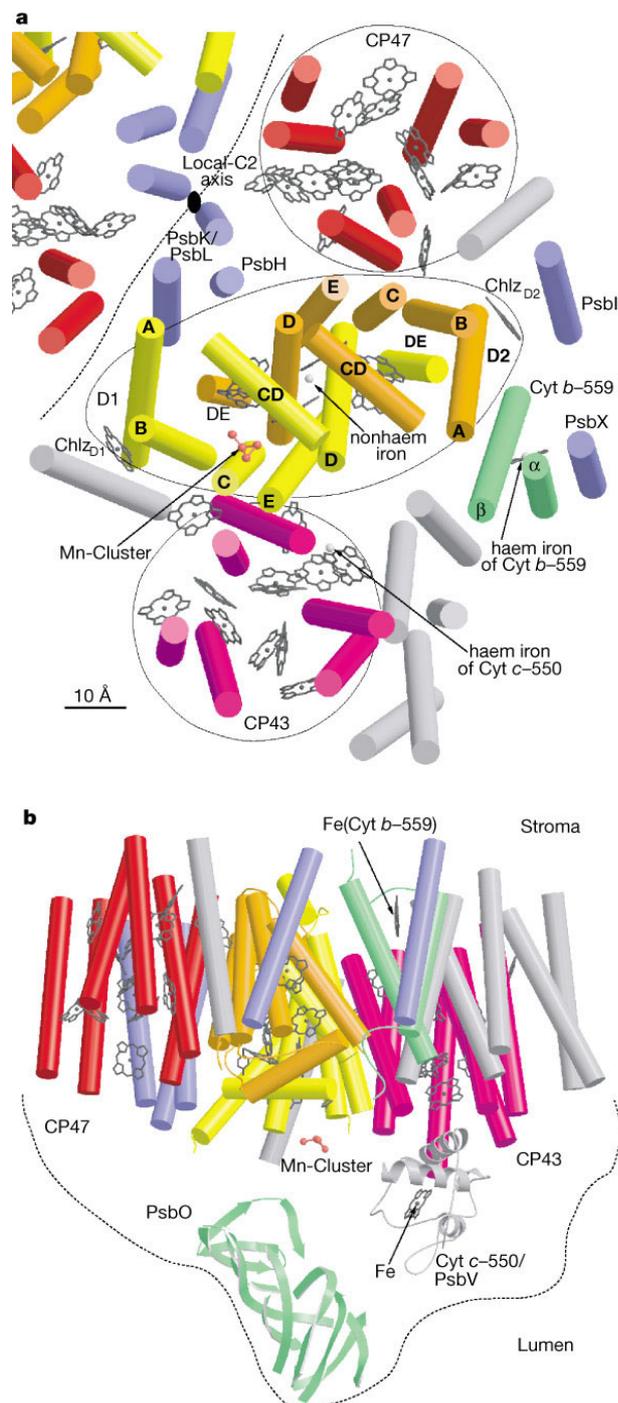


Abb. 2: Cartoon-Darstellung der PS II-Struktur (3,8 Å) von *Synechococcus elongatus* [4].

- a:** Anordnung der transmembranen Helices und Kofaktoren im PS II in der Aufsicht. Ein PS II-Monomer ist vollständig abgebildet, während das zweite Monomer (abgegrenzt durch die gestrichelte Linie) nur teilweise zu sehen ist. Die α -Helices des D1, D2-Proteins sind durch eine Ellipse, und die des CP 43 und CP 47 durch jeweils einen Kreis zusammengefasst. Die grauen Helices konnten noch nicht zugeordnet werden.
- b:** Seitenansicht auf die leicht gekippte Membran. Das Protein des wasserspaltenden Apparats hat eine Faltblattstruktur (grün). Cytochrom c_{550} wurde mit α -Helices modelliert (grau).

Kleinere Unterschiede bestehen bei den Abständen und der Geometrie der Helices zueinander. Diese Unterschiede in der Anordnung mögen ihre Ursprünge in der Kristallbildung haben, können aber auch ursächlich für die hohe Instabilität der PS II-RC sein [5]. In der von Zouni et al. [4] publizierten Struktur konnten erstmals die α - und β -Untereinheiten des Cytochrom b_{559} gesehen werden. Besonders der Ort dieser Proteinuntereinheiten und somit auch der des aktiven Zentrums (Protohäm) war eine Überraschung, denn es ist am „inaktiven Ast“ lokalisiert, d.h. an der D2-Untereinheit. Aufgrund der gefundenen biochemischen Ergebnisse wurde bisher davon ausgegangen, dass das Cytochrom am „aktiven Ast“, d.h. an der D1- Untereinheit, lokalisiert ist, da für dieses eine mögliche Rolle am Ladungstransfer diskutiert wird [11;12].

2.2 Kofaktoren und Pigmente des Reaktionszentrums

2.2.1 Anzahl der Kofaktoren und Pigmente

Die Auflösung der Strukturanalyse des PS II reicht aus, um Tetrapyrrolpigmente zu identifizieren (Abb. 2). Deshalb besteht mittlerweile kein Zweifel mehr, dass im Reaktionszentrum sechs Chlorophylle (Chl) und zwei Pheophytine (Phe) vorhanden sind. Der erhöhte Chlorophyllgehalt war lange Zeit umstritten, denn die Homologie zu den purpurbakteriellen Reaktionszentren (pb-RC) hat nur vier Chl pro zwei Phe erwarten lassen. Die auf biochemischem Wege gefundene Stöchiometrie von 6 Chl pro 2 Phe wurde deshalb lange Zeit als Artefakt, hervorgerufen durch Verunreinigungen mit Pigment, angesehen [13-15]. Eine in dieser Auflösung der Röntgenstruktur zwar nicht sichtbare, aber dennoch mittlerweile akzeptierte Tatsache ist die Existenz von zwei β -Carotinen (Car) innerhalb des RC [16-18]. Zusätzlich zu den sechs Chlorophyllen, zwei Pheophytinen und den zwei β -Carotinen⁴ gibt es noch weitere Kofaktoren, die, bis auf den ersten, im Laufe der Präparation verloren gehen: das Protohäm im Cyt b_{559} , die Plastochinone, der Tetramangancluster des wasserspaltenden Apparats, der ein Chlorid- und ein Calciumion beinhaltet, sowie ein Nicht-Häm-Eisen und Carbonat-Anion(en).

⁴ Zu den Kofaktoren zählen auch zwei Tyrosin-Aminosäuren (sog. Y_Z und Y_D) aus den D1- und D2-Untereinheiten, welche maßgeblich an den Redoxreaktionen beteiligt sind.

2.2.2 Lage und Funktion der Pigmente

In der Arbeit von Zouni et al. [4] können die Elektronendichten des Tetrapyrrolgerüsts der Pigmente zwar gesehen werden, aber es ist nicht möglich, Angaben über die exakte Lage und Orientierung zu machen. Die derzeit zugänglichen Informationen sind in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 3) zusammengefasst.

Die Strukturanalyse zeigt, dass sich die Pigmente in einer pseudo- C_2 -Symmetrie anordnen, wobei die C_2 -Symmetrieachse durch das Nicht-Häm-Eisen und das Zentrum des Dimers (s.u.) verläuft. Die Pigmente können in innenliegende Pigmente, die von den D- und E-Helices des Heterodimers umschlossen sind (Abb. 2), und in äußere Pigmente eingeteilt werden. Erstere werden nachfolgend „Kern-Pigmente“ genannt. Bei den beiden äußeren Pigmenten wird unterschieden, an welche der Proteinunterheit sie über Liganden des zentralen Magnesiums gebunden sind: Eines der Chl ist an das D1- oder D2-Protein assoziiert. Wegen dieser äußeren Lage werden sie nachfolgend auch als „periphere Pigmente/Chlorophylle“ bezeichnet. Die anderen sichtbaren Chl stammen von den Kernantennen CP 43 und CP 47 und sind von all den in den Antennen vorhandenen Chlorophyllen diejenigen, die dem RC am nächsten sind.

Die Kern-Pigmente werden, analog zum pb-RC, eingeteilt in (i) ein „Special Pair“ oder P680, d.h. zwei parallel zueinander stehende Chlorophylle (hier P_{D1} und P_{D2}), welche senkrecht zur Membran angeordnet sind; (ii) zwei „zusätzliche Chlorophylle“, d.h. jeweils am D1- und D2-Protein angeordnete Chl (Chl_{D1} und Chl_{D2}), welche um ca. 30° gegen die Membran-Normale gekippt sind; und (iii) die Pheophytine Phe_{D1} und Phe_{D2} . Diese Pigmente sind dabei symmetrisch („Pseudo- C_2 -Symmetrie“) angeordnet, wobei die eine Hälfte der Pigmente an das D1- und die andere an das D2-Protein gebunden ist.

Aufgrund der Homologien zum pb-RC wurde lange davon ausgegangen, dass das P680 wie bei den pb-RC aus einem dimeren (Bakterio-)Chl gebildet wird [10;19]. Durch biophysikalische Messungen war der dimere Charakter prinzipiell vorhergesagt, es gab aber auch grundsätzliche Unterschiede:

A Einleitung

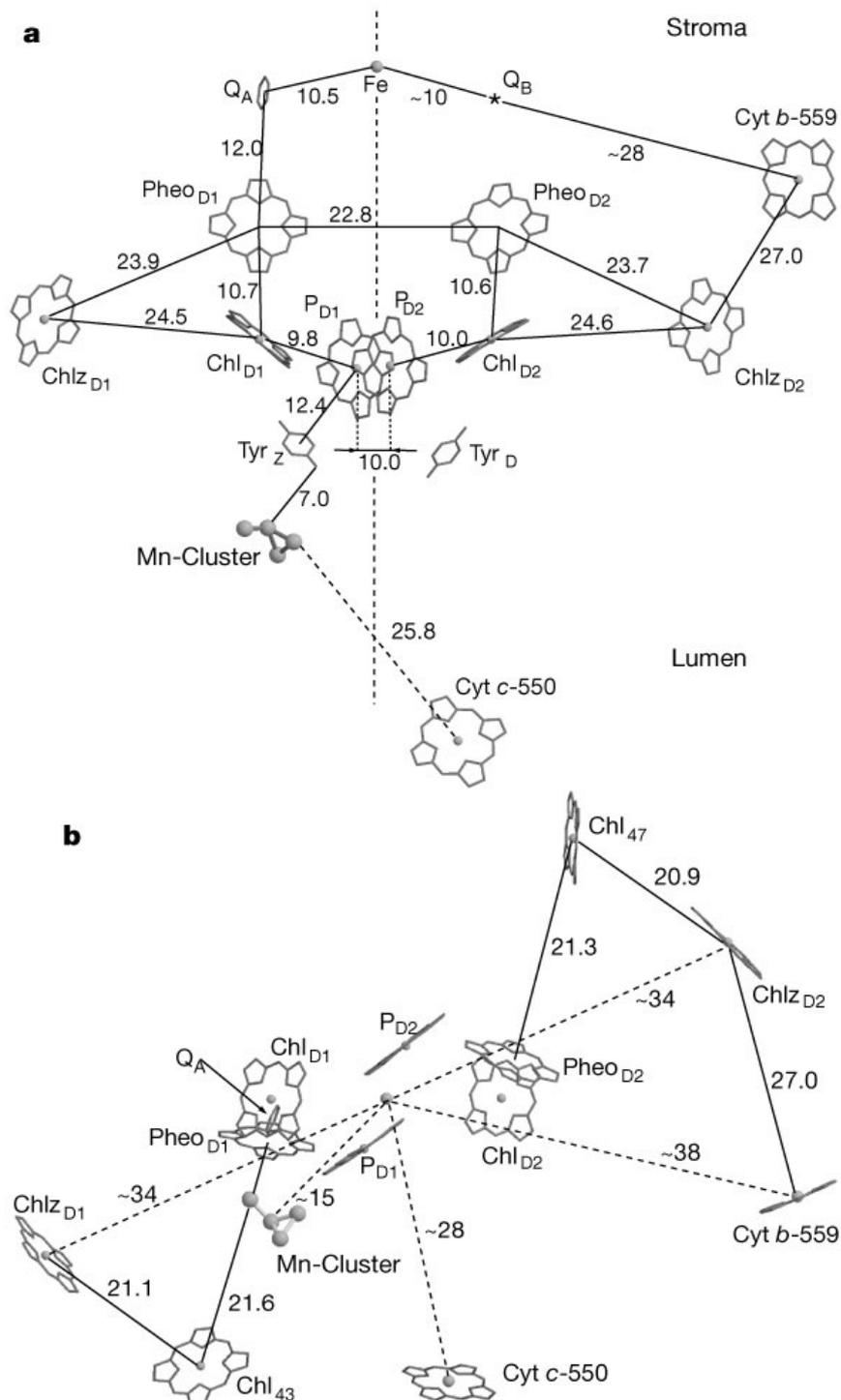


Abb. 3: Anordnung der Kofaktoren in der PS II-Struktur (3,8 Å) von *Synechococcus elongatus* [4].

a: Seitenansicht: Die durchgezogenen Linien geben den Abstand [Å] zwischen den jeweiligen Zentren an. Die vertikale gepunktete Linie gibt die Pseudo-C₂-Achse an; der Stern verweist auf die vermutete Bindungsstelle des Q_B.

b: Aufsicht auf die Membran: Die durchgezogenen Linien geben, wie in **a**, den Abstand der Pigmente zueinander an („Center-to-Center“), die gestrichelten Linien geben die Entfernung der Pigmente zur C₂-Achse an, welche durch das Nicht-Häm-Eisen verläuft.

A Einleitung

Der Abstand der Chlorophylle zueinander war deutlich höher als in den pb-RC (ca. 11 gegenüber 7.6 Å) [13], was durch die nun vorliegende Struktur bestätigt wurde (10 Å). Dadurch ist die Kopplung der Chlorophylle deutlich verringert, so dass Veränderungen des elektronischen Zustands ($P680^{+}$ und 3P680) nur mehr ein einzelnes monomeres Chl betreffen [20;21] und nicht wie bei den pb-RC das Dimere. Die Chlorophylle des „Special Pair“ werden über Histidine gebunden (D1-198H und D2-198H) [22;23].

Die Abstände der innenliegenden Pigmente, d.h. die Abstände P_{D1} - P_{D2} , P - Chl_{D1} bzw. $D2$, Phe_{D1} bzw. $D2$ - Chl_{D1} bzw. $D2$, (siehe Abb. 3) untereinander, liegen im Bereich von 9,8 bis 10,7 Å und sind in etwa äquidistant, wodurch das oben vorgestellte Konzept des Dimers stark in Frage gestellt wird [23]. Vielmehr scheint das, anhand spektroskopischer Untersuchungen ermittelte, schwach gekoppelte Multimer-Modell [21] die im angeregten Zustand ablaufenden Prozesse besser zu beschreiben. Es postuliert ähnliche exzitonische Kopplungen der im RC-Kern vorhandenen Pigmente, d.h. der 4 Chl und 2 Phe, so dass die Kern-Pigmente entweder als Monomere oder als Multimer beschrieben werden müssen. Die Einbindung der peripheren Chlorophylle in ein solches Exziton bleibt offen.

Die Lage und die Anwesenheit dieser lange umstrittenen Chl sind mit der Struktur von Zouni et al. [4] endgültig geklärt. Die Chlorophylle befinden sich an der Peripherie (an den jeweiligen Helices A des D1- und D2-Proteins) des RC an die sie über Histidine (D1-118H and D2-118H) gebunden sind. Das periphere Chl des D2-Proteins ist vom Protein des Cytochrom b_{559} umgeben. Jedes der peripheren Chlorophylle ist von den Kern-Pigmenten durch Helices der eigenen Proteinuntereinheit, als einer Art physikalischer Barriere getrennt (Abb. 2). Eine Ausdehnung der exzitonischen Pigmentkopplung auf alle RC Pigmente erscheint wegen der räumlichen Trennung von Kernpigmenten und Peripheren eher fraglich. Die Struktur von Zouni et al. [4] brachte in diese Diskussion noch einen weiteren, bisher noch nicht in Betracht gezogenen Aspekt: Es konnten Chl - aus den Kernantennen CP 43 und CP 47 stammend - identifiziert werden, die deutlich näher an den Kernpigmenten sitzen als die peripheren Chl (Abb. 3). Den peripheren Chl konnte bisher jedoch noch keine klar definierte Funktion zugeschrieben werden [24-27]. Aufgrund bisheriger Messungen scheint es möglich, dass eines der peripheren Chl bei der Reduktion von $P680^{+}$ durch Cyt b_{559} als Intermediat vermittelt [11].

A Einleitung

Die Existenz zweier Pheophytine wurde zuerst zwar nur aufgrund der Analogie zu den bakteriellen RC postuliert, konnte aber sehr bald darauf durch analytische Methoden bestätigt werden [28;29]. Von diesen beiden Pheophytinen kann wie im pb-RC nur eines photoreduziert werden [19;30]. Desweiteren stellte sich heraus, dass die beiden Pheophytine, ähnlich wie ihre bakteriellen Analoga [31], u. a. über Wechselwirkung mit einem Glutaminrest (D1-Glu130 [32]) an das Protein gebunden werden [33;34].

Obwohl die β -Carotine in der Struktur von Zouni et al. (Abb. 2) nicht gesehen werden, gibt es keine Zweifel an der Stöchiometrie von zwei Car pro RC [27;28]. Über deren Lage innerhalb des PS II-RC ist jedoch bisher wenig bekannt. Es scheint, dass sie nicht mit den anderen Pigmenten in van der Waals-Kontakt stehen, da der Triplettzustand des P680 nicht gequencht wird [35]. Dennoch scheint das β -Carotin auch im PS II-RC eine photoprotektive Wirkung zu haben, denn es ist in der Lage, Singulett Sauerstoff zu quenchen [17]. Zur Zeit scheint es sehr wahrscheinlich, dass die Carotine am Elektronentransport beteiligt sind, und zwar in der Übertragung sekundärer Elektronen zur Reduktion des $P680^{+}$ zu P680 über Cytochrom b_{559} [16;36;37].

2.3 Energietransferwege im Reaktionszentrum

Die Funktion der Pigmente wurde bisher analog zu der der pb-RC diskutiert, mit einem Elektronen-Transfer von P680 über Chl und Phe zu Plastochinon auf dem "rechten, aktiven Ast" (D1-Untereinheit) und einer unaufgeklärten Funktion der Pigmente auf dem "linken, inaktiven Ast" (D2-Untereinheit) [22;38;39]. Das Modell kann aber weder das Auftreten des hohen Redoxpotentials von 1,1 V, der notwendig ist, um Wasser zu oxidieren (+0,8 V), noch die Funktion des nur schwach gekoppelten primären Donors erklären. Als Alternative wurde das Multimer-Modell eingeführt, in dem alle Tetrapyrrolpigmente als exzitonisch gekoppelt angesehen werden [21]. In der vorliegenden Struktur des cyanobakteriellen PS II könnten sogar Belege für dieses Modell gesehen werden, denn die sechs Kern-Pigmente (vier Chl und zwei Phe) sind nahezu äquidistant. Das „Special Pair“ könnte nun aus einem Tetramer gebildet werden.

Aufgrund dieser Äquidistanz werden in der Literatur zur Zeit neue, auf dem Multimer basierende Konzepte zur Beschreibung der Primärreaktionen (Reaktionen im angeregten Zustand, Ladungstrennung, etc.) diskutiert. Durch die fehlende oder nur schwach vorhandene exzitonische Pigmentkopplung der Chlorophylle des Special

A Einleitung

Pairs kann sich kein niedrigerenergetischer Zustand (eine sog. „red-shifted-trap“) ausbilden. Zusätzlich besitzen alle beteiligten Pigmente ähnliche Absorptionen, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass sich der angeregte Zustand über alle Kern-Chl (und vielleicht auch über die Phe) verteilt. Bei einer solchen Verteilung stellt sich die Frage, von welchem der Chl die Ladungstrennung ausgeht: Innerhalb des Pigmentverbundes erscheint das Chl, das dem aktiven Pheophytin am nächsten ist, favorisiert zu sein. Es wird photooxidiert und geht in einen radikalischen positiv geladenen Zustand ($P680^{+}$) über. Um von Tyr_z wieder reduziert werden zu können, muss der oxidierte Zustand aber erst wieder in dessen Nähe gelangen, was nur durch eine Migration des Kationradikals gelänge [23;40;41]. Unter dem Aspekt des Multimers stellt sich aber noch zusätzlich die Frage, ob die bisher angenommene Trennung zwischen aktiver und inaktiver Seite innerhalb des RC zutreffend ist. Für einen nur einseitig ablaufenden Prozess sprechen viele Experimente mit pb-RC und dem PS I [42-45]. Unter Berücksichtigung der gefundenen äquidistanten Abstände der Kernpigmente und der Monodirektionalität des Ladungstransfers (voraussichtlich der D1-Untereinheit) kann das oben bereits formulierte Modell verfeinert werden. Die Prozesse könnten demnach folgendermaßen ablaufen: Die Absorption eines Lichtquants regt das gekoppelte Pigmentsystem an, wobei das dem aktiven Pheophytin (am D1-Protein) am nächsten stehende Chl zum $P680^{+}$ oxidiert wird. Dieses wird von dem senkrecht in der Membran stehenden Chl (einem der P680-Pigmente) reduziert, wodurch letzteres in den oxidierten Zustand übergeht (entspricht einer Lochwanderung des oxidierten Zustands) und dann auf „gewohntem“ Wege (via Tyr_z) reduziert wird.

Die exakten Mechanismen dieser lichtinduzierten Reaktionen sowie das Zustandekommen des hohen Redoxpotentials werden bis zum Vorliegen einer hochaufgelösten Röntgenstruktur und vermutlich darüber hinaus kontrovers sein. Die Kenntnis der Struktur schränkt zwar die Modelle erheblich ein, erlaubt aber auch bei den pb-RC keine direkte Ableitung der elektronischen Prozesse. Um diese aufzuklären, bedarf es nach wie vor spektroskopischer Untersuchungen an nativen und biochemisch und/oder molekularbiologisch modifizierten Komplexen.

2.4 Modifizierungen am Reaktionszentrums des Photosystems II

Vielversprechende Methoden zur Modifizierung von photosynthetischen Komplexen liefert zur Zeit u.a. die Molekularbiologie. Durch den selektiven Ersatz einer für die Pigmentbindung verantwortlichen Aminosäure gegen eine andere ligandierende (oder nicht ligandierende) Aminosäure können Komplexe mit stark veränderten photophysikalischen Eigenschaften hergestellt werden, um an diesen Energietransfer-Prozesse zu studieren. So zeigten Messungen an Thylakoiden mit gentechnisch veränderten PS II, bei denen ein für die Bindung des peripheren Chl verantwortliches Histidin am D2-Protein (D2-117H) gegen ein Threonin ausgetauscht war (D2-117T-Mutante), dass die Kinetik des Energietransfers eines peripheren Chl zu den Kernpigmenten von etwa 30 auf 100 ps verlangsamt wurde, wodurch die Ladungsrekombination stark anstieg. Die Autoren vermuten als Grund hierfür eine im Komplex veränderte Orientierung des peripheren Chl, das dadurch leicht zu einem Kationradikal oxidiert werden kann und in diesem Zustand die Fluoreszenz auslöscht [46]. Bei einer anderen Mutante, bei der das Histidin 117 an D2 gegen ein Asparagin ausgetauscht wurde (D2-117N), wurde nur eine geringe Verzögerung der Fluoreszenz (20-30 ps) detektiert, was auf eine unvollständige Energieäquilibration hindeutet [47].

Neue Aspekte über den Energietransfer könnten auch durch die von Vavilin et al. [48;49] erzeugten Mutanten von *Synechocystis* sp. PCC 6803 erhalten werden. Durch die Einführung von Genen, die die pflanzliche Chl-Oxidase und das LHC II codieren, konnten PS II-RC isoliert werden, in denen drei der sechs Chlorophylle *a* durch Chlorophyll *b* und knapp eines der beiden Pheophytine *a* gegen Pheophytin *b* ersetzt wurde. Bisher wurden jedoch noch keine Messungen an solchen Komplexen publiziert.

Eine weitere Methode zur Herstellung modifizierter Komplexe ist ein Austausch der Pigmente. Dabei werden temperatur- oder detergenteninduziert native durch chemisch modifizierte Tetrapyrrolkofaktoren ersetzt. Diese Methode konnte bisher sehr erfolgreich bei purpurbakteriellen (und einem pflanzlichen) Pigmentproteinkomplexen angewendet werden [50-55]. Die modifizierten Komplexe in Verbindung mit selektiven spektroskopischen Methoden konnten wesentlich dazu beitragen, die Primärschritte der (purpurbakteriellen) Photosynthese (Lichtsammung und Ladungstrennung) aufzuklären [56-58], weshalb das Konzept des Pigmentaustauschs auch auf die pflanzlichen Typ II Reaktionszentren übertragen wurde. Arbeiten von Gall et al. [59;60] konnten zeigen, dass der Pigmentaustausch grundsätzlich auch mit PS II-RC möglich ist, wobei

A Einleitung

aber die erhöhte Instabilität der pflanzlichen gegenüber den purpurbakteriellen Reaktionszentren den Austausch erschwert. Die Fragen nach der Bindungsstelle (Ort, Beschaffenheit) und der Funktion des austauschbaren Chlorophylls am Elektronen- und Energietransfer blieben unbeantwortet. Shkuropatov et al. entwickelten parallel hierzu ein Verfahren zum Austausch der Pheophytine am PS II-RC [61], das im wesentlichen auf den Versuchen von Gall et al. [62] basiert. Sie konnten das inaktive Pheophytin gegen ^{13}C -Deoxo- ^{13}C -hydroxypheophytin *a* ersetzen [63]. Mittlerweile kann mit dieser Methode das inaktive Phe zu 100 % und das aktive Phe zu 50 % gegen das ^{13}C -Deoxo- ^{13}C -hydroxypheophytin *a* ersetzt werden [64].

Ein weiterer alternativer Ansatz zur vorgenannten Modifikation von PS II-RC wurde von Vacha et al. [66] beschrieben. Mittels Cu-Affinitätschromatographie isolierten sie PS II-RC, deren Chlorophyllgehalt von 6 auf 5 reduziert ist. Dabei wird ein bei 670 nm absorbierendes Chl extrahiert. Dieses wird dem, über D2-118H koordiniertem peripheren Chl zugeordnet [67]. Es wurde festgestellt, dass diese 5-Chlorophyll-Reaktionszentren empfindlicher gegenüber Temperatur und Lichteinwirkung sind als die 6-Chl PS II-RC und somit leichter und schneller an Aktivität verlieren [66]. Durch selektive spektroskopische Messungen konnten die Autoren zu den Diskussion über die spektralen Zuordnungen der RC-Pigmente – und somit auch über deren Mitwirken an den photochemischen Prozessen des RC – beitragen [68-70]. Die Mitwirkung der peripheren Chl an dem von Durrant [21] postulierten Multimer, in dem alle RC-Pigmente energetisch gekoppelt sind, ist bisher noch unklar, obwohl einige Daten der 5-Chl PS II-RC darauf hinweisen, dass die peripheren Chl jeweils monomer, d.h. ungekoppelt (zu den Kern-Pigmenten) vorliegen [67;71].

3 Ziel der Arbeit

Basierend auf den Arbeiten zum Pigment austausch von Gall (siehe oben und [60]) sollen im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit weitere Versuche zur Modifizierung von PS II-RC gemacht werden, um intensivere Einblicke in die Struktur und Funktionsweise der PS II-RC zu erhalten. Hierzu wurden neben stringenteren Analysemethoden (vgl. Abschnitt C.1.2 und C.2.2) zunächst Optimierungen eingeführt, die die Aufreinigung des Austauschansatzes betreffen (vgl. Abschnitt C.3.1.1.1). Der Pigment austausch soll mit unterschiedlichen Pigmenten durchgeführt werden, um Aufschlüsse über die Pigmentbindungstasche im PS II-RC zu erhalten (vgl. Abschnitt C.3 und D.2).

Durch eine geeignete Modifikation der PS II-RC sollen auch Aussagen über Bindungs ort und Funktion des austauschbaren Chlorophylls möglich werden. Hierzu wurden insbesondere Versuche mit den von Vacha isolierten 5-Chlorophyll-Reaktionszentren (s.o.) durchgeführt, mit dem Ziel des „Wiederauffüllens“, d.h. einer Rekonstitution der leeren Bindungstasche (vgl. Abschnitt D.4 und E.3). Eine geeignete Modifizierung dieser Bindungsstelle soll so Aussagen über eine Mitwirkung des/der peripheren Chlorophylls/e am Energietransfer ermöglichen (vgl. Abschnitt D.5). Die Austausch- und die Rekonstitutionsversuche wurden miteinander verglichen (D.4), um den Austauschort am PS II-RC zu ermitteln.

Parallel zu den Arbeiten zur Modifikation von PS II-RC wurden Versuche unternommen, die Stabilität nativer PS II-RC zu erhöhen. Hierzu wurde insbesondere eine neuartige polymere amphiphile Detergenzklasse getestet, die sog. Amphipole. Die zur Solubilisierung wirksame Konzentration wurde ermittelt sowie Versuche zur Bestimmung der Aktivität unternommen (vgl. C.5).

B Material und Methoden

1 Allgemeine Angaben

Alle Experimente mit PS II-RC wurden in Dunkelheit auf Eis oder unter grünem Sicherheitslicht ($<10 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 515-560 nm) im Kühlraum (4-8 °C) durchgeführt. Sämtliche verwendeten Geräte, Materialien und Lösungen wurden vorgekühlt (4 °C) verwendet und auf Eis gehalten.

Geräte

Ultraschallbad:	Frequenz 45 kHz; HF-Leistung 120W (Bachhofer)		
Tischzentrifuge:	Biofuge fresco (Kendro)		
Kühlzentrifuge:	Centricon H-401 (Kontron Hermle)	Festwinkelrotor	A6.18
	3K18C (Sigma)	Festwinkelrotoren	12154 und 12155
Ultrazentrifuge:	Discovery 90 (Sorvall)	Festwinkelrotor	RP50T
		Ausschwingrotor	RPS40T
Elektrophorese:	Mini-Protean II Dual- Slab Cell (Biorad) mit Constant Voltage Power Supply 1000/500 (Biorad)		
Kaltlichtlampe:	KL 1500 (Schott)	0-3.500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	
Lichtmessgerät	LI-COR LI-189 (Bachhofer)	Messbereich 400-700 nm	

Chemikalien und Säulenmaterialien

Die verwendeten Chemikalien wurden analysenrein bezogen und, falls nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die für die HPLC-Analyse verwendeten Lösungsmittel wurden durch eine PTFE-Membranfilter 0,2 μm (Whatman) vakuumfiltriert.

B Material und Methoden

Detergentien:

CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat	Biomol
DM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid	Biomol
TX-100	Triton X-100	Merck

Säulenmaterialien:

Q-Sepharose Fast-Flow	Pharmacia
Toyopearl TSK-DEAE-650 (S)	TosoHaas
Biobeads P6	Biorad
HPLC Econosphere Silica (4,6 mm x 120 mm)	Merck

Pigmente:

Die Ausgangspigmente wurden weitgehend von Frau Brigitte Wilhelm isoliert und von mir weiter modifiziert. Vor der Verwendung wurden sie mittels HPLC auf Reinheit untersucht und gegebenenfalls (wiederholt) aufgereinigt.

Chlorophyll a (Chl) wurde durch Extraktion mit MeOH aus dem sprühgetrocknetem Cyanobakterium *Spirulina geitleri* gewonnen. Die Aufreinigung erfolgte über Sepharose CL-6B [72].

Pheophytin a (Phe) wurde durch Ansäuern des Chlorophyllrohextrakts mit konzentrierter Essigsäure und anschließender Aufreinigung mittels präparativer Kieselgelplatten hergestellt [73].

[Ni²⁺]-Chlorophyll a (Ni-Chl) respektive *[Zn²⁺]-Chlorophyll a (Zn-Chl)* wurden durch Erhitzen von Pheophytin in Anwesenheit der entsprechenden Metallacetate in Essigsäure gewonnen [74]. Die Aufreinigung erfolgte über präparative Kieselgelplatten.

[Zn²⁺]-Methylchlorophyllid (Zn-Me-Chlid) wurde ausgehend vom Phe über das Pheophorbid (Pheid) dargestellt. Hierzu wurde der Phythylester des Phe sauer umgeestert, und dann das Zink wie oben beschrieben eingelagert [75]. Die Aufreinigung erfolgte über präparative Kieselgelplatten.

[3-Acetyl]-chlorophyll a (Ac-Chl) wurde aus BChl durch Oxidation mit 2,3-Dichloro-5,6-dicyanobenzochinon (DDQ) gewonnen [76].

Das Pyro-Derivat [*3-Acetyl*]-13²-demethoxycarbonylchlorophyll *a* (*Ac-Py-Chl*) wurde durch mehrstündiges Erhitzen unter Rückfluss (über Nacht) von *Ac-Chl* in Pyridin hergestellt [77]. Die Aufreinigung erfolgte über Sepharose CL-6B [72].

Bakteriochlorophyll a (*BChl*) wurde aus *Rb. spheroides* R26 (Anzucht durch Frau Claudia Bubenzer-Hange) mit MeOH extrahiert und über DEAE-Cellulose gereinigt [78].

[*3-Vinyl*]-*bakteriochlorophyll a* (*Vi-BChl*) wurde aus *BChl* hergestellt. Dieses wurde zuerst durch Zugabe von NaBH₄ zu [*3*¹-Hydroxy]-*bakteriochlorophyll* reduziert, was unter thermischer Eliminierung zu *Vi-BChl* umgesetzt wurde [78]. Die Aufreinigung erfolgte über RP-18.

Protochlorophyll a (*Proto-Chl*) wurde durch Oxidation von *Chl* mit DDQ (2,3-Dichloro-5,6-dicyanochinon) hergestellt [79]. Die Aufreinigung erfolgte über RP-18 (HPLC).

2 Spektroskopische Methoden

2.1 Allgemeine Bedingungen und Geräte

Spektroskopische Messungen, die nur wenige Minuten benötigen, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für längere Messungen wurden kühlbare Küvettenhalter (thermostatisiert auf 4 °C) eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Spectacle 1.55 (Labcontrol) und Origin 5.0 (MicroCal). Für die RC-Mengenbestimmung wurde der von De Las Rivas et al. [17] für *Chl a* im PS II-RC ermittelte Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 103.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (pro Chlorophyll) verwendet.

UV-Vis Absorptionsspektroskopie

Elektronenabsorptionsspektren wurden, bis auf die von Kapitel C.4, an einem Lambda 2 Spektrometer (Perkin Elmer) gemessen. Die Daten wurden über die firmeneigene Software PECCS Vers. 3.2 verarbeitet. Die in Kapitel C.4 dargestellten Absorptionsspektren wurden bei Raumtemperatur mit einem UV 300 Spektrometer (Unicam) aufgenommen.

Die *Tieftemperaturspektren* wurden mit einem selbstgebauten Spektrometer aufgenommen, bestehend aus einer Mikrosekunden Xenon Blitzlampe FX-1160 (EG & G) mit einer Blitzdauer von 1 μs , einem MS 257 Imaging Monochromator (Oriol) und einem Aufnahme- und Trigger-System FL 100 (Photon System Instruments). Der

Detektor besteht aus zwei großen Photodioden S 4111 (Hamamatsu), je eine für den Proben- und für den Referenzstrahl. Jedes Absorptionsspektrum stellt eine Akkumulation von 10 Spektren dar, die innerhalb von 1 s aufgenommen wurden. Die Probe wurde mit Glycerin auf eine Glycerin-Endkonzentration von 60 % und eine $OD_{676\text{nm}}$ von 0,5 eingestellt. Die Probe wurde in einen Optistat Badkryostaten (Oxford Instruments) gestellt und langsam auf 78 K gekühlt.

Fluoreszenz-Spektroskopie

Die *Messungen bei Raumtemperatur* erfolgten an einem SPEX Fluorolog 221 Fluorimeter (Jobin-Yvon Inc.) mit selbstgeschriebener Software (Dr. A. Pazur). Die gezeigten Spektren sind nicht korrigiert. Die Proben wurden bei einer OD_{676} von 0,09-0,1 vermessen. Die Detektion erfolgte im Allgemeinen mit einem Hamamatsu Photomultiplier R 374 (300– 800 nm) und nur in Anwesenheit von Bakteriochlorophyllen mit dem Hamamatsu Photomultiplier R 316 (300-1000 nm). Die Spaltbreiten im Anregungs- und Emissionsstrahlengang waren $1,25 \times 10^6$ nm bzw. $6,00 \times 10^6$ nm. Sie wurden so gewählt, dass die Anregungsintensität gering genug ist, um lichtinduzierte Degenerierung der Proben (PS II-RC) zu vermeiden, aber ausreichend, um trotzdem ein gutes Signal zu erhalten. Die *Tieftemperatur Fluoreszenz Emissionsspektren* wurden mit einem Fluorolog Spektrofluorimeter (Jobin-Yvon Inc.) mit einer spektralen Auflösung von 2 nm aufgenommen. Die Anregungswellenlänge war 435 nm (Bandbreite 4 nm). Die RC wurden auf eine Konzentration von $2,2 \mu\text{M}$ verdünnt und, mit einem internen Fluoreszenzstandard (Rhodamin B, $8 \mu\text{M}$) gemischt, in die Vertiefung eines Metallhalters gegeben, und dann in flüssigen Stickstoff eingefroren.

CD-Messungen

Die Messungen erfolgten mit einem Dichrograph CD 6 (Jobin-Yvon Inc.). Zur Detektion wurde ein Photomultiplier R 374 (300-800 nm) verwendet. Die CD-Spektren in Kapitel D.4 wurden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit einem Spektropolarimeter V 715 (JASCO) aufgenommen. Die PS II-RC wurden auf eine Endkonzentration von $1,85 \mu\text{M}$ gebracht und bei 1 cm Schichtdicke vermessen.

2.2 Messung der photochemischen Aktivität

Zur Messung der photochemische Aktivität wurde die lichtinduzierte Anreicherung von Phe^{\bullet} in Anwesenheit von Natriumdithionit und Methylviologen gemessen [13;28;80].

Die Messungen wurden an einem TIDAS Diodenarray-Spektrometer (J&M) mit dem TISPEC-Programm (J&M) durchgeführt. Dabei war der Küvettenhalter auf kurze Distanz mit Lichtleiter verbunden, wodurch die Messung durch Streuung des einfallenden aktinischen Lichts kaum gestört wurde, so dass keine zusätzlichen Streufilter notwendig waren. Zur Belichtung diente eine Kaltlichtlampe mit Lichtleiter KL 1500 (Schott) und einem 620 nm Kantenfilter (Schott). Die Lichtintensität an der Oberfläche der Küvette betrug ca. $2.200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Zu 0,5 mL einer RC-Lösung mit $\text{OD}_{676} = 0,3-0,6$, entsprechend einer RC Konzentration von 0,48-0,96 μM , wurden direkt vor der Messung 25 μL Methylviologen (20 μM in Wasser, Endkonzentration 1 μM) und 10 μL frisch angesetzte Natriumdithionit-Lösung (30 mM in Wasser, Endkonzentration 6 mM) hinzugegeben, gut durchmischt, und die Probe dann 30 s belichtet. Die Reaktion wurde *in situ* detektiert, wobei jedes Absorptionsspektrum (Messbereich: 200-1000 nm) eine Akkumulierung von 20 Spektren darstellt, die innerhalb einer Sekunde aufgenommen wurden. Zur Auswertung wurde das Spektrum zum Zeitpunkt $t = 0$ s (Dunkel) von dem Spektrum bei $t = 30$ s (Licht) subtrahiert.

Die Photooxidation von P680 zu P680^{•+} in Gegenwart von Silikomolybdat (SiMo) wurde mit dem oben beschriebenen Blitz-Spektrometer bei 4 °C gemessen. Die RC wurden auf eine Konzentration von 1,1 μM eingestellt, mit 200 μM SiMo versetzt, und acht Sekunden mit weißem Licht einer Intensität von $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet. Hierzu wurde eine Halogenlampe mit Lichtleiter und einem getriggerten mechanischen Shutter benutzt.

3 Isolierung und Charakterisierung von 6-Chl PS II-RC

3.1 Isolierung

Die Isolierung der 6-Chlorophyll Reaktionszentren des Photosystem II (PS II-RC) entsprach im wesentlichen der von Gall etablierten Methode [60;81], welche auf der Methode von Nanba und Satoh [28] basiert. Sämtliche, für die Isolation notwendigen Geräte (Rotoren, Zentrifugenbecher, Glasgefäße) und Lösungen wurden vorgekühlt (4 °C) verwendet. Alle Schritte wurden in Dunkelheit auf Eis oder unter grünem Sicherheitslicht ($<10 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 515-560 nm) im Kühlraum (4-8 °C) durchgeführt.

B Material und Methoden

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung von PS II-RC dienen Blätter von 10-14 Tage alten grünen Erbsenkeimlingen. Zur Aussaat wurden die Erbsensamen (Sorte „ERBI“, BayWa) in einem 50 x 80 cm großen Pflanzgefäß auf einer 5 cm hohen Pflanzenerdschicht (Mischung aus dem Botanischen Garten München) verteilt, mit einer etwa 2 cm hohen Erdschicht bedeckt und mit Leitungswasser gegossen. Die Anzucht erfolgte in einem Versuchsgewächshaus des Botanischen Instituts ohne Zusatzbeleuchtung. Nach etwa 2 Wochen konnten die ca. 10 cm hohen Pflanzen geerntet werden, wobei nur die Blätter verwendet wurden. Nicht sofort verwendetes Pflanzenmaterial wurde bei -20 °C gelagert und bei Bedarf verwendet.

1. Die Erbsenblätter (500 g) wurden mit 500 mL STN-Puffer (10 mM Tricin, pH 8, 400 mM Saccharose, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) im Mixer zerkleinert und durch 4 Lagen Baumwollgaze filtriert.
2. Das Filtrat wurde zentrifugiert (15 min, 10.000g, 4 °C), der Überstand dekantiert und das Pellet in 70 mL Tricin-Puffer (20 mM, pH 8) mit 150 mM NaCl und 10 mM MgCl₂ resuspendiert, mit dem Potter-Homogenisator homogenisiert und zentrifugiert (12 min, 17.500g, 4 °C).
3. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 mL einer MgCl₂-Lösung (10 mM in Wasser) suspendiert, homogenisiert und zentrifugiert (12 min, 17.500g, 4 °C).
4. Zur Bestimmung des Gesamtchlorophyllgehalts wurde das Pellet in wenig (<35 mL) MES-Puffer (20 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, pH 6,5) mit 10 mM MgCl₂ überführt und homogenisiert. Aus dieser Suspension wurden Aliquots zu 10 µL gezogen und durch Schütteln mit 1 mL 80 % Aceton/Wasser (v/v) das Chlorophyll extrahiert. Der Gesamtchlorophyllgehalt des Extrakts - und somit auch der von 1 mL Suspension - wurde mit folgender Formel (gültig für 1 cm Küvettschichtdicke) bestimmt [82]:

$$\text{Chl } a + \text{Chl } b = (20,2 \times \text{OD}_{645} - \text{OD}_{710}) + 8,02 \times (\text{OD}_{663} - \text{OD}_{710}) / 10 \text{ [mg/mL]}$$

Der Gesamtchlorophyllgehalt der Suspension – er entspricht dem gemessenen Chlorophyllgehalt des Aceton/Wasser-Extrakts multipliziert mit dem Suspensionsvolumen – wurde durch Zugabe des entsprechenden Volumens an MES-Puffer (20 mM, pH 6,5) mit 10 mM MgCl₂ auf einen Wert von 1,75 mg/mL eingestellt.

B Material und Methoden

5. Nun wurde die Suspension mit TX-100 (30 % in Wasser) versetzt, wobei pro Milligramm Chlorophyll 70 μ L Tritonlösung (entspricht 21 mg TX-100 pro mg Chl) zugegeben wurde. Durch leichtes Schwenken wurde diese Suspension gemischt und im Dunkeln auf Eis 20 min inkubiert.
6. Nach der Zentrifugation (40 min, 40.000g, 4 °C) wurde der Überstand abdekantiert und von diesem zwei Aliquots zu je 10 μ L abgenommen. Das Pellet wurde in 50 mL MES-Puffer (20 mM, pH 6,5) mit 10 mM MgCl₂ resuspendiert, homogenisiert und auch hiervon zwei Aliquots von je 10 μ L abgefüllt. Diese Aliquots (zwei des Überstandes und zwei des resuspendierten Pellets) wurden wie oben beschrieben mit jeweils 1 mL 80 % Aceton/Wasser (v/v) extrahiert und spektroskopisch vermessen. Hierbei wurde das Chlorophyll *a* zu Chlorophyll *b* Verhältnis im Überstand und in der Suspension mit den nachfolgenden Formeln bestimmt (gültig für eine Küvettenschichtdicke von 1 cm) [82]:

$$\text{Chl } a = (12,7 \times \text{OD}_{663} - \text{OD}_{710}) + 2,69 \times (\text{OD}_{645} - \text{OD}_{710}) / 10 \text{ [mg/mL]}$$

$$\text{Chl } b = (22,9 \times \text{OD}_{645} - \text{OD}_{710}) + 4,68 \times (\text{OD}_{663} - \text{OD}_{710}) / 10 \text{ [mg/mL]}$$

Der ermittelte Quotient (Verhältnis von Chl *a* zu Chl *b*) sollte im Überstand einen Wert zwischen 1 und 2 und in der Suspension zwischen 4 und 6 ergeben. In diesen Werten zeigte sich die Effektivität der im Schritt 5 durchgeführten Solubilisierung der Membranen mit TX-100. An dieser Stelle konnte die PS II-RC-Isolierung unterbrochen werden, hierfür wurde die Suspension nach Zugabe von 5-10 % (v/v) Glycerin in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

7. Im Rahmen der Unterbrechung wurde die aufgetaute Suspension zentrifugiert (40 min, 40.000g, 4 °C) und der Überstand abdekantiert. Das Pellet wurde in 45 mL Tris-HCl Puffer (50 mM, pH 9) resuspendiert, homogenisiert und 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert.
8. Nach Zentrifugation der Suspension (30 min, 40.000g, 4 °C) wurde das Pellet in 30 mL Tris-HCl Puffer (50 mM, pH 6,8) aufgenommen, homogenisiert und der Gesamtchlorophyllgehalt wie unter Punkt 4 beschrieben, bestimmt. Die Suspension wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge an Tris-HCl Puffer (50 mM, pH 6,8) auf einen Gesamtchlorophyllgehalt von 1 mg/mL eingestellt.
9. Zusätzlich wurde Gesamtvolumen der Suspension bestimmt und mit der nachfolgenden Formel die Mengen an zuzugebenden TX-100 (30 % in Wasser) zu berechnen (entspricht einer TX-100 Endkonzentration von 4 % (v/v)):

B Material und Methoden

Tritonmenge [mL] = Gesamtvolumen der Suspension x 0,151

Diese mit Triton versetzte Suspension wird sogleich im Potter-Homogenisator gründlich gemischt und 1 Stunde auf Eis im Dunkeln gerührt.

10. Nach diesem Schritt wurde die Lösung zur Abtrennung nicht solubilisierter Fragmente zentrifugiert (60 min, 100.000g, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert (in diesem befinden sich die solubilisierten PS II Membranproteine) und anschließend chromatographisch aufgereinigt.
11. Zur chromatographischen Aufreinigung wurde eine Säule (2,5 x 10 cm) mit Toyopearl TSK-DEAE-650 (S) gepackt und mit TTX-Puffer (50 mM Tris, pH 6,8, 0,3 mM TX-100) mit 30 mM NaCl äquilibriert. Die Säule wurde mit den solubilisierten PS II-Fragmenten beladen (wobei je nach Isolation zwischen 50 und 150 mg Chl aufgetragen wurde). Die an die Säule adsorbierten RC wurden ca. 14 h mit TTX-Puffer mit 30 mM Natriumchlorid (NaCl) gespült (mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,5-3 mL/min). Gegen Ende der Zeit wurde der Waschpuffer absorptionspektroskopisch überprüft.
12. Ab dem Zeitpunkt, bei dem im Waschpuffer $OD_{433} < OD_{415}$ war, wurde ein Gradientenmischer an die Säule angeschlossen, um die RC mit 300 mL eines linearen NaCl-Dichtegradienten (30-250 mM) zu eluieren. Das Eluat wurde in 1,5 mL Fraktionen gesammelt und spektroskopisch vermessen. Die grünen Hauptfraktionen (RC-Fraktionen) wurden gesammelt und mit Tris-HCl Puffer (50 mM, pH 6,8) auf das fünffache Volumen verdünnt.
13. Um das Detergenz TX-100 gegen *n*-Dodecyl- β -D-maltosid (DM) auszutauschen, wurden die gesammelten, verdünnten RC-Fraktionen auf eine kleinere Konzentrierungssäule (1,5 x 2 cm) aufgetragen, gepackt mit Toyopearl TSK-DEAE-650 (S) und äquilibriert mit TTX-Puffer (50 mM Tris, pH 6,8, 0,3 mM TX-100) mit 30 mM NaCl. Für den Detergenzaustausch wurde so lange mit TDM-Puffer (50 mM Tris, pH 6,8, 1,0 mM DM) mit 30 mM NaCl gespült, bis kein TX-100 mehr im Spülpuffer detektierbar war ($OD_{280} < 0,01$). Nach der Elution mit TDM-Puffer (50 mM Tris, pH 6,8, 1,0 mM DM) mit 400 mM NaCl wurden die RC aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die PS II-RC konnten bei -70 °C gelagert werden.

Die 5-Chlorophyll Reaktionszentren des Photosystems II (5-Chl PS II-RC) wurden von F. Vacha (Molekularbiologisches Institut für Pflanzen und Akademie der Wissenschaft,

Südböhmische Universität Budweis, Tschechien) nach seiner Methode isoliert [66] und für die Rekonstitutionsexperimente zur Verfügung gestellt. Falls notwendig, wurden die RC über Ultrazentrifugation mit Centricon-30 Röhren (Amicon, Ausschlussgröße 30 kDa) bei 1.000g aufkonzentriert.

3.2 Proteinzusammensetzung

3.1.1 Denaturierende Polyacrylamidgel Elektrophorese

Um die Reinheit der isolierten RC zu testen, wurde standardmäßig eine SDS-PAGE durchgeführt. Hierzu wurden die in Natrium Dodecylsulfat (SDS) denaturierten Proteine in einem diskontinuierlichen System, entsprechend ihrem Molekulargewicht, aufgetrennt. In dem hier verwendeten System wurde noch zusätzlich 6 M Harnstoff zugesetzt:

Sammelgel:	4 % Acrylamid (mit 3 % Crosslinker), pH 6,8, 6 M Harnstoff
Trenngel:	12 % Acrylamid (mit 3 % Crosslinker), pH 8,8, 6 M Harnstoff
Apparatur:	Biorad Mini-Protean II (Biorad)
Auftragspuffer:	Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 6,8) mit 3 % (v/v) SDS, 5 % (v/v) Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin und 0,1 % (v/v) Bromphenolblau.
Laufpuffer:	Tris-Puffer (25 mM, pH 8,3) mit 192 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS
Laufbedingungen:	0,3 h, 50 V (Sammelgel) dann 1,1 h 200 V (Trenngel)
Probepreparation:	Die Proben wurden mit dem Auftragspuffer vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (ein Erhitzen der Probe führt zu Aggregationen und wurde deshalb nicht durchgeführt).
Detektion:	Serva Blue R (siehe B.3.1.3)

3.1.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Für die zweidimensionale Polyacrylamid – Gelelektrophorese wurden die isolierten 6-Chl PS II-RC auf das von Müller [84] für solubilisierte Thylakoidmembranen optimierte System aufgetragen.

1. Dimension (Blue-Native PAGE):

Sammelgel:	4 % Acrylamid (mit 3 % Crosslinker); 50 mM Bis-Tris, pH 7,0, 500 mM ϵ -Aminocaprinsäure
Trenngel:	6-12 % Acrylamid (mit 3 % Crosslinker), 50 mM Bis-Tris, pH 7,0, 500 mM ϵ -Aminocaprinsäure)
Apparatur:	Biorad Protean II
Anodenpuffer:	50 mM Bis-Tris, pH 7,0
Kathodenpuffer:	50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris, pH 7,0 und 0,02 % (w/v) Serva Blue G
Laufbedingungen:	150 V (Sammelgel), 500-1000 V (Trenngel).
Probepreparation:	Die Proben wurden mit 60 μ L ACA-Puffer (750 mM ϵ -Aminocaprinsäure, 50 mM Bis-Tris, pH 7,0, 0,5 mM EDTA) und 5 μ L einer Lösung bestehend aus 750 mM ϵ -Aminocaprinsäure und 5 % (w/v) Serva Blue G versetzt und in die Geltaschen pipettiert.
Durchführung:	Alle Puffer wurden vorgekühlt verwendet (4 °C), und die Apparatur während der Trennung auf 8 °C temperiert. Nachdem die Serva blue G Lauffront etwa die Hälfte des Trenngels erreicht hatte, wurde der Kathodenpuffer gegen den gleichen Laufpuffer, aber ohne Serva blue G, ausgetauscht.

Nach Beendigung des Laufs wurden die einzelnen Spuren mit einem scharfen Skalpell ausgeschnitten und dieser Gelstreifen in Solubilisierungs- und Denaturierungspuffer (66 mM Dithiothreitol, 66 mM Na₂CO₃, 2 % (w/v) SDS) 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert.

2. Dimension (SDS-PAGE):

Als nächster Schritt wurde der inkubierte Gelstreifen auf ein SDS-Polyacrylamid Gel mit Harnstoff einer Dicke von 1 mm aufgelegt und mit Sammelgel überschichtet. Die Bedingungen hierfür waren die gleichen wie oben unter „Denaturierende Polyacryl-

amidgel Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli [83]“ beschrieben. Die hier verwendeten Gele waren 20 x 20 x 0,1 cm (Höhe x Länge x Dicke) und die Trennung der Proteine erfolgte bei 15 °C und 40 mA pro Gel.

3.1.3 Färbung der Proteingele

Coomassiefärbung:

Die Gele wurden in einer Coomassie-Färbelösung (0,25 % (w/v) Serva Blue R, 40 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Essigsäure) 60 Minuten unter Schwenken inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrunds geschah durch Inkubation in einer Entfärberlösung (40 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Essigsäure), die mindestens zweimal gewechselt wurde.

Silberfärbung:

Für die Silberfärbung wurde mit einer Gelfärbeapparatur (Hoefer) folgendes Programm durchgeführt:

1. Fixierung: 40 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Essigsäure, 30 Min.
2. Sensibilisierung: 30 % (v/v) Ethanol, 0,012 % (w/v) Glutaraldehyd, 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat, 0,5 M Natriumacetat-tetrahydrat, 30 Min.
3. Waschen: Wasser (zweifach destilliert), 3 x 5 Min.
4. Silber-Lösung: 14,6 mM Silbernitrat, 1,5 % (v/v) Formaldehyd, 20 Min.
5. Waschen: Wasser (zweifach destilliert), 2 x 1 Min.
6. Entwickler-Lösung: 240 mM Natriumcarbonat, 0,75 % (v/v) Formaldehyd, 2-10 Min.
7. Stop-Lösung: 39,2 mM Na₂EDTA-dihydrat, 10 Min.
8. Waschen: Wasser (zweifach destilliert), 3 x 5 Min.
9. Aufbewahren in: 10 % (v/v) Glycerin.

Jede Lösung wurde mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt, wobei für die Färbeapparatur ein Volumen von 125 mL nötig war.

4 Modifikation der Reaktionszentren von Photosystem II

4.1 Pigmenttausch an 6-Chl PS II-RC

100 nmol des auszutauschenden Pigments wurden in 20 μ L MeOH/1 % (v/v) Triton X-100 (TX-100) gelöst (ergab im Austauschansatz eine TX-100 Endkonzentration von 0,02 % (v/v)) und für 30 s mit Ultraschall behandelt. Das Lösungsmittel wurde im Argonstrom abgeblasen. Auf das getrocknete Pigment wurden 500 μ L einer RC-Lösung (6,4 μ M) in TDM-Puffer (50 mM Tris, pH 6,8, 1,0 mM DM) mit 30 mM NaCl (TDM-Puffer/30 mM NaCl) gegeben, 30 s mit Ultraschall behandelt und bei 30 °C 45 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben mit 500 μ L TDM-Puffer/30 mM NaCl verdünnt und 10 Minuten auf Eis gestellt. Zur Entfernung ungelöster Pigmentpartikel wurde die Lösung zentrifugiert (10 min, 10.000g, 4 °C). Wurde anschließend chromatographisch aufgereinigt, so konnte der Überstand sofort auf die Säule aufgetragen werden. Wurde durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt, so musste das vorhandene Triton X-100 davor noch chromatographisch entfernt werden. Hierzu wurde der Überstand aus der Zentrifugation auf eine mit TDM-Puffer/30 mM NaCl äquilibrierte, Q-Sepharose Säule (0,5 x 2 cm) aufgetragen und solange mit TDM-Puffer/30 mM NaCl gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm im Waschpuffer $<0,01$ war. Danach wurden die RC mit TDM-Puffer/400 mM NaCl eluiert und das Eluat (ca. 0,5 mL) auf einen linearen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen (Kapitel B.4.3.2).

4.2 Pigmentrekonstitution an 5-Chl PS II-RC

Das verwendete Pigment (100 nmol) wurde in 20 μ L MeOH/1 % (v/v) Triton X-100 gelöst und 30 s mit Ultraschall behandelt. Nachdem das Lösungsmittel im Argonstrom abgeblasen war, wurden 1 mL einer 5-Chl PS II-RC-Lösung (7,6 μ M) in TDM-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1,0 mM DM) mit 30 mM NaCl (TDM-Puffer/30 mM NaCl) zugegeben, 30 s mit Ultraschall behandelt und bei 29 °C 40 min inkubiert. Danach wurde die Reaktionsmischung mit gleichem Volumen TDM-Puffer/30 mM NaCl verdünnt und 5 min auf Eis gestellt. Um eventuell nicht gelöstes Pigment aus dem Ansatz zu entfernen, wurde der Rekonstitutionsansatz zentrifugiert (10 min, 10.000g, 4 °C) und der Überstand auf eine mit gefüllte Q-Sepharose (äquilibriert mit TDM-Puffer/30 mM NaCl) Pipettensäule (0,5 x 2 cm) gegeben. Zur Entfernung des TX-100 wurden die adsorbierten RC solange mit TDM-Puffer/30 mM NaCl gewaschen, bis $OD_{280} <0,01$ war. Nach der Elution mit TDM-Puffer/400 mM NaCl wurden die RC (ca. 0,5 mL) auf

einen linearen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und aufgereinigt (Kap. C.4.3.2).

4.3 Aufreinigung nach Modifikation

4.3.1 Säulenchromatographische Aufreinigung

Zur säulenchromatographischen Aufreinigung wurden mit Q-Sepharose FF gefüllte Pippettensäulen (0,5 x 2 cm), welche zuvor mit TTX-Puffer/30 mM NaCl (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,3 mM TX-100) mit 30 mM NaCl (TTX-Puffer/30 mM NaCl)) äquilibriert wurden, mit der Reaktionsmischung beladen. Die adsorbierten PS II-RC wurden solange mit TTX-Puffer/30 mM NaCl gespült, bis absorptionsspektroskopisch kein Pigment mehr im Waschpuffer detektiert wurde, d.h. die OD war im Bereich von 300 bis 800 nm $< 0,01$. Die RC wurden mit 1,5 mL TTX-Puffer/400 mM NaCl eluiert, das Eluat mit 3 mL Tris-HCl Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8) verdünnt und auf eine zweite, wie oben beschrieben vorbehandelte, Q-Sepharose FF-Säule aufgetragen. Die adsorbierten RC wurden mit TTX-Puffer/30 mM NaCl gespült, bis auch hier absorptionsspektroskopisch kein Pigment mehr im Waschpuffer zu sehen war. Jetzt wurde der TTX-Puffer/30 mM NaCl gegen TDM-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1,0 mM DM) mit 30 mM NaCl (TDM-Puffer/30 mM NaCl) ausgetauscht. Dazu wurden die adsorbierten RC so lange mit TDM-Puffer/30 mM NaCl (10-20 mL) gespült, bis im Waschpuffer $OD_{280\text{ nm}} < 0,01$ war. Die RC wurden mit 0,5-1,0 mL TDM-Puffer/400 mM NaCl eluiert und das Eluat absorptionsspektroskopisch vermessen. Zur Bestimmung der Wiederauffindungsrate wurden die Reaktionszentren photometrisch quantifiziert und in Bezug zu der Menge an verwendeten PS II-RC gesetzt. Die typische Menge an wiedergefundenen RC lag bei dieser Methode zwischen 40 und 50 Prozent der eingesetzten Menge.

4.3.2 Aufreinigung durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Die linearen Saccharose-Dichtegradienten wurden aus je 5 mL einer 0,1 M und einer 1,0 M Saccharoselösung (0,1 M und 1,0 M Saccharose in 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM KCl, 1 mM DM) mit Hilfe eines Gradientenmischers (Werkstatt-Eigenbau) und einer Peristaltikpumpe (Gilson minipuls 2, Pumpgeschwindigkeit 1,5 mL pro min) in Zentrifugengläser (14 x 95 mm) gegossen. Dieser Gradient wurde mit der Probe (0,5 mL) überschichtet und in einem Ausschwingrotor (RPS 40T) ultra-

zentrifugiert (16 h, 190.000g, 4 °C). Nach der Zentrifugation wurde ein Glaskanüle ($\varnothing = 1$ mm, $l = 100$ mm) vorsichtig in die Mitte des Zentrifugenröhrchens bis auf den Boden eingeführt. Diese Kanüle war an eine Peristaltikpumpe angeschlossen, mit der der Gradient von unten nach oben abgepumpt und in 1 mL Fraktionen gesammelt wurde. Diese Fraktionen wurden einzeln absorptionspektroskopisch vermessen. Zur Bestimmung der Wiederauffindungsrate wurden die RC-Fraktionen vereint und spektral-photometrisch quantifiziert. Die typische Menge an wiedergefundenen RC lag bei dieser Methode zwischen 70 und 95 Prozent der eingesetzten Menge.

4.4 Pigmentextraktion und HPLC-Analyse

4.4.1 Pigmentextraktion

Die Extraktion der Pigmente erfolgte im wesentlichen nach der von Struck [78] beschriebenen und von Gall [60] leicht modifizierten Methode. Hierfür wurden die RC auf kleine Q-Sepharose Säule (Pasteurpipette, 0,5 x 2 cm) adsorbiert, und mit etwa 20 mL Wasser gewaschen, um so Puffer und Detergenz zu entfernen. Zur Extraktion wurden die Pigmente nacheinander mit 3 mL MeOH und 2 mL CHCl_3 eluiert. Der ungefärbte Vorlauf wurde verworfen und das gefärbte Eluat in einem 10 mL Rundkolben aufgefangen. Das Lösungsmittel des gesammelten Eluats wurde dann am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt, wobei die Zugabe von 5 mL Toluol als Azeotrop auch letzte Wasserspuren beseitigte. Die trockenen Pigmente wurden in 200 μL Toluol aufgenommen und sofort in die HPLC injiziert.

4.4.2 Pigmentanalyse

HPLC-System: 2 Pumpen LKB 2248 (Pharmacia), Kontroll-Element LCC 2252 (Pharmacia), Hochdruckmischer (Pharmacia), Injektor 9725i (Rheodyne) mit 100 μL Injektionsvolumen.
Detektion: Tidas Diodenarray-Spektrometer (300-1100 nm) (J&M).
Programm: Spectralys 1.55 (Labcontrol)

System I:

Feste Phase: Kieselgel Econosphere 5 μm ; (4,6 mm x 50 mm)
Flüssige Phase: Laufmittel A 100 % Toluol
Laufmittel B 90 % Toluol, 7 % MeOH, 3 % 2-Propanol
Fluss-Geschwindigkeit: 2 mL/min

B Material und Methoden

Gradient:

Zeit [min]	0	1	8	10	18	21	23	28	30	35
Anteil B [%]	0	3	3	10	15	50	100	100	0	0

System II:

Feste Phase: Kieselgel Econosphere 5 µm; (4,6 mm x 150 mm)

Flüssige Phase: Laufmittel A 100 % Toluol

Laufmittel B 85 % Toluol, 15 % Tetrahydrofuran (THF)

Fluss-Geschwindigkeit: 2 mL/min

Gradient:

Zeit [min]	0	5	15	20	28	37
Anteil B [%]	0	8	15	100	0	0

Soweit nicht anders angegeben, wurde das System I zur Analyse der Pigmentzusammensetzung verwendet. System II wurde nur dann verwendet, wenn Ni-Chl und Phe zusammen im Ansatz vorhanden waren (siehe auch Kapitel C.1.2 und C.2.2). Die jeweiligen Pigmente wurden neben ihrer Retentionszeit durch *in situ* Spektroskopie identifiziert, wobei Retentionzeit und Absorptionsspektren der extrahierten mit denen authentischer Pigmente im selben Laufmittelsystem verglichen wurden. Zur Quantifizierung des Pigmentgehalts wurden für jedes der nativ vorkommenden und für jedes der in den Versuchen verwendete Pigment (Tab. 2) entsprechende Eichsysteme entwickelt (siehe auch Kapitel C.1.2 und C.2.2).

5 Stabilitätsuntersuchungen von 6-Chl PS II-RC in Amphipol

5.1 Allgemeines

Die Amphipole des Typs A8-35 (siehe Abb. 46) wurden im Labor von J-L Popot (CNRS, Paris, Frankreich) nach der Vorschrift von Tribet [85] synthetisiert. Für die Versuche wurden PS II-RC in TDM-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 1,0 mM DM) mit 400 mM NaCl und in TCH-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM CHAPS) mit 400 mM NaCl verwendet. Alle verwendeten Reaktionszentren stammten aus einer Präparation.

5.2 Bestimmung der benötigten Amphipolmenge

Reaktionszentren in TDM-Puffer: Zu 15 μL PS II-RC in TDM-Puffer (0,5 g/L \equiv 5 μM , in 50 mM Tris, 180 mM NaCl, 0,72 mM DM, pH 7,0) wurden jeweils 0 (Blindprobe), 7,5, 15,0 und 37,5 μL einer Amphipol-Lösung (1g/L, A8-35) gegeben, entsprechend einem molaren Protein zu Amphipol-Verhältnis von 1:0, 1:1, 1:2 und 1:5.

Reaktionszentren in TCH-Puffer: Zu 15 μL PS II-RC (0,3 g/L \equiv 3 μM , in 50 mM Tris, 120 mM NaCl, 10 mM CHAPS, pH 8,0) wurden jeweils 0 (Blindprobe), 9, 22,5 und 45,0 μL der Amphipol-Lösung, entsprechend einem RC zu Amphipol-Verhältnis von 1:0, 1:2, 1:5 und 1:10, gegeben. Die Proben wurden gemischt und 15 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach wurden sie mit Tris-HCl Puffer (50 mM, pH 8,0) auf 150 μL aufgefüllt (entspricht einer 10-fachen Verdünnung) und zentrifugiert (10 min, 190.000g, 4°C). Der Überstand wurde auf die Anwesenheit eines Pellets untersucht. Nach Zentrifugation wurden die Proben spektralphotometrisch vermessen. Bei Vorhandensein eines Pellets wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und dann gemessen.

5.3 Solubilisierungstest

5.3.1 Detergenzaustausch durch Verdünnen

Reaktionszentren in TDM-Puffer: 9,5 μL einer Amphipol-Lösung (100g/L, A8-35) wurden zu 900 μL PS II-RC (0,21 g/L \equiv 2,1 μM in 50 mM Tris, 80 mM NaCl, 0,5 mM DM, pH 7) gegeben, gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Das molare RC zu Amphipol-Verhältnis lag hier bei 1:5. Dann wurde mit Tris-HCl (50 mM, pH 7) um das 10-fache verdünnt, so dass eine „unwirksame“ Detergenzkonzentration vorliegt (<0,1 mM \equiv sub-CMC) vorliegt. Die Probe wurde in dieser Verdünnung unmittelbar für Messungen verwendet.

Reaktionszentren in TCH-Puffer: 8,5 μL der Amphipol-Lösung (100g/L, A8-35) wurden zu 500 μL PS II-RC (0,32 g/L \equiv 3,2 μM in 50 mM Tris, 180 mM NaCl, 5mM CHAPS, pH 8) gegeben, gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Das molare RC zu Amphipol-Verhältnis war hier 1:5. Dann wurde mit Tris-HCl (50 mM, pH 8) um das 10-fache verdünnt, so dass CHAPS unter dessen CMC (<8 mM) vorlag. Die Probe wurde in dieser Verdünnung unmittelbar für Messungen verwendet.

5.3.2 Detergenzaustausch durch Biobeads

2,2 µL einer Amphipol-Lösung (100 g/L, A8-35) wurden zu 100 µL PS II-RC (0,433 g/L \equiv 4,3 µM in 50 mM Tris, 160 mM NaCl, 1,0 mM DM, pH 7,0) gegeben, gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde mit 900 µL Tris (50 mM, pH 7,0) verdünnt und mit 2,2 mg Biobeads (P6), entsprechend einem Detergenz zu Biobeads-Verhältnis (w/w) von 1:10, versetzt. Die Mischung wurde für 90 min im Dunkeln auf Eis gerührt. Nach der Entfernung der Biobeads (durch Abpipettieren des Überstands) wurde die Lösung für Messungen verwendet.

5.4 Messung der Langzeitstabilität

Die Reaktionszentren wurden wie in Kapitel C.5.3 beschrieben behandelt, sofort nach dem Amphipol-Austausch in temperierte Küvettenhalter (4 und 20 °C) gestellt und die zeitliche Veränderung der Absorption verfolgt. Die Messungen wurden über 14-16 Stunden durchgeführt, wobei jede 20 Minuten ein Spektrum aufgenommen wurde. Die Auswertung über den Braun'schen Aktivitätsparameter (%P680) [13], der mit folgender Formel aus dem Absorptionsspektrum ermittelbar ist (gültig für eine Schichtdicke von 1 cm).

$$\%P680 = (2,38 \cdot (OD_{679} - OD_{730}) / (OD_{672} - OD_{730}) - 1,64) \cdot 100$$

C Ergebnisse

1 Analytik und Spektroskopie an PSII-RC

1.1 Proteinzusammensetzung

Die hier isolierten 6-Chl PS II-RC (C.3.1) wurden routinemäßig durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht und die Proteine mit Coomassie-Blau R6 angefärbt (Abb.4).

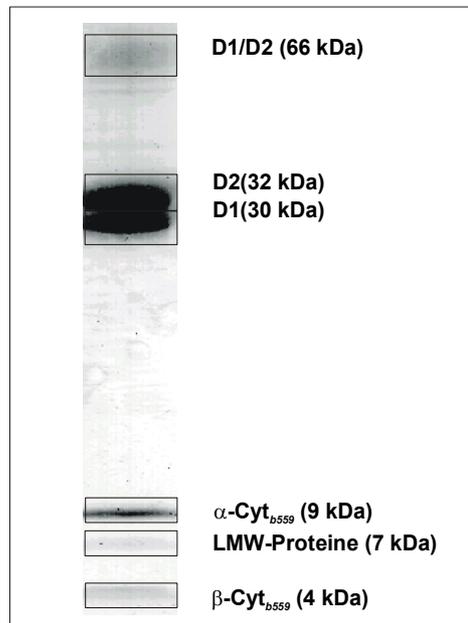


Abb. 4: SDS– Harnstoff-Gel mit isolierten 6-Chlorophyll-Reaktionszentren des Photosystem II, Coomassie-Blau gefärbt. Es wurden 16 μ g Protein aufgetragen. Die Molekularmassen wurden mit Markerproteinen bestimmt (Spur ist nicht gezeigt).

Auf dem Gel (Abb. 4) sind die Banden des D1/D2-Heterodimer (66 kDa), des D2 (32 kDa) und D1 Proteins (30 kDa) sowie der α - und β -Untereinheiten des Cyt_{b559} (9 und 4,5 kDa) zu erkennen. Zwischen diesen Untereinheiten ist noch eine Bande vorhanden, welche einem oder mehreren der kleinen, an das RC assoziierten Proteinen, den sog. Low-Molecular-Weight-(LMW) Proteinen, zugeordnet werden kann. Im Bereich zwischen 40 und 50 kDa sind keine Banden sichtbar, so dass eine signifikante Verunreinigung durch die Kernantennen CP43 (43 kDa) und CP47 (47 kDa) ausgeschlossen werden kann. Eine signifikante Verunreinigung mit Fremdproteinen konnte im Rahmen einer Kooperation mit Bernd Müller (Botanisches Institut München, Labor

C Ergebnisse

Eichacker) ausgeschlossen werden. Hierfür wurden die Reaktionszentren einer Präparation in einem hochaufgelösten zweidimensionalen Elektrophoresesystem auf deren Proteinzusammensetzung untersucht.

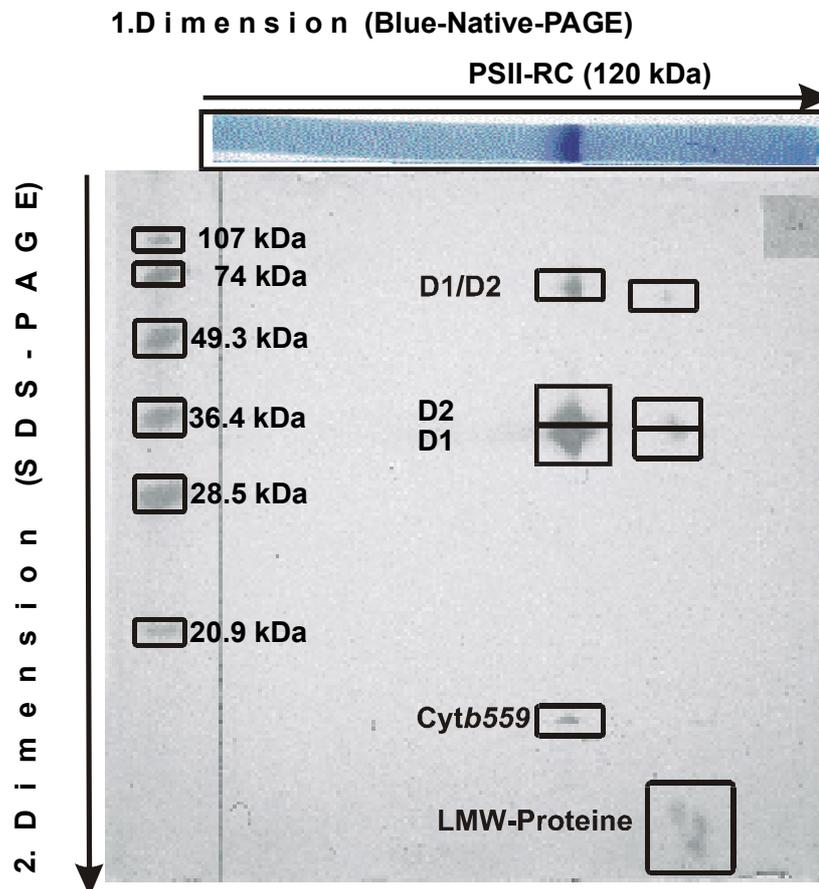


Abb. 5: Zweidimensionale Gelelektrophorese isolierter 6-Chlorophyll Reaktionszentren. Erste Dimension „Blue-Native-PAGE“-horizontaler Gelstreifen oben, aufgetragen wurden 25 µg Protein; Zweite Dimension SDS-Harnstoff-Gel – Silberfärbung. Es wurden zusätzlich Markerproteine aufgetragen (Spur links). Die Pfeile geben die Laufrichtungen der Gele in den jeweiligen Dimensionen wieder.

In der ersten Dimension wurde hierzu ein auf Schagger und Jagow [86] basierendes System zur Trennung von nativen Proteinkomplexen verwendet (erste Dimension, Blue-Native-PAGE). In der zweiten Dimension wurden die ausgeschnittenen und entsprechenden vorbehandelten Gelspuren der „ersten Dimension“ jeweils auf ein eigenes SDS-Harnstoffgel (2. Dimension, SDS-PAGE) aufgelegt, mit Sammelgel überschichtet und aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden das Gel silbergefärbt und die Proteingewichte durch einen Molekulargewichtsstandard bestimmt. Der Gelstreifen der ersten Dimension und das Gel der zweiten Dimension sind in Abb. 5 dargestellt.

C Ergebnisse

In der ersten Dimension (Abb. 5, oberer horizontaler Gelstreifen) erfolgte eine Trennung in eine starke Bande, entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 120 kDa, und eine schwache Bande bei 100 kDa (in der Abbildung nicht sichtbar). Für das isolierte PS II-RC wird ein Gewicht von 106 kDa angegeben [87], was mit dem in der ersten Dimension bestimmten Komplexgewicht übereinstimmt. In der zweiten Dimension wurde noch zusätzlich ein Proteinmarker (Abb. 5, linke Spur) aufgetragen. Der 120 kDa Komplex trennte sich hier in verschieden große Proteine, die den RC-Proteinen zugeordnet werden können: Das D1/D2-Heterodimer (~70 kDa), das D2- (~32 kDa) und D1 Protein (~30 kDa) sowie der Cyt b_{559} -Komplex (16 kDa), der hier nicht in seine α - und β -Untereinheiten getrennt wurde (vergleiche Abb. 4). Die Bande der ersten Dimension, der ein Komplexgewicht von 100 kDa zugeordnet werden konnte (in Abb. 5 nicht zu sehen), trennte sich in der zweiten Dimension weitgehend in die gleichen Bestandteile auf wie die Bande bei 120 kDa.

Zu sehen waren auch hier die Proteine des D1/D2-Heterodimers, die Bande bei 16 kDa fehlte (entsprechend dem Cyt b_{559} -Komplex), aber zusätzlich konnten hier weitere Proteinbanden (zwischen 3 und 10 kDa) gesehen werden, die den Proteinuntereinheiten des Cyt b_{559} -Komplexes (α - und β -Untereinheit) sowie den LMW-Proteinen zugeordnet wurden. In der hier durchgeführten zweidimensionalen Proteinanalyse des isolierten PS II-RC konnten keine Hinweise auf eine Kontamination mit Fremdproteinen (v.a. CP 43 und CP 47) gesehen werden.

1.2 Pigmentanalyse

1.2.1 Trennsystem

Um die Pigmentzusammensetzung zu quantifizieren, wurde das von Gall [60] entwickelte HPLC-System optimiert. Sein Gradientensystem hatte zwar eine gute Trennleistung, aber den Nachteil, dass die Elutionsbande des Pheophytins sehr breit und dessen Retentionszeiten nicht reproduzierbar waren. Um die Fehler bei der quantitativen Auswertung so gering wie möglich zu halten, sollten die Elutionsbanden symmetrisch und möglichst schmal sein, ebenso sollte die Pigmenttrennung unter reproduzierbaren Bedingungen erfolgen. D.h. die Banden sollten gut voneinander getrennt werden, wobei die Retentionszeit und die Form der Banden konstant sein sollten. Besonders wichtig ist hierbei das Elutionsprofil von Pheophytin, denn die Quantifizierung der RC erfolgte meist „relativ“ und zwar bezogen auf 2 Pheophytine.

C Ergebnisse

Für die Optimierung wurde als erstes die Laufmittelzusammensetzung der flüssigen Phase verändert: Das ursprünglich ternäre Gemisch des Laufmittels A, bestehend aus 99,85 % Toluol, 0,05 % Methanol und 0,1 % 2-Propanol, wurde gegen reines Toluol ausgetauscht. Das Laufmittel B behielt aber seine 3 Komponenten, nur wurde der Anteil der darin enthaltenen polaren Lösungsmittel von ursprünglich 95,5 % Toluol, 4,0 % Methanol und 0,5 % i-Propanol auf nun 90 % Toluol, 7 % Methanol, und 3 % 2-Propanol erhöht. Die „Vereinfachung“ der Laufmittelzusammensetzung hatte zum Ziel, mögliche Misch- und Pipettierfehler zu reduzieren, was die Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen und somit auch die der Retentionszeiten erhöhen sollte. Als nächstes wurde das Gradientenprogramm (entspricht der Variation der Laufmittelzusammensetzung in der Zeit) an die feste und die flüssige Phase sowie an die Spezifität der HPLC-Anlage angepasst, so dass die oben genannten Kriterien (schmale Elutionsbanden, gute Trennung, konstante Retentionszeit) erfüllt wurden. Dabei stellte sich das folgende, auf normaler Phase basierende Gradientensystem als besonders gut heraus. Es wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit (bis auf eine Ausnahme) als Standard-Analysesystem (System I) verwendet:

System I:

Feste Phase: Kieselgel Econosphere 5 µm; (4,6 mm x 50 mm)

Flüssige Phase: Laufmittel A 100 % Toluol

Laufmittel B 90 % Toluol, 7 % MeOH, 3 % 2-Propanol

Fluss-Geschwindigkeit: 2 mL/min

Gradient:

Zeit [min]	0	1	8	10	18	21	23	28	30	35
Anteil B [%]	0	3	3	10	15	50	100	100	0	0

Die Ausnahme war die gleichzeitige Analyse von [Ni²⁺]-Chlorophyll *a* (Ni-Chl) und Pheophytin *a* (Phe). Das System I konnte diese Pigmente nicht voneinander trennen. Obwohl bei Injektion einzelner Pigmente die Retentionszeiten des Phe und des Ni-Chl unterschiedlich waren, konnte bei gemeinsamer Injektion beider Pigmente keine Bandentrennung mehr gesehen werden. Die Pigmente liefen in einer Front. Die resultierende Retentionszeit dieser nunmehr „gemeinsamen Bande“ war, verglichen mit der ursprünglichen Zeit des Ni-Chl, kleiner und verglichen mit der des Phe größer. Es scheint, dass die Polarität des Ni-Chl erniedrigt und die des Phe erhöht wurde.

C Ergebnisse

Die einfachste Erklärung für dieses Laufverhalten ist eine Komplexbildung von Phe und Ni-Chl, wobei aber genauere Untersuchungen zur Aufklärung des Effekts nicht durchgeführt wurden. Da Aggregation in polaren Lösungsmitteln besonders ausgeprägt ist [88], bietet sich eine polare mobile Phase an, die möglichst auch als Ligand für Nickel dienen kann. Es wurde festgestellt, dass die Zugabe eines komplexierenden Lösungsmittels (Tetrahydrofuran, THF) das Laufverhalten von Ni-Chl derart verändert, dass dieses und Phe gut voneinander getrennt wurden. Als optimal stellte sich folgendes Gradientensystem (System II) heraus:

System II:

Feste Phase: Kieselgel Econosphere 5 μ m; (4,6 mm x 150 mm)

Flüssige Phase: Laufmittel A 100 % Toluol

Laufmittel B 85 % Toluol, 15 % Tetrahydrofuran (THF)

Fluss-Geschwindigkeit: 2 mL/min

Gradient:

Zeit [min]	0	5	15	20	28	37
Anteil B [%]	0	8	15	100	0	0

Die Abbildung 6 zeigt eine mit Eichpigmenten (Chl, Phe und Ni-Chl) durchgeführte HPLC Analyse. Die Pigmentzusammensetzung der Eichmischung betrug 1 Chl: 1 Phe: 3 Ni-Chl. Obwohl sich die Peaks von Ni-Chl und Phe geringfügig überlappen, konnten sie zur Pigmentquantifizierung herangezogen werden (näheres in Kapitel D.1.2.2, D.1.2.3 und D.2.2). Das System II wurde nur für die Analyse von mit Ni-Chl modifizierten Komplexen verwendet, da die Elutionsprofile der Tetrapyrrolpigmente breiter sind als bei Trennungen mit dem System I (ein Vergleich der beiden Systeme ist in Abb. 7 dargestellt).

Das Chromatogramm des jeweiligen Pigments wurde bei dessen langwelligstem Maximum aufgenommen. Die Abbildung zeigt, dass mit beiden Systemen eine sehr gute Trennung der nativ vorkommenden Pigmente erreicht wurde. Der Vergleich zwischen den Systemen I und II zeigt, dass die Elutionsprofile sämtlicher im System I vorhandener Peaks schmal (scharf) und sehr symmetrisch sind. In dem Chromatogrammen des System I konnten sogar die Epimere des Chlorophylls (*a* und *a'*) getrennt werden (Abb. 7, links: Chl *a'* läuft kurz vor Chl). Wegen dieser Vorteile gegenüber dem System II wurde das System I – soweit nichts anderes erwähnt – als Standard-Analysesystem verwendet.

C Ergebnisse

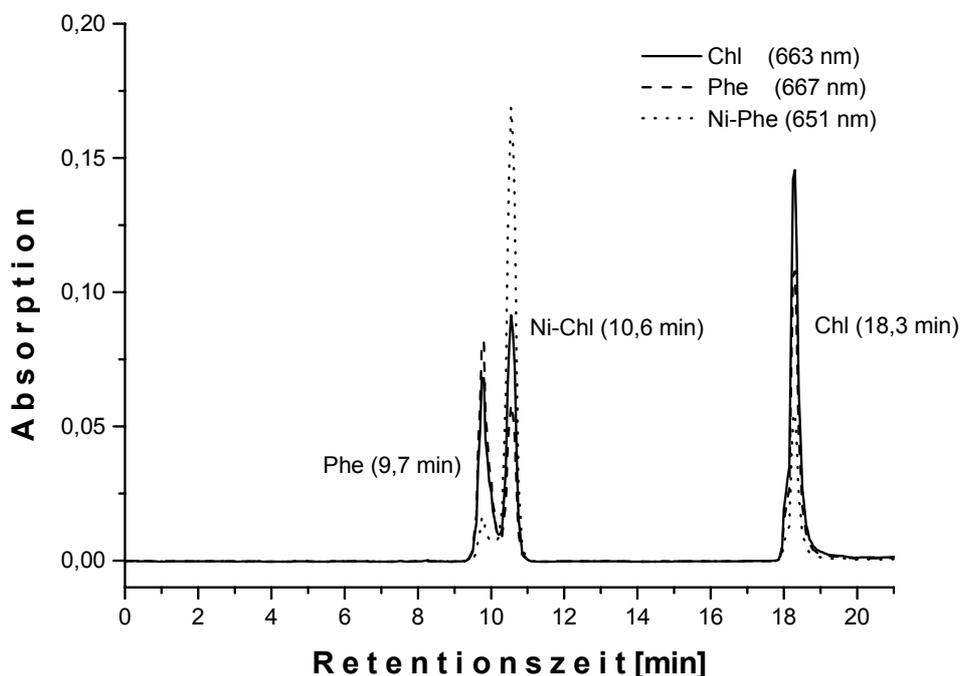


Abb. 6: HPLC-DAD Analyse von Chlorophyll a, Pheophytin a und $[\text{Ni}^{2+}]$ -Chlorophyll a. Hierfür wurden isolierte Pigmente im Verhältnis 1: 1: 3 gemischt, injiziert und mit System II aufgetrennt. Gezeigt sind die am jeweiligen Absorptionsmaximum der Pigmente aufgenommenen Chromatogramme.

1.2.2 Kalibrierung des Trennsystems

Um die Pigmentanalyse quantitativ (bezogen auf 2 Phe) auswerten zu können, wurden System I und II mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pigmenten kalibriert. Für die Eichung wurde eine spektralphotometrisch definierte Menge an reinem Pigment in die HPLC-Anlage injiziert und dessen jeweiliges Elutionsprofil (Chromatogramm) am langwelligsten Maximum aufgenommen. Zur spektroskopischen Mengenbestimmung wurden folgende molaren Extinktionskoeffizienten verwendet (Tab. 1).

Zur Quantifizierung der Pigmente wurden die Peaks, aufgenommen am jeweiligem Absorptionsmaximum, d.h. bei 664 nm für Chl, 668 nm für Phe und 464 nm für Car, integriert. Falls Epimere getrennt waren, wurden die Flächen der Peaks addiert. Die Flächen wurden mit der spektralphotometrisch bestimmten Menge in Beziehung gesetzt, und in einem Diagramm (Eichkurve, Abb. 8) aufgetragen. Die einzelnen Werte stellen Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Messungen dar. Es ergaben sich in

C Ergebnisse

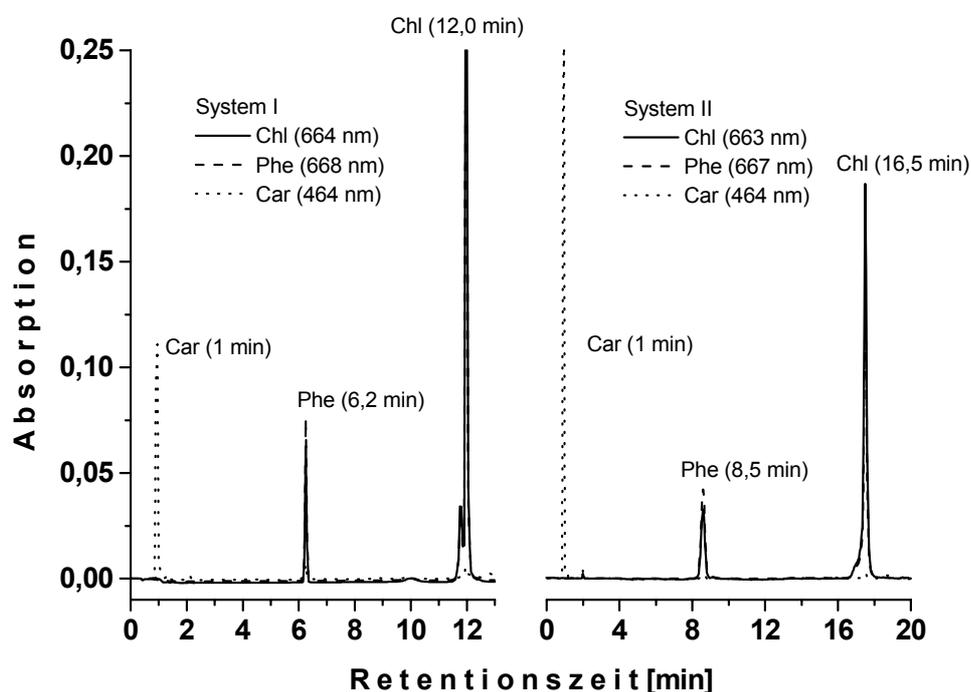


Abb. 7: HPLC-DAD Analyse des Pigmentextrakts isolierter 6-Chlorophyll Reaktionszentren aufgetrennt mit System I (links) und System II (rechts).
Gezeigt sind die am jeweiligen Absorptionsmaximum der Komponenten β -Carotin, Pheophytin a und Chlorophyll a aufgenommene Chromatogramme.

allen Fällen Geraden, deren dazugehörige lineare Gleichung ermittelt wurden. In den Abb. 8 und Abb. 9 sind die Eichkurven der nativen RC-Pigmente (bzw. von Ni-Chl) sowie die dazugehörigen Geradegleichungen dargestellt. Da, wie oben erwähnt, mit zwei Gradientensystemen (System I und II) gearbeitet wurde, mussten solche Geraden für jedes System aufgenommen werden. Die Eichgeraden wurden in regelmäßigen Abständen mit definierten Pigmentmengen und -mischungen kontrolliert und verifiziert. Die Übereinstimmung aller hier vorgestellten Eichgeraden lag zwischen 96 und 99 % (entsprechend einem Korrelationskoeffizienten von 0,96 und 0,99). Mit der Steigung der entsprechenden Ausgleichsgeraden (Abb. 8 und Abb. 9) konnte die relativen Pigmentmenge bezogen auf 2 Phe berechnet werden.⁵

⁵ Zur Berechnung der relativen Pigmentmenge n (pro 2 Phe) wurden folgende Gleichung verwendet: $n_{\text{Pigment}} = \frac{2 \cdot \text{Steigung von Eichgeraden (Phe)}}{\text{Steigung Eichgerade (Pigment)}} \cdot \frac{\text{Peakfläche (Pigment)}}{\text{Peakfläche (Phe)}}$

C Ergebnisse

Pigment	gemessen in:	Extinktionskoeffizient		Referenz
		ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$]	λ_{max} [nm]	
Chlorophyll <i>a</i> (Chl)	Diethylether	90.100	662	[89]
Pheophytin <i>a</i> (Phe)	Diethylether	55.500	667	[90]
β -Carotin (Car)	Aceton	134.000	454	[91]
[3-Acetyl]-chlorophyll <i>a</i> (Ac-Chl) und [3-Acetyl]-demethoxycarbonyl- chlorophyll <i>a</i> (Ac-Py-Chl)	Aceton		677	[76]
		65.200 ¹		
[Zn ²⁺]-Chlorophyll <i>a</i> (Zn-Chl) und [Zn ²⁺]-Methylchlorophyllid <i>a</i> (Zn-Me- Chlid)	Diethylether		654	[92]
		90.300 ²		
[Ni ²⁺]-Chlorophyll <i>a</i> (Ni-Chl)	Chloroform	32.900 ³	654	[93]
Bakteriochlorophyll <i>a</i> (BChl)	Diethylether	101.000	771	[78]
[3-Vinyl]-bakteriochlorophyll <i>a</i> (Vi-BChl)	Diethylether	82.500	745	[78]
Protochlorophyll <i>a</i> (Proto-Chl)	Diethylether	24.300	624	[89]

^{1,2} wurde für die jeweiligen Pigmente gleichgesetzt, ³ ermittelt für Ni-Me-Chlid.

Tab. 1: Tabellarischer Überblick der für hier verwendeten molaren Extinktionskoeffizienten und deren Literaturquelle.

C Ergebnisse

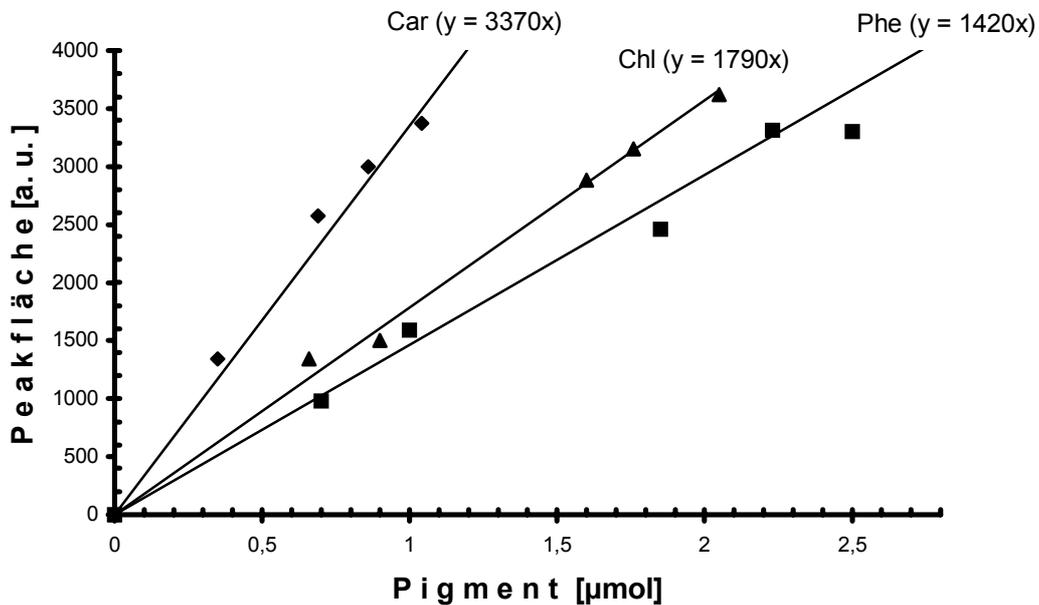


Abb. 8: Eichkurven für die HPLC-DAD Analyse des Pigmentextrakts isolierter 6-Chlorophyll Reaktionszentren, erstellt mit System I.

Spektralphotometrisch bestimmte Mengen an reinem β -Carotin, Pheophytin a und Chlorophyll a wurden in die HPLC injiziert und die Peakfläche der so erhaltenen Chromatogramme integriert. Jeder Punkt stellt einen Mittelwert aus drei Messungen dar. Die Punkte wurden durch eine Gerade miteinander verbunden, deren Gleichung im Diagramm dargestellt ist.

Anmerkung zu den Nachweisgrenzen der Detektierbarkeit und Auswertbarkeit: Bei Proben, deren langwelligstes Absorptionsmaximum eine relative Absorption von mehr als $5 \cdot 10^{-4}$ OD entsprechend einer Konzentration von >5 nM ($\epsilon = 100.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und entsprechend einer Pigmentmenge von >17 pMol hatten, war das Signal-Rauschverhältnis so gut, dass diese Mengen im Absorptionsspektrum noch gesehen werden konnten. Bei dem Chromatogramm konnten die Peaks ab einer Höhe von $0,5 \cdot 10^{-4}$ OD deutlich vom Grundrauschen unterschieden werden.

C Ergebnisse

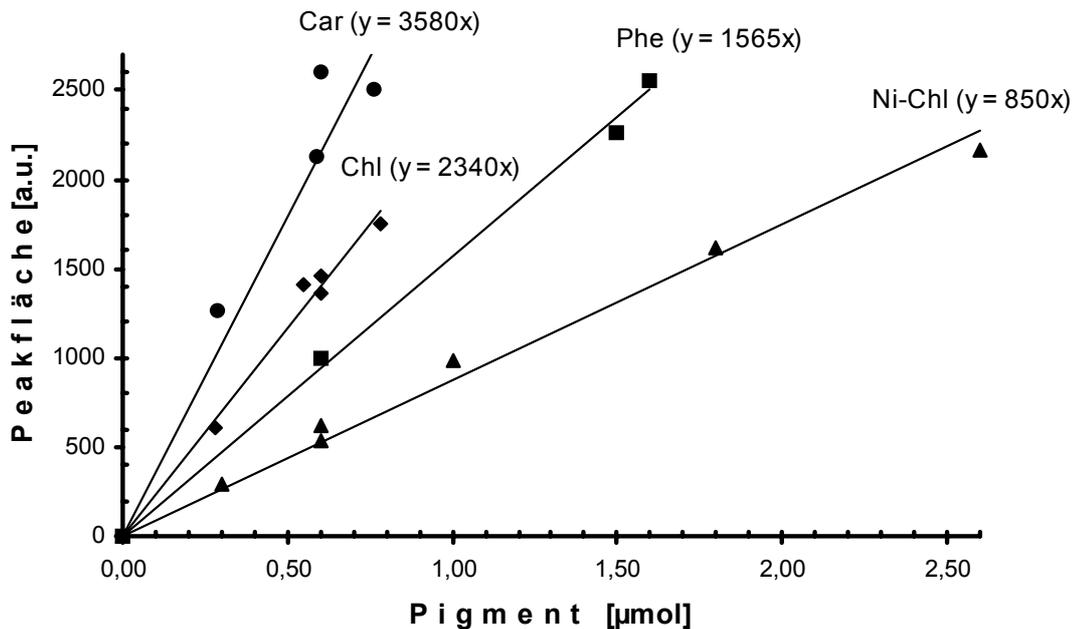


Abb. 9: Eichkurven für die HPLC-DAD Analyse des Pigmentextrakts isolierter 6-Chlorophyll Reaktionszentren und Ni-Chl erstellt mit System II.

Spektralphotometrisch bestimmte Mengen an reinem β -Carotin, Pheophytin a, Chlorophyll a, und $[\text{Ni}^{2+}]$ -Chlorophyll a wurden in die HPLC injiziert und die Peakfläche der so erhaltenen Chromatogramme integriert. Jeder Punkt stellt einen Mittelwert aus drei Messungen dar. Die Punkte wurden durch eine Gerade miteinander verbunden, deren Gleichung im Diagramm dargestellt ist.

Die Nachweisgrenze der Auswertbarkeit lag - je nach Pigment - zwischen 10 und 20 nMol (entspricht im Chromatogramm in etwa einer Peakhöhe von $5 \cdot 10^{-4}$ OD⁶). Unter dieser Menge wurde im Rahmen der Kalibrierung eine erheblich Abweichung von den sonst gültigen Eichkurven festgestellt, was daran lag, dass der Anteil des Rauschsignals am Peak höher wurde.

1.2.3 Quantifizierung

Die HPLC-DAD Analyse konnte zeigen, dass der Pigmentgehalt der im Rahmen dieser Arbeit isolierten 6-Chlorophyll Reaktionszentren des Photosystem II, d.h. die RC einer „Standard“-Präparation nach [28], im Bereich von 5,8-6,2 Molekülen Chlorophyll und 1,2-1,7 Molekülen β -Carotin pro 2 Pheophytinen lag. Dieses entspricht den Literaturwerten von 5,8-6,5 Chlorophyllen und 1,7-2,3 β -Carotinen pro 2 Pheophytinen [18] (näheres hierzu in Kapitel D.1) [94;95]. Für die 5-Chlorophyll Reaktionszentren isoliert

⁶ Die Angabe der Peakhöhe ist hier lediglich Anhaltspunkt, da die Pigmentmenge proportional zur Peakfläche und nicht zur -höhe ist.

nach Vacha [66] konnte mittels HPLC-DAD-Analyse ein Pigmentgehalt von 4,8 - 5,3 Moleküle Chl und 1,1 - 1,3 Molekülen β -Carotin gefunden werden. Dieser Pigmentgehalt korrespondiert gut mit den in der Literatur für solche RC angegebenen Werten von 5,1 - 5,2 Chlorophyllen und 0,83 - 1,1 β -Carotinen pro 2 Pheophytinen [66; 94]. Die Daten der hier durchgeführten HPLC-DAD Analyse geben sehr deutlich den unterschiedlichen Chlorophyllgehalt zwischen den 6-Chl und 5-Chl PS II-RC wieder. Dieser war wichtig, um die nachfolgenden Versuche (Kapitel C.3 und C.4) beurteilen zu können. Anders ist es mit dem Carotingehalt. Je nach Isolationsprozedur⁷ kann er beträchtlich variieren, was aber die Stabilität und die Aktivität der PS II-RC nicht beeinträchtigt [96;97] und die weiteren durchgeführten Versuche nicht beeinflusst.

1.3 Absorptionsspektroskopie

Das isolierte 6-Chlorophyll Reaktionszentrum des PS II (6-Chl PS II-RC) besitzt ein charakteristisches Absorptionsspektrum (Abb. 10), in dem folgende Banden oder Regionen unterschieden werden können:

- i) *Die Q_y -Bande des PS II-RC mit einem Maximum bei 676 nm:* Die Lage dieser Bande gibt Auskunft über die Aktivität und Reinheit der Reaktionszentren, wobei aber zu berücksichtigen ist, dass ihre exakte Lage vom anwesenden Detergenz abhängen kann: Bei aktiven RC liegt das Maximum dieser Bande zwischen 675,5 und 676,5 nm⁸ [81]. Der Verlust an photochemischer Aktivität manifestiert sich in einer kurzwelligen Verschiebung der Q_y -Bande zu Werten von 672 nm (hier sind die Pigmente noch an das Protein gebunden, jedoch ist die relative Lage zueinander verändert) und weiter zu 669 nm (hier liegen die Pigmente ungebunden vor) [13]. Eine Verunreinigung durch die Kernantennen (CP 43 oder CP 47) oder überschüssiges freies Chlorophyll manifestiert sich auch hier: Das Maximum der Q_y -Bande kann sich auf Werte bis hin zu 672 nm verschieben.

⁷ Der zwischen den verschiedenen 6-Chl PS II-RC Präparationen stark variierende Carotingehalt ist auf Schwankungen der zur Solubilisierung verwendeten TX-100 Konzentrationen (und/oder in den Inkubationszeiten) zurückzuführen. Eine Erhöhung (und/oder eine Verlängerung der Einwirkungszeit) erniedrigt den Carotingehalt von isolierten RC [96;97].

⁸ Die Variationen liegen hierbei zwischen 675,5 und 676,5 nm: Das Q_y -Maximum liegt in TX-100 bei 675,5 nm, in DM bei 676 nm und in CHAPS bei 676,5 nm [81].

C Ergebnisse

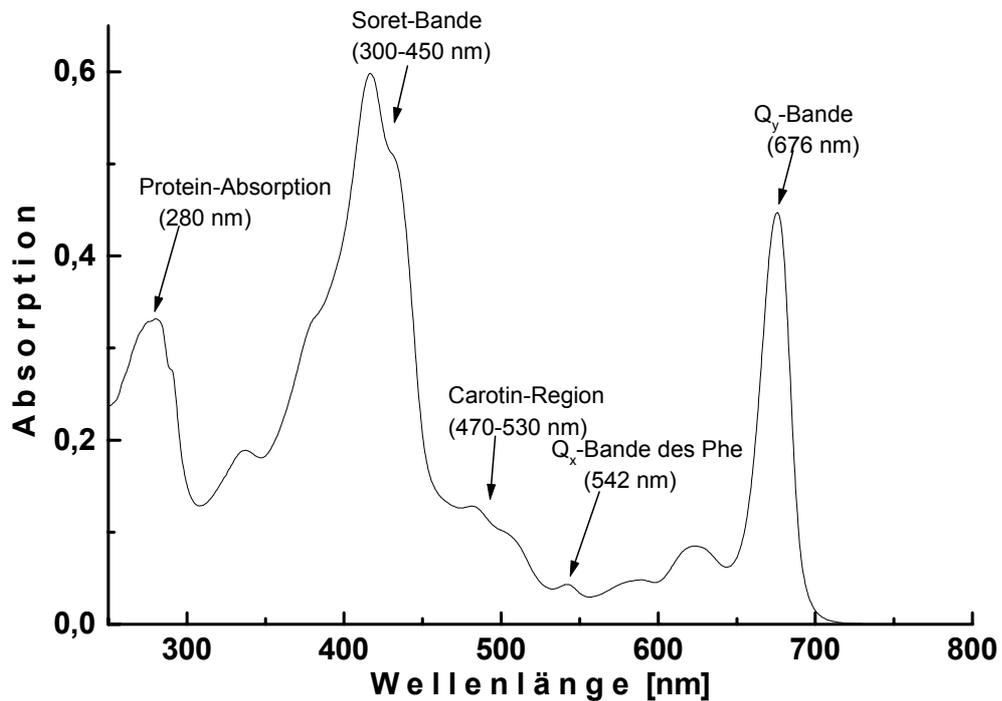


Abb. 10: Absorptionsspektrum der 6-Chlorophyll Reaktionszentren von Photosystem II aufgenommen in 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1,0 mM DM.

- ii) Die Q_x-Bande des Phe mit einem Maximum bei 542 nm: Diese Bande ist die einzige Absorptionsbande, die nur einem Pigmenttyp (Phe) zugeordnet werden kann, da die Q_x-Bande der Chlorophylle schwächer und breiter ist. Unter der Annahme eines gleichbleibenden Pheophytinanteils und eines gleichbleibenden Hintergrunds durch die Chlorophylle kann bei dieser Wellenlänge normiert werden. Dies wurde bei allen in dieser Arbeit zum Vergleich herangezogenen Spektren durchgeführt.
- iii) Die Carotinoid-Region zwischen 480 und 530 nm: Die Intensität und die Lage der β -Carotin Absorptionsbanden innerhalb des PS II-RC Komplexes sind variabler als die Banden der übrigen RC-Pigmente. Je nach Vorbehandlung der RC (Waschen mit TX-100) variiert der Carotiningehalt und somit die Höhe der Carotinbande [17]. Die Form der Absorptionsbanden (Breite und Höhe der Banden bei 485 nm und 510 nm) sind vom anwesenden Detergenz abhängig: In Anwesenheit von CHAPS oder TX-100 sind sie gut aufgelöst und schmal, wohingegen sie in Anwesenheit von DM breit werden [60].

C Ergebnisse

- iv) *Die Soret-Banden im Bereich von 400-450 nm:* Unter dieser Einhüllenden (mit einem Hauptmaximum bei 418 nm und einer langwelligen Schulter bei 435 nm) befinden sich die Absorptionsbanden der Tetrapyrrolokofaktoren, deren Lage i. A. folgendermaßen zugeordnet wird: Phe und Cyt b_{559} bei 418 nm und Chl bei 435 nm [28;98]. Das Verhältnis von OD_{418nm}/OD_{435nm} kann zur Überprüfung der RC-Reinheit herangezogen werden, und es sollte bei einer Pigmentstöchiometrie von 6 Chl pro 2 Phe, einen Wert zwischen 1,16-1,20 haben [96].
- v) *Die Protein-Bande im UV-Bereich mit einem Maximum bei 280 nm:* Sie wird ebenso wie die Soretbande zur qualitativen Beurteilung der PS II-RC Komplexe herangezogen [60], denn das Verhältnis von Protein- zu Pigmentabsorption charakterisiert die Reinheit der Präparation, wobei die relativen Intensitäten der Absorptionsbanden bei 280, 418 und 676 nm folgende Tendenz zeigen sollten:

$OD_{280nm} < OD_{676nm} < OD_{418nm}$ (entsprechend einem Verhältnis von etwa 0,7 : 1,0 : 1,3). Der Vergleich der relativen Intensitäten ermöglicht eine schnelle Qualitätsbeurteilung der PS II-RC. Bei einer erhöhten Proteinabsorption, in einem Ausmaß, dass $OD_{280nm} \geq OD_{676nm}$ (und auch $\geq OD_{418nm}$) ist, liegt eine starke RC-Deaktivierung mit möglichem Pigmentverlust vor (Daten sind nicht gezeigt).

Die Absorptionsspektren der 5-Chl PS II-RC und der 6-Chl PS II-RC sind sich sehr ähnlich. Sie besitzen nur geringe, jedoch signifikanten Unterschiede, die von Eijkelhoff et al. [67] genauer beschrieben wurden: Die wichtigsten absorptionsspektroskopisch sichtbaren Unterschiede der 5-Chl RC gegenüber den 6-Chl PS II-RC sind: i) eine leichte Rotverschiebung des Q_y -Bandenmaximums auf Werte bis zu 676,5 nm (in *n*-Dodecyl- β -D-maltosid (DM)); ii) eine Verringerung der Q_y -Bandenbreite; iii) eine niedrigere Absorption in der Carotin-Region. Eine genauere Charakterisierung solcher 5-Chl RC wird im Kapitel C.4 vorgenommen. Die Absorptionsspektroskopie ist trotz der starken Überlappungen der RC-Pigmentbanden⁹ sehr hilfreich. Sie ist einfach durch-

⁹ Im Gegensatz zu bakteriellen RC, bei denen sich die Q_y -Absorptionen über einen Bereich von 1.500 cm^{-1} erstrecken und die einzelnen Pigmente voneinander unterscheidbar sind, sind es im PS II-RC nur 500 cm^{-1} , wobei die Banden aller Tetrapyrrolopigmente des PS II-RC innerhalb einer unstrukturierten Einhüllenden liegen. Die spektrale Zuordnung der im RC vorhandenen Tetrapyrrolopigmente ist noch nicht eindeutig geklärt [71;129;162]. Die Veränderung der Kofaktoren kann auch hier helfen einzelne Pigmente spektral einzuordnen.

führbar und gibt Aufschluss über Quantität und Qualität der unterschiedlichen Proben. Für die Mengenbestimmung (von 5-Chl und 6-Chl PS II-RC) wurde der von De Las Rivas et al. [17] ermittelte molare Extinktionskoeffizient von Chlorophyll im PS II-RC verwendet ($103.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pro Chl). Es wurde davon ausgegangen, dass in der 6-Chl RC-Präparation 6 Chl und in der 5-Chl PS II-RC 5 Chl pro 2 Phe vorhanden sind und die RC-Molmasse 100 kDa beträgt.

1.4 Fluoreszenzspektroskopie

Um die Reaktionszentren auf deren Homogenität, d.h. auf die Anwesenheit von freiem Pigment, zu untersuchen, wurde die von Gall [60] etablierte Messmethode verwendet. Hierzu werden Anregungs- und Emissionsspektren aufgenommen, die bei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert bzw. angeregt wurden. Nach Normierung auf deren Bandenmaximum sollten bei einem vollständig energetisch äquilibrierten System alle Spektren die gleiche Form besitzen, d.h. deckungsgleich sein. Die Anwesenheit von freiem bzw. zusätzlichem Pigment verändert die Lage und/oder Form der Fluoreszenzbanden verändert, die von der Emissions- und Anregungswellenlänge abhängen. Die hier verwendeten (nativen und auch die modifizierten) Reaktionszentren wurden routinemäßig nach dieser „Gall’schen Methode“ untersucht (Abb. 11 und Abb. 12).

Die *Anregungsspektren*¹⁰ der verwendeten 6-Chl PS II-RC (Abb. 11-links) stimmen mit den publizierten Spektren überein [99;100], wobei die geringen Unterschiede hier zunächst vernachlässigt wurden (siehe unten). Die Spektren zeigen die charakteristische Bandenform und auch die in der Literatur [100;101] angegebene Lage des Bandenmaximums bei 438 nm. Die Anregungsspektren der 5-Chl PS II-RC (Abb. 12-links) unterscheiden sich geringfügig von den der 6-Chl PS II-RC: Sie besitzen ein blauverschobenes Bandenmaximum bei 434 nm und unter Anregung bei etwa 420 nm eine höhere Emissionsintensität, welche sich durch die unterschiedlichen Anteile an Chl pro Phe in beiden Präparationen erklären lässt. Die Fluoreszenz des Pheophytins pro Chlorophyll ist bei den 5-Chl PS II-RC intensiver als bei den 6-Chl PS II-RC.

¹⁰ Die Spektren wurden nicht korrigiert, d.h. sie beinhalten noch die gerätespezifischen Merkmale (Lampenpeaks, Monochromatoren-Kennlinie, etc.) und sind deshalb nur relativ zu bewerten. Dies ist auch der wichtigste Grund dafür, dass Absorptions- und Anregungsspektren des PS II-RC nicht, wie in der Theorie gefordert [163], spiegelbildlich zueinander sind.

C Ergebnisse

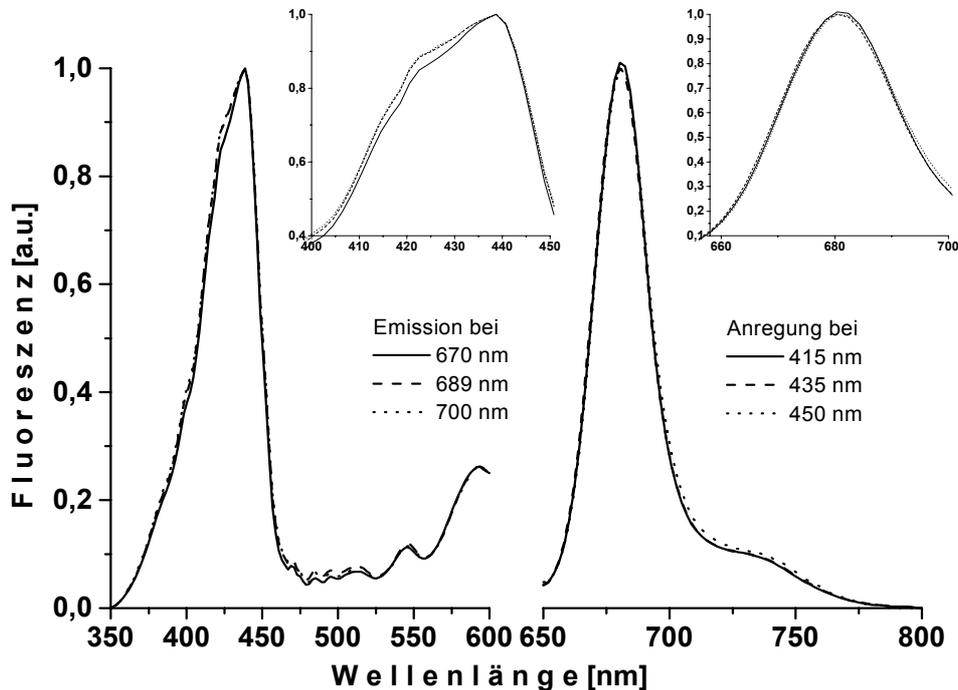


Abb. 11: Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren isolierter 6-Chlorophyll Reaktionszentren in 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1,0 mM DM.

links: Anregungsspektren aufgenommen bei 670, 689 700 nm Emissionswellenlänge.
rechts: Emissionsspektren angeregt bei 415, 435, 450 nm. Der Bereich der Bandenmaxima ist jeweils oben rechts vergrößert dargestellt. Die Spektren wurden auf das jeweilige Bandenmaximum normiert

In beiden Präparationen (6-Chl und 5-Chl Reaktionszentren) können in den Anregungsspektren nur schwach ausgeprägte β -Carotinbanden (460-530 nm) gesehen werden, was auf eine geringe Energieübertragung von β -Carotin (Car) auf Chlorophyll (Chl) bzw. Pheophytin (Phe) in beiden Arten von RC schließen lässt. Für die 6-Chl PS II-RC konnte von Kwa et al. [101] und von van Dorssen et. al. [102] gezeigt werden, dass die Energieübertragungseffizienz von Car zum Chl (bzw. Phe) nur 20-30 % bezogen auf die von Chl zu Phe (bzw. von Phe zu Chl) beträgt.

Die *Emissionsspektren* der 6-Chl PS II-RC (Abb. 11-rechts) besitzen ihr jeweiliges Bandenmaximum bei 682 nm, unabhängig von der Anregung. Die Bandenformen und die Lage der Banden stimmen mit den publizierten [99;100;103-105] überein.¹¹ Die Emissionsmaxima der 5-Chl PS II-RC Spektren befinden sich bei 681 nm (Abb. 12-

¹¹ Für die Lage des Emissionsmaximums der 6-Chl PS II-RC werden Werte zwischen 682 und 685 nm angegeben [100].

C Ergebnisse

rechts) und sind gegenüber denen der 6-Chl PS II-RC um 1 nm blauverschoben. Die Form der Emissionsbande ist bei den 5-Chl PS II-RC um etwa 10 % schmaler und asymmetrischer als die der 6-Chl PS II-RC, was mit früheren publizierten Daten übereinstimmt [68].

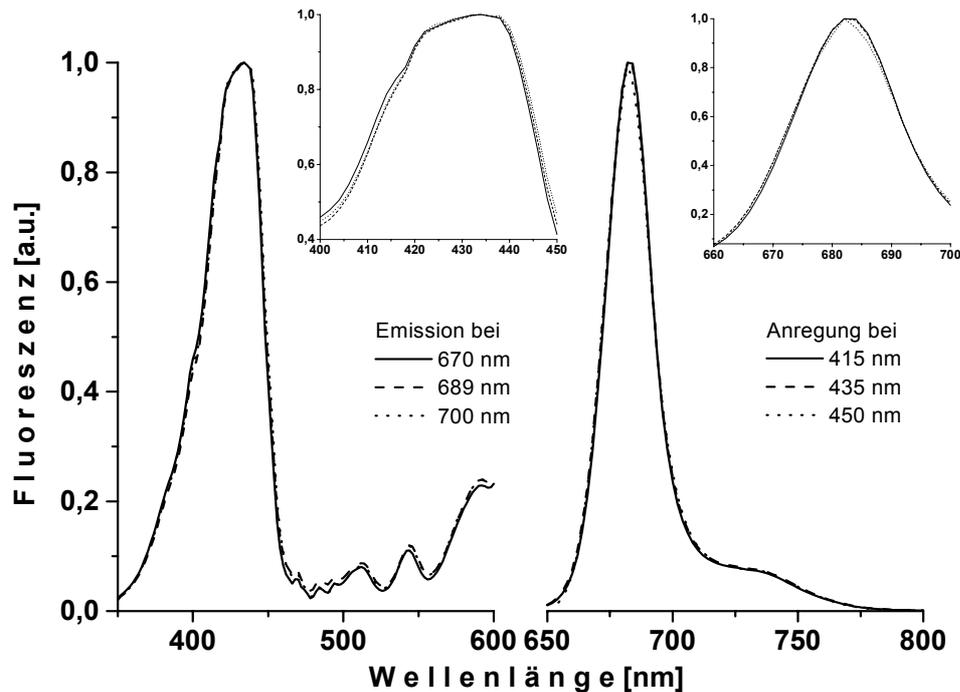


Abb. 12: Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren isolierter 5-Chlorophyll Reaktionszentren in 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1,0 mM DM.

links: Anregungsspektren aufgenommen bei 670, 689 700 nm Emissionswellenlänge.
rechts: Emissionsspektren angeregt bei 415, 435, 450 nm. Der Bereich der Bandenmaxima ist jeweils oben rechts vergrößert dargestellt. Die Spektren wurden auf das jeweilige Bandenmaximum normiert

Bereits in den Übersichtsspektren deutet sich an, dass entgegen der Erwartung die Bandenformen innerhalb einer Messreihe leicht variieren. Dabei zeigten sich klare reproduzierbare Unterschiede in den Bandenformen. Beide Arten von Reaktionszentren wurden bei jeweils 415, 435 bzw. 450 nm angeregt. In den 6-Chl PS II-RC ergibt die Anregung bei den unterschiedlichen Wellenlängen eine geringfügige langwellige Verschiebung der Emissionsbande (Abb. 11- rechts). Diese ist korreliert mit der Anregungswellenlänge, d.h. mit zunehmend „langwelliger“ Anregung emittiert der Komplex auch „langwelliger“. Der gleiche Effekt ist in den 5-Chl PS II-RC zu sehen (Abb.12-rechts), wobei dieser dort weniger ausgeprägt ist.

Die Anregungsbanden der 6-Chl PS II-RC zeigen untereinander eine stärker ausgeprägte Wellenlängenabhängigkeit als die entsprechenden Banden der 5-Chl PS II-RC. Im Gegensatz hierzu zeigen die Emissionsbanden der 6-Chl PS II-RC untereinander geringere Unterschiede. Diese (geringfügigen) Unterschiede in den Bandenformen normierter 6-Chl PS II-RC Fluoreszenzspektren konnten bereits von Gall [59] gesehen werden, der diese aber vernachlässigte, denn er konnte ungebundenes Pigment als Ursache hierfür ausschließen. Diese Unterschiede sind ein erster Hinweis auf eine (un)vollständige Energieäquilibrierung innerhalb aller RC-Pigmente (sechs Chlorophylle und 2 Pheophytine), die in Kapitel D.5 genauer untersucht wird.

1.5 Aktivitätsmessungen

1.5.1 Phe^{•-}-Akkumulierung

Eine Methode zur Aktivitätsbestimmung ist die Messung der photoinduzierte Phe^{•-}-Akkumulierung in Anwesenheit eines externen Elektronendonors [106]. Hierbei wird durch Belichtung eine Ladungstrennung innerhalb des PS II-RC induziert, wodurch der Primäre Donor P680 zu P680^{•+} oxidiert und der Akzeptor (das Pheophytin) zu Phe^{•-} reduziert wird. Das Kationradikal P680^{•+} wird durch das anwesende Dithionit über Methylviologen wieder zu P680 reduziert, was eine Ladungsrekombinationen der ionisch radikalischen Zustände verhindert. Das Radikalanion Phe^{•-} ist somit in diesem Zustand gefangen und wird akkumuliert. Dieses kann absorptionsspektroskopisch verfolgt werden (Abb. 13), wobei vor allem das Differenzspektrum (Licht *minus* Dunkel) zur Beurteilung der Aktivität herangezogen wird. An dieser Ladungstrennung ist nur eines der beiden anwesenden Pheophytine beteiligt [28;61;80].

Die hier aufgenommenen Spektren zeigen die für die Reduktion von Pheophytin zum Radikalanion (Phe^{•-}) typischen Charakteristika, welche im Differenzspektrum (Licht *minus* Dunkel bzw. Phe^{•-} *minus* Phe) als negative Signale bei 422, 515, 545 und 682 nm, und positive Signalen bei 450, 595, 656, und 672 nm zu sehen sind [28;80;106]. Diese lichtinduzierten Veränderungen sind reversibel, wohingegen das negative Signal bei 667 nm (sichtbar als Schulter) irreversibel ist (Photobleichung) [98;35]. Die Amplitude dieser irreversiblen Absorptionsdifferenz kann als Maß für die Aktivität herangezogen werden, da das Photobleichen von der Aktivität des RC abhängt. Partielle Inaktivierung manifestiert sich in einer Verringerung der Amplitude

C Ergebnisse

bei 682 nm (reversible Differenzbande) und einer Erhöhung der 667 nm Bande. Bei vollständiger Degradierung fehlt die 682 nm Bande vollständig und es gibt nur noch Bleicheffekte (negative Absorptionsdifferenz bei 667 nm, Daten sind nicht gezeigt).

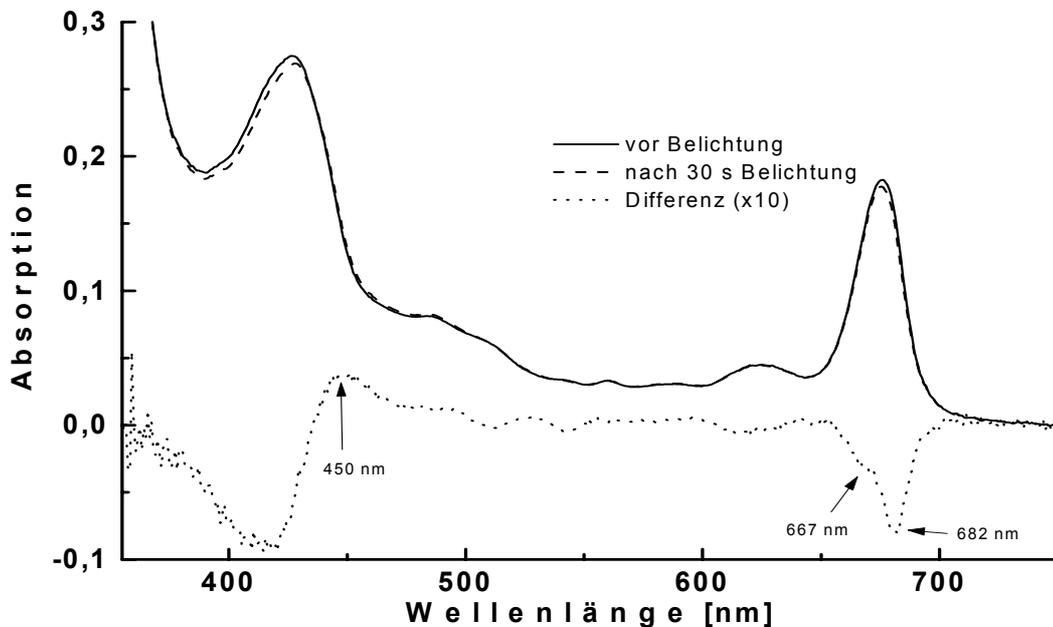


Abb. 13: Aktivitätsmessungen an 6-Chlorophyll PS II-RC: Phe⁻-Akkumulierung.

Die Spektren zeigen die Absorption von Reaktionszentren vor und nach 30 s Belichtung mit Rotlicht (620 nm mit $2.200 \mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und deren Differenzspektrum (10-fach vergrößert). Belichtet wurden RC mit einer Konzentration von $0,64 \mu\text{M}$ in 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1,0 mM DM in Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ Methylviologen und 6 mM Natriumdithionit.

1.5.2 P680⁺⁺-Akkumulierung

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Aktivität ist die reversible lichtinduzierte Oxidation des primären Donors P680 zu P680⁺⁺ in Anwesenheit des Elektronenakzeptors Silikomolybdat (SiMo). Sie indiziert die komplementäre Aktivität zur Akkumulierung von Phe⁻. Im Gegensatz zu der Phe⁻-Akkumulierung (Kapitel D.1.5.1) wird der kationradikalische Zustand P680⁺⁺ konserviert. Auch hier werden die Absorptionsdifferenzen gemessen, wobei man sich wegen der Eigenabsorption des SiMo nur auf den Q_y-Bereich beschränkt (Abb.14).

C Ergebnisse

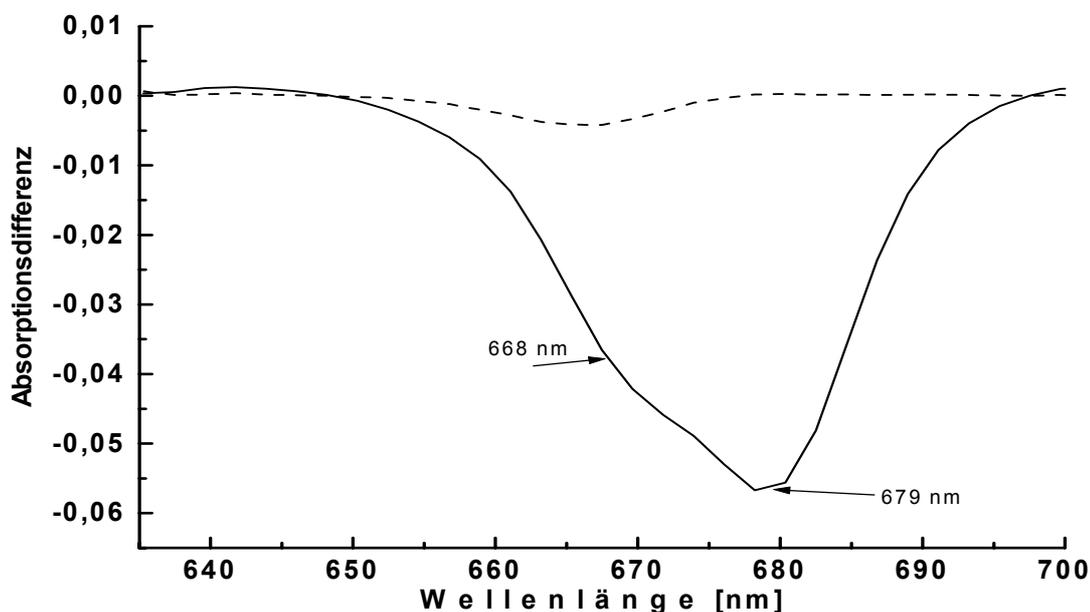


Abb. 14: Aktivitätsmessungen an 6-Chlorophyll PS II-RC-P680•+-Anreicherung.

Die Spektren zeigen die Absorptionsdifferenzspektren von Reaktionszentren nach 8 s Belichtung mit Weißlicht einer Intensität von $2.200 \mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (durchgezogene Linie) und nach 20 s Relaxation im Dunkeln (gestrichelte Linie). Belichtet wurden RC mit einer Konzentration von $1,1 \mu\text{M}$ in 50 mM Tris-HCl , pH 6,8, $1,0 \text{ mM DM}$ in Anwesenheit von $200 \mu\text{M}$ Silikomolybdat.

Das noch während der Belichtung aufgenommene Differenzspektrum (durchgezogene Linie) besitzt ein charakteristisches Minimum um 680 nm (hier: 679 nm). Diese Bande reflektiert die auf die reversible Photooxidation von P680 (zu $\text{P680}^{\bullet+}$) zurückgehende Absorptionsänderungen. Zusätzlich kann noch eine Schulter bei 669 nm gesehen werden, die nach Relaxation im Dunkeln erhalten bleibt (Daten nicht gezeigt) und deshalb auf irreversibles Photobleichen¹² zurückzuführen ist. Die hier aufgenommenen Spektren stimmen mit den publizierten überein [107;108]. Diese Messung stellt eine empfindlichere Methode als die $\text{Phe}^{\bullet-}$ -Akkumulierung dar, die Aktivität der Reaktionszentren zu untersuchen. Sie wurde hauptsächlich bei den Rekonstitutionsversuchen verwendet (siehe Kapitel D.4).

¹² Siehe auch [35], die zeigen konnten, dass das reversible Photobleichen auf ein bei 670 nm absorbierendes, oxidationsempfindliches Chl zurückzuführen ist.

1.6 CD-Spektroskopie

Das jeweilige CD-Spektrum der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten 5-Chl und 6-Chl PS II-RC besitzt charakteristische Extrema bei 681 (+), 666 (-), 452 (-), 435 (+) nm (Abb. 15), was mit den publizierten Daten übereinstimmt [13;67]. Die 5-Chl RC (gestrichelte Linie) zeigen die gleichen CD-Banden wie die 6-Chl RC (durchgezogene Linie). Die Lage und die relativen Amplituden der Extrema beider Reaktionszentren stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit miteinander überein (Abb. 15).

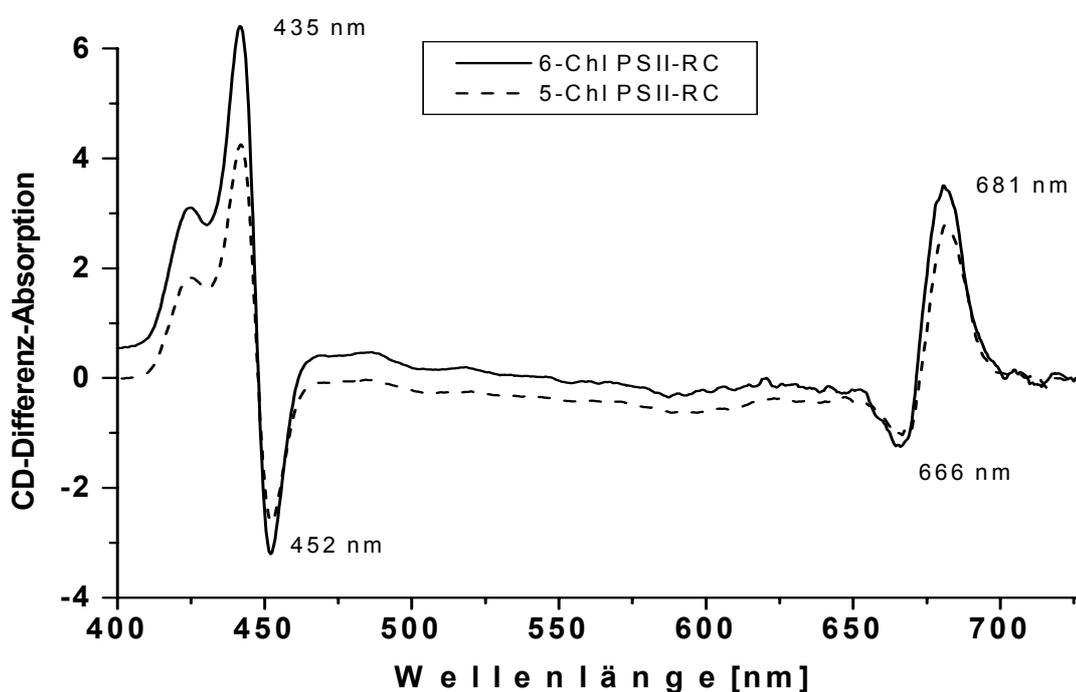


Abb. 15: Messungen des Circular dichroismus von 6-Chlorophyll und 5-Chlorophyll Reaktionszentren.

RC lagen in Konzentration von $0,64 \mu\text{M}$ in 50 mM Tris-HCl , pH 6,8, $1,0 \text{ mM DM}$ vor.

Die exakte Zuordnung der gefundenen Signale ist bislang nicht möglich. Das CD-Signal der im RC vorhandenen Chlorine kann durch das Protein induziert und/oder durch exzitonische Wechselwirkungen der Pigmente untereinander hervorgerufen sein. Freies (B)Chl in Lösung ist chiral, zeigt aber auf der abgebildeten Skala keine CD-Aktivität [109]. Bislang wurde davon ausgegangen,¹³ dass das CD-Spektrum (v. a. das

¹³ Die bereits seit längerem bestehende Diskussion über die Natur des Primären Donors P680 wurde durch die Veröffentlichung der PS II-Röntgenstruktur [4] intensiviert. Der dimere Charakter des P680 (starke exzitonische Kopplung) wird stärker als bisher in Frage gestellt, denn innerhalb des RC sind die vier Kern-Chl gleich weit voneinander entfernt. Diese lassen sich entweder als ein schwach gekoppeltes Tetramer (bestehend aus 4 äquidistanten Chl)

Signal in der Q_y-Region) hauptsächlich von dem Primären Donor P680 (gebildet von zwei leicht gekoppelten Chl) stammt [13;110;102], denn eine Störung dieser Anordnung (entspricht einer Deaktivierung des RC) führt zu einem veränderten CD-Signal: Der Circular dichroismus nimmt in der Regel ab, wobei sich auch die Lagen der Banden verschieben [13].

2 Verwendete Pigmente

2.1 Übersicht

Die für Austausch und Rekonstitution der Kofaktoren am Reaktionszentrum des Photosystem II verwendeten Pigmente sollten folgende Bedingungen erfüllen: sie sollten i) leicht isolierbar oder darstellbar sein, ii) strukturell nicht zu stark von dem nativ vorkommenden Chl abweichen, iii) sich in ihren photophysikalischen Eigenschaften deutlich von den nativen Pigmenten unterscheiden und iv) geeignet sein, Informationen über die strukturellen Erfordernisse der Bindungstasche an die Pigmente zu liefern. Die Pigmente, die gemäß diesen Bedingungen ausgewählt wurden, sind in Abb. 16 und der dazugehörigen Tabelle 2 dargestellt. Sie lassen sich strukturell in die Kategorien „*transmetalliert*“, „*peripher modifiziert*“ und in „*Pigmente mit veränderten Konjugationssystem des Makrozyklus*“ (Porphyrine und Bakteriochlorine) einteilen.

beschreiben oder als Monomere [23;41]. Messungen an RC in photooxidierten Zustand zeigten, dass sich der radikalische Zustand nach Oxidation nur auf ein Chlorophyll beschränkt. Wodurch es wahrscheinlich ist, dass nur ein einziges Chl der Kern-Chlorophylle der Primäre Donor zu sein scheint [40;161;164].

C Ergebnisse

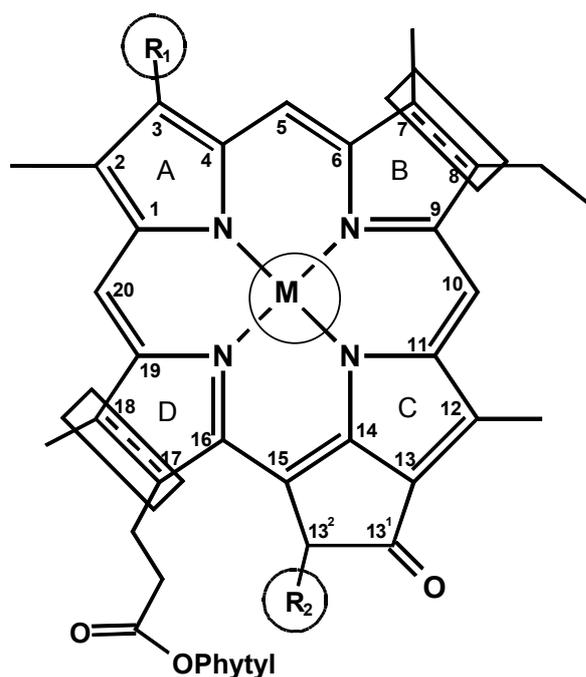


Abb. 16: Strukturformel der für den Austausch verwendeten Tetrapyrrolpigmente. Die Zuordnung erfolgt mit Tabelle 2. Variable Elemente sind markiert.

Name	M	R ₁	R ₂	C ₇ -C ₈	C ₁₇ -C ₁₈
Chlorophyll a (Chl)	Mg ²⁺	-CH=CH ₂	-COOCH ₃	db ^[1]	eb ^[2]
[Zn ²⁺]-Chlorophyll a (Zn-Chl)	Zn ²⁺	-CH=CH ₂	-COOCH ₃	db	eb
[Zn ²⁺]-Methylchlorophyllid a (Zn-Me-Chlid)	Zn ²⁺	-CH=CH ₂	-COOCH ₃	db	eb
[Ni ²⁺]-Chlorophyll a (Ni-Chl)	Ni ²⁺	-CH=CH ₂	-COOCH ₃	db	eb
[3-Acetyl]-chlorophyll a (Ac-Chl)	Mg ²⁺	-COCH ₃	-COOCH ₃	db	eb
[3-Acetyl]-demethoxycarbonylchlorophyll a (Ac-Py-Chl)	Mg ²⁺	-COCH ₃	-H	db	eb
Bakteriochlorophyll a (BChl)	Mg ²⁺	-COCH ₃	-COOCH ₃	db	eb
[3-Vinyl]-bakteriochlorophyll a (Vi-BChl)	Mg ²⁺	-CH=CH ₂	-COOCH ₃	db	eb
Protochlorophyll a (Proto-Chl)	Mg ²⁺	-CH=CH ₂	-COOCH ₃	db	db

[1] db = Doppelbindung; [2] eb = Einfachbindung;

Tab. 2: Überblick über die für den Austausch verwendete modifizierte (Bakterio)-Chlorophylle. Die Substituenten beziehen sich auf die Strukturformel in Abb. 16.

C Ergebnisse

Bei den *transmetallierten Chlorophyllen* ist das enthaltene Zentralmetall Mg^{2+} durch andere zweiwertige Metallkationen ersetzt. Der Schwerpunkt wurde auf den Austausch mit $[Zn^{2+}]$ - und $[Ni^{2+}]$ -Chlorophyll gelegt. Zn-Chl und Mg-Chl sind sich absorptions- und fluoreszenzspektroskopisch sehr ähnlich, wobei das Zn-Chl chemisch stabiler und deshalb für Austauschexperimente gut geeignet ist. Zusätzlich zeigt sich, dass viele Chlorophyll-bindende Proteine bzw. Chlorophyll-umsetzende Enzyme nicht zwischen Zn^{2+} - und Mg^{2+} -Chl diskriminieren [111-113].

Für die Versuche wurde auch ein an C-17⁴ umgeestertes Zn-Chl verwendet, das $[Zn^{2+}]$ -Methylchlorophyllid a (Zn-Me-Chlid), welches statt des langen hydrophoben (apolaren) Phetyl-Rests einen Methyl-Rest trägt und somit sterisch weniger anspruchsvoll und hydrophiler (polarer) als Zn-Chl ist. Dieses Molekül nimmt eine Zwischenstellung zwischen den peripher modifizierten und den transmetallierten Chlorophyllen ein, wird aber im Rahmen dieser Arbeit den transmetallierten Pigmenten zugeordnet. Dies entspricht der Erfahrung bei der Modifikation von purpurbakteriellen Reaktionszentren, deren Pigment-Bindungstaschen nicht zwischen an C-17⁴ unterschiedlich veresterten BChl diskriminieren [55;78;114].

Ni-Chl wurde als mögliche Energietransfer-Sonde ausgewählt,¹⁴ da es in der Lage ist, Anregungsenergie extrem schnell [58] durch innere Konversion abzubauen. Die Absorptionsspektren dieser Pigmente sind in Abb. 17 gezeigt. Die Abbildung zeigt die Absorptionsspektren von Ni-Chl und Zn-Chl (Zn-Me-Chlid besitzt das gleiche Absorptionsspektrum wie Zn-Chl) im Vergleich zu Chl (aufgenommen in Diethylether). Die Q_y -Banden der transmetallierten Pigmente sind relativ zu der des Chl blauverschoben. Diese Verschiebung beträgt bei Zn-Chl und Zn-Me-Chlid 5 nm und bei Ni-Chl 17 nm. Der Einbau solcher Pigmente in das PS II-RC lässt eine (leichte) Blauverschiebung der Q_y -Bande des Reaktionszentrums erwarten.

Die *peripher modifizierten Chlorophylle* besitzen Mg^{2+} als Zentralmetall und ein unverändertes Chlorin-Konjugationssystem, wobei jedoch einzelne Reste ($R_{1,2}$) (siehe Abb. 16 und Tab. 2) verändert wurden. Als Vertreter dieser Art von Pigmenten wurde in dieser Arbeit [3-Acetyl]-chlorophyll a (Ac-Chl) und [3-Acetyl]-demethoxycarbonylchlorophyll a (Ac-Py-Chl) ausgewählt. In beiden Molekülen ist der Vinylrest (R_1) von

¹⁴ Ni-BChl modifizierte pb-RC und Antennen wurden zur Untersuchung des Energietransfer eingesetzt [145;146].

C Ergebnisse

Chlorophyll *a* durch einen Acetylrest ersetzt, wobei bei Ac-Py-Chl noch zusätzlich die Carboxymethylester-Gruppe an C-13² abgespalten wurde. Die Veränderungen des C₃-Substituenten können spektralphotometrisch gesehen werden (Abb. 18).

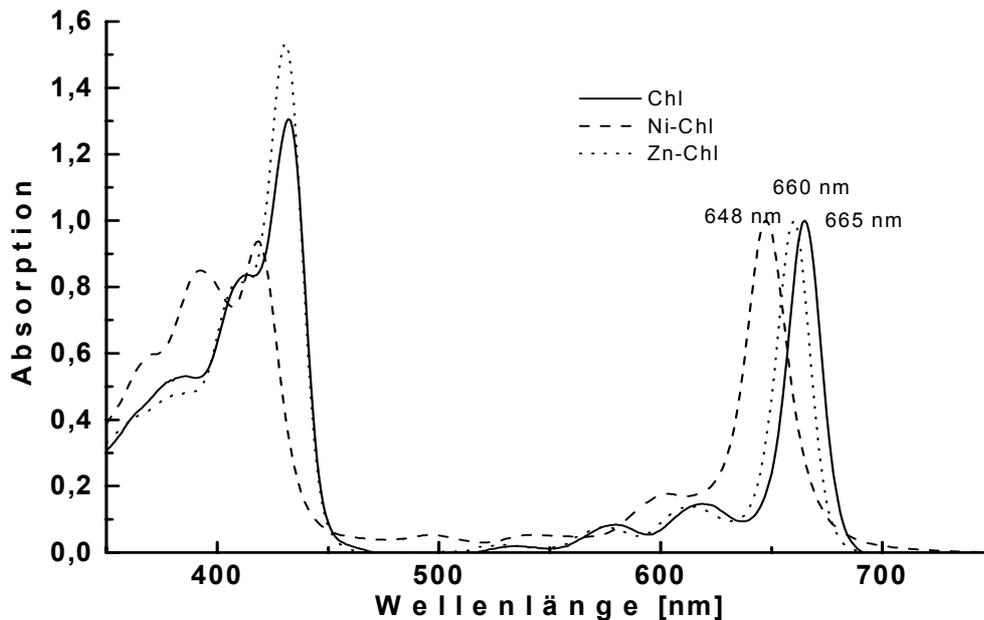


Abb. 17: Absorptionsspektren von Chlorophyll *a*, [Ni²⁺]-Chlorophyll *a* und [Zn²⁺]-Chlorophyll *a* in Diethylether.

Die Spektren sind auf deren langwelligstes Bandenmaximum normiert.

Der Vergleich der Spektren von Ac-Chl, Ac-Py-Chl und Chl (Abb. 18) zeigt eine langwellige Verschiebung der Q_y-Bande des Ac-Chl (und Ac-Py-Chl) gegenüber der des Chl (um etwa 10 nm in Diethylether). Der Austausch eines Chl gegen ein Ac-Chl innerhalb des PS II-RC sollte, wenn diese Verschiebung im RC erhalten bleibt, gut zu verfolgen sein.

Das Ac-Chl besitzt die gleichen peripheren Gruppen wie BChl, aber in Analogie zu Chl eine Doppelbindung zwischen C-7 und C-8. Es stellt ein strukturelles Bindeglied zwischen Chl und BChl dar, so dass aufgrund dieser Zwischenstellung Auskunft über die Spezifität der Bindungstasche erhalten werden kann.

C Ergebnisse

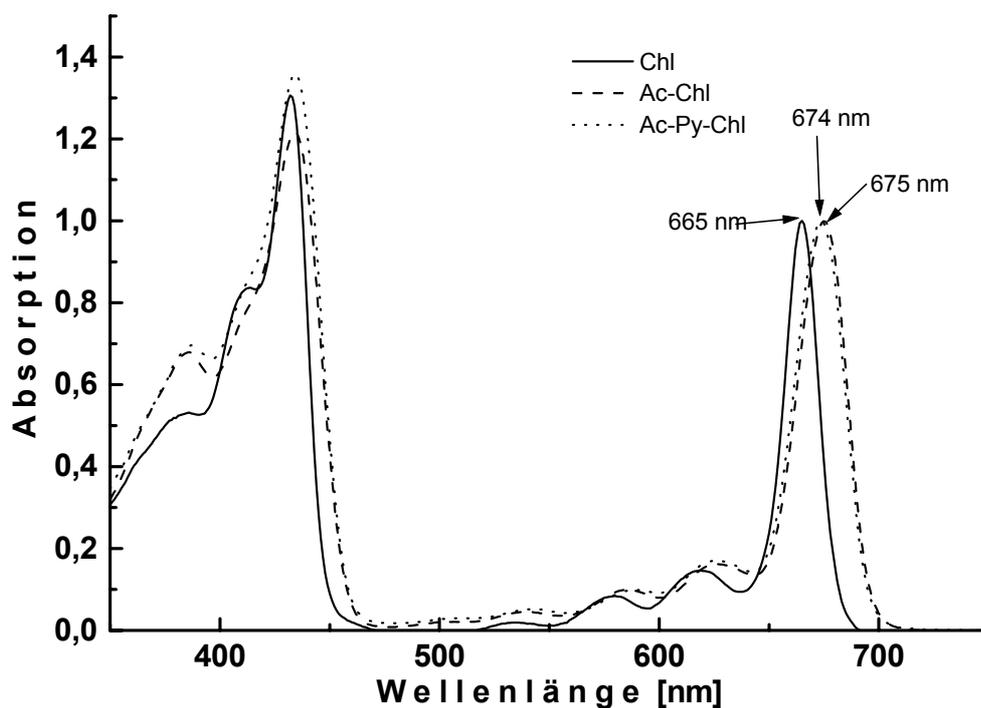


Abb. 18: Absorptionsspektren von Chlorophyll a, [3-Acetyl]-chlorophyll a und [3-Acetyl]-Demethoxycarbonyl-Chlorophyll a in Diethylether. Die Spektren sind auf deren langwelligstes Bandenmaximum normiert.

Das zusätzlich an C-13² modifizierte Ac-Py-Chl besitzt ein gegenüber dem Ac-Chl nur geringfügig verändertes Absorptionsspektrum: Das Q_y-Bandenmaximum ist um 1 nm kurzwellig verschoben (Abb. 18). Die Abspaltung der Carboxymethylgruppe (R₂) am isozyklischen Pentanonring hat einerseits eine Beeinflussung des Keto-Enol Gleichgewichts im isozyklischen Ring (das Gleichgewicht liegt zwangsläufig vollständig auf der Seite des Ketons) und andererseits den Verlust des Chiralitätszentrums an C-13² zur Folge. Es ist heute noch nicht geklärt, in wie weit das Vorhandensein des Chiralitätszentrums an C-13² sowie die Keto-Enol-Tautomerie das Bindevverhalten und die Funktionalität der Pigmente innerhalb der Pigment-Protein-Komplexe beeinflussen.

Als „Pigmente mit geändertem Konjugationssystem des Makrocyclusses“ wurden hier Vertreter der Bakteriochlorine und Porphyrine ausgesucht (Bakteriochlorophyll (BChl), [3-Vinyl]-bakteriochlorophyll (BChl) und Protochlorophyll (Proto-Chl)). Sie unterscheiden sich von den Chlorinen durch das Fehlen der Doppelbindung zwischen C-7 und C-8 (im Falle der Bakteriochlorine) oder durch eine zusätzliche Doppelbindung

C Ergebnisse

zwischen C-17 und C-18 (im Falle der Porphyrine, Abb. 16). Die unterschiedliche Anzahl der Doppelbindungen und somit die Konjugation des Makrozyklusses bewirkt starke Unterschiede in den Absorptionsspektren (Abb. 19 und Abb. 20).

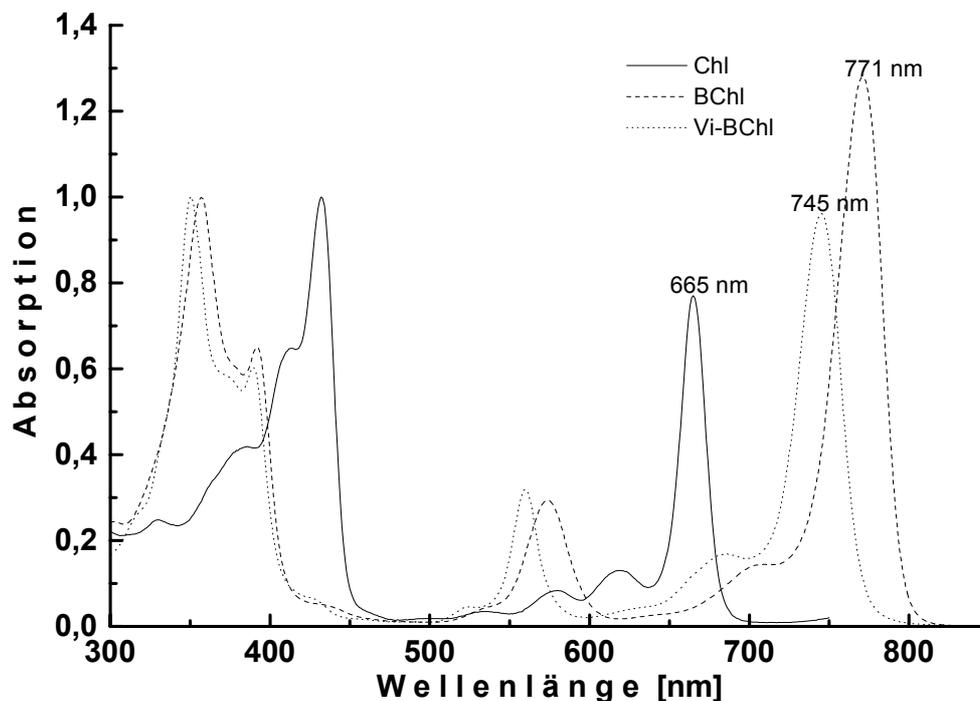


Abb. 19: Absorptionsspektren von Chlorophyll a, Bakteriochlorophyll a in Diethylether. Die Spektren sind auf deren Soret-Bandenmaximum normiert.

Wie oben erwähnt, besitzt BChl, verglichen mit Chl, eine Doppelbindung im Tetrapyrrolring weniger und enthält eine Acetyl-Gruppe an C-3. Die resultierenden elektronischen Unterschiede sind im Absorptionsspektrum sichtbar: Die Q_y-Bande des BChl ist im Vergleich zu Chl um 109 nm rotverschoben (in Diethylether), das Verhältnis von Soret- zu Q_y-Bande ist von 1,3 (Chl) auf 0,8 (BChl) gesunken. Die Q_x-Bande des BChl ist, im Gegensatz zu der des Chl, intensiver und spektral gut aufgelöst. Bisher schlugen alle Versuche fehl, BChl in das PS II-RC zu integrieren [59], weshalb hier noch zusätzlich das Vi-BChl getestet wurde. Dieses Pigment unterscheidet sich von Chl nur durch das Fehlen der Doppelbindung zwischen C-7 und C-8. Es ist ähnlich wie Ac-Chl (siehe oben) ein strukturelles Bindeglied zwischen BChl und Chl.

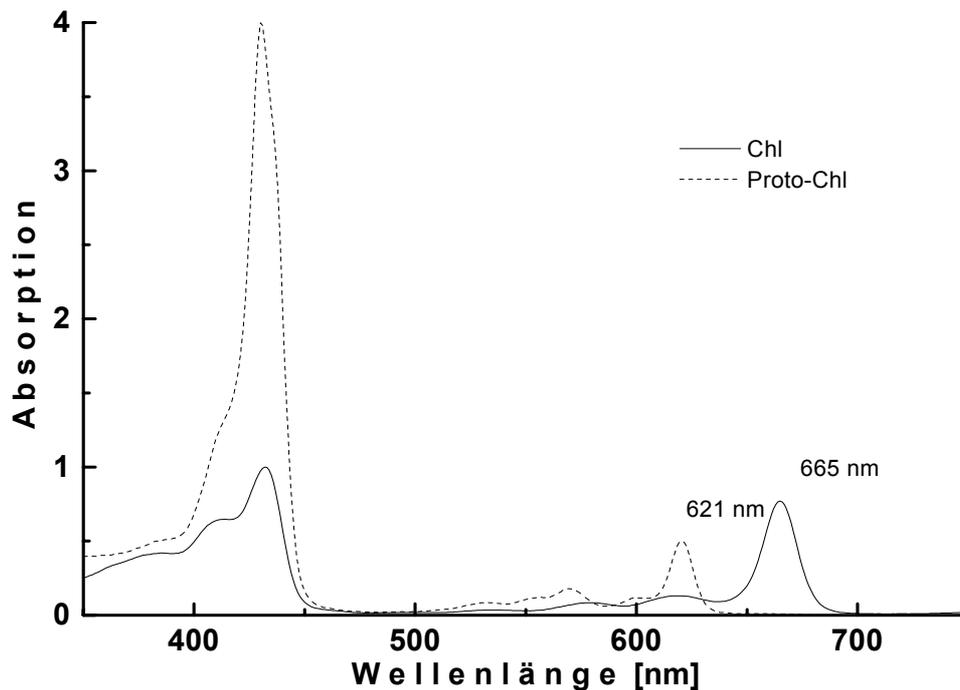


Abb. 20: Absorptionsspektren von Chlorophyll a und Protochlorophyll a in Diethylether.

Proto-Chl, als Vertreter der Porphyrine besitzt verglichen mit Chl eine zusätzliche Doppelbindung zwischen C-17 und C-18. Die daraus resultierende veränderte elektronische Struktur kann klar im Absorptionsspektrum gesehen werden (Abb. 20): Die Q_y -Bande des Proto-Chl ist gegenüber der des Chl um 34 nm blauverschoben (in Diethylether) und das Soret- zu Q_y -Bandenverhältnis ist stark verändert, es erhöht sich von 1,3 bei Chlorophyll zu 8,3 bei Protochlorophyll.

2.2 Eichung der HPLC-DAD

Für alle hier vorgestellten Pigmente wurden ebenso wie für die nativ im RC vorkommenden Pigmente (Chl, Phe, Car) Eichgeraden für die HPLC-DAD Analyse erstellt. Dies ist wichtig, um die Versuche quantitativ auswerten zu können. Dabei wurde wie unter Kapitel C.1.2 beschrieben vorgegangen. Die Eichung wurde (mit Ausnahme von Ni-Chl, siehe Kapitel C.1.2.1) mit System I durchgeführt. Dabei konnten Eichgeraden (Abb. 21) mit einer Übereinstimmung von 96 % und 99 % (entsprechend einem Korrelationskoeffizienten von 0,96 und 0,99) gefunden werden.

C Ergebnisse

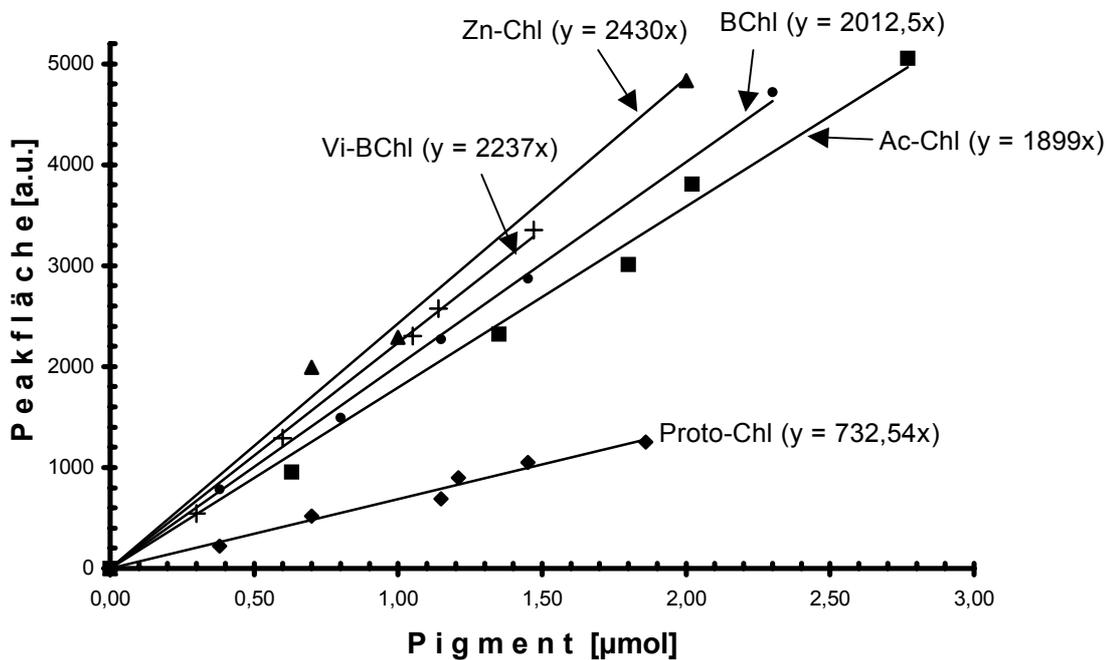


Abb. 21: Eichkurven für die HPLC-DAD Analyse chemisch modifizierter Pigmente erstellt mit System I.

Spektralphotometrisch bestimmte Mengen des entsprechenden isolierten Pigments wurden in die HPLC injiziert und über die Fläche der so erhaltenen Chromatogramme integriert. Jeder Punkt stellt einen Mittelwert aus drei Messungen dar. Die Punkte wurden durch eine lineare Gerade miteinander verbunden. Die Gleichung der Ausgleichsgeraden ist im Diagramm dargestellt.

Mit den dazugehörigen Geradengleichungen (dargestellt in Abb. 21) wurde der nach Modifikation mittels HPLC-DAD Analyse gefundene Pigmentgehalt der Reaktionszentren ermittelt. Die so ermittelten Stöchiometrien werden in Zusammenhang mit den jeweiligen Versuchen (Kapitel D.3 und D.4) besprochen.

3 Pigmentaustausch an 6-Chl PS II-RC

3.1 Transmetallierten Chlorophyllen

3.1.1 [Zn²⁺]-Chlorophyll a und [Zn²⁺]-Methylchlorophyllid a

Gall [59] konnte bereits zeigen, dass es möglich ist, ein Chlorophyll des 6-Chlorophyll Reaktionszentrums von Photosystem II durch Zn-Chl zu ersetzen, wobei allerdings deutlich mehr Zn-Chl gebunden (4,9 Zn-Chl pro 2 Phe) als Chlorophyll verdrängt werden. Nach den Ergebnissen dieser Versuche scheint das überschüssige Zn-Chl gebunden vorzuliegen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob diese spezifische gebunden oder unspezifisch am Komplex adsorbiert sind. Hierfür wurde versucht, die Aufreinigung des Austauschansatzes zu variieren.

3.1.1.1 Aufreinigung

Chromatographie

Zur Verbesserung der chromatographischen Reinigung der Ansätze (6-Chl PS II-RC inkubiert mit Zn-Chl (=Austauschansatz) und Chl (=Kontrollansatz)) wurden verschiedene Waschpuffer getestet, um ungebundenes Pigment zu entfernen. Um die Löslichkeit des Pigments zu erhöhen, wurden ligandierende Puffersysteme (s.o.) verwendet. Hierzu wurden i) ein Imidazolpuffer (50 mM Imidazol, 1,0 mM DM, pH 6.8) und ii) ein Tris/Pyridin-Puffer (50 mM Tris, 1 % (v/v) Pyridin, 1,0 mM DM, pH 6.8) getestet. Die adsorbierten RC des Austausch- und Kontrollansatzes wurden – wie in Material und Methoden beschrieben – solange mit den jeweiligen Puffern gewaschen, bis kein freies Pigment mehr von der Säule eluiert wurde (dies wurde durch Absorptionsspektroskopie kontrolliert). Die chromatographische Reinigung wurde zweimal wiederholt.

Zu i): Nach dem Waschen mit dem Imidazolpuffer konnten RC eluiert werden, in denen ein hoher Zn-Chl Anteil erkennbar war (zu sehen an einer deutlich ausgeprägten Schulter bei 435 nm und einer kurzwelligen Verbreiterung der Q_y-Bande um 670 nm; Daten sind nicht gezeigt). Das Maximum der Q_y-Absorptionsbande lag bei 674 nm. Die Daten der HPLC-Analyse bestätigten die bereits spektroskopisch ermittelte relative Erhöhung der metallierten Tetrapyrrolpigmente im PS II-RC.

C Ergebnisse

Durch HPLC-DAD Analyse konnte für den Austauschversuch und dem Kontrollversuch (Werte in Klammern) folgende Pigmentstöchiometrien – bezogen auf zwei Pheophytine – ermittelt werden: 5,5 (6,0) Chl, 1,5 (1,3) Car und 13 (0) Zn-Chl. Die Erhöhung der Anzahl metallierter Tetrapyrrolpigmente bei den mit Zn-Chl inkubierten RC auf einen Wert über 20 (im Vergleich hierzu blieb sie bei den mit Chl inkubierten RC konstant) zeigte deutlich, dass die Behandlung mit Imidazolpuffer zwar ausreicht, um extern zugefügtes Chl zu entfernen, jedoch Zn-Chl nicht vollständig entfernen kann. Der Zn-Chl Anteil lag sogar noch höher als bei Gall (s.o.).

Zu ii) Nach dem Waschen mit Tris/Pyridin-Puffer und anschließender Elution konnte auch hier im RC-Spektrum ein Überschuss an Zn-Chl gesehen werden (deutlich ausgeprägte Schulter bei 435 nm, kurzweilig verbreiterte Q_y-Bande um 670 nm, Daten sind nicht gezeigt). Zusätzlich verschob sich das Q_y-Bandenmaximum auf 671 nm (vorher 676 nm), was auf einen starken Aktivitätsverlust der PS II-RC hinweist (vgl. C.1.3). Die Q_y-Bande des mit Chl inkubierten 6-Chl PS II-RC (Kontrollansatzes) zeigt eine Verschiebung auf Werte von 672 nm, wobei keine Hinweise auf überschüssiges zusätzliches Chl (sichtbar an einer Schulter bei 435 nm) vorlagen. Demnach destabilisiert die Behandlung mit Tris/Pyridin-Puffer das PS II-RC sehr stark, was auf die Anwesenheit von Pyridin zurückzuführen ist. Aufgrund dieser RC-Inaktivierung wurden mit diesen Proben keine weiteren Versuche mehr durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Versuche zur Optimierung der chromatographischen Reinigung (unter Beibehaltung des Säulenmaterials) scheiterten: Milde Bedingungen (Imidazol-Puffer) reichten nicht aus, um das Zn-Chl vollständig zu entfernen und stärker chelierende Waschungen (Anwesenheit von 1 % (v/v) Pyridin im Waschpuffer) destabilisierten den Komplex. Deshalb wurde nach Alternativmethoden für eine schonende und gleichzeitig stringente Aufreinigung des Inkubationsansatzes gesucht.

Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Als eine weitere Möglichkeit zur Aufreinigung der Inkubationsansätze wurde die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation getestet. Der Gradient wurde so gewählt, dass bei Zentrifugation über Nacht innerhalb der Röhrchenlänge niedermolekulare (freie Pigmente), mittelmolekulare (RC-Komplexe) und hochmolekulare Fraktionen (oligomere Pigmente und/oder Pigment-Detergenz-Mizellen) voneinander getrennt

C Ergebnisse

werden konnten. Nach verschiedenen Tests (Stufengradienten mit unterschiedlichen Molaritäten) zeigte sich, dass ein linearer Dichtegradient von 0,1 M bis 1,0 M Saccharose (in 10 mL) und einer Trennlänge von 8 cm geeignet ist und eine hohe Wiederauffindungsrate¹⁵ der Komplexe nach Zentrifugation garantiert.

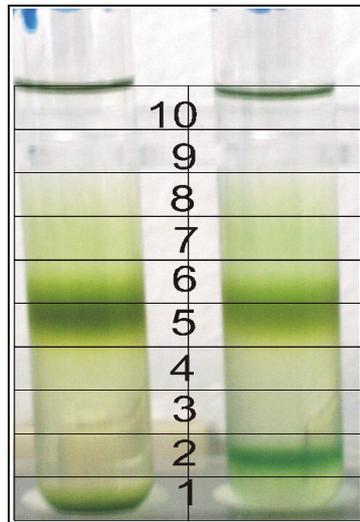


Abb. 22: Auftrennung der Austauschansätze in dem Saccharose-Dichtegradienten (0,1-1,0 M Saccharose).

linkes Röhrchen: Trennung von $[Zn^{2+}]$ -Chlorophyll a und PS II-RC nach Inkubation.
rechtes Röhrchen: Trennung von Chlorophyll a und PS II-RC nach Inkubation. Die Nummern kennzeichnen die für die Analyse gesammelten Fraktionen zu je 1 mL.

Ein Beispiel für die Auftrennung der unterschiedlichen Komponenten im Inkubationsansatz nach Ultrazentrifugation ist in Abb. 22 gezeigt. Aufgetragen wurden mit Zn-Chl (linkes Röhrchen) und Chl (rechtes Röhrchen) inkubierte RC. Die Gradienten wurden in 1 mL Fraktionen vom Boden der Röhrchen, gemäss der Nummerierung in Abb. 22, gesammelt. Es ergeben sich für die „schweren“ (= große Dichte) Fraktionen niedrige und für die „leichten“ (= kleine Dichte) Fraktionen hohe Nummern. Die spektralphotometrische Analyse der gefärbten Fraktionen ergab für die mit Zn-Chl inkubierten PS II-RC (entspricht den linken Röhrchen in Abb. 22) folgende Spektren (Abb. 23, A-C).

¹⁵ Die Wiederauffindungsrate (die Menge an RC nach Inkubation und Aufreinigung, bezogen auf die eingesetzte RC-Menge) lag zwischen 70 und 95 %.

C Ergebnisse

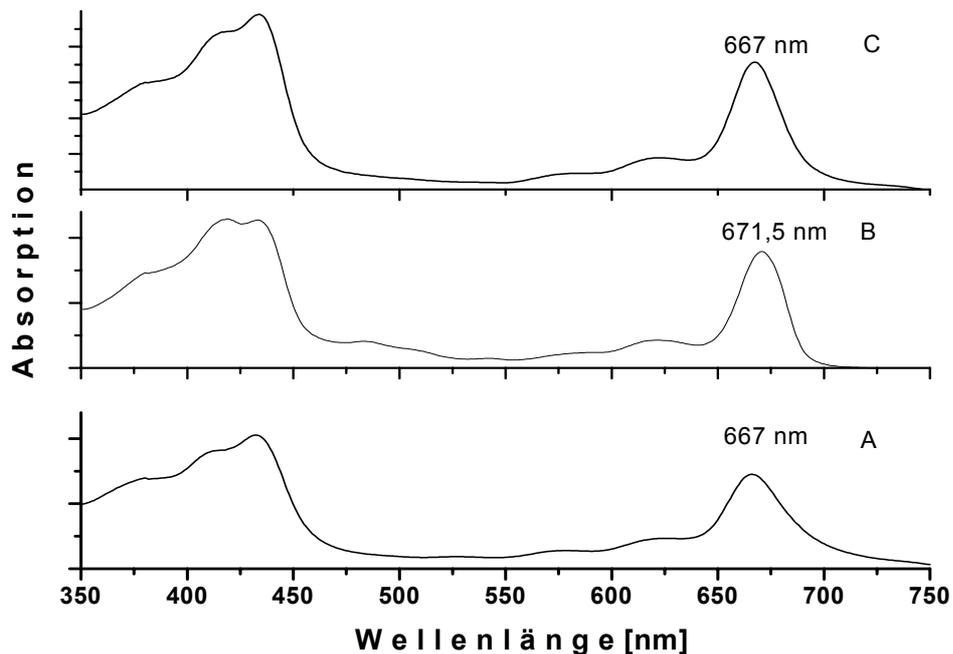


Abb. 23: Absorptionsspektren der gefärbten Banden des Saccharose-Dichtegradienten des mit $[Zn^{2+}]$ -Chlorophyll *a* durchgeführten Austauschansatzes aus Abbildung 22 (links).

A: Spektrum der Fraktion 1– unterste Bande; B: Spektrum der vereinigten Fraktionen 5 und 6–mittlere Bande; C: Spektrum der vereinigten Fraktionen 7 bis 9–oberste Bande.

Die Spektren der Fraktion 1 (Abb. 23-A) und der Fraktionen 7-9 (Abb. 23-C) sind sich sehr ähnlich und stammen hauptsächlich von im Ansatz überschüssig vorhandenen Zn-Chl. Die Maxima der Absorptionsbanden liegen in beiden Spektren bei 434 und 667 nm. Die Q_y -Banden beider Spektren sind unsymmetrisch und vor allem auf der langwelligen Flanke verbreitert. Die unsymmetrische Bandenform weist auf das Vorhandensein unterschiedlich großer oligomerer Pigmentaggregate hin [88]. (Bakterio) Chlorophyll (-derivate) neigen in wässrigen Systemen zu solchen Aggregationen [88;115;116], welche noch zusätzlich durch Anwesenheit von Detergenzien gefördert werden kann [117-119]. In Versuchen mit Zn-Chl und Chl in Detergenzlösung konnten im aggregierten Zustand Rotverschiebungen der Q_y -Bande bis 70 nm beobachtet werden [119].

Die nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation gesehene unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der freien Pigmente in der ersten Fraktion und in der siebten bis neunten Fraktion lässt den Schluss zu, dass sich die Pigmente (der „schweren“ und der „leichten“ Fraktion) in der Aggregationsstufe und im Solubili-

C Ergebnisse

sierungsgrad (unterschiedlich große Pigment-Detergenz-Mizellen) voneinander unterscheiden¹⁶. Eine genauere Identifizierung der sich in den „schweren“ und in den „leichten“ Fraktionen befindenden Komponenten wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Die mittlere Bande¹⁷ (Fraktionen 5 und 6) enthält aufgrund des Spektrums (Abb. 23-B) eindeutig PS II-RC (die Kriterien hierfür sind ausführlich in Kapitel D.1.3 dargestellt), jedoch zeigen diese ein stark blauverschobenes Q_y -Absorptionsmaximum (671,5 nm). Eine detaillierte Besprechung dieses Versuchs erfolgt im Kapitel C.3.1.1. Analog hierzu wurde auch der Kontrollansatz (rechtes Röhrchen, Abb. 22) analysiert (PS II-RC inkubiert mit Chl). Die spektroskopische Untersuchung der Fraktionen ergab folgende Spektren (Abb. 24-A bis C), welche den gefärbten Banden des Röhrchens in Abb. 22 entsprechen.

Das Spektrum der mittleren Fraktionen 5 und 6 (Abb. 24-B) zeigt die charakteristischen Absorptionsbanden von PS II-RC (Abb. 22). Die Q_y -Bande besitzt ihr Maximum bei 675,5 nm, was auf einen Erhalt der RC-Aktivität und eine gute Trennung von überschüssigem Chl und RC hinweist. Weitere detaillierte Versuchsauswertungen des hier durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigtem Versuchsansatzes (mit Chl inkubierte RC, =Kontroll-RC) erfolgen im Kapitel C.3.1.1.2 parallel zur Besprechung des Austauschexperiments mit Zn-Chl.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Aufreinigung des Austauschansatzes durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation sehr effizient verlief. Die PS II-RC konnten von dem überschüssig vorhandenen extern zugefügten Pigment abgetrennt werden (Abb. 22). Der Überschuss befand sich dabei sowohl in der

¹⁶ Für den hier verwendeten Saccharose-Dichtegradienten (0,1 bis 1,0 M Saccharose in DM-Puffer und Zentrifugation (16h 190.000g, 4 °C, RPS40T, Röhrchengröße 14 x 95 mm)) wurde von Müller [84] eine Eichgerade zur Molekularmassenbestimmung angefertigt. Laut dieser Eichung befinden sich in der Fraktion 1 Teilchen mit einer Masse bis zu 620 kDa und in den Fraktionen sieben bis neun Molekularmassen zwischen 75 und 23 kDa. Da die Eichung mit Proteinen durchgeführt wurde, kann diese nur für eine ungefähre Abschätzung der Aggregate und/oder der Pigment-Detergenz-Mizellen Größe herangezogen werden, denn im Rahmen der Arbeit wurde keine Korrelation zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit von (oligomeren) Chlorophyllen und Proteinen durchgeführt.

¹⁷ Gemäß der Eichung von Müller [84] (s.a. vorherige Fußnote) können in den Fraktionen 5 und 6 Proteine mit einer Molekularmasse von 130 und 75 kDa gefunden werden, d.h hier werden PS II-RC erwartet, deren monomeres Gewicht mit 106 kDa angegeben wird [87].

C Ergebnisse

„schweren“ (1,0– 0,82 M Saccharose) als auch in der „leichten“ (0,37-0,19 M Saccharose) Fraktion. Die PS II-RC wurden in den mittleren Fraktionen (0,64-0,46 M Saccharose) gefunden. Die spektroskopische Beurteilung dieser RC, d.h. Beurteilung der Lage und Form der Q_y -Bande, das Verhältnis von $OD_{418\text{ nm}}/OD_{435\text{ nm}}$ (am Beispiel des PS II-RC inkubiert mit Chl, Abb. 24-B) zeigte, dass diese aktiv und frei von überschüssigem Chl sind (Details zur Beurteilung dieser Charakteristika ist in Kapitel D.1.3 beschrieben).

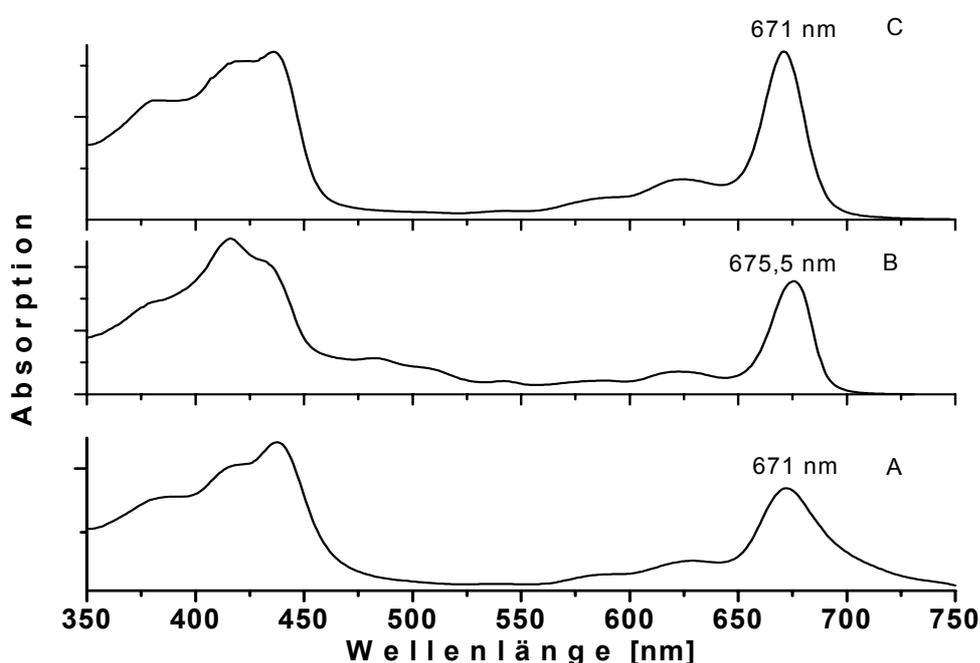


Abb. 24: Absorptionsspektren der gefärbten Banden des Saccharose-Dichtegradienten des mit Chlorophyll a durchgeführten Kontrollansatzes aus Abbildung 22-rechts.

A: Spektrum der Fraktion 2 – unterste Bande; B: Spektrum der vereinigten Fraktionen 5 und 6-mittlere Bande; C: Spektrum der vereinigten Fraktionen 7 bis 9–oberste Bande.

3.1.1.2 Charakterisierung

Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektren der durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (Kapitel C.3.1.1.1) erhaltenen PS II-RC, d.h. die Fraktionen 5 und 6 des Austauschansatzes (inkubiert mit Zn-Chl) und des Kontrollansatzes (inkubiert mit Chl), sind in Abb. 25 dargestellt. Auch hier kann zwischen „schweren“ (Abb. 24-A, Fraktion 2) und

C Ergebnisse

„leichten“ (Abb. 24-C, Fraktionen 7-9) Banden/Fraktionen unterschieden werden. Beide Absorptionsspektren entsprechen reinem Chl in wässriger Detergenzlösung [119]. Die Bandenmaxima stimmen mit den publizierten überein und liegen hier bei 438 nm und 671 nm. Trotz der Ähnlichkeit beider Proben kann im Spektrum der schweren Fraktion (Abb. 24-A) eine ausgeprägte langwellige Schulter der Q_y -Bande gesehen werden, was auf Pigmentaggregation hinweist [120]. Im Spektrum der leichten Fraktionen (Abb. 24-C) fehlt diese Schulter, weshalb hier, d.h. in den Fraktionen 7-9, das Chl monomer oder nur geringfügig aggregiert vorliegt. Eine weitere Identifizierung wurde nicht vorgenommen.

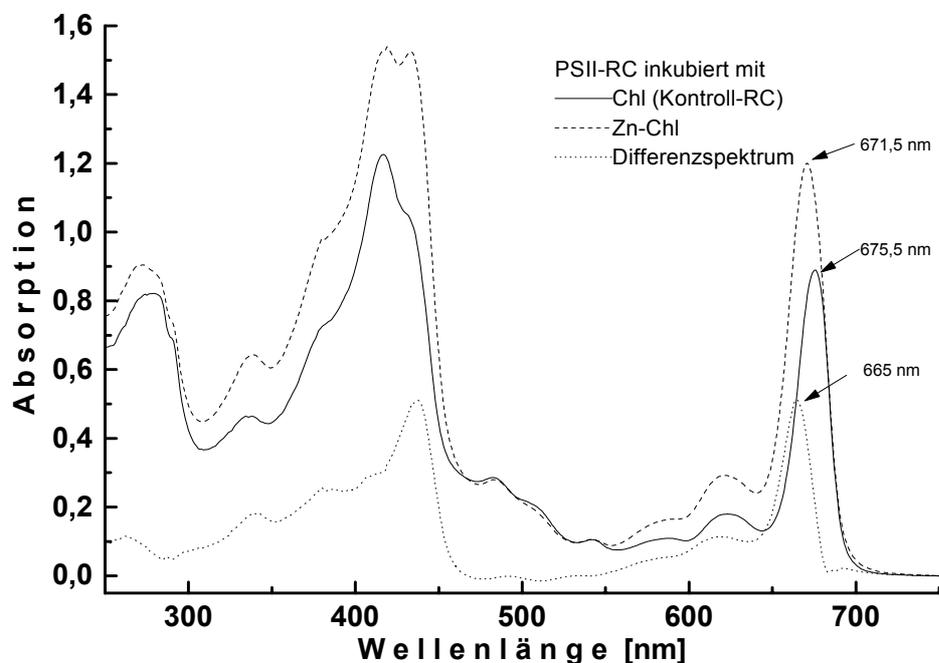


Abb. 25: Absorptionsspektren des $[Zn^{2+}]$ -Chlorophyll *a* –Austauschs und des Kontroll-experiments (Chlorophyll *a* –Austausch).

Die 6-Chlorophyll Reaktionszentren wurden mit Chl (Kontroll-RC) und Zn-Chl inkubiert und mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die Spektren sind auf die Q_x -Bande des Phe (542 nm) normiert. Gepunktete Linie: Differenzspektrum des mit Zn-Chl ausgetauschten RC *minus* Kontroll-RC.

Nach Normierung der Spektren (auf die Q_x -Bande des Phe bei 542 nm) zeigt sich deutlich, dass die Intensitäten der Absorptionsbanden der mit Zn-Chl inkubierten RC sowohl in der Soret- als auch in der Q_y -Region höher als die des Kontroll-RC sind. In der Carotin-Region sind praktisch keine Veränderungen zu sehen. Die Q_y -Bande des modifizierten Komplexes ist gegenüber der des Kontroll-RC um 4 nm kurzwellig verschoben und liegt nun bei 671,5 nm (Kontroll-RC 675,5 nm). Deutliche Abweichungen

C Ergebnisse

sind auch in der Soretbande zu erkennen. Das Differenzspektrum (Zn-Chl inkubiertes RC *minus* Kontroll-RC) zeigt einen Absorptionsszuwachs in der Soret-Region (300 bis 450 nm) und in der kurzwelligen Flanke des Q_y -Bereichs, mit Maxima bei 438 nm und 665 nm.

Die Integration über den Bereich von 600 bis 750 nm (Q_y -Banden) lieferte für die mit Zn-Chl inkubierten RC den 1,5-fachen Wert verglichen mit den Chl inkubierten RC. Unter Annahme gleicher Pigment-Oszillatorenstärke sollten nach einem „eins zu eins“ durchgeführten Pigmenttausch die Flächen unter der Q_y -Bande in beiden Komplexen gleich sein. Die 1,5-fache Erhöhung der Fläche deutet – unter den oben angeführten Annahmen – auf eine Erhöhung der Gesamtanzahl der Tetrapyrrolpigmente von 8 (6 Chl und 2 Phe) auf 12 relative Einheiten im mit Zn-Chl behandelten RC hin.

Aktivitätsmessung

Aufgrund des stark blauverschobenen Maximums der Q_y -Bande bei den mit Zn-Chl behandelten RC war die Messung der photochemischen Aktivität besonders wichtig. Die Aktivität wurde über lichtinduzierte Akkumulierung von Phe^* , wie in Kapitel D.1.5.1 beschrieben, getestet. Danach ist die Aktivität der mit Zn-Chl und Chl inkubierten RC gegenüber einem nicht-behandelten nativen RC nur um etwa 20 % gesunken. Die Aktivität der ausgetauschten Probe (78 %) ist darüber hinaus innerhalb der Fehlergrenze mit der des Kontroll-RC (82 %) vergleichbar, so dass die Anwesenheit von Zn-Chl die Aktivität nicht erniedrigt. Der Aktivitätsverlust beider Proben sollte vielmehr auf die Inkubation bei erhöhter Temperatur zurückzuführen sein.

HPLC-DAD Analyse

Die durchgeführte HPLC-DAD Analyse konnte den bereits spektroskopisch abgeschätzten Überschuss an Tetrapyrrolpigmenten bestätigen und präzisieren. Für den modifizierten Komplex und das Kontroll-RC (in Klammern) konnten folgende Pigmentzusammensetzungen ermittelt werden: $4,7 \pm 0,2$ ($6,2 \pm 0,4$) Chl, $1,2 \pm 0,2$ ($1,2 \pm 0,2$) Car, $4,0 \pm 0,5$ (0) Zn-Chl pro 2 Phe. Die Daten zeigen, dass der Austausch gelingt, wobei etwa ein Chl verdrängt und gleichzeitig vier weitere Zn-Chl im Komplex gebunden sind. Der Gesamtchloringehalt des PS II-RC wurde durch die Inkubation mit Zn-Chl von ursprünglich 8 auf nun 11 erhöht. Diese Daten sind kompatibel mit dem spektroskopisch ermittelten Chloringehalt von 12 Tetrapyrrolpigmenten nach der Zn-Chl

C Ergebnisse

Behandlung. Verglichen mit der chromatographischen Aufreinigung (20 Tetrapyrrolpigmente pro 2 Phe; vgl. Kapitel C.3.1.1.1) ist das eine deutliche „Verbesserung“.

Fluoreszenzspektroskopie

Um die Proben auf die An- oder Abwesenheit von freiem Pigment zu untersuchen, wurden auch hier Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren (Abb. 26) bei unterschiedlichen Wellenlängen, gemäss der Gall'schen Methode, aufgenommen, (siehe Kapitel D.1.4).

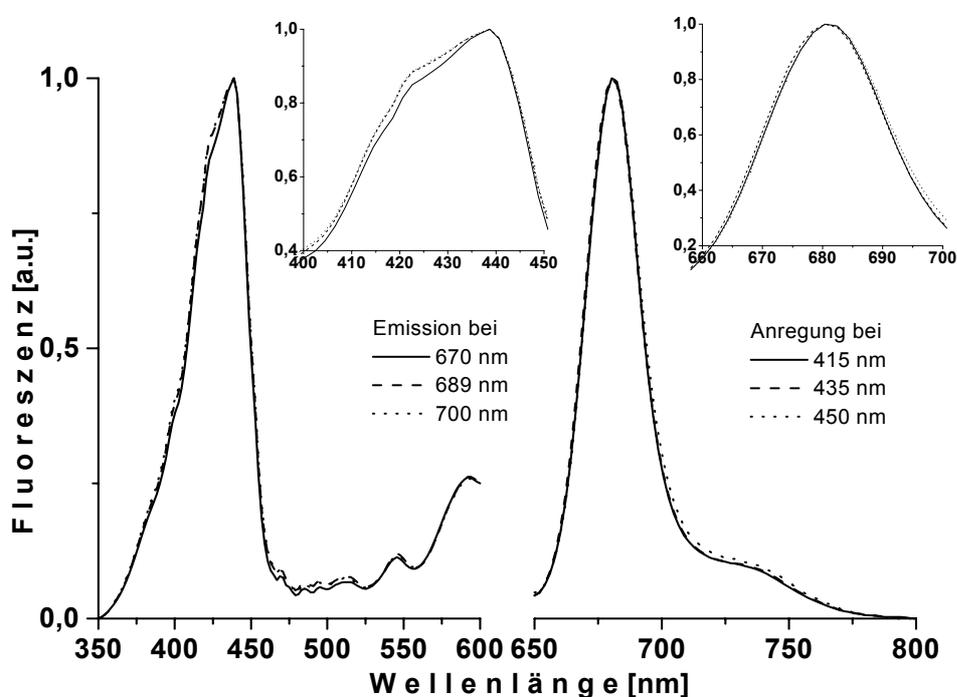


Abb. 26: Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren von 6-Chl PS II-RC inkubiert mit $[Zn^{2+}]$ -Chlorophyll *a* in 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1,0 mM DM. links: Anregungsspektren aufgenommen bei 670, 689 700 nm. rechts: Emissionsspektren angeregt bei 415, 435, 450 nm. Der Bereich der Bandenmaxima ist jeweils oben rechts vergrößert dargestellt. Die Spektren wurden auf das jeweilige Bandenmaximum normiert.

Die Fluoreszenzspektren der mit Zn-Chl inkubierten Proben weichen nach Normierung auf deren jeweilige Maxima geringfügig voneinander ab. Diese, von der eingestrahlt bzw. detektierten Wellenlänge abhängige Bandenform ist in der Vergrößerung (in Abbildung jeweils rechts oben dargestellt) gut zu sehen. Ähnliches Abweichen konnte bereits bei unbehandelten, nativen 6-Chl PS II-RC (Abb. 11) und ebenso bei dem hier

C Ergebnisse

parallel durchgeführten Kontrollexperiment gesehen werden (Daten nicht gezeigt). Die Maxima der Emissionsbande liegen bei dem Zn-Chl inkubierten Reaktionszentrum einheitlich bei 680 nm. Sie sind verglichen mit denen des parallel durchgeführten Kontrollperiments (6-Chl PS II-RC inkubiert mit Chl, Daten sind hier nicht gezeigt) um 2 nm blauverschoben.

Aufgrund der leicht unterschiedlichen Bandenformen in den Anregungs- und Emissionsspektren kann die Anwesenheit von freiem Pigment nicht pauschal ausgeschlossen werden. Deshalb war gerade in diesem Versuch die Frage nach ungebundenem Pigment zu klären. Für das Fluoreszenz-Kontrollexperiment wurden PS II-RC mit der im Austauschansatz detektierten Menge an exogenen Zn-Chl gemischt und ohne Inkubation vermessen (Abb. 27).

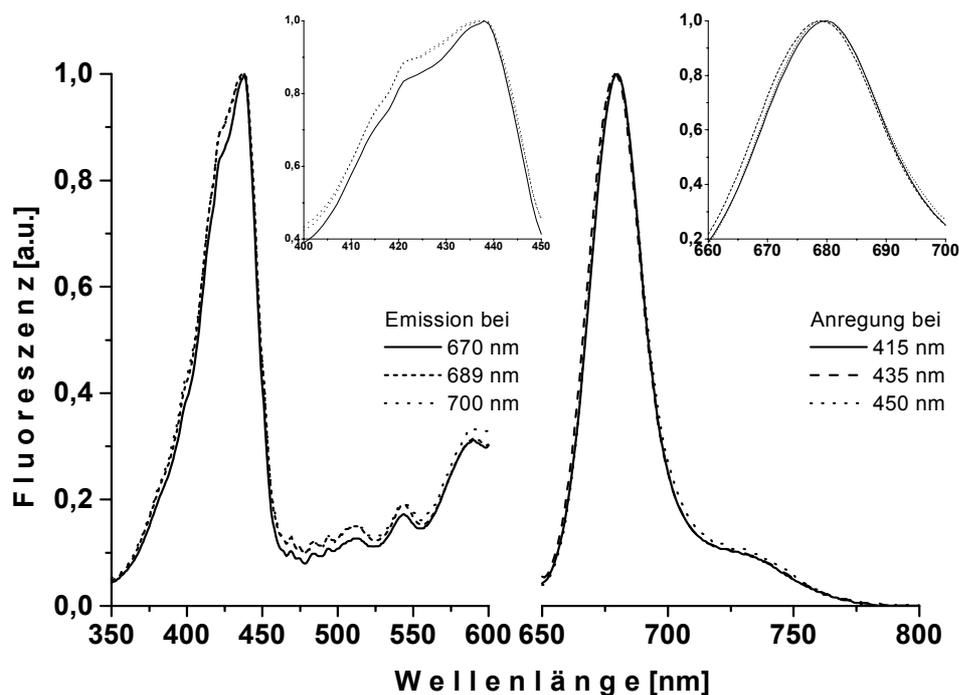


Abb. 27: Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren von 6-Chl PS II-RC und $[Zn^{2+}]$ -Chlorophyll a ohne Inkubation gemischt im Verhältnis eins zu vier. links: Anregungsspektren aufgenommen bei 670, 689 700 nm. rechts: Emissionsspektren angeregt bei 415, 435, 450 nm. Der Bereich der Bandenmaxima ist jeweils oben rechts vergrößert dargestellt. Die Spektren wurden auf das jeweilige Bandenmaximum normiert.

Nach der Normierung der Spektren auf deren jeweilige Bandenmaxima zeigt sich im Kontrollexperiment eine verstärkte Abhängigkeit der Bandenform und -lage von der

C Ergebnisse

Detektions- bzw. Anregungswellenlänge (siehe Kapitel C.1.4): Die Banden der Anregungs- und Emissionsspektren werden mit zunehmender Detektions- bzw. Anregungswellenlänge breiter. Zusätzlich verschieben sich die Emissionsbandenmaxima um ca. 1 nm (je nach Anregungswellenlänge) kurzwellig. Die Ursache hierfür liegt in dem Vorhandensein von freiem Zn-Chl.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die Spektren der Austauschproben (Abb. 26) und die der nativen RC (Abb. 11) ähnlicher sind als die der Zn-Chl Mischung und RC (Abb. 27). Deshalb findet bei ersteren RC ein sehr viel besserer Energieaustausch statt. Der nach Austausch gefundene Überschuss an Zn-Chl sollte so in der Nähe der anderen Tetrapyrrolpigmente gebunden vorliegen.

3.1.2 [Ni²⁺]-Chlorophyll a

Nach Inkubation der PS II-RC mit Ni-Chl (Austauschexperiment) und Chl (Kontroll-experiment) wurde der Ansatz über Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt und absorptionsspektroskopisch vermessen (Abb. 28). Die Spektren wurden auf die Q_x-Bande des Phe (542 nm) normiert. Im Vergleich der Spektren zeigt sich, dass das mit Ni-Chl inkubierte RC eine gegenüber dem Kontroll-Experiment (mit Chl inkubiertes RC) um 1,5 nm kurzwellig verschobene sowie kurzwellig verbreiterte Q_y-Bande besitzt. Das Differenzspektrum (Ni-Chl behandelte PS II-RC *minus* Kontroll-RC) bestätigt dieses. Es zeigt einen Absorptionsszuwachs bei 658 nm und einen Verlust bei 670 nm. Die Spektren der Proben weichen auch in der Carotin-Region (bei etwa 475 nm) voneinander ab, wobei hier die Absorption des Kontroll-RC kleiner ist als die nach Ni-Chl Austausch. Ein (geringer) Verlust von Car bei den mit Ni-Chl behandelten Proben ist eher unwahrscheinlich, da deren Pigmentanalyse einen konstanten Car-Gehalt (pro 2 Phe) lieferte. Der bei dem Kontroll-RC detektierte Absorptionsverlust könnte also entweder, wie von Gall et al. vermutet [60], durch eine Umorientierung der Carotine während der Inkubation bei höheren Temperaturen verursacht sein oder einen Artefakt aufgrund der Normierung auf eine sehr kleine Bande (542 nm) darstellen.

Die Integration über den Bereich von 600 bis 750 nm (Q_y-Bande) zeigte, dass das mit Ni-Chl inkubierte RC eine Fläche von 29,4 und das Kontroll-RC von 30 Einheiten besitzt. Diese Abweichung von 2 % ist sicher innerhalb der Fehlergrenze. Unter der Annahme gleicher Pigment-Oszillatorenstärken ergibt sich ein unveränderter Gehalt an Tetrapyrrolpigmenten von 6 Chl pro 2 Phe.

C Ergebnisse

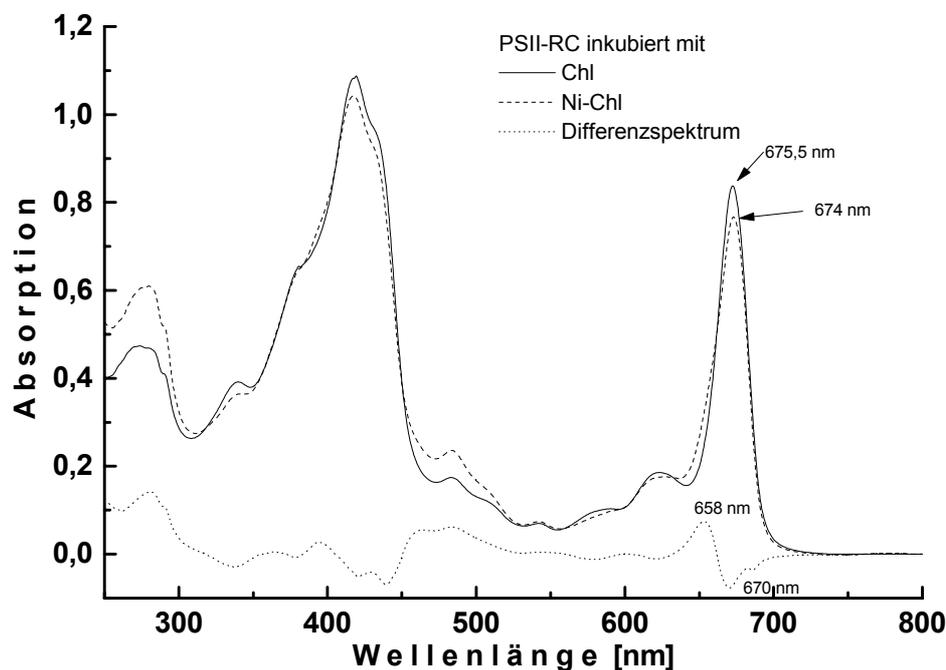


Abb. 28: Absorptionsspektren des $[\text{Ni}^{2+}]$ -Chlorophyll *a* –Austauschs und des Kontroll-experiments (Chlorophyll *a* –Austausch).

Die 6-Chlorophyll Reaktionszentren wurden mit Chl (Kontroll-RC) und Ni-Chl inkubiert und mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die Spektren sind auf die Q_x -Bande des Phe (542 nm) normiert. Gepunktete Linie: Differenzspektrum des mit Ni-Chl ausgetauschten RC *minus* Kontroll-RC.

Aktivitätsmessung

Die Aktivität der behandelten Komplexe wurde mittels Phe^{*}-Akkumulation getestet und mit der nativer Komplexe verglichen. Die nach Inkubation gefundenen Aktivitäten der mit Ni-Chl bzw. Chl behandelten RC lagen bei 83 bzw. 85 %, bezogen auf die Aktivität nativer 6-Chl PS II-RC. Die Werte der Restaktivität des inkubierten RC im Kontroll- und Austauschexperiment unterscheiden sich nicht wesentlich, weshalb der Aktivitätsverlust nicht durch das konzertierte Entfernen und Hinzufügen der Pigmente hervorgerufen zu sein scheint, sondern vielmehr durch die Temperaturbehandlung bei der Inkubation.

HPLC-DAD Analyse

Die Pigmentanalyse mittels HPLC-DAD (hier mit dem System II; vgl. Kapitel C 1.2.1) ergab für den modifizierten Komplex und das Kontroll-Experiment (in Klammern) folgende Zusammensetzung: $4,9 \pm 0,3$ ($5,7 \pm 0,2$) Chl, $1,4 \pm 0,1$ ($1,4 \pm 0,1$) Car, $0,6 \pm 0,2$ (0) Ni-Chl pro 2 Phe. Die Daten zeigen, dass ein Austausch stattgefunden hat, wobei in

etwa 0,8 Chl gegen 0,6 Ni-Chl ausgetauscht wurden. Die nicht ganzzahligen Werte (<1) deuten darauf hin, dass der Austausch nicht vollständig ist. Die für die inkubierten RC ermittelten Gesamtanzahlen der Tetrapyrrolpigmente von $7,5 \pm 0,5$ (modifizierter Komplex) und $7,7 \pm 0,2$ (Kontroll-RC) unterscheiden sich aber nur um etwa 3 % voneinander. Dies deutet, ebenso wie die spektralphotometrisch ermittelten Flächen der Absorptionsbanden darauf hin, dass ein Austausch eines Chl und der Einbau eines Ni-Chl stattgefunden hat.

Fluoreszenz Spektroskopie

Wie bei vorhergehenden Austauschexperimenten (Kapitel C.3.1.1) wurden Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren bei unterschiedlichen Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen gemessen. Da Ni-Chl in der Lage ist, Anregungsenergie extrem schnell¹⁸ strahlungslos (durch innere Konversion) abzubauen, kann externes Ni-Chl hier nicht nachgewiesen werden. Die Wellenlängenunabhängigkeit der Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren beider Versuchsansätze zeigten, dass alle Pigmente des mit Chl analog behandelten PS II-RC (=Kontroll-RC) funktional integriert sind und in den mit Ni-Chl ausgetauschten Proben keine freien Chl oder Phe vorhanden sind. Die Emissionsmaxima des mit Ni-Chl behandelten RC sind gegenüber denen des Kontroll-Experiments um 2 nm blauverschoben (von 682 nm auf 680 nm). Zur Ermittlung der relativen Quantenausbeute wurden Emissionsspektren von mit Ni-Chl und Chl inkubierten Reaktionszentren aufgenommen. Die Q_y -Absorptionen der PS II-RC wurden auf einen Wert von OD 0,05 eingestellt. Nach Anregung bei 435 nm zeigten die mit Ni-Chl inkubierten RC eine im Mittel um 20 % reduzierte Fluoreszenz verglichen mit der der Kontroll-RC.

3.2 Peripher modifizierte Chlorophyllen

3.2.1 [3-Acetyl]-chlorophyll a – Einfachaustausch

Abb. 29 zeigt ein Absorptionsspektrum des Austauschansatzes (PS II-RC inkubiert mit Ac-Chl) und des Kontrollansatzes (inkubiert mit Chl) nach einmaligem Austausch. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Spektren wiederum auf die Q_x -Bande des Phe

¹⁸ Fiedor et al. [146] und Hartwich et al. [145] konnten zeigen, dass Ni-BChl in der Lage ist, sehr schnell (≤ 50 fs) innerhalb eines exzitonic gekoppelten Systems Anregungsenergie durch innere Konversion abzubauen.

C Ergebnisse

(542 nm) normiert. Das Maximum der Q_y -Bande des mit Ac-Chl inkubierten PS II-RC ist gegenüber dem des Kontrollansatzes (mit Chl inkubiertes RC) um 0,5 nm rotverschoben, die Bande ist außerdem langwellig verbreitert. Die Unterschiede sind im Differenzspektrum (mit Ac-Chl behandeltes PS II-RC *minus* Kontroll-RC) besser zu sehen (Absorptionsszuwachs bei 690 nm und -verlust bei 670 nm). Der hinzugekommene langwellige Absorptionsanteil ist auf die Anwesenheit von Ac-Chl zurückzuführen. Ac-Chl hat, verglichen mit Chl, ein um knapp 20 nm rotverschobenes Q_y -Bandenmaximum, welches in wässriger Detergenzlösung bei 686 nm liegt [120] (vgl. hierzu auch die Spektren von Ac-Chl und Chl in Diethylether in Abb. 18).

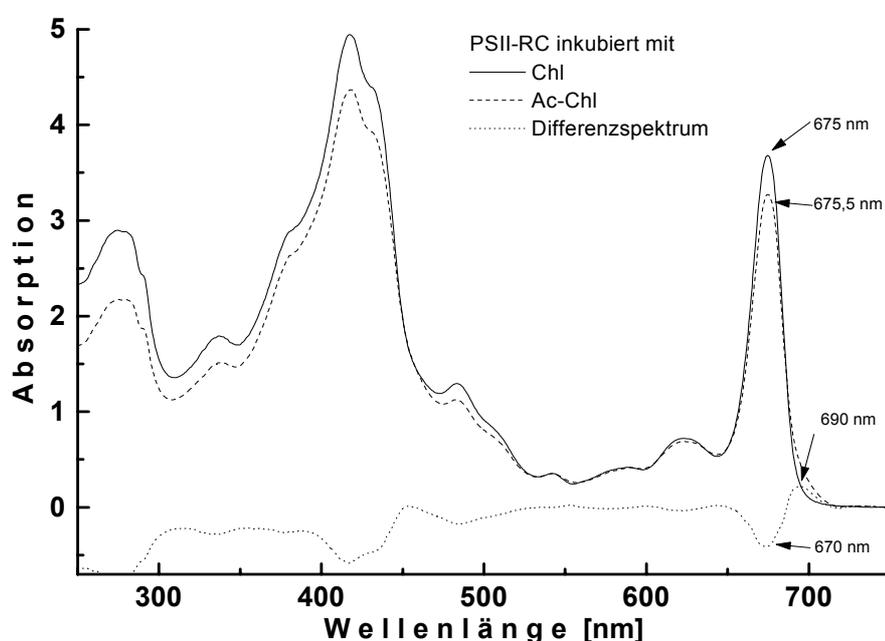


Abb. 29: Absorptionsspektren des [3-Acetyl]-chlorophyll a (Ac-Chl)-Austauschs und des Kontrollversuchs (Chlorophyll a -Austausch).

Die 6-Chlorophyll Reaktionszentren wurden mit Chl (Kontroll-RC) und Ac-Chl inkubiert und mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die Spektren sind auf die Q_x -Bande des Phe (542 nm) normiert. Gepunktete Linie: Differenzspektrum des mit Ac-Chl ausgetauschten RC *minus* Kontroll-RC.

Die Anwesenheit oligomerer Ac-Chl Aggregate kann ausgeschlossen werden, da diese noch wesentlich mehr rotverschoben absorbieren¹⁹ (siehe auch die Bemerkungen über

¹⁹ Im Rahmen der Austauschversuche konnte bei den Experimenten mit Ac-Chl mehrmals eine Pigmentaggregation beobachtet werden (Daten sind nicht gezeigt). Dieses manifestiert sich in einer stark erhöhten Absorption im rotwelligen Spektralbereich und kann zum Entstehen einer neuen Bande führen, die ein Maximum bei etwa 730 nm hat [120].

C Ergebnisse

oligomere Pigmente in Kapitel C.3.1.1.1). Auch hier (vgl. mit Ni-Chl inkubierte RC, Kapitel C.3.1.2) ergeben sich Abweichungen in der Carotin-Region um 475 nm, wonach die Absorption des mit Ac-Chl inkubierten RC kleiner ist als die des Kontroll-RC, obwohl die Pigmentanalyse der untersuchten RC einen konstanten Carotingehalt pro 2 Phe zeigen. Die möglichen Ursachen sind in Kapitel C.3.1.2 erklärt und sehr wahrscheinlich ein durch die Normierung verursachter Artefakt.

Die Integration über den Bereich von 600 bis 750 nm (Q_y -Bande) zeigt, dass sich nach einmaliger Inkubation des RC die Flächen des Kontroll- und Austauschexperiments nur um 2 % voneinander unterscheiden (119 und 117), was innerhalb der Fehlergrenzen liegt. Diese Werte lassen – unter Annahme gleicher Pigment-Oszillatorenstärke – den Schluss zu, dass die Anzahl der Tetrapyrrolpigmente konstant blieb.

Aktivitätsmessung

Die Aktivität der behandelten Komplexe wurde mittels Phe⁺-Akkumulation getestet und mit der nativer Komplexe verglichen. Die nach einmaliger Inkubation gefundenen Aktivitäten der mit Ac-Chl bzw. Chl behandelten RC lagen bei 75 bzw. 80 %. Da sich die Restaktivitäten der inkubierten RC im Kontroll- und Austauschexperiment nicht deutlich unterscheiden, sollte auch hier der Aktivitätsverlust auf die Temperaturbehandlung zurückzuführen sein.

HPLC-DAD Analyse

Die Pigmentanalyse mittels HPLC-DAD ergab für den modifizierte Komplex (nach einmaligem Austausch) und die Kontroll-Probe (in Klammern) folgende Zusammensetzung: $5,2 \pm 0,2$ ($6,1 \pm 0,1$) Chl, $1,6 \pm 0,1$ ($1,5 \pm 0,1$) Car, $0,8 \pm 0,1$ (0) Ac-Chl pro 2 Phe.

Die Daten zeigen, dass ein Austausch stattgefunden hat, wobei etwa ein Chl gegen ein Ac-Chl ausgetauscht wurde. Die Werte <1 deuten darauf hin, dass der Austausch nicht vollständig stattgefunden hat. Die für die inkubierten RC ermittelte Gesamtanzahlen der Tetrapyrrolpigmente von $8,0 \pm 0,3$ (modifizierter Komplex) und $8,1 \pm 0,1$ (Kontroll-RC) unterscheiden sich nicht signifikant (2%). Dieser Befund unterstützt das spektroskopisch gefundene Ergebnis, dass aufgrund der übereinstimmenden Flächen (modifiziertes vs. Kontroll-RC) ein „eins zu eins“ Austausch stattgefunden hat.

Fluoreszenz Spektroskopie:

Das Austausch- und Kontrollexperiment wurden gemäss der Gall'schen Methode (vgl. Kapitel C.1.4) auf Anwesenheit von freiem ungebundenen Pigment untersucht (Abb. 30).

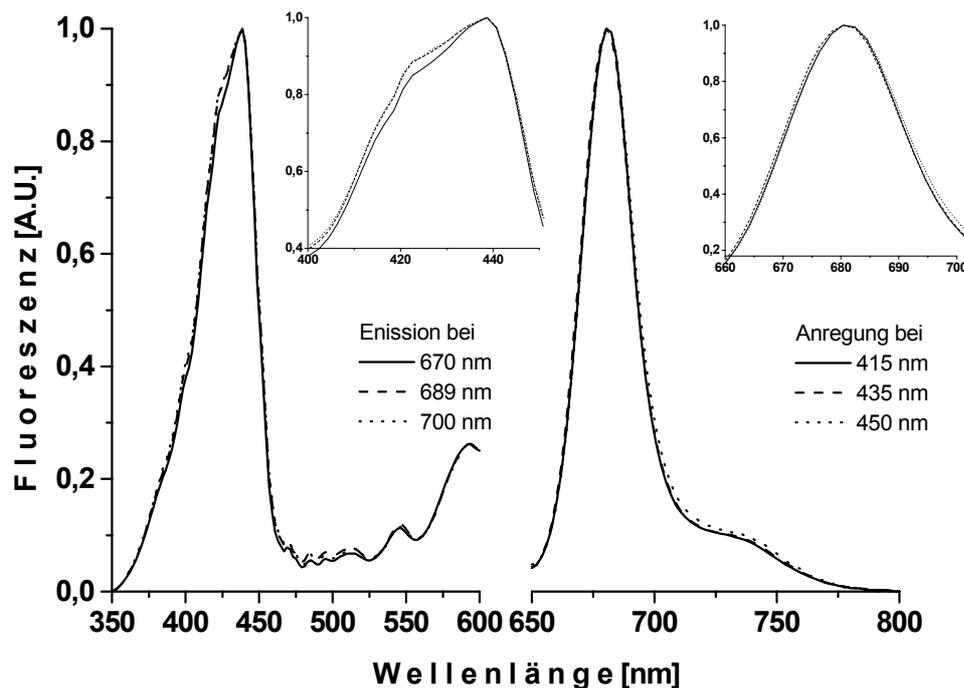


Abb. 30: Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren von 6-Chl PS II-RC inkubiert mit [3-Acetyl]-chlorophyll *a* in 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1,0 mM DM.

links: Anregungsspektren aufgenommen bei 670, 689 700 nm. rechts: Emissionsspektren angeregt bei 415, 435, 450 nm. Der Bereich der Bandenmaxima ist jeweils oben rechts vergrößert dargestellt. Die Spektren wurden auf das jeweilige Bandenmaximum normiert.

Die Spektren der mit Ac-Chl inkubierten RC (Abb. 30) zeigen nach der Normierung geringe Unterschiede in den Bandenformen, welche im wesentlichen denen nativer 6-Chl PS II-RC (Abb. 11) entsprechen: Die Emissionsmaxima liegen bei 681 nm und sind gegenüber denen des Kontroll-experiments um 1 nm rotverschoben (Daten sind nicht gezeigt). Die Anregungs- und die Emissionsspektren zeigen eine Abhängigkeit von der Detektionswellenlänge. Je längerwellig angeregt bzw. detektiert wird, desto breiter werden die entsprechenden Banden. Solche Abhängigkeiten/Abweichungen konnten auch in den Spektren des Kontroll-Experiments (Daten sind nicht gezeigt) und in den Spektren nativer (Abb. 11 und Abb. 12) und modifizierter Komplexe (Abb. 26) gesehen

werden. Die Präsenz von freiem Ac-Chl in den gereinigten Reaktionsansätzen konnte auch durch Zumischung von Ac-Chl ausgeschlossen werden. Gall erhielt für ein Kontroll-Gemisch aus RC und Ac-Chl (im Verhältnis eins zu eins) Fluoreszenzspektren, deren Anregungs- und Emissionsspektren untereinander sehr stark differierten [59;60]. Die mit der HPLC-DAD Analyse gefundenen 0,8 Moleküle Ac-Chl pro 2 Phe liegen somit sehr wahrscheinlich Protein-gebunden vor.

3.2.2 [3-Acetyl]-chlorophyll a-Doppelaustausch

Oben gesagtes bestätigte die Ergebnisse von Gall et al. [59], die zeigten, dass der Austausch von Ac-Chl in das PS II-RC möglich ist. Der Chlorophyllgehalt des PS II-RC reduzierte sich von 5,6 auf 4,6, wobei zusätzlich 1,6 Ac-Chl (pro 2 Phe) gefunden wurden. Die nicht-ganzzahligen Werte deuteten zwar auf den Ersatz von Chl durch Ac-Chl hin, aber die Gesamtzahl der Tetrapyrrolopigmente wurde gleichzeitig leicht erhöht.

Bisher war ein Kofaktoren-Austausch mit einem exakten „eins-zu-eins“ Austausch noch nicht gesehen worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb versucht, unter den hier optimierten Bedingungen (Aufreinigung und Analytik), einen zweimaligen Austausch durchzuführen. Ziel des Versuchs war es, eine höhere Austauschrate (~100 %) zu erzielen und/oder ein weiteres Chl innerhalb des RC zu ersetzen. Hierfür wurde die doppelte Ansatzgröße eines sonstigen Austauschversuchs verwendet und auch ein zusätzlicher Konzentrierungsschritt zwischen dem ersten und zweiten Austausch eingefügt. Parallel wurde ein Kontroll-Experiment (mit Chl inkubierte PS II-RC) durchgeführt. Die RC des oben beschriebenen Austauschs (Austausch- und Kontroll-experiment) wurden in Anwesenheit von Ac-Chl und Chl ein zweites Mal inkubiert.

Abb. 31 zeigt normierte Absorptionsspektren der, nach zweifacher Inkubation mit Ac-Chl und Chl erhaltenen Austausch- und Kontrollproben. Es kann deutlich gesehen werden, dass die Q_y - und die Soret-Banden des Austauschexperiments gegenüber denen des Kontroll-Experiments stark verbreitert sind und das Q_y -Maximum um 1 nm rotverschoben ist. Dieses manifestiert sich im Differenzspektrum (mit Ac-Chl behandeltes PS II-RC *minus* Kontroll-RC), in dem ein Absorptionsverlust bei 670 nm und ein -zuwachs bei 690 nm zu sehen ist. Die langwelligen Absorptionsanteile an der Q_y -Bande weisen auch hier auf die Präsenz von nicht-aggregierten Ac-Chl hin (siehe oben). Die Carotin-Region blieb unverändert.

C Ergebnisse

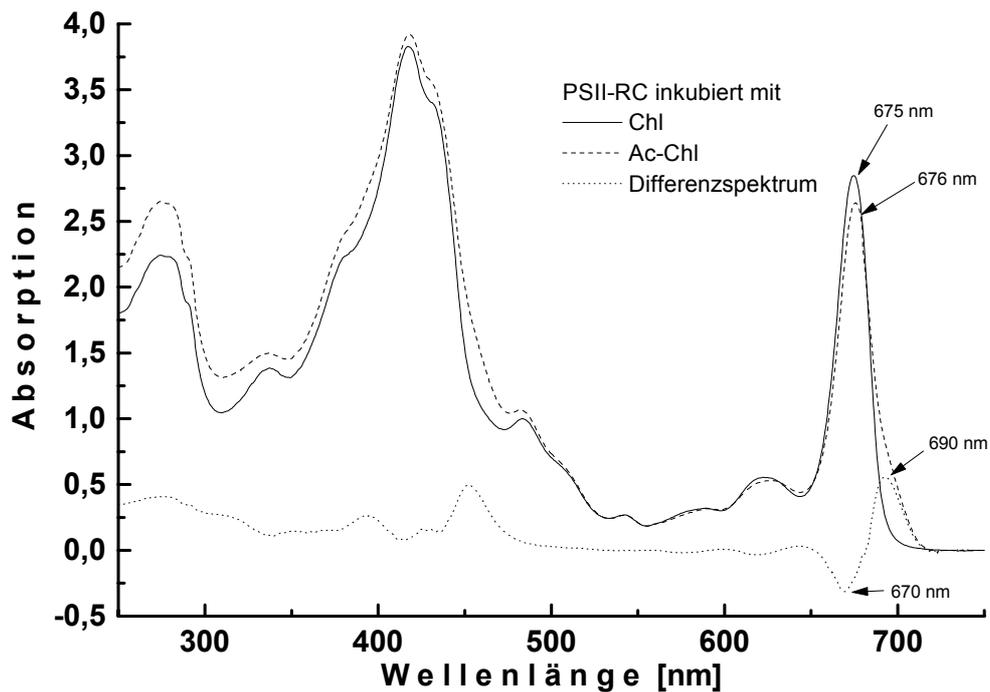


Abb. 31: Absorptionsspektren der zweimal mit [3-Acetyl]-chlorophyll a und zweifach mit Chlorophyll a (Chl) (Kontroll-RC) inkubierten 6-Chl PS II-RC (Doppelaustausch).

Die bereits einmal mit Ac-Chl behandelten 6-Chlorophyll Reaktionszentren (aus Abb. 30) wurden nochmals mit Ac-Chl und Chl inkubiert und mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die Spektren sind auf die Q_x -Bande des Phe (542 nm) normiert. Gepunktete Linie: Differenzspektrum des mit Ac-Chl ausgetauschten RC *minus* Kontroll-RC.

Die Integration über die Q_y -Bande (600 bis 750 nm) liefert für das zweifach mit Ac-Chl inkubierte RC einen relativen Wert von 96 und für das Kontroll-RC einen Wert von 91 Einheiten. Die Flächen weichen um 6 % voneinander ab. Obwohl dieser Wert noch in der Fehlergrenze liegt, kann er aber als Hinweis über eine mögliche Erhöhung der Anzahl an Tetrapyrrolpigmenten innerhalb des „Ac-Chl-PS II-RC“ gewertet werden (unter Annahme gleicher Pigment-Oszillatorenstärke aller RC-Pigmente).

Aktivitätsmessung

Die behandelten Komplexe wurden mittels Phe^* -Akkumulation auf deren Aktivität getestet. Als Bezugsgröße diente auch hier die Aktivität nativer Komplexe. Die hier gefundenen Werte lagen bei beiden Proben nur mehr bei etwa 45 % und entspricht den bisher niedrigsten gefundenen Wert. Die zweifache Austauschprozedur scheint besonders stark die RC-Aktivität zu erniedrigen.

HPLC-DAD Analyse

Die Pigmentanalyse mittels HPLC-DAD ergab für den zweifach modifizierten Komplex und das Kontroll-Experiment (in Klammern) folgende Zusammensetzung: $4,8 \pm 0,1$ ($5,7 \pm 0,1$) Chl, $1,7 \pm 0,1$ ($1,7 \pm 0,1$) Car, $1,7 \pm 0,1$ (0) Ac-Chl pro 2 Phe. Die Daten zeigen, dass nicht nur ein Austausch stattgefunden hat, sondern, dass auch zusätzliches Pigment gebunden ist. Die Anzahl der Tetrapyrrolpigmente des Austauschexperiments ist gegenüber der des Kontroll-experiments um 0,8 Moleküle bzw. 11 % erhöht.

Die Modifikation einer weiteren Bindungsstelle konnte nicht gesehen werden, da der Chlorophyllgehalt gegenüber dem Ausgangsreaktionszentrum (s.o.) relativ konstant blieb (siehe auch Tab. 5). Aufgrund der sehr niedrigen Aktivität der so behandelten Reaktionszentren (Restaktivität von 45 %, s.o.), wurden keine weiteren Untersuchungen mehr an diesen Komplexen durchgeführt.

3.2.3 [3-Acetyl]-Demethoxycarbonylchlorophyll a

Für die Austauschversuche am PS II-RC wurde auch Ac-Py-Chl verwendet. Es ist dem in Kapitel C.3.2.1 verwendeten Ac-Chl sehr ähnlich, jedoch fehlt der für pflanzliche Chlorophylle charakteristische Carboxymethyl-Rest an C-13² (eine Übersicht und ein Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pigmente befindet sich im Kapitel C.2). Die RC wurden mit einem Überschuss an Ac-Py-Chl und Chl inkubiert und mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt und spektralphotometrisch vermessen (Abb. 32).

Nach Normierung der Spektren auf die Q_x-Bande des Phe (542 nm) ist deutlich zu erkennen, dass die Q_y- und Soret-Bande der mit Ac-Py-Chl inkubierten PS II-RC, gegenüber der des mit Chl inkubierten RC (Kontroll-RC) langwellig verbreitert sind. Das Q_y-Maximum ist gegenüber dem Kontroll-RC um 1 nm rotverschoben. Das Differenzspektrum (mit Ac-Py-Chl behandeltes PS II-RC *minus* Kontroll-RC) zeigte einen Absorptionsszuwachs bei 690 nm und einen Absorptionsverlust bei 670 nm. In der Carotin-Region sind leichte Abweichungen zu sehen, deren mögliche Ursachen bereits in Kapitel C.3.1.2 diskutiert wurden. Auch hier gibt es keine Hinweise auf oligomere Pigmente (die Kriterien hierfür sind oben bei den mit Ac-Chl durchgeführten Versuchen besprochen).

C Ergebnisse

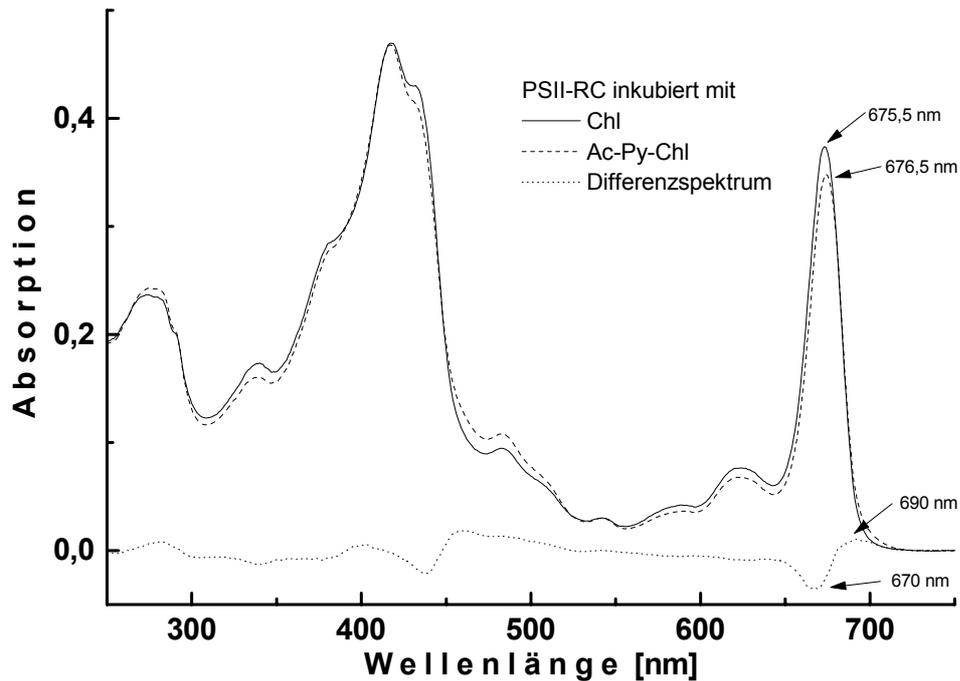


Abb. 32: Absorptionsspektren des [3-Acetyl]-Demethoxycarbonylchlorophyll a (Ac-Py-Chl)-Austauschs und des Kontrollelements (Chlorophyll a -Austausch). Die 6-Chlorophyll Reaktionszentren wurden mit Chl (Kontroll-RC) und Ac-Py-Chl inkubiert und mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die Spektren sind auf die Q_x -Bande des Phe (542 nm) normiert. Gepunktete Linie: Differenzspektrum des mit Ac-Py-Chl ausgetauschten RC *minus* Kontroll-RC.

Die Integration über den Bereich von 600 bis 750 nm (Q_y -Bande) liefert für das mit Ac-Chl inkubierte RC einen relativen Wert von 11,7 und für das Kontroll-RC von 12,5 Einheiten. Die Flächen weichen um etwa 6 % voneinander ab. Obwohl diese Abweichung sicherlich noch in der Fehlergrenze liegt, kann der Wert aber einen Hinweis darauf geben, dass hier, im Gegensatz zu den in Kapitel C.3.2.3 beschriebenen Versuch, der Einbau von Ac-Py-Chl nicht sehr effizient ist und zu einer Erniedrigung des Tetrapyrrolgehalts führt.

Aktivitätsmessung

Die Aktivität der behandelten Komplexe wurde mittels Phe^+ -Akkumulation getestet und mit der Aktivität nativer Komplexe verglichen. Die nach Inkubation gefundenen Aktivitäten der mit Ac-Py-Chl bzw. Chl behandelten RC lagen bei 72 bzw. 75 %, bezogen auf die Aktivität nativer 6-Chl PS II-RC. Diese Werte liegen in dem bisher nach einmaliger Inkubation gefundenen Aktivitätsbereich der PS II-RC.

HPLC-DAD Analyse

Die Pigmentanalyse mittels HPLC-DAD ergab für den modifizierten Komplex und das Kontroll-Experiment (in Klammern) folgende Zusammensetzung: $4,6 \pm 0,1$ ($5,7 \pm 0,2$) Chl, $1,4 \pm 0,1$ ($1,4 \pm 0,1$) Car, $0,7 \pm 0,1$ (0) Ac-Py-Chl pro 2 Phe. Die Werte zeigen, dass ein Austausch stattgefunden hat, wobei 1,1 Chl gegen etwa 0,7 Ac-Py-Chl ausgetauscht wurden. Der gefundene Ac-Py-Chl Gehalt (pro 2 Phe) von <1 deutet aber darauf hin, dass der Austausch nicht vollständig ist. Die für die inkubierten RC ermittelte Menge an Tetrapyrrolpigmenten von $7,3 \pm 0,2$ (modifizierter Komplex) und $7,7 \pm 0,1$ (Kontroll-RC) unterscheidet sich um etwa 4 % voneinander, wobei hier erstmalig die modifizierten RC weniger Tetrapyrrolpigmente enthalten. Dieses Ergebnis korrespondiert mit dem spektroskopisch gefundenen abweichenden Tetrapyrrolgehalt. Es erscheint deshalb sehr wahrscheinlich, dass der Austausch unvollständig ist. Allerdings deuten diese Daten auch klar darauf hin, dass Ac-Py-Chl trotz Verlust der Carboxymethyl-Gruppe an C-13² zumindest zum Teil eingebaut werden kann.

Fluoreszenz Spektroskopie

Um festzustellen, ob das hinzugekommenen Pigment gebunden oder ungebunden vorliegt, wurden von jeder Probe Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren bei unterschiedlichen Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen aufgenommen (vergleiche Kapitel C.1.4). Alle Proben zeigten, bis auf die vorgenannten Unterschiede bei Normierung auf das Bandenmaximum, eine einheitliche Fluoreszenz (Daten sind nicht gezeigt). Somit kann die Anwesenheit von freiem, nicht Energie-austauschendem Ac-Py-Chl ausgeschlossen werden. Das Pigment ist demnach in den Komplex integriert.

3.3 Bakteriochlorine und Porphyrine

3.3.1 [3-Vinyl]-bakteriochlorophyll a und Bakteriochlorophyll a

Als weiteres wurden Versuche durchgeführt Pigmente mit Bakteriochlorinstruktur in das RC zu integrieren (siehe Kapitel C.2). Hierfür wurde Vi-BChl und BChl ausgewählt. Ersteres ist dem Chl sehr ähnlich und unterscheidet sich nur durch die Einfachbindung zwischen C-7 und C-8, letzteres besitzt zusätzlich noch eine veränderte Seitengruppe an C-3 (Acetyl- statt Vinyl-Gruppe, Abb. 16). Alle Versuche, BChl in das PS II-RC einzutauschen, schlugen fehl [60], weshalb hier erstmalig auch das Vi-BChl verwendet wurde, das gegenüber Chl einen nur geringen strukturellen Unterschied hat. Die nach

C Ergebnisse

Inkubation mit Vi-BChl und Chl (als Kontrollversuch) und Reinigung mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation erhaltenen RC wurden spektralphotometrisch vermessen (Abb. 33). Die Spektren der mit Vi-BChl und Chl (=Kontroll-RC) behandelten PS II-RC zeigen nach Normierung auf die Q_x -Bande des Phe (542 nm), nur geringe, für den Austausch bisher nicht signifikante Unterschiede in der Soret- und Q_y -Bande. Die Lage der Q_y -Banden-Maxima sind im Austausch- und im Kontroll-experiment gleich. Im Differenzspektrum (mit Vi-BChl behandeltes PS II-RC *minus* Kontroll-RC) ist zu sehen, dass bei etwa 280 nm und auch zwischen etwa 470 und 530 nm die Vi-BChl behandelte Probe eine höhere Absorption besitzt als das Kontroll-RC. Diese geringen Unterschiede könnten auf unterschiedliche Lichtstreuung zurückzuführen sein.

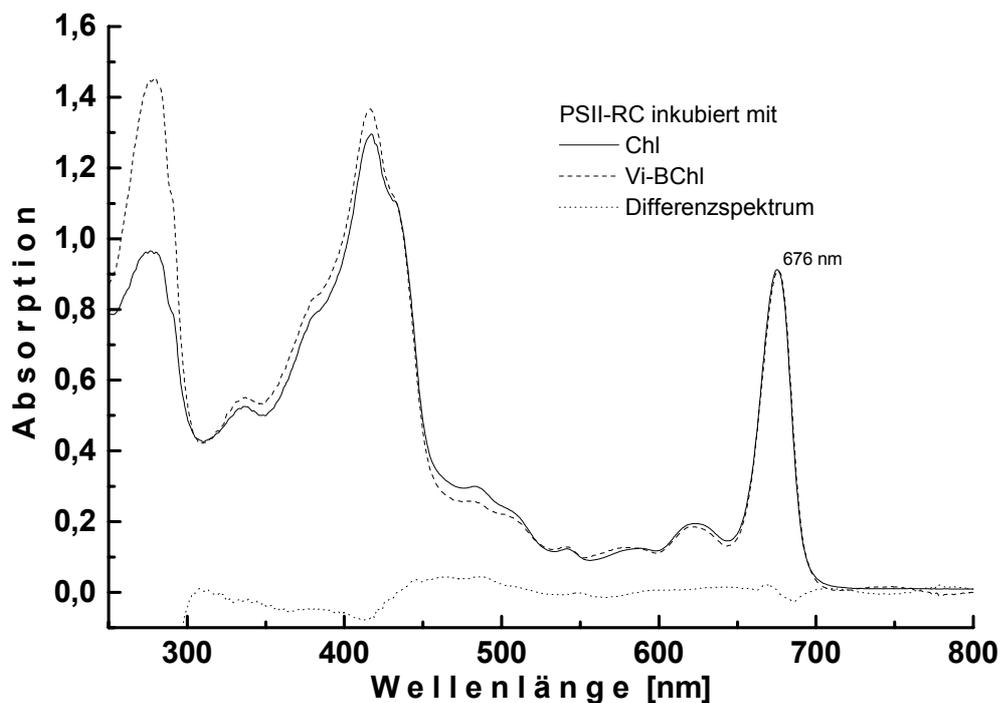


Abb. 33: Absorptionsspektren des [3-Vinyl]-bakteriochlorophyll a (Vi-BChl)-Austauschs und des Kontroll-experiments (Chlorophyll a –Austausch).

Die 6-Chlorophyll Reaktionszentren wurden mit Chl (Kontroll-RC) und Vi-BChl inkubiert und mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die Spektren sind auf die Q_x -Bande des Phe (542 nm) normiert. Gepunktete Linie: Differenzspektrum des mit Vi-BChl ausgetauschten RC *minus* Kontroll-RC.

Der Austausch eines Chl gegen ein Vi-BChl (oder BChl) sollte eine Absorptionsabnahme in der Q_y -Bande (bei etwa 670 nm) und das Auftreten einer zusätzlichen Bande um größer 750 nm erwarten lassen. Einen solchen Effekt konnte hier nicht

C Ergebnisse

gesehen werden. Gleiches gilt auch für die mit BChl durchgeführten Versuche (Daten nicht gezeigt). Nach Inkubation mit BChl und anschließender Aufreinigung waren die Absorptionsspektren der Probe und der Kontrollprobe unverändert, weshalb an diesen Probe keine weiteren spektroskopischen Untersuchungen mehr durchgeführt wurden.

Die Pigmentanalyse mittels HPLC-DAD bestätigte das spektroskopisch ermittelte Ergebnis: Es konnte auch hier innerhalb der HPLC-DAD Nachweisgrenzen²⁰ kein zusätzliches Pigment detektiert werden. Die Pigmentanalyse der mit Vi-BChl und Chl (Werte in Klammern) inkubierten Komplexe ergab folgendende Zusammensetzung: 6,1±0,2 (6,2±0,4) Chl und 1,1±0,1 (1,2±0,1) Car pro 2 Phe. Auch für die mit BChl durchgeführten Experimente (nicht gezeigt) konnte weder eine Veränderung der nativen Pigmentzusammensetzung noch die Anwesenheit von BChl festgestellt werden (Tab. 5), weshalb keine weiteren Untersuchungen an diesen Komplexen durchgeführt wurden.

3.3.2 Protochlorophyll a

Es wurde versucht, Proto-Chl (als Vertreter der Porphyrine, vgl. hierzu Kapitel C.2) in das PS II-RC einzutauschen, denn auch dieses besitzt gegenüber Chl eine veränderte Konjugation des Tetrapyrrolgerüsts. Nach Inkubation der PS II-RC mit Proto-Chl und Chl und anschließender Aufreinigung konnten folgende Absorptionsspektren (Abb. 34) erhalten werden: Die Normierung auf die 542 nm – Bande (Q_x-Bande des Phe) wurde trotz der in diesem Bereich vorhandenen Absorptionsbanden des freien Proto-Chl (Abb. 19) beibehalten, um eine Vergleichbarkeit mit den bisher durchgeführten Austauschversuchen zu erhalten. Die Spektren der Proto-Chl inkubierten RC zeigen gegenüber den Spektren der mit Chl inkubierten RC (Kontroll-RC) nur geringe Abweichungen in der Q_y-Region und stärkere in der Soret-Region. Genauer erkennbar sind diese Unterschiede in dem Differenzspektrum (mit Proto-Chl behandeltes PS II-RC *minus* Kontroll-RC) das einen Absorptionsszuwachs bei 632 nm und bei 442 nm zeigt. Auffällig ist hier, dass das Differenzspektrum Ähnlichkeiten mit dem Absorptionsspektrum von freiem Proto-Chl zeigt (Abb. 19), wobei insbesondere die gegenüber Chl wesentlich intensivere Soret-Bande charakteristisch ist.

²⁰ Nachweisgrenze: Höhe der Absorptionsbande $>5 \cdot 10^{-4}$ OD. Dieses entspricht (bezogen auf Chlorine mit $\epsilon = 100.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) einer Konzentration von $>5 \text{ nM}$ und einer Pigmentmenge von etwa $>17 \text{ pmol}$ (vgl. Kapitel C.1.2).

C Ergebnisse

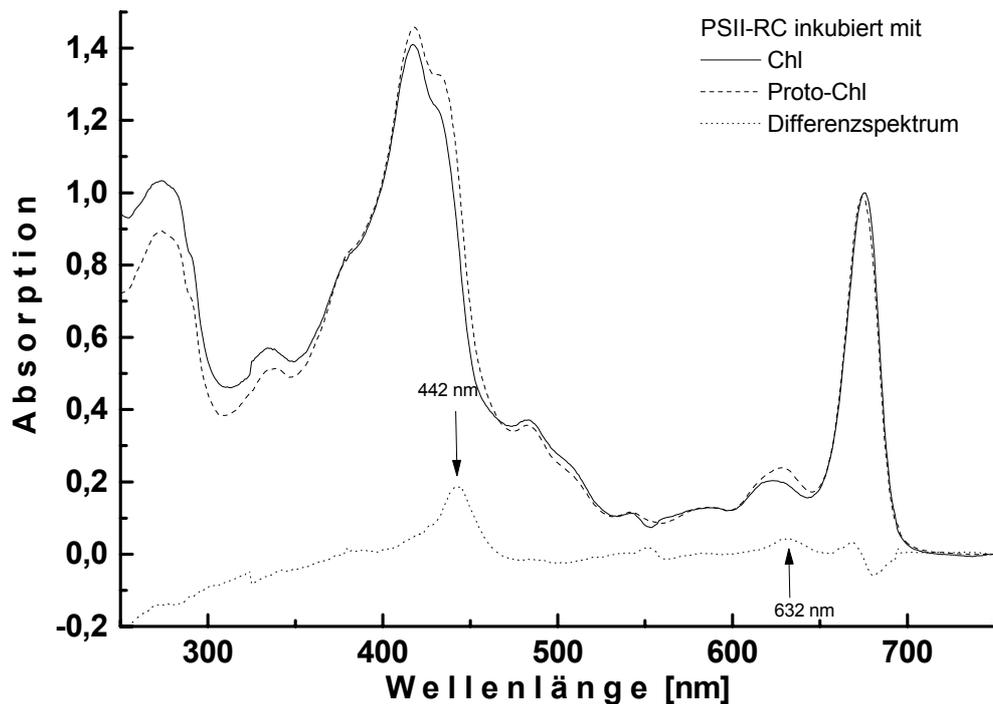


Abb. 34: Absorptionsspektren des Protochlorophyll a (Proto-Chl)-Austauschs und des Kontroll-experiments (Chlorophyll a-Austausch). Die 6-Chlorophyll Reaktionszentren wurden mit Chl (Kontroll-RC) und Proto-Chl inkubiert und mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die Spektren sind auf die Q_x -Bande des Phe (542 nm) normiert. Gepunktete Linie: Differenzspektrum des mit Proto-Chl ausgetauschten RC *minus* Kontroll-RC.

Aktivitätsmessung

Die Aktivität der behandelten Komplexe wurde auch hier mittels $\text{Phe}^{\bullet-}$ -Akkumulation getestet und mit der Aktivität nativer Komplexe verglichen. Die nach Inkubation gefundenen Aktivitäten der mit Proto-Chl bzw. Chl behandelten RC lagen bei 72 bzw. 75 %, jeweils bezogen auf die Aktivität nativer 6-Chl PS II-RC. Die Aktivitäten liegen im Bereich der bisher gefundenen Aktivitäten der PS II-RC nach einmaliger Inkubation.

HPLC-DAD Analyse

Die Pigmentanalyse mittels HPLC-DAD ergab für den modifizierten Komplex und das Kontroll-Experiment (in Klammern) folgende Zusammensetzung: $6,1 \pm 0,1$ ($6,2 \pm 0,4$) Chl, $1,4 \pm 0,1$ ($1,2 \pm 0,1$) Car, $0,5 \pm 0,1$ Proto-Chl pro 2 Phe. Die Werte zeigen, dass zwar 0,5 Proto-Chl im PS II-RC-Komplex vorhanden sind, jedoch der Chlorophyllgehalt innerhalb der Fehlergrenzen konstant blieb. Die für die inkubierten RC ermittelte Gesamt-

C Ergebnisse

anzahl der Tetrapyrrolpigmente erhöhte sich von $8,2 \pm 0,4$ (Kontroll-RC) auf $8,6 \pm 0,2$ (mit Proto-Chl inkubiertes RC). Es zeigt sich hier, dass kein Eintausch des Proto-Chl in das RC stattgefunden hat, denn die Pigmentstöchiometrie lässt dies als eher unwahrscheinlich erscheinen. Jedoch könnte es möglich sein, dass eine Bindung an einer schwachen Bindungsstelle erfolgte (siehe Zn-Chl Austausch), da hier, im Gegensatz zu den Versuchen mit BChl und Vi-BChl, das modifizierte Pigment nach Aufreinigung noch detektiert werden konnte.

Fluoreszenz Spektroskopie

Um zu testen, ob das gefundene Pigment gebunden oder frei vorliegt, wurden auch hier Fluoreszenz Anregungs- (Abb. 35) und Emissionsspektren (nicht gezeigt) bei unterschiedlichen Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen aufgenommen (vergleiche Kapitel C.1.4).

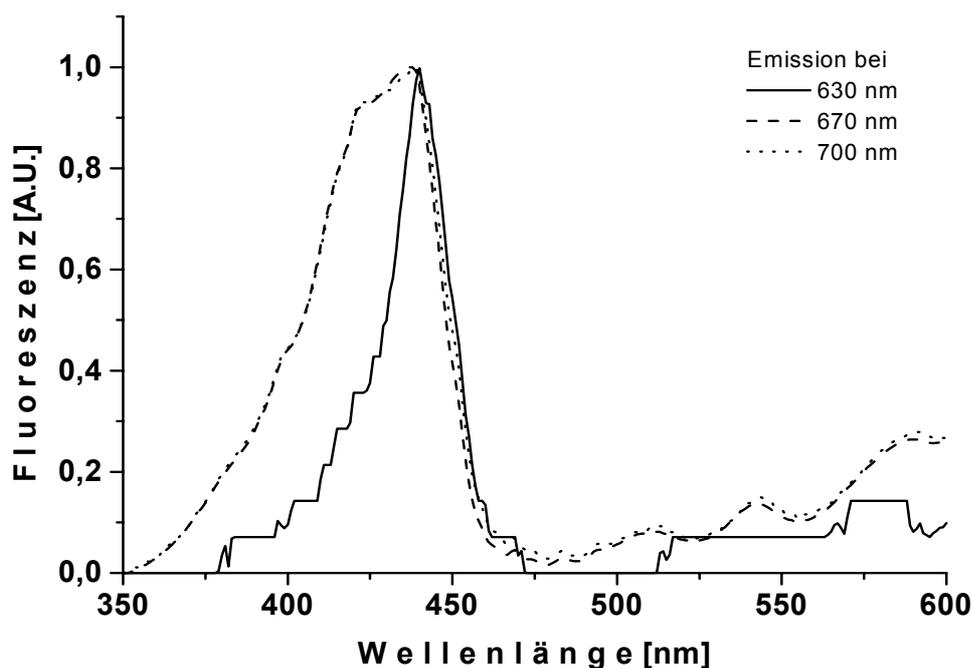


Abb. 35: Fluoreszenz Anregungsspektren von 6-Chl PS II-RC inkubiert mit Protochlorophyll a in 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1,0 mM DM. Die Anregungsspektren wurden bei 630, 670 und 700 nm aufgenommen. Die Spektren wurden auf das jeweilige Bandenmaximum normiert. Wegen der geringen Probenmenge sind die Spektren verrauscht.

Im Gegensatz zu den Fluoreszenzmessungen vorheriger Experimente wurde hier die Detektionswellenlängen der Anregungsspektren sowohl spezifisch für PS II-RC (d.h.

C Ergebnisse

bei 670 und 700 nm) als auch zusätzlich spezifisch für Proto-Chl (bei 630 nm) gewählt. Die Spektren zeigen nach Normierung auf deren Bandenmaxima deutliche Unterschiede. Das bei 630 nm (Q_y -Bande des Proto-Chl) aufgenommene Spektrum unterscheidet sich hierbei deutlich von den bei 670 und 700 nm detektierten. Diese Varianzen deuten klar auf das Vorhandensein von freiem Pigment hin (siehe auch die Versuche in Kapitel D.1.4), weshalb darauf geschlossen werden kann, dass das mittels HPLC-DAD detektierte zusätzliche Proto-Chl ungebunden vorliegt.

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Daten der in Kapitel C.3 vorgestellten Versuche folgende Tendenz beim Pigmenttausch am PS II-RC erkennen lassen: Innerhalb des PS II-RC scheint nur eine Chlorophyllbindungstasche für den Pigmenttausch zugänglich zu sein (C.3.2.2), obwohl die Daten des Zn-Chl Austauschs zeigen, dass Zink-Pigment in einem reproduzierbaren Überschuss gebunden werden kann (C.3.1.1). Dieses gilt aber nicht für alle transmetallierten Chlorophylle, denn bei Ni-Chl wurde eine etwa stöchiometrische Menge an Pigment gebunden (C.3.1.1). Zusätzlich kristallisierte sich heraus, dass ein „echter“ Austausch stattfindet, d.h. dass das hinzukommende Pigment ein Chl verdrängt. Hierbei wurde aber eine unterschiedliche Austauscheffizienz gefunden (siehe HPLC-DAD Daten der jeweiligen Kapitel C.3 oder Tab.6). Die Austauschexperimente zeigten auch, dass nur Pigmente mit Chlorinstruktur in das PS II-RC eingebaut werden. Denn es war nicht möglich, Porphyrine und Bakteriochlorine zu integrieren (C.3.3). Es konnte festgestellt werden, dass Veränderungen an der Peripherie von Chlorinpigmenten (Ring A und E, Abb. 16) von der Bindungstasche akzeptiert werden (C.3.2).

4 Pigmentrekonstitution an 5-Chl PS II-RC

4.1 Allgemeines

Vacha konnte durch den Einsatz von Cu-Affinitätschromatographie ein Chl aus dem PS II-RC entfernen, wobei sich der Pigmentgehalt auf 5Chl/2Phe reduziert [66;94]. Bei dem extrahierten Chl handelt es sich um ein bei 670 nm absorbierendes Chlorophyll, welches an der Peripherie des PS II-RC lokalisiert ist [67]. Die Annahme, dass dieses Chl aus der peripheren Chl_z Bindungsstelle der D2-Untereinheit (gebunden an D2-118H) entfernt wird [66;68], scheint nun aufgrund der von Zouni et al. [4] publizierten

C Ergebnisse

Röntgenstrukturanalyse unwahrscheinlich. Die Bindungsstelle wird durch Cytochrom b_{559} und Psb I abgeschirmt, so dass dieses Chl für die Extraktion schlechter als das symmetrisch angeordnete Chl $_z$ -D1 zugänglich ist. Es ist deshalb sehr viel wahrscheinlicher, dass in den Präparationen das periphere Chl der D1-Untereinheit fehlt.

Die in Kapitel C.3 vorgestellten und in D.3.4.5 diskutierten Ergebnisse des Pigmentaus-tausches haben gezeigt, dass es möglich ist, ein natives Chl durch gewisse trans-metallierte oder peripher modifizierte Chlorophyllderivate im PS II-RC zu ersetzen. Bisher konnten aber noch keine Aussagen zum Austauschort gemacht werden. Es könnte möglich sein, dass das hier ausgetauschte und das von Vacha [66] extrahierte Chl aus derselben Pigment-Bindungsstelle stammt. Diese Hypothese sollte durch die Rekonstitution solcher Chlorophyll-armen PS II-RC unter Austauschbedingungen überprüft werden, denn bei gleichem Bindungsort sollten durch Rekonstitution und durch Austausch modifizierten RC die gleiche Pigmentzusammensetzung haben. Um-gekehrt sollten Unterschiede in der Pigmentstöchiometrien (d.h. unterschiedliche An-zahl an gebundenen modifizierten Pigment) nach Austausch bzw. Rekonstitution den gleichen Bindungsort ausschließen.

4.2 Chlorophyll a

4.2.1 Pigmentanalyse

Die von Vacha zur Verfügung gestellten 5-Chl PS II-RC wurden wie in B.4.2 be-schrieben mit Chl inkubiert und aufgereinigt. Als Kontrollexperiment wurden 5-Chl PS II-RC ohne Zusatz von Pigmenten inkubiert (=Kontroll-RC). Die Pigmentzusammen-setzungen der mit Chl inkubierten 5-Chl PS II-RC und des Kontroll-RCs wurden wie in Kapitel D.1.2.1 beschrieben mittels HPLC-DAD Analyse bestimmt. Sie ergab für die mit Chl inkubierten 5-Chl PS II-RC und für das ohne Chl inkubierte Kontroll-Experiment (in Klammern) folgende Zusammensetzung: $6,2 \pm 0,4$ ($5,2 \pm 0,2$) Chl und $1,2 \pm 0,1$ ($1,2 \pm 0,2$) Car pro 2 Phe. Die Daten zeigen, dass der Chlorophyllgehalt der mit Chl inkubierten RC gegenüber dem Kontroll-RC (5-Chl PS II-RC ohne Chl inkubiert) um 1,0 erhöht war. Die Pigmentzusammensetzung gleicht nunmehr eher der eines nativen 6-Chl PS II-RC (5,8 Chl/2 Phe) als der eines „nativen“ 5-Chl PS II-RC (5,0 Chl/2 Phe) (siehe auch Kapitel D-1.3). Die Daten deuten darauf hin, dass die nahezu leere Bindungs-stelle der 5-Chl PS II-RC unter Rekonstitutionsbedingungen mit Chlorophyll aufgefüllt werden konnte, d.h. dass die Rekonstitution im Rahmen der analytischen Genauigkeit

vollständig war. Um festzustellen, ob es sich hierbei um eine echte funktionelle Be-
setzung handelt, wurden diese RC weiter untersucht.

4.2.2 Spektroskopie

Die Reaktionszentren wurden absorptionspektroskopisch untersucht (Abb. 36), wobei
Chl rekonstituierte 5-Chl PS II-RC mit Kontroll-RC, welche unter identischen Bedingun-
gen, jedoch ohne Zugabe von Chl behandelt wurden verglichen werden.

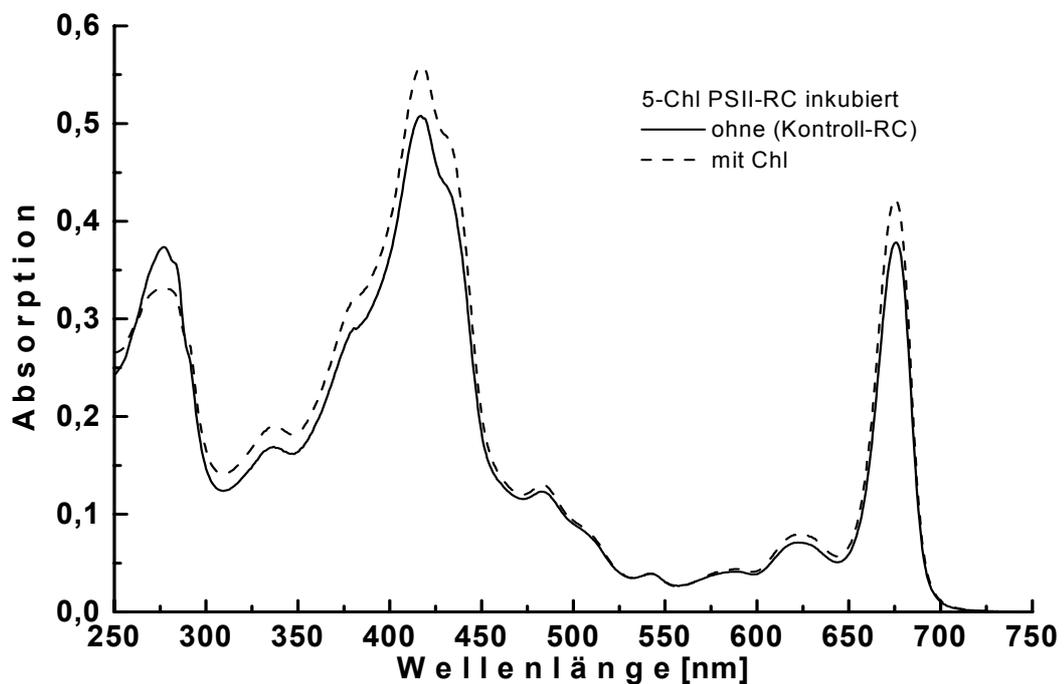


Abb. 36: Absorptionsspektren (298 K) der 5-Chlorophyll-Reaktionszentren nach Rekonstitution mit Chlorophyll a verglichen mit dem Kontrollexperiment.
Die 5-Chl PS II-RC wurden in Anwesenheit von Chl bzw. ohne Chl (Kontrollexperiment) inkubiert und mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die Spektren sind auf die Q_x-Bande des Phe (542 nm) normiert.

Nach der Normierung der Spektren auf die Q_x-Bande des Phe (542 nm) kann bei der rekonstituierten Probe ein Amplitudenzuwachs und eine Verbreiterung der Soret- und Q_y-Bande gesehen werden. Das Maximum der Q_y-Bande ist gegenüber dem des Kontroll-RC um 0,5 nm blauverschoben (von 675,5 nm auf 675 nm). Die Proteinabsorption der rekonstituierten Probe ist etwas niedriger als die des Kontroll-RCs, was auf die effiziente Aufreinigungsmethode zurückgeführt werden kann, durch die denaturiertes Protein vom RC abgetrennt wird.

C Ergebnisse

Leichte Absorptionsveränderungen sind auch in der Carotin-Region um 475 nm erkennbar. Aufgrund der oben vorgestellten Pigmentanalyse, welche einen konstanten Gehalt von Car/2 Phe liefert, kann davon ausgegangen werden, dass die Rekonstitutionsprozedur den Carotingehalt nicht veränderte. Der Absorptionsszuwachs (rekonstituiertes vs. Kontroll-RC) könnte möglicherweise durch eine Umorientierung der Carotine während der Inkubation bei höheren Temperaturen hervorgerufen sein, da dieser Effekt auch in den Austausch-Experimenten zu sehen ist. Es kann aber auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass dieses nur ein Artefakt wegen der Normierung auf eine kleine Bande (542 nm) ist.

Zur Quantifizierung des Absorptionsszuwachses der rekonstituierten RC bezogen auf die Kontroll-RC wurde über die Q_y -Bande (750– 600 nm) integriert. Es zeigte sich, dass die Fläche der rekonstituierten Probe um 11 % größer ist als die der Kontroll-RC. Dies korrespondiert mit dem erwarteten Wert von 14 % (unter der Annahme, dass die 5 bzw. 6 Chl und die 2 Phe gleiche Oszillatorenstärken besitzen) und den Daten der HPLC-Analyse (s.o.), die einen Zuwachs von 13 % vorhersagen.

Die durch die Rekonstitution verursachten Veränderungen im Q_y -Bereich sind noch deutlicher bei tiefen Temperaturen zu sehen (Abb. 37). Der Vergleich der Tieftemperatur Absorptionsspektren belegt den oben gesehenen Absorptionsszuwachs bei 672 nm bei den mit Chl behandelten 5-Chl PS II-RC (im Vergleich zu den Kontroll-RC) sowie eine kurzweilige Verbreiterung der Q_y -Bande. Die Spektren und die gefundenen Veränderungen korrespondieren sehr gut mit einem Vorhandensein eines „sechsten“ Chlorophylls im Reaktionszentrum nach Rekonstitution.

CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren der Abb. 38 des mit Chl inkubierten 5-Chl PS II-RC und des Kontroll-RC (inkubiert, jedoch ohne Chl) zeigen sowohl in der Bandenform als auch in der Lage keine deutlichen Unterschiede. Die Spektren entsprechen denen unbehandelter nativer 5-Chl bzw. 6-Chl PS II-RC (Abb. 15). Die Temperaturbehandlung und das Hinzukommen des „sechsten“ Chlorophylls stört demnach weder die für das Signal verantwortliche Pigmentanordnung (siehe hierzu auch Kapitel C.1.6) noch trägt das hinzugekommene (zusätzliche) Chl signifikant zum Signal bei.

C Ergebnisse

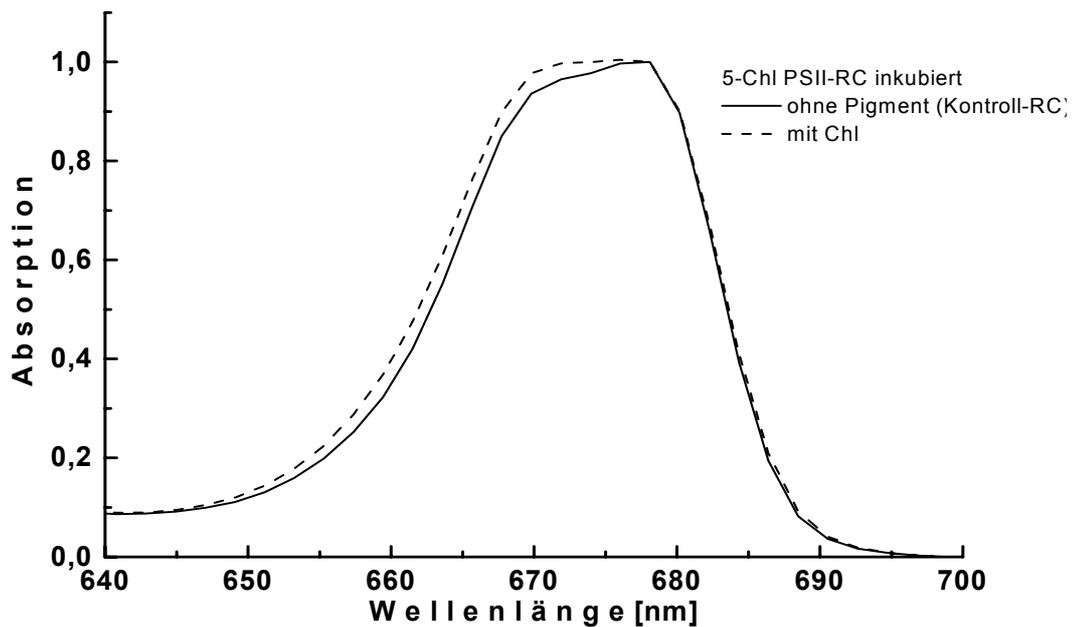


Abb. 37: Tieftemperatur Absorptionsspektren (78 K) der 5-Chlorophyll-Reaktionszentren nach Rekonstitution mit Chlorophyll a verglichen mit dem Kontroll-experiment.

Das analog, aber ohne Zusatz von Chl behandelte RC diente als Kontroll-experiment. Die Spektren sind auf 678 nm normiert

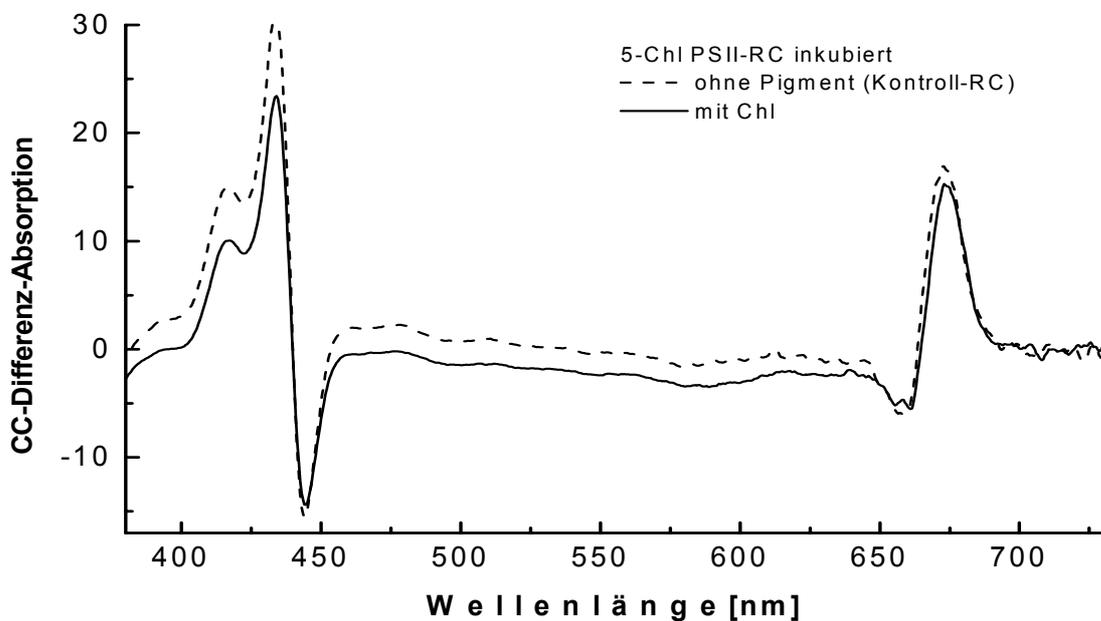


Abb. 38: Messungen des Circular dichroismus nach Rekonstitution der 5-Chlorophyll Reaktionszentren mit Chlorophyll a im Vergleich zum Kontroll-experiment.

Das analog, aber ohne Zusatz von Chl behandelte RC diente als Kontroll-experiment.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Form der Anregungs- und Emissionsspektren (Abb. 39) der mit Chlorophyll rekonstituierten Probe zeigte die nach der Gall'schen Interpretation geforderte (weitgehende) Unabhängigkeit von der Emissions- bzw. Anregungswellenlänge (siehe hierzu auch Kapitel D.1.4). Auch hier lieferte allerdings die genauere Betrachtung der einzelnen Spektren geringfügige Unterschiede. Eine leichte Blauverschiebung der Emissionswellenlänge korreliert mit dem Wechsel der Anregungswellenlänge von 415 zu 450 nm. Effekte, die durch die Anwesenheit von ungebundenen Pigment verursacht sein können sind zum einen markanter (siehe Abb. 27), und zum anderen aufgrund der gefundenen Pigmentunterschiede (<1) eher unwahrscheinlich. Ein solcher Effekt könnte aber, wie bereits beschrieben, auch durch eine unvollständige Energieäquilibrierung innerhalb der Pigmente des PS II-RC hervorgerufen werden.

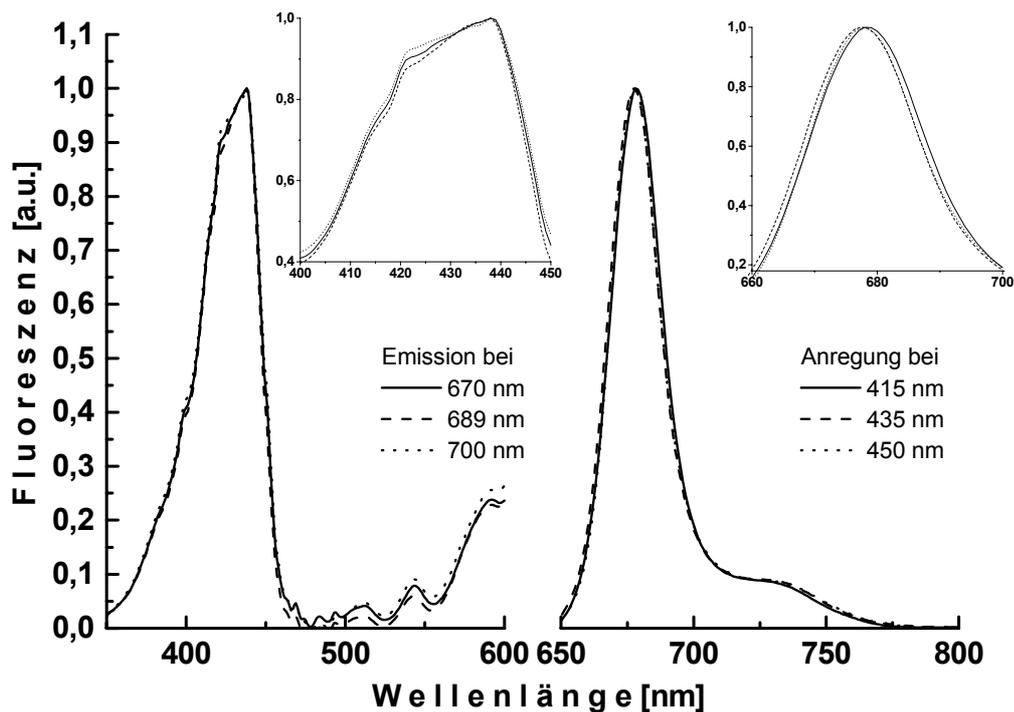


Abb. 39: Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren von 5-Chlorophyll-Reaktionszentren nach Rekonstitution mit Chlorophyll a in 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1,0 mM DM.

links: Anregungsspektren aufgenommen bei 670, 689 700 nm. rechts: Emissionsspektren angeregt bei 415, 435, 450 nm. Der Bereich der Bandenmaxima ist jeweils oben rechts vergrößert dargestellt. Die Spektren wurden auf das jeweilige Bandenmaximum normiert.

C Ergebnisse

Zusätzlich wurde die Fluoreszenz-Quantenausbeute von rekonstituierten 5-Chl PS II-RC-Komplex gemessen und mit der nativer 6-Chl PS II-RC verglichen. Der Vergleich ergab eine Abweichung von lediglich 3%, was auf die Intaktheit der rekonstituierten RC schließen lässt.

Photochemische Aktivität

Abb. 40 zeigt die Absorptionsdifferenzspektren (Licht *minus* Dunkel) von den mit Chl inkubierten 5-Chl PS II-RC und den Kontroll-RC in Gegenwart von Silikomolibdat (SiMo). Die Spektren reflektieren die Oxidation des primären Donors P680 zu P680^{•+} (vgl. hierzu auch D.1.5.2) und geben die photochemische Aktivität wieder. Die Bande der mit Chl inkubierten (=rekonstituierten) Probe ist, verglichen mit der des Kontroll-Experiments, an der kurzwelligen Flanke verbreitert, was auf die (partiell) irreversible Photooxidation eines der peripheren Chl zurückzuführen ist [17]. Es entspricht dadurch den Eigenschaften nicht modifizierter 6-Chl PS II-RC [107;101]].

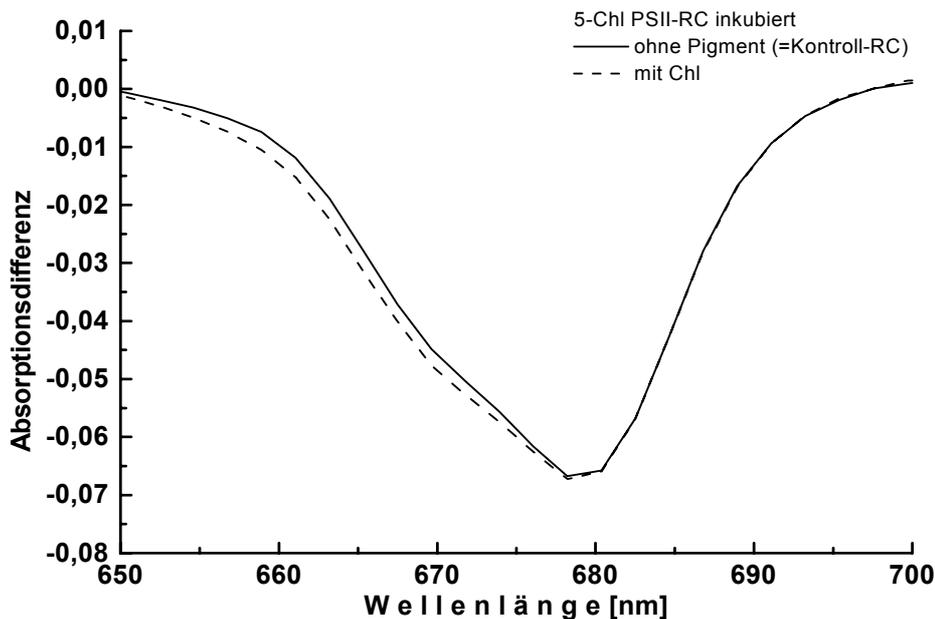


Abb. 40: Anreicherung von P680^{•+} nach Rekonstitution von 5-Chl PS II-RC mit Chlorophyll a im Vergleich zum Kontrollexperiment.

Das analog, aber ohne Zusatz von Chl behandelte RC diente als Kontrollexperiment. Die Spektren zeigen die Absorptionsdifferenz nach 8 s Belichtung mit Weißlicht einer Intensität von $2.200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in Anwesenheit von $200 \mu\text{M}$ Silikomolybdat. Die Spektren sind auf deren Bandenmaximum normiert.

C Ergebnisse

Die Aktivität der RC wurde zusätzlich durch Messung der Phe^{*}-Akkumulierung bestimmt (Daten sind nicht gezeigt). Die rekonstituierten RC zeigten nach Inkubation bei erhöhter Temperatur noch 90 % der Aktivität eines nativen 5-Chl PS II-RC. Die Kontroll-RC (ohne Zusatz von Chl inkubierte RC) zeigten eine Restaktivität von 57 %, d.h. eine starke Deaktivierung.

Der Aktivitätsverlust der 5-Chl-Kontroll-RCs nach Inkubation ist deutlich höher als der der 6-Chl-Kontroll-RC, welche unter ähnlichen Bedingungen behandelt wurden (siehe hierzu die entsprechenden Abschnitte in Kapitel C.3). Hier manifestiert sich die bekannte Instabilität von 5-Chl PS II-RC gegenüber 6-Chl PS II-RC bei Wärmebehandlung [66]. Der Vergleich der Daten, welche von der rekonstituierten Probe und Kontroll-experiment erhalten wurde zeigt deutlich, dass die RC mit höherem Pigmentgehalt, d.h. die rekonstituierten, eine Wärmebehandlung besser ertragen, d.h. weniger deaktivieren. Es erscheint somit, dass das Wiederauffüllen der Bindungstasche dem Deaktivierungsprozess bei Wärmebehandlung entgegenwirkt.

4.3 [Ni²⁺]-Chlorophyll a, [3-Acetyl]-chlorophyll a und [Zn²⁺]-Chlorophyll a

4.3.1 Pigmentanalyse

Für die Rekonstitution von 5-Chl PS II-RC wurden neben Chl (siehe Kapitel C.4.2) weiterhin Ni-Chl, Ac-Chl und Zn-Chl verwendet. Die 5-Chl PS II-RC wurden auch hier bei erhöhter Temperatur (29 °C) und in Anwesenheit der Pigmente 40 Minuten lang inkubiert²¹. Parallel hierzu wurde jeweils ein Kontrolleexperiment unter analogen Bedingungen durchgeführt (5-Chl PS II-RC ohne Pigment inkubiert). Nach der Aufreinigung wurden die Reaktionszentren mittels HPLC -DAD auf ihren Pigmentgehalt untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefasst.

²¹ Verglichen mit den Versuchsbedingungen des Austauschs (45 Min. bei 30 °C) sind die der Rekonstitution etwas milder (40 Min. bei 29 °C).

C Ergebnisse

Art der Probe	Inkubiert mit:	Pigmentgehalt (relativ zu 2 Phe)			
		Chl	Phe	Car	Pigment
5-Chl PS II-RC	--	5,2±0,2	2	1,2±0,2	--
5-Chl PS II-RC	Ni-Chl	5,3±0,2	2	1,2±0,2	0,8±0,1 Ni-Chl
5-Chl PS II-RC	Ac-Chl	5,1±0,3	2	1,2±0,2	0,5±0,2 Ac-Chl
5-Chl PS II-RC	Zn-Chl	5,1±0,2	2	1,2±0,2	4,0±0,5 Zn-Chl

Tab. 3: Pigmentstöchiometrien der mit Ni-Chl, Ac-Chl und Zn-Chl behandelten 5-Chlorophyll Reaktionszentren und dessen Kontrollexperiment (inkubiert ohne Zusatz von Pigment) ermittelt durch HPLC-DAD Analyse.

Die Werte sind auf einen Pheophytin Gehalt von zwei normiert und stellen den Mittelwert über jeweils drei unabhängige HPLC- Analysen dar.

Die rekonstituierten Proben zeigten je nach verwendeten Pigment Unterschiede im Rekonstitutionserfolg: Zum Beispiel konnte nach der Rekonstitution mit Ni-Chl in der entsprechenden Probe 0,8±0,2 zusätzliche Pigmente pro 2 Phe gefunden werden (Tab. 3). Dieser Wert entspricht, wie bei der Rekonstitution mit Chl (0,8±0,2 siehe Kapitel D.4.2), einer nahezu vollständigen Rekonstitution der unbesetzten Bindungsstelle. Nach der Rekonstitution mit Ac-Chl konnte hingegen nur 0,5±0,2 zusätzliche Pigmente pro 2 Phe gefunden werden, weshalb es scheint, dass Ac-Chl die Bindungsstellen nur teilweise besetzt. Anders ist es bei der Rekonstitution mit Zn-Chl, hier konnte ein Überschuss an zusätzlich gebundenen Pigment gefunden werden, nämlich 4,0±0,5 Zn-Chl pro 2 Phe.

Bemerkenswert ist die gefundene relativ geringe Variation des Chlorophyllgehalts von 4,7-5,3 Chl pro 2 Phe nach Inkubation der 5-Chl PS II-RC unter „Austauschbedingungen“. Diese Bedingungen verursachen hier, im Gegensatz zu den in Kapitel C.3 besprochenen Austauschversuchen, keine Erniedrigung des Chlorophyllgehalts. Das extern zugesetzte (modifizierte) Pigment kann in das RC eingebaut werden, ohne ein weiteres Chl zu verdrängen. Die Anzahl der nach Modifikation (Austausch und Rekonstitution) gefundenen Chlorophyllderivate ist vergleichbar (vgl. Tabellen 6 und 7): Die Pigmentmengen (bezogen auf 2 Phe) bewegen sich, je nach verwendetem Pigment, im Bereich von 0,5 bis 1,3 Moleküle Pigment pro 2 Moleküle Pheophytine. Einzige Ausnahme ist Zn-Chl: Hier konnten 3,0 und 4,0 Moleküle Zn-Chl pro 2 Moleküle

Pheophytin gefunden werden, wobei der Tetrapyrrolgehalt sowohl in den rekonstituierten als auch in den ausgetauschten RC anstieg. All das deutet darauf hin, dass die für Pigment austausch (konzertiertes Verdrängen und Einbau eines modifizierten Chl) und Rekonstitution (Einbau eines (modifizierten) Chl in Chl-abgereicherte RC) zugängliche Bindungsstelle die gleiche ist.

4.3.2 $[\text{Ni}^{2+}]$ -Chlorophyll a rekonstituierte RC

Abb. 41 zeigt das Absorptionsspektrum eines mit Ni-Chl rekonstituierten Komplexes im Vergleich zum Kontroll-Experiment (5-Chl PS II-RC inkubiert ohne Pigment) bei Raumtemperatur. Nach der Normierung auf 542 nm sind auch hier (wie auch in den Chl-rekonstituierten 5-Chl PS II-RC) deutliche Unterschiede zwischen der rekonstituierten Probe und der Kontrollprobe zu erkennen.

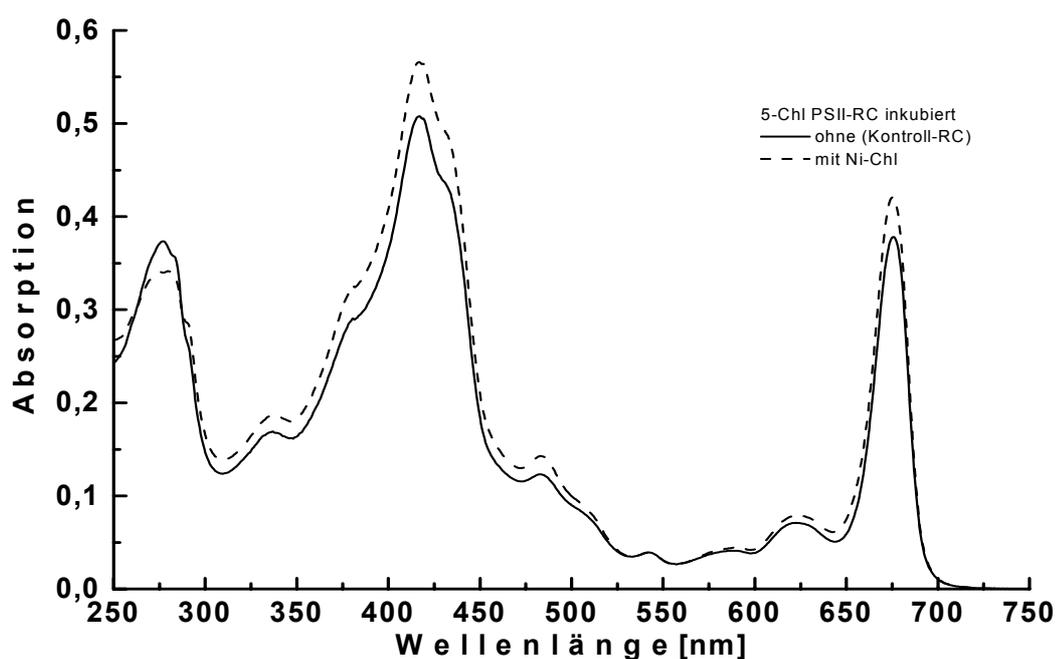


Abb. 41: Absorptionsspektren (298 K) der 5-Chlorophyll-Reaktionszentren nach Rekonstitution mit $[\text{Ni}^{2+}]$ -Chlorophyll a verglichen mit dem Kontrollexperiment. Die 5-Chl PS II-RC wurden in Anwesenheit von Ni-Chl bzw. ohne Chl (Kontroll-experiment) inkubiert und mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die Spektren sind auf die Q_x -Bande des Phe (542 nm) normiert.

Die spektralen Veränderungen nach Inkubation mit Ni-Chl (verglichen mit dem jeweiligen Kontroll-RC) entsprechen im wesentlichen denen der mit Chl inkubierten 5-Chl PS II-RC. Auch hier kann eine kurzweilig verbreiterte Q_y -Bande und eine ver-

C Ergebnisse

breiterte Soretbande gesehen werden. Ebenso nehmen die Pigmentbanden der rekonstituierten Probe an Intensität und Breite zu, während die Proteinbande an Intensität verliert. In der Carotin-Region ergeben sich auch Veränderungen die, wie bereits vorne näher erläutert (C.3.2.1), nicht von der Rekonstitution zu stammen scheinen. Die Unterschiede in der Proteinbande ergeben sich auch hier durch effizientes Aufreinigen, durch das denaturiertes Protein entfernt wird. Die Lage des Q_y -Maximums ist nach der Rekonstitution mit Ni-Chl von 675 nm nach 675,5 nm verschoben. Zur Ermittlung der relativen Flächen von rekonstituierter Probe und Kontroll-RC, wurde über den Bereich von 750 bis 600 nm integriert. Für die rekonstituierte Probe ergibt sich ein Flächenzuwachs von 11 %. Dieser Wert entspricht in etwa dem theoretisch ermittelten Wert von 13 % (unter Annahme gleicher Oszillatorenstärke der Chl und Phe) und dem durch HPLC ermittelten von 12 %.

Bestätigt werden diese Ergebnisse durch Tieftemperatur-Absorptionsspektren der rekonstituierten RCs und Kontroll-RCs (Abb. 42). Es können Absorptionzuwächse an der kurzwelligen Flanke der Q_y -Bande gesehen werden, welche bei 670 und 650 nm verstärkt auftreten, was auf die Besetzung der vakanten Bindungstaschen durch Ni-Chl hinweist.

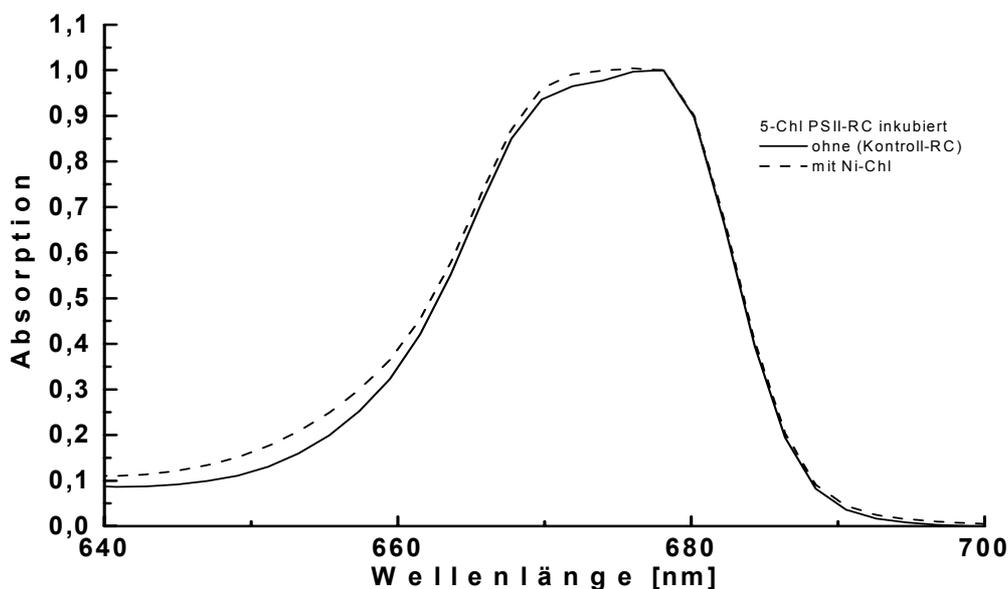


Abb. 42: Tieftemperatur Absorptionsspektren (78 K) der 5-Chlorophyll-Reaktionszentren nach Rekonstitution mit $[\text{Ni}^{2+}]$ -Chlorophyll a (Ni-Chl) verglichen mit dem Kontrollexperiment.

Das analog, aber ohne Zusatz von Chl behandelte RC diente als Kontrollexperiment. Die Spektren sind auf 678 nm normiert

CD-Spektroskopie

Die Formen der CD-Spektren (Abb. 43) des mit Ni-Chl rekonstituierten und des Kontroll-RC gleichen sich, wobei sie die für PS II-RC charakteristischen Banden besitzen (vergleiche hierzu Kapitel C.1.6 und Abb. 15). Das CD-Signal des Q_y-Übergangs der rekonstituierten RCs zeigt im negativen Extremum eine kurzweilige Verschiebung um 4 nm gegenüber dem des Kontroll-RCs. Alle anderen Extrema stimmen in beiden Spektren in ihren Lagen überein.

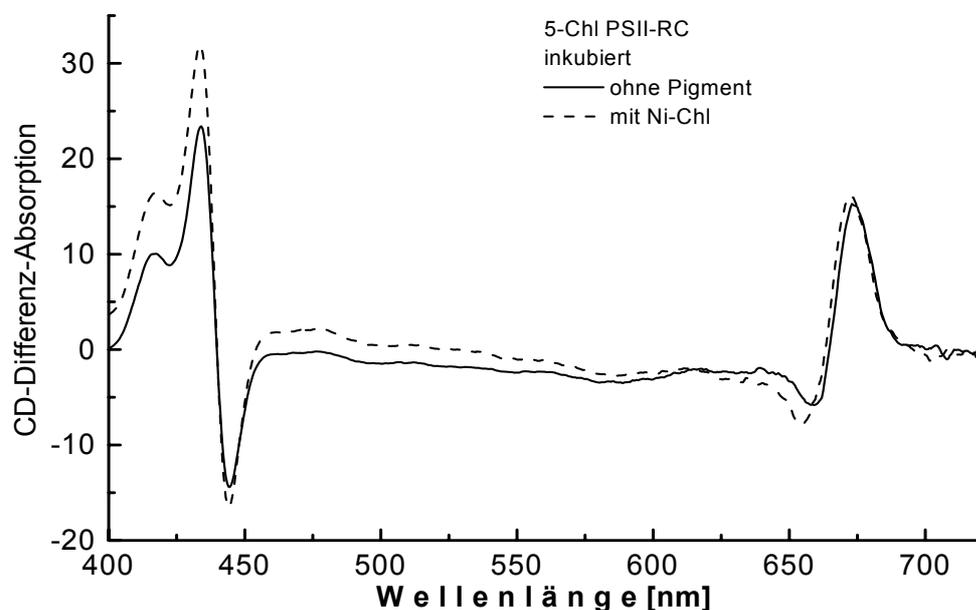


Abb. 43: Messungen des Circular dichroismus nach Rekonstitution der 5-Chlorophyll Reaktionszentren mit $[\text{Ni}^{2+}]$ -Chlorophyll *a* im Vergleich zum Kontrollexperiment.

Das analog, aber ohne Zusatz von Chl behandelte RC diente als Kontrollexperiment.

Fluoreszenzspektroskopie

Für die mit Ni-Chl rekonstituierten Proben wurden Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren wie unter C.3.1.2 beschrieben aufgenommen (Daten nicht gezeigt). Es konnte festgestellt werden, dass in den gemessenen Proben keine freien Chlorophylle und/oder Pheophytine vorhanden waren. Zusätzlich wurde die Fluoreszenz-Quantenausbeute der mit Ni-Chl rekonstituierten 5-Chl PS II-RC-Komplexe gemessen und mit der der Kontroll-RC verglichen. Die Messung ergab nur eine teilweise verminderte Fluoreszenz, was den Messungen am Ni-Chl Austauschexperiment ähnelt. Die Minderung lag bei den mit Ni-Chl rekonstituierten Proben bei Werten um 25 %, bezogen auf die Fluoreszenz des Kontroll-RC.

Test zur photochemischen Aktivität

Die Photooxidation des P680 zu P680⁺ lieferte die Absorptionsdifferenzspektren (Licht *minus* Dunkel) (Abb. 44) von den mit Ni-Chl inkubierten 5-Chl PS II-RC und dem Kontroll-RC in Gegenwart von Silikomolibdat (SiMo). Die Bande des mit Ni-Chl inkubierten (=rekonstituierten) Reaktionszentrums ist, verglichen mit der des Kontroll-Experiments, an der kurzwelligen Flanke breiter, was durch die Besetzung der zuvor leeren Bindungstasche hervorgerufen sein könnte. Ein an dieser Stelle verbreitertes Signal wird in diesem Zusammenhang weitgehend auf eine irreversible Photooxidation eines der peripheren Chl zurückgeführt [17;101;107]. Die Lage des Maximums, ungeachtet der Breite, entspricht der nicht-modifizierter (nativer) RCs (vgl. Abb. 40). Dieses deutet darauf hin, dass trotz Einbau von Ni-Chl, welches in der Lage ist, Anregungsenergie einzufangen, die photooxidative Wirkung des primären Donors P680 beibehalten wird.

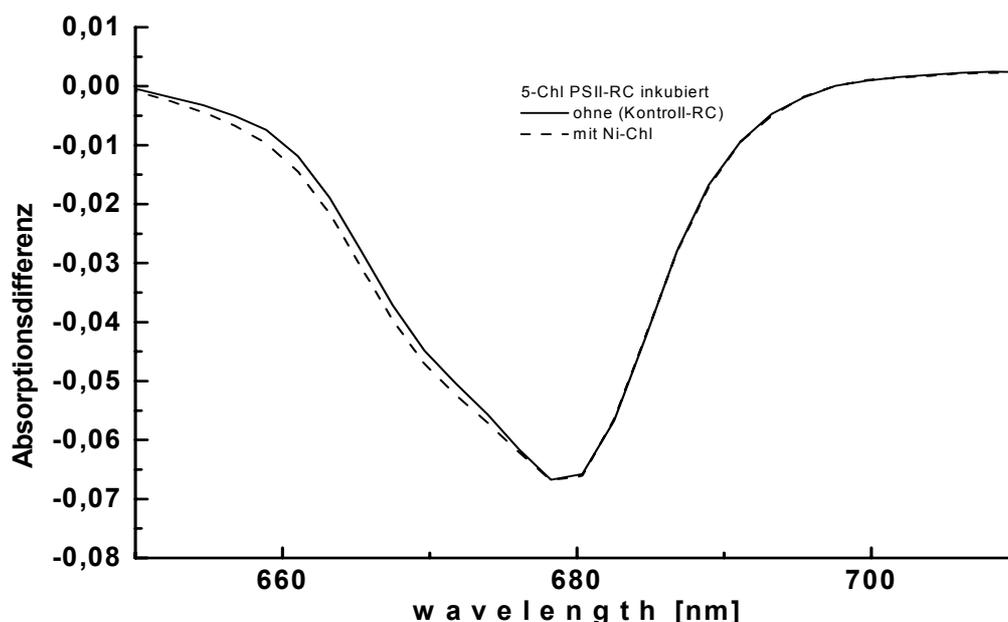


Abb. 44: Anreicherung von P680⁺ nach Rekonstitution von 5-Chl PS II-RC mit [Ni²⁺]-Chlorophyll a im Vergleich zum Kontrollexperiment.

Das analog, aber ohne Zusatz von Ni-Chl behandelte RC diente als Kontrollexperiment. Die Spektren zeigen die Absorptionsdifferenzspektren nach 8 s Belichtung mit Weißlicht einer Intensität von $2.200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in Anwesenheit von $200 \mu\text{M}$ Silikomolybdat. Die Spektren sind auf das Maximum der negativen Differenzbande normiert.

Die Aktivität der RC wurde zusätzlich durch Messung der Phe^{*}-Akkumulierung bestimmt (Daten nicht gezeigt). Dabei besaßen die rekonstituierten RC nach der Inkubation bei erhöhter Temperatur noch 90 % der Aktivität nativer 5-Chl PS II-RC,

während die Reaktionszentren des Kontrollansatzes eine Restaktivität von nur noch 55 % zeigten. Auch hier ist wieder die Tendenz erkennbar, dass die Rekonstitution (das Auffüllen der leeren Bindungsstelle) die 5-Chl PS II-RC gegenüber einer Degradierung durch Wärme stabilisiert.

4.3.3 [3-Acetyl]-chlorophyll a und [Zn²⁺]-Chlorophyll a rekonstituierte RC

Rekonstitution mit Ac-Chl

Abb. 45 zeigt das Absorptionsspektrum eines mit Ac-Chl rekonstituierten Komplexes im Vergleich zum Kontroll-Experiment (5-Chl PS II-RC inkubiert ohne Pigment) bei Raumtemperatur. Nach Normierung auf 542 nm ergeben sich auch hier spektrale Unterschiede zwischen der Ac-Chl inkubierten Probe und dem Kontroll-RC (5-Chl PS II-RC ohne Zusatz von Pigment inkubiert). Diese sind besonders in der Soret- und Q_y-Bande der rekonstituierten Probe zu sehen. Sowohl die Q_y-Bande als auch die Soretbande sind an ihren langwelligen Flanken verbreitert. Das Maximum der Q_y-Bande ist gegenüber dem des Kontroll-Experiments um 0,5 nm langwellig verschoben (von 675 nm auf 675,5 nm). Diese spektralen Veränderungen konnten auch bei den Austauschversuchen mit dem gleichen Pigment (Ac-Chl, Kapitel C.3.2) gesehen werden.

Die Integration über die Flächen (im Bereich von 750 bis 600 nm) rekonstituierter und Kontroll-RC ergab für die Rekonstitution einen Flächenzuwachs von 5 %. Dieser Wert entspricht in etwa dem durch HPLC-DAD Analyse ermittelten Wert von 4 % und steht für eine nur partiell gelungene Rekonstitution, denn der theoretisch erwartete Wert (unter der vereinfachenden Annahme, dass alle Tetrapyrrolpigmente des Reaktionszentrums gleiche Oszillatorenstärke besitzen) betrüge bei einer vollständigen Rekonstitution 13 %. Durch die Aufnahme von Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren bei unterschiedlichen Emissions- bzw. Anregungswellenlängen (Daten sind nicht gezeigt) konnte die Anwesenheit von freiem Pigment ausgeschlossen werden, so dass von einem funktionellen Einbau der zusätzlichen Pigmente gesprochen werden kann (vgl. Kapitel C.1.4).

Die photochemische Aktivität wurde mittels Phe⁻-Akkumulierung (siehe Kapitel C.1.5.1) bestimmt und lieferte folgende Aktivitäten: Die mit Ac-Chl rekonstituierten Reaktionszentren zeigten eine Restaktivität von 78 % (bezogen auf ein natives/unbehandeltes 5-Chl PS II-RC), wohingegen das Kontroll-RC 5-Chl PS II-RC inkubiert ohne

C Ergebnisse

Pigment, 55 % Restaktivität besitzt. Diese Werte entsprechen den in den vorherigen Rekonstitutionsversuchen gefundenen Werten und zeigen auch hier, dass die Kontroll-RC stärker unter der Temperaturbehandlung leiden als die rekonstituierten RC.

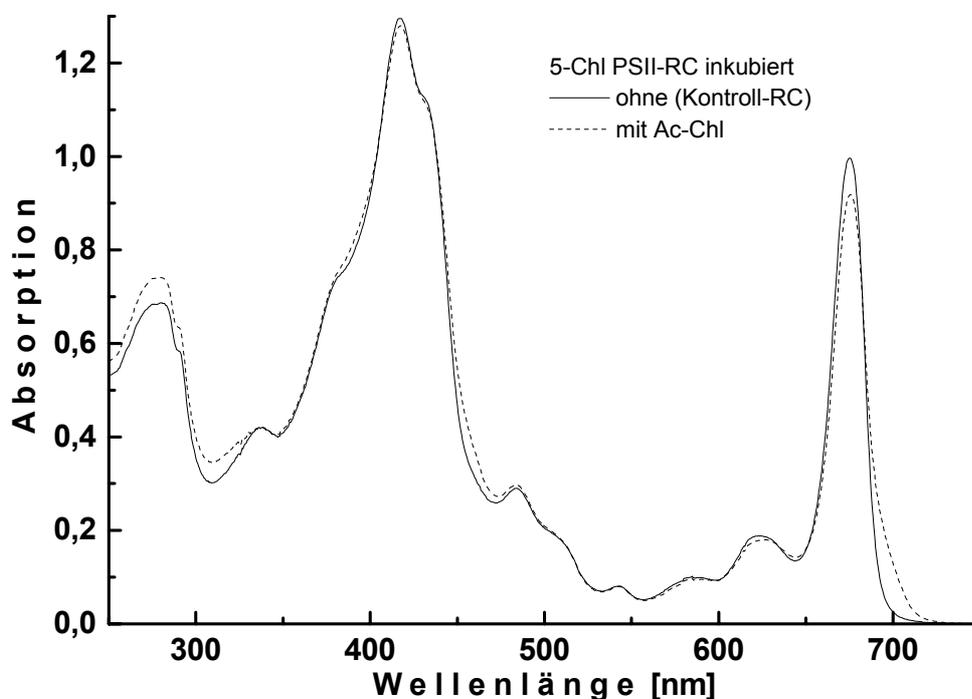


Abb. 45: Absorptionsspektren der 5-Chlorophyll-Reaktionszentren nach Rekonstitution mit [3-Acetyl]-chlorophyll a verglichen mit dem Kontrollexperiment.

Die 5-Chl PS II-RC wurden in Anwesenheit von Ac-Chl bzw. ohne Chl (Kontroll-experiment) inkubiert und mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die Spektren sind auf die Q_x -Bande des Phe (542 nm) normiert.

Rekonstitution mit Zn-Chl

Nach der Rekonstitution mit Zn-Chl konnte, in Analogie zu den Austauschexperimenten, eine erhöhte Anzahl an Tetrapyrrolpigmenten gefunden werden (siehe auch Kapitel C.3.1.1). Laut HPLC-DAD Analyse (Tabelle 3) wurden in der rekonstituierten Probe insgesamt 11,8 (davon $4 \pm 0,5$ Zn-Chl pro 2 Phe) und im Kontrollexperiment 7,4 Chlorine gefunden. Die Spektren der mit Zn-Chl inkubierten 5-Chl PS II-RC sind hier nicht gezeigt, da sie den in Kapitel C.3.1.1 gezeigten Spektren im wesentlichen entsprechen. Auch hier zeigten die Absorptionsspektren die durch den Überschuss an Zn-Chl hervorgerufenen Bandenformen, -intensitäten und -verschiebungen (Abb. 25). Die wichtigsten seien noch einmal kurz aufgeführt: Die Q_y -Bande verschiebt sich kurzwellig von 675,5 nm nach 673 nm, wobei die Bande kurzwellig stark verbreitert ist. In der Soretbande zeigt sich eine sehr ausgeprägte Schulter bei etwa 435 nm. Die Spektren

der Fluoreszenzanregung und -emission zeigen ähnlich geringe Wellenlängenabhängigkeiten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das überschüssige Zn-Chl an den PS II-RC-Komplex assoziiert ist und zumindest teilweise Energie austauscht. Zur Ermittlung der photochemischen Aktivität wurden Phe⁻-Akkumulierungsspektren gemessen. Die Auswertung ergab dabei die folgende, wie bereits bei der Rekonstitution mit den übrigen Pigmenten gesehene Tendenz: Die rekonstituierte Probe hat eine Restaktivität von 85 % (bezogen auf ein nicht inkubiertes 5-Chl PS II-RC) und das Kontroll-RC (5-Chl PS II-RC inkubiert ohne Pigment) nur noch 50 %.

5 Aktivität und Stabilität von 6-Chl PS II-RC in Amphipolen

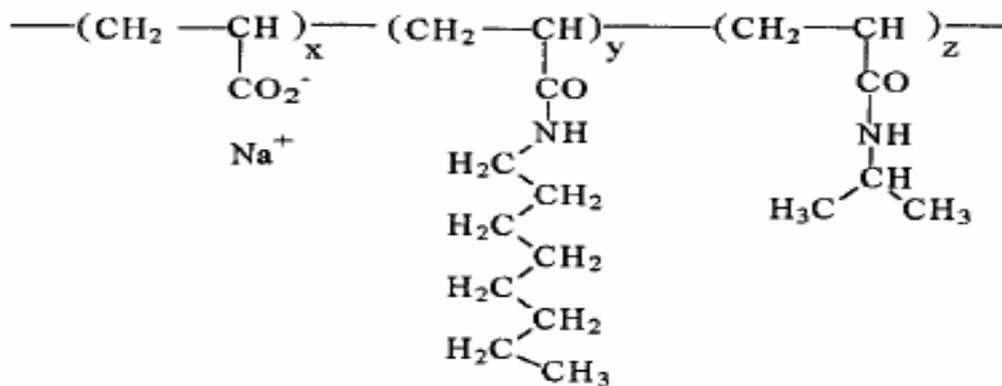
5.1 Allgemeines

Seit der ersten Isolierung von PS II-RC [28] war es ersichtlich, dass diese gegenüber purpurbakteriellen RC (pb-RC) sehr labil sind [121]. Die Stabilität und Aktivität isolierter PS II-RC hängen dabei sehr stark von den Bedingungen bei denen sie aufbewahrt werden ab. Hierbei spielen Faktoren wie z.B. Temperatur, pH-Wert, Puffersubstanzen und insbesondere die Art des anwesenden Detergens eine Rolle [80;82;122]. Der Einfluss von Detergentien (und pH-Wert) auf die Stabilität von isolierten PS II-RC wurde von Gall [81] systematisch untersucht. Er konnte feststellen, dass isolierte RC in Cholsäure-Derivate eine höhere Aktivität und Stabilität zeigen, als in dem häufig verwendeten *n*-Dodecyl- β -D-maltosid (DM)²². Die Stabilität der Reaktionszentren ist in 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) besonders hoch, aber auch hier noch keinesfalls mit der von pb-RC vergleichbar.

Popot und Tribet [123] haben kürzlich eine neuartige Klasse von makromolekularen Detergenzien beschrieben, die Amphipole. Diese Detergenzien bestehen aus einer aliphatischen Kette mit hydrophilen, geladenen Seitengruppen. Aufgrund der positiv (Amine) und negativ (Carbonsäure) geladenen Seitenketten besitzen sie amphiphile Eigenschaften. Das molekulare Gewicht der bisher synthetisierten Amphipole liegt bei 70 bzw. 280 kDa (Abb. 46).

²² Bereits sehr früh stellte sich heraus, dass der Detergenzaustausch von TX-100 zu DM nach der Isolierung die Aktivität der RC erhöht [121] und TX-100 eine zusätzlich stark destabilisierende Wirkung auf das PS II-RC hat (in Anwesenheit von TX-100 degenerieren die RC selbst bei 0 °C innerhalb weniger Stunden) [13].

C Ergebnisse



Name	<MW> (kDa) (DP)	Molar ratio of monomers in mol % (mean number of monomers per molecule)		
		ungrafted	octyl	isopropyl
A 8-75	~ 8 (~70)	~75% (~52)	~25% (~18)	0%
A 8-35	~8 (~70)	~35% (~24)	~25% (~18)	~40% (~28)
A 34-75	~34 (~280)	~75% (~210)	~25% (~70)	0%
A 34-35	~34 (~280)	~35% (~98)	~25% (~70)	~40% (~112)

Abb. 46: Molekülstruktur der Amphipole, einer neuartigen Detergenzklasse, entnommen aus [85].

Die Amphipole bilden mit dem Protein einen stabilen Amphipol/Protein-Komplex. Die optimale Stöchiometrie (Anzahl der Moleküle Amphipol pro Molekül Protein) variiert je nach untersuchten Protein [85]. Der Protein-Amphipol-Komplex kann als eine Einheit mit quasi irreversiblen Bindungen betrachtet werden, wobei in einigen Fällen recht gut der native Zustand, d.h. der Zustand, den die Proteine innerhalb der Phospholipid-Doppelschicht einnehmen, hergestellt zu sein scheint [124].

Nach einem Modell von Popot sind die individuellen Wechselwirkungen dynamisch. Da aber immer eine größere Zahl von Wechselwirkungen „aktiv“ ist, bleibt das Amphipol dauerhaft an das Protein gebunden. Die in Amphipol eingepackten Membranproteine verhalten sich deshalb wie lösliche Proteine, wobei die Anwesenheit eines konventionellen Detergenz nicht mehr notwendig ist [85;123].

In mehreren Fällen wurde gezeigt, dass die Amphipole wasserunlösliche Membranproteine in Lösung halten können, indem sie die hydrophoben Wechselwirkungen des Proteins absättigen und eine polare Oberfläche generieren. Es konnte gezeigt werden,

dass die meisten der getesteten Proteine ihre Aktivität behielten, im Falle der ATPase war sie sogar erhöht. Bisher wurden die Ergebnisse der Solubilisierung von Bakteriorhodopsin, pb-RC, des Cytochrom b_6f Komplexes, Matrix Porin und Ca^{2+} -ATPase [124] publiziert. Aufgrund der oben dargestellten Eigenheiten war es von Interesse, ob sich die Amphipole auch zur Solubilisierung und/oder Stabilisierung von PS II-RC eignen.

5.2 Bedingungen des Detergenzaustauschs

Für die Versuche wurden PS II-RC in TDM-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 1,0 mM DM) mit 400 mM NaCl und in TCH-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM CHAPS) mit 400 mM NaCl verwendet. Zu den RC-Proben wurden jeweils unterschiedliche Mengen an Amphipol des Typs A8-35 (siehe Abb. 46) zugegeben, gemischt und auf Eis inkubiert. Die Protein- zu Amphipol-Mengen entsprachen dabei einem Verhältnis von 1:0 (Kontrollexperiment), 1:1 bzw. 1:2,²³ 1:5 und 1:10 (jeweils (w/w)). Alle Proben wurden danach um das 10-fache verdünnt, so dass die DM- bzw. CHAPS-Konzentrationen unterhalb der CMC (=sub-CMC) vorlagen. Nach Ultrazentrifugation wurden die Proben auf die Bildung eines Pellets untersucht, denn eventuelle unsolvatisierte Bestandteile würden nach Zentrifugation ein Pellet ergeben.

Während im Kontrollexperiment (mit einem Protein- zu Amphipol-Verhältnis von 1:0) und in den Proben mit einem Protein- zu Amphipol-Verhältnis von 1:1 bzw. 1:2 nicht mehr gelöste Bestandteile gefunden wurden, lagen alle anderen Proben (d.h. die mit einem Protein zu Amphipol-Verhältnis von 1:5 und 1:10) vollständig gelöst vor, so dass nach der Zentrifugation kein Pellet sichtbar war. Die Überstände wurden jeweils spektralphotometrisch (auf deren Zusammensetzung) untersucht. In Abb. 47 sind die auf die Q_x -Bande des Phe (542 nm) normierten Spektren zweier Proben dargestellt. Hierbei handelt es sich um RC in CHAPS, die mit A8-35 im Verhältnis 1:2 bzw. 1:5 versetzt wurden und nach Ultrazentrifugation in Lösung waren. In beiden Proben ist CHAPS in einer nicht mehr zur Solubilisierung fähigen Konzentration (<CMC) vorhanden.

²³ Zu den RC in DM wurde A8-35 im Verhältnis von 1:1 (w/w) und zu den Reaktionszentren in CHAPS im Verhältnis von 1:2 (w/w) zugegeben.

C Ergebnisse

Beide Spektren zeigen das charakteristische RC Spektrum (Abb. 10), wobei in beiden Proben das langwelligste Maximum von anfangs 676 nm (RC in CHAPS vor dem Detergenzaustausch, Daten nicht gezeigt) auf nun 674 nm verschoben ist. In der Probe mit dem geringeren Amphipolgehalt (durchgezogene Linie, Abb. 47) ist die Proteinabsorption deutlich höher als in der Probe mit höherem Amphipol-Gehalt (gestrichelte Linie, Abb. 47). Zusätzlich kann hier auch noch eine stärkere Lichtstreuung festgestellt werden, die allerdings nicht allein das Zustandekommen der höheren Absorption erklären kann. Die in dieser Probe gefundene erhöhte Proteinabsorption deutet stark auf eine partielle RC-Degradierung hin (vergleiche hierzu auch das Kapitel über Absorptionsspektroskopie an PS II-RC, Kapitel C.1.3), was auch die Anwesenheit eines Pellets nach Zentrifugation erklärt.

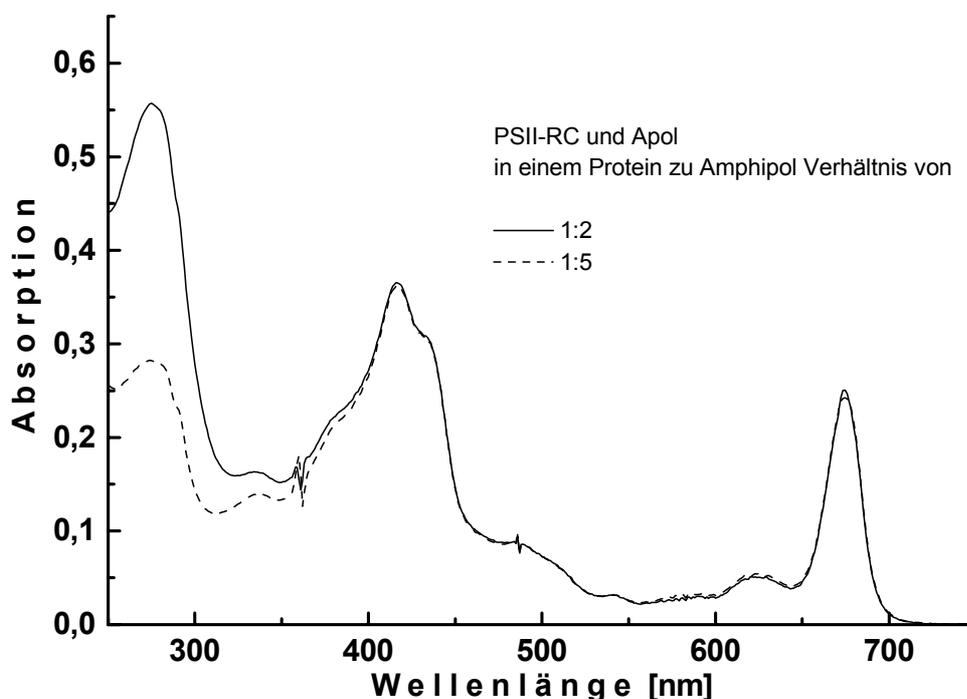


Abb. 47: Absorptionsspektren von 6-Chlorophyll-Reaktionszentren in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Amphipol A8-35.

Die Reaktionszentren wurden nach Inkubation mit unterschiedlichen Mengen an Amphipol zentrifugiert (190.000g, 20 Min.) und der Überstand vermessen. Die Spektren sind auf die Q_x -Bande des Phe (542 nm) normiert.

Im Gegensatz hierzu zeigt das Spektrum der mit einem höheren Anteil an Amphipol solubilisierten RC-Proben (Protein : Amphipol = 1 : 5 (w/w)) die für aktive Reaktionszentren typischen Bandenverhältnisse, welche im Kapitel C.1.3 näher beschrieben sind. Das „gute“ RC-Spektrum und das Fehlen eines Pellets nach Ultrazentrifugation

C Ergebnisse

belegen die vollständige Solubilisierung der RC durch die vorhandenen Amphipole. Gleiches konnte auch für die analog behandelten PS II-RC, welche vormals in TDM-Puffer solubilisiert waren, gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Für die vollständige Solubilisierung der Reaktionszentren war auch in diesen Proben ein Protein- zu Amphipol-Verhältnis von 1:5 notwendig. Aufgrund dieser Daten wurden sämtliche weiteren Versuche mit einem Protein- zu Amphipol-Verhältnis von 1 : 5 (w/w) gemacht.

5.3 Aktivitätsentwicklung

5.3.1 Allgemeines

Die verwendeten RC stammten alle aus einer Präparation, wurden aber zum Teil einem Detergenzwechsel unterzogen, so dass die hier verwendeten PS II-RC entweder in TDM-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 1,0 mM DM) mit 400 mM NaCl oder in TCH-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM CHAPS) mit 400 mM NaCl gelöst waren. Der Austausch des Detergenz gegen Amphipol wurde wie in Kapitel B.5.2.3 beschrieben durchgeführt, wobei das Protein zu Amphipol -Verhältnis 1 : 5 betrug.

Als Amphipol wurde das vom Typ A8-35 getestet (siehe Abb. 46). Um mögliche, von den anwesenden Detergenzien verursachte Effekte beurteilen zu können, wurde im nachfolgenden zwischen den in den Proben noch anwesenden Detergentien DM und CHAPS differenziert. *Zur Bestimmung der Aktivität* wurde der von Braun eingeführte spektroskopisch definierte Aktivitätsparameter %P680 verwendet, der den Anteil an aktiven P680 widerspiegelt [13]. Dieser wird durch aus den Absorptionen bei 679 und 672 nm (mit 730 nm als Nullwert) mit Hilfe der folgenden Formel bestimmt:

$$\%P680 = (2,38*(OD_{679}-OD_{730})/(OD_{672}-OD_{730})-1,64)*100,$$

Die Formel reflektiert die Annahme, dass die Aktivität des RC von der Intaktheit des Primären Donors bestimmt wird, dessen aktive Form ein Absorptionsmaximum bei 679 nm und dessen inaktive eines bei 672 nm hat [82]. In den systematisch durchgeführten Untersuchungen zur Stabilität der PS II-RC konnte Gall et al. [81] zeigen, dass der Mechanismus der RC-Deaktivierung in allen getesteten Detergenzien gleich war, und somit die Deaktivierung sehr gut von der Braun'schen Formel (s.o.) beschrieben werden kann.

5.3.2 Entwicklung der Aktivität bei 4 °C

Um die Aktivitätsentwicklung der verschiedenen Reaktionszentren in Amphipol (vom Typ A8-35, Abb. 46) zu messen wurde über 15 Stunden alle 30 Minuten ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Hierbei wurden die Proben während der Messung auf 4 °C gekühlt. Als Messbeginn ($t=0$) wurde der Zeitpunkt des Verdünnens des vorhandenen Detergenz nach Inkubation mit Amphipol unter dessen CMC (=sub-CMC) definiert. Nach jeder Messung wurden das Absorptionsspektrum gemäß der Braun'schen Formel ausgewertet (siehe Kapitel D.5.3.1). Die so ermittelte Daten sind in Abhängigkeit der Zeit und der Proben in Abb. 48 dargestellt, welche die zeitliche Entwicklung des Aktivitätsparameter % P680 von PS II-RC bei 4 °C zeigt. Dieser Darstellung ist zu entnehmen, dass der Wert von %P680 von einem der Kontrollexperimente im Laufe der Messung sehr stark abnahm. Das durch DM solubilisierte PS II-RC zeigte innerhalb von 15 Stunden einen Verlust von sechs Einheiten, wobei 50 % der Gesamtdifferenz in den ersten vier Stunden verloren gingen. Die bekannte sehr viel bessere Wirkung von CHAPS auf die Aktivität und Stabilität der RC zeigte sich auch hier in einer langsamen Deaktivierung: Nach 15 Stunden war der Anfangswert um insgesamt nur zwei Einheiten gesunken, nämlich von 73,1 auf 71,1.

Beide Kontrollexperimente hatten bereits bei Messbeginn einen geringfügig unterschiedlichen Wert (71,3 bzw. 73,0). Dieser, bereits am Anfang erkennbare Aktivitätsunterschied zwischen den RC in DM und CHAPS sowie der unterschiedliche Grad der Deaktivierung nach 15 h reflektieren die erhöhte Stabilität/Aktivität von PS II-RC in CHAPS gegenüber der in DM (siehe oben und [81]). Auffällig ist hier jedoch, dass die verschiedenen Proben unterschiedliche Nullwerte besitzen, was auf eine mögliche spektrale Verschiebung der RC in den unterschiedlichen Proben hinweist.

Der Aktivitätsverlauf der durch Amphipol in Lösung gehaltenen RC glich dem der CHAPS solubilierten Reaktionszentren. Die Anfangs- und Endwerte des Braun'schen Aktivitätsparameter differierten in beiden Proben nach 15 Stunden bei 4 °C um jeweils zwei Einheiten. Die Anfangswerte (73,1 und 73,5) und die Kurvenverläufe der in Amphipol solubilierten Reaktionszentren sind sich sehr ähnlich, weshalb das noch vorhandene Detergenz (CHAPS oder DM) keinen Einfluss auf die Stabilität/Aktivität zu haben scheint. Zusätzlich hierzu haben die Kurven einen ähnlichen Verlauf wie die von CHAPS solubilierten Reaktionszentren.

C Ergebnisse

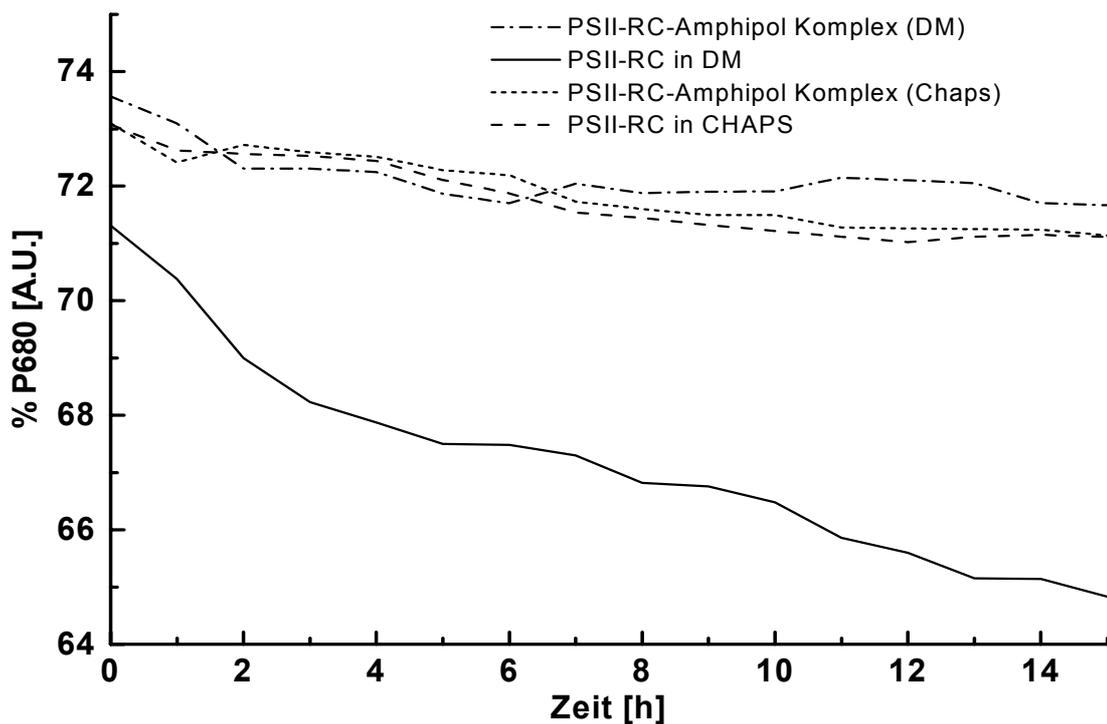


Abb. 48: Entwicklung des Aktivitätsparameters (%P680) von 6-Chlorophyll Reaktionszentren in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen an Amphipol A8-35 bei 4 °C. Die Reaktionszentren lagen zum einen in Amphipol gelöst vor, wobei aber die entsprechenden Detergentien *n*-Dodecyl- β -D-maltosid (DM) (durchgezogene Linie, pH 7,2) bzw. CHAPS (gestrichelte Linie, pH 8) noch in unwirksamen Mengen vorhanden waren. Und zum anderen lagen sie nur in den Detergenzien DM (gepunktete Linie, pH 7,2) bzw. CHAPS (gepunktete-gestrichelte Linie, pH 8) vor.

5.3.3 Entwicklung der Aktivität bei 20 °C

Die unter Punkt C.5.3.2 beschriebenen Messungen wurden in der gleichen Art auch bei 20 °C durchgeführt. Gemessen wurden zwei Kontrollexperimente (RC solubilisiert in CHAPS oder DM) und zwei mit A8-35 solubilisierte Reaktionszentren in denen noch Spuren (sub-CMC) von CHAPS oder DM vorhanden waren. Die Absorptionsspektren wurden auch hier gemäß der Baun'schen Formel zur Bestimmung des Aktivitätsparameter ausgewertet und die so ermittelten Daten graphisch dargestellt (Abb. 49).

Von den beiden Kontrollproben zeigten die Proben in CHAPS die geringste Degenerierung: Die Anfangs- und Endwerte differierten im Laufe der Messung nur um fünf Einheiten. Deutlich höher war der Aktivitätsverlust der RC in DM: Hier unterschieden sich die Werte zu Beginn und Ende der Messung um 14 Einheiten. Die Deaktivierung in Amphipol verlief in den Proben in unterschiedlichem Ausmaß: Während in den

C Ergebnisse

Proben in denen noch Spuren von CHAPS anwesend waren ein „mittlerer“ Aktivitätsverlust verzeichnet werden konnte (15 Einheiten Differenz zwischen Anfangs- und Endwert), wurde bei Anwesenheit geringer Mengen an DM eine „starke“ Reduzierung der Aktivität gesehen (um etwa 30 Einheiten).

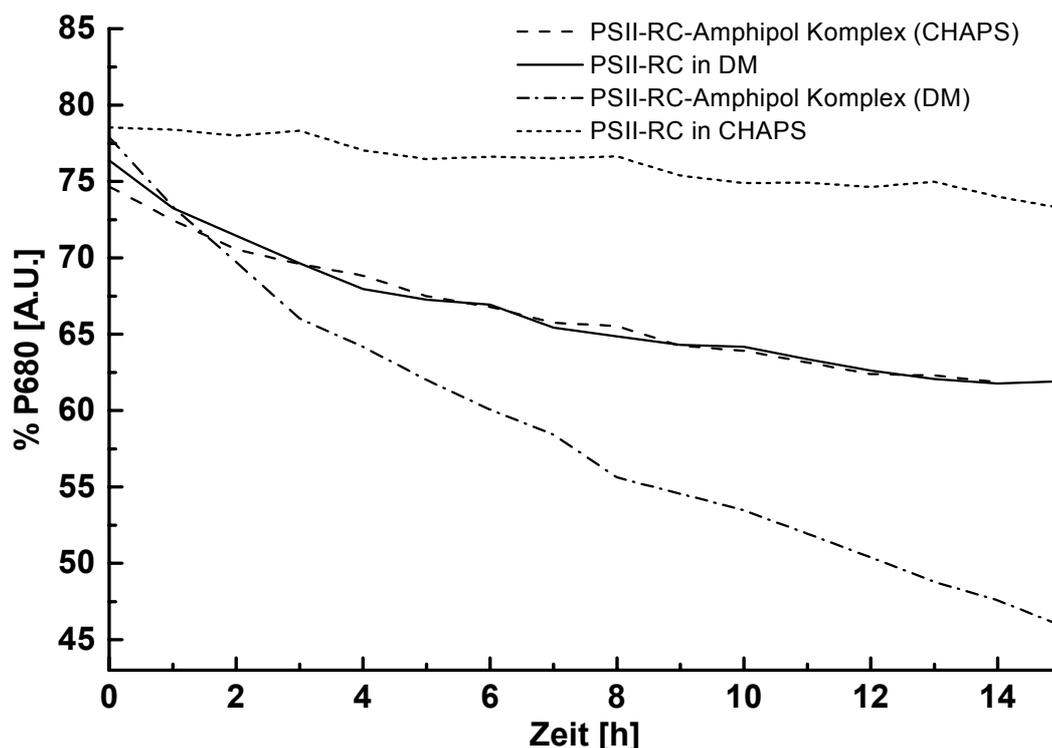


Abb. 49: Entwicklung des Aktivitätsparameters (%P680) von 6-Chlorophyll Reaktionszentren in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen an Amphipol A8-35 bei 20 °C.

Der Versuch wurde analog zu dem in Abb. 48 gezeigten durchgeführt, jedoch bei einer Temperatur von 20 °C. Die RC lagen zum einen in Amphipol gelöst vor, wobei aber die entsprechenden Detergentien DM (durchgezogene Linie, pH 7,2) bzw. CHAPS (gestrichelte Linie, pH 8) noch in unwirksamen Mengen vorhanden waren. Und zum anderen lagen sie nur in den Detergenzien DM (gepunktete Linie, pH 7,2) bzw. CHAPS (gepunktet- gestrichelte Linie, pH 8) vor.

Der Vergleich zwischen den Graphen der „Kontrollgruppe“ und der „Amphipolgruppe“ zeigt, dass die Reaktionszentren in CHAPS bei erhöhter Temperatur (20 °C) nur ein geringes Maß an Deaktivierung zeigten. Die durch Amphipol solubilisierten Reaktionszentren zeigten hingegen nur geringe Stabilität und das Maß an Deaktivierung war groß. Hierbei ähnelten sich die Kurvenverläufe und somit die Aktivitätsverluste der RC in DM und der RC in Amphipol in Anwesenheit von CHAPS in einer sub-CMC Menge. Besonders stark nahm die Aktivität in den Proben ab, die durch Amphipol solubilisiert

C Ergebnisse

waren und bei denen DM in einer sub-CMC Menge vorhanden war. Die Anwesenheit von Amphipol führte bei 20 °C zu einer Destabilisierung der RC, wobei der Effekt in Anwesenheit von CHAPS (unter CMC) abgeschwächt und in Anwesenheit von DM verstärkt war.

5.3.4 Korrelation von „%P680“ und der Phe⁻-Akkumulierungsrate

Aufgrund der in Abb. 48 und 49 gesehenen unterschiedlichen Anfangswerte stellte sich die Frage, wie weit die spektroskopisch ermittelten Braun'schen Aktivitätsparameter %P680 mit dem Maß korrelieren, Phe⁻ zu akkumulieren (ΔA). Hierzu wurden die Proben zusätzlich noch auf ihre photochemische Aktivität, hier auf die Fähigkeit, Phe⁻ zu akkumulieren, untersucht (siehe auch Kapitel C.1.5.1). Die Messung erfolgte sofort nach dem Amphipolaustausch und die so erhaltenen Daten (Tab. 4) wurden auf Kongruenz untersucht. Auch hier wurden zwei Arten von Proben unterschieden: Die Kontrollgruppe bestehend aus Reaktionszentren in CHAPS bzw. DM und Amphipolgruppe in der die Reaktionszentren durch Amphipol solubilisiert vorlagen, in Gegenwart von sub-CMC Mengen von CHAPS oder DM.

6-Chlorophyll Reaktionszentren wurden in Lösung gehalten durch:	Photochemische Aktivität*	
	%P680	ΔA (682 nm)
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	79,0 \pm 1,0	0,040 \pm 0,004
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid (DM)	77,5 \pm 1,5	0,009 \pm 0,001
Amphipol A8-35 in Gegenwart von CHAPS (sub-CMC)	74,0 \pm 1,0	0,022 \pm 0,003
Amphipol A8-35 in Gegenwart von DM (sub-CMC)	73,5 \pm 0,5	0,022 \pm 0,002
Amphipol A8-35**	68,0 \pm 0,5	0,023 \pm 0,003

* Alle Werte wurden durch drei unabhängige Messungen ermittelt und stellen den Mittelwert dar; ** Reste des noch vorhandenen Detergenz wurde durch Biobeads-P6 entfernt.

Tab. 4: Vergleich der Aktivitätsparameter (%P680) mit den Amplituden der Absorptionsdifferenz (ΔA) bei 682 nm durch die Akkumulierung von Phe⁻ unterschiedlicher Proben.

Die Werte wurden am Zeitpunkt $t = 0$ s bei Raumtemperatur aufgenommen und sind auf einen Proteingehalt von 20 mg/L normiert.

C Ergebnisse

Gemessen am *Braun'schen Aktivitätsparameter (%P680)* sind die Reaktionszentren der amphipol-freien Kontrollproben am aktivsten, wobei die Aktivität der PS II-RC in CHAPS um etwa zwei Einheiten größer war als die in DM. Die Aktivitätsparameter lagen bei Zugabe von Amphipol jeweils deutlich unter denen der Kontrollgruppe. Für die Reaktionszentren (der Amphipolgruppe), in denen noch Spuren von Detergenz vorhanden waren, ergaben sich im Rahmen der Fehlergrenze die gleichen Werte für beide Detergentien. Die Probe in der das Detergens durch ein Adsorbens entfernt wurde zeigte die niedrigsten Werte.

Gemessen an der Amplitude der Phe⁻-Akkumulation ergibt sich eine deutlich andere Reihung (Tab. 4). Als Maß für die Akkumulierung wurde die Amplitude der Absorptionsveränderung (ΔA) nach 30 s Belichtung verwendet. Die Proben wurden auf eine Proteinkonzentration von 20 mg/L normiert. Die photochemischen Aktivitäten der Reaktionszentren der Kontrollgruppe zeigten deutliche Unterschiede: In Anwesenheit von CHAPS war die Aktivität der PS II-RC fast viermal so hoch wie in Gegenwart von DM. Die Werte der Amphipolgruppe lagen dazwischen, sie zeigten alle in etwa den gleichen Wert, unabhängig davon, in welchem Detergenz die RC solubilisiert waren, und ob es nach Zugabe von Amphipole entfernt wurde oder nicht.

Der Vergleich der Aktivitäten (Tab. 4) zeigte, dass beide Methoden zu unterschiedlichen Werten führen, wobei es nicht möglich ist, den Aktivitätsparameter %P680 und die photochemisch ermittelten Werte zu korrelieren. Erklärbar ist dies damit, dass der Aktivitätsparameter spektroskopisch ermittelt wird und geringe Verschiebungen der Absorptionsbande zu unterschiedlichen Werten führen. Die Form und die Lage der Absorptionsbanden kann dabei je nach Umgebung variieren. Die nicht-korrelierbaren Werte der Tab. 4 zeigen, dass der Braun'sche Aktivitätsparameter ungeeignet ist, die Aktivität von PS II-RC in Anwesenheit von Amphipolen zu ermitteln. Damit sind auch die unterschiedlichen Anfangsaktivitäten, die in den Kurven der Graphen in Abb. 48 und 49 gesehen wurden, erklärbar. Obwohl keine Aussage über das absolute Maß der Aktivität der RC gemacht werden kann, ist es aber dennoch möglich, die zeitliche Veränderung der Aktivität innerhalb einer Probe zu verfolgen.

D Diskussion

1 „5- und 6-Chlorophyll Reaktionszentren“ von Photosystem II

1.1 Proteinzusammensetzung

Für die Austausch- und Rekonstitutionsexperimente ist die Proteinhomogenität des Ausgangsmaterials sehr wichtig, denn Verunreinigungen mit Fremdproteinen (hier vor allem mit den Kernantennen CP 43 und CP 47) können zu zusätzlichen Pigmentbindungsstellen führen und eine exakte Dateninterpretation unmöglich machen. Deshalb wurde eine routinemäßige Überprüfung der Proteinzusammensetzung jeder Präparation durchgeführt.

Die Proteinanalysen der in den Versuchen verwendeten PS II-RC ergaben folgende Proteinzusammensetzung (Kapitel C.1): In den hier präparierten Reaktionszentren (6-Chl PS II-RC) konnten die Proteinuntereinheiten D1 (30 kDa), D2 (32 kDa) und die α - und β -Untereinheiten des Cyt_{b559}-Komplexes (9 und 4,5 kDa) detektiert werden (Abb. 4). Ferner wurde ein Protein mit der Molekülmasse von 66 kDa und eines mit 7 kDa identifiziert. Ersteres entspricht dem sogenannten D1/D2 Heterodimer, welches durch unvollständige Solubilisierung entsteht [28], letzteres entspricht einem der an das RC assoziierten LMW (low molecular weight) Proteine [80]. Bisher ist in isolierten PS II-RC das Psb I [126] und das Psb W [127] nachgewiesen worden.

Um die Ergebnisse der oben vorgestellten Analyse abzusichern, wurde zusätzlich ein hochauflösendes zwei dimensionales Gelsystem, ein „Blue-Native-PAGE“, durchgeführt (Abb. 5). Nach der Trennung in der ersten Dimension konnten zwei native Komplexe mit Molekulargewichten von 120 und 100 kDa gesehen werden, von denen der erste in dem Coomassie gefärbten Gel gut und letzterer nur schwach sichtbar war. Beide Komplexe besitzen ein Molekulargewicht, das dem für isolierte RC angegebenen Molekulargewicht von 106 kDa [87] ähnlich ist. Nach der Trennung dieser Banden in der zweiten Dimension (denaturierendes SDS-PAGE) zeigte sich, dass der 120 kDa schwere Komplex Proteine des Heterodimers (D1/D2), der D1- und D2-Untereinheiten sowie des Cyt_{b559}-Komplexes (α - und β -Untereinheit) enthält. Der 100 kDa schwere Komplex löste sich in die gleichen Hauptbestandteile wie der 120 kDa schwere Komplex auf (D1/D2-Heterodimer, D1- und D2-Untereinheiten), wohingegen der Cytochrom-Komplex weiter in seine Untereinheiten aufgetrennt war. Zusätzlich konnten

weitere kleine LMW-Proteine gesehen werden. Weder in der ersten noch in der zweiten Dimension konnten Proteine der Kernantennen gesehen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Verunreinigungen mit Kernantennen sowohl im Standard- als auch im hochaufgelösten 2-dimensionalen Protein-Gelelektrophorese-System unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

1.2 Pigmentzusammensetzung

Zur exakten Versuchsinterpretation ist auch eine genaue Bestimmung der Pigmentzusammensetzung der PS II-RC sehr wichtig. Die am häufigsten verwendete Methode zur Bestimmung des Pigmentgehalts ist die HPLC-DAD Analyse [13;60]. Hierfür werden die Pigmente aus den Reaktionszentren extrahiert, chromatographisch aufgetrennt und jedes einzeln voneinander anhand ihrer Absorptionsspektren validiert.

Der Vorteil dieser Methode gegenüber einer rein spektroskopischen Auswertung liegt darin, dass sie unabhängig von den vorhandenen Pigmenten eingesetzt werden kann. Die rein spektroskopische Auswertung ist hingegen auf konstant vorhandene Pigmente ausgelegt (beim PS II-RC: Chlorophyll, Pheophytin und β -Carotin) weshalb hierdurch veränderte Pigmentzusammensetzung (durch Rekonstitution oder Austausch) nicht mehr genau bestimmt werden können. Obwohl bei den 5-Chl oder 6-Chl PS II-RC eine spektroskopische Pigmentanalyse grundsätzlich möglich wäre, wurde sie hier nicht durchgeführt, denn nur so können untereinander vergleichbare Daten erhalten werden. Denn ein wesentlicher Teil der Arbeit bestand darin den nativen Pigmentgehalt der RC durch Austausch und Rekonstitution zu verändern.

Die Pigmentbestimmung aller RC erfolgte daher einheitlich ausschließlich durch HPLC-DAD Analyse. Das garantierte eine gute Vergleichbarkeit der Experimente und Präparationen untereinander. Der Pigmentgehalt der hier verwendeten und hergestellten Präparationen sowie der Experimente (Austausch- und Rekonstitutionsexperimente) wurde mit einem kalibrierten HPLC-DAD System bestimmt (Kapitel C.1.2). Mit dieser Methode können, im Rahmen der Messgenauigkeit des Spektrometers (siehe C.1.2.2), auch sehr geringe Mengen an Pigment bestimmt werden, wobei auch solche Pigmente bestimmt werden können, die dem Chl spektroskopisch ähnlich sind, wie z.B. 13²-Hydroxychlorophyll.

D Diskussion

Bei der HPLC-DAD Analyse von PS II-RC ist es zur Quantifizierung üblich, eine Bezugsgröße einzuführen. Hierfür wird ein konstanter Pigmentgehalt von 2 Pheophytinen pro RC vorausgesetzt, und die gefundenen Mengen der übrigen Pigmente hierauf bezogen [28;80;128]. Die gefundenen Pigmentstöchiometrien sind somit nur Relativ-Werte, d.h. Werte bezogen auf 2 Pheophytine.

Die in der Literatur für isolierte 6-Chl-PS II-RC angegebenen Pigmentstöchiometrien differieren. Sie liegen zwischen 4 und 6 Chl und 1-2 Car pro 2 Pheophytine. Der Chlorophyllgehalt der PS II-RC wurde Anfang der 1990er Jahre stark diskutiert, denn der gegenüber den purpurbakteriellen RC (pb-RC) erhöhte (Bakterio) Chlorophyllgehalt (4 BChl pro 2 BPhe im pb-RC) wurde lange Zeit als ein Artefakt der Isolierung diskutiert [14]. Als Hauptursache hierfür wurden Verunreinigung durch chlorophyllbindende Proteine (v.a. CP 43 und CP 47) genannt [27;129]. Mittlerweile ist es aufgrund der analytisch gefundenen Daten sowie der durch die Röntgenstruktur des PS II gewonnenen Einblicke allgemein akzeptiert, dass die nach Standardmethoden [26;28] isolierten RC (Standard-RC) sechs Moleküle Chl und zwei Moleküle Car pro zwei Pheophytine besitzen.

Die im nachfolgenden gemachte Unterscheidung zwischen „neuerer“ und „älterer“ Literatur reflektiert die Unsicherheit bei der Anzahl der zusätzlichen Chlorophylle. In der „neueren“ Literatur wurden die durch HPLC-DAD ermittelten relativen Stöchiometrien isolierter 6-Chl PS II-RC im Bereich von 5,8-6,5 Molekülen Chlorophyll und 1,7-2,3 Molekülen β -Carotin pro 2 Pheophytine angegeben. Im Einzelnen wurde der Pigmentgehalt von PS II-RC in [18] angegeben mit 6,2-6,5 Molekülen Chlorophyll (Chl) und 1,7-2,0 Moleküle β -Carotin (Car), in [94] mit 5,9-6,3 Moleküle Chl, 1,88-2,28 Molekülen Car oder in [95] mit 5,8 Moleküle Chl und 1,8 Molekülen Car jeweils pro 2 Molekülen Pheophytin. Die Werte „älterer“ Publikationen [94;95] differieren sehr stark im Chlorophyllgehalt (pro 2 Phe), wobei je nach Autor zwischen 4 und 6 Moleküle Chlorophyll (bezogen auf 2 Phe) angegeben wurde. Im Speziellen wurden 4,6-5,6 Moleküle Chl in [28] bzw. 4,4-5 Chl in [13] oder 6,1 Chl in [128] und 5,8- 6,2 Chl in [105] gefunden.

Für die im Rahmen dieser Arbeit isolierten 6-Chl PS II-RC konnte, wie in Kapitel C.1.2.3 vorgestellt, ein Pigmentgehalt im Bereich von 5,8-6,2 Molekülen Chlorophyll und 1,2-1,7 Molekülen Carotin pro 2 Pheophytinen mittels HPLC-DAD Analyse ermittelt

D Diskussion

werden. Dieses entspricht dem in der neueren Literatur veröffentlichten Pigmentgehalt. Ein Vergleich zu den oben angegebenen Literaturdaten ist in Tab. 5 dargestellt.

Pigmentgehalt von 6-Chlorophyll PS II-RC im Vergleich zur Literatur			
Quelle	Chl	Car	Phe
Diese Arbeit	5,8-6,2	1,2-1,7	2
[18]	6,2-6,5	1,7-2,0	2
[94]	5,9-6,3	1,88-2,28	2
[95]	5,8	1,8	2
[28]	4,6-5,6	keine Angabe	2
[13]	4,4-5	keine Angabe	2
[128]	6,1	keine Angabe	2
[105]	5,8- 6,2	keine Angabe	2

Tab. 5: **Literaturvergleich der Pigmentzusammensetzung isolierter 6-Chlorophyll PS II-RC.**
Die Werte wurden mittels HPLC-DAD Analyse erhalten.

Der relative auf 2 Phe bezogene Chl-Gehalt der hier isolierten und analysierten RC lag bei $6,0 \pm 0,2$. Er liegt sehr gut im Bereich der oben aufgeführten „neueren“ Literaturwerte. Die hier gefundene, nur geringe Abweichung von 0,2 Molekülen Chlorophyll ist ein Indiz dafür, dass die hier verwendeten Reaktionszentren weitgehend frei von überschüssigem Chl sind. Der in der Literatur gefundene höhere Chlorophyllgehalt von $\sim 6,5$ pro 2 Phe ist vermutlich auf geringe Verunreinigungen mit exogenen Chl zurückzuführen. Die hier gefundenen Werte belegen auch, dass die Extraktion und kalibrierte HPLC-DAD Analyse zu mit der Literatur vergleichbaren Ergebnissen führt (siehe hierzu Kapitel A.2.2.1). Dieses muss nicht immer der Fall sein, wie die Werte in Tab. 5 zeigen. Der Chlorophyllgehalt der in [13;28] analysierten Reaktionszentren ist deutlich niedriger als der tatsächlich im PS II-RC vorhandene. Diese Werte reflektieren u.a. auch eine unvollständige oder unsachgemäße Probenextraktion und/oder Analyse (die Probleme bei der Probenextraktion und der Auswertung wurden im Kapitel C.1.2 näher beschrieben).

D Diskussion

Anders die Interpretation des Carotingehalts (Tab. 5): Hier schwankt die Anzahl der Carotine zwischen eins und zwei. Der Carotingehalt ist flexibel: Je nach Vorbehandlung der RC kann dieser zwischen 1 und 2 Molekülen variieren [17]. Die Werte >2 sind weitgehend auf Fehler in der Auswertung und/oder Probenvorbereitung zurückzuführen, da der bei PS II-RC erwartete Carotingehalt bei 2 Carotinen pro 2 Pheophytinen liegt. Bisher konnte aber noch keine Erniedrigung des Carotingehalts von PS II-RC auf Werte <1 gesehen werden, was auf eine hoch- und eine weniger- affine Bindungsstelle für Carotine im PS II-RC hinweist. Biochemische Untersuchungen konnten bereits sehr früh zeigen, dass der Carotingehalt nativer PS II-RC bei 2 Molekülen β -Carotin pro 2 Pheophytinen liegt [18]. Er ist gegenüber dem Gehalt an Carotinoiden pupurbakterieller RC um eins erhöht [10;130]. Der Gehalt an Car kann aber je nach Isolationsprozedur stark variieren. Diese Schwankungen konnten auf unterschiedliche Konzentrationen und/oder Inkubationszeiten von TX-100 während der Präparation zurückgeführt werden. Hierbei bewirkte eine Erhöhung und/oder eine Verlängerung der Einwirkungszeit eine Erniedrigung des Carotingehalts isolierter 6-Chl PS II-RC [96;97]. Die gleichen Untersuchungen haben zeigen können, dass ein veränderter Carotingehalt die Stabilität und Aktivität der PS II-RC nicht beeinflusst. [97]

In der vorliegenden Arbeit wurden nicht nur 6-Chl PS II-RC, sondern auch Chl abgereicherte PS II-RC, sogenannte 5-Chlorophyll-Reaktionszentren (5-Chl PS II-RC), verwendet. Diese wurden von Vacha nach seiner Methode isoliert [66] und für Rekonstitutionsversuche zur Verfügung gestellt (Kapitel C.4). Die Pigmentstöchiometrie solcher 5-Chl PS II-RC wurde mit der hier verwendeten Analysemethode bestimmt (Kapitel C.4.2.1) und ergab eine Pigmentzusammensetzung von 4,8-5,3 Molekülen Chl und 1,1-1,3 Molekülen Car pro 2 Pheophytine. Sie entspricht den für diese RC publizierten Daten von 5,1-5,2 Molekülen Chlorophyll und 0,83-1,1 Carotin pro 2 Pheophytine [66;94].

Es konnte gezeigt werden, dass die hier verwendeten Reaktionszentren des Photosystems II (sowohl die 5- als auch die 6-Chlorophyll Reaktionszentren) in ihrer Protein- und Pigmentzusammensetzung rein vorlagen, d.h. keine Verunreinigungen im Rahmen der Messgenauigkeit detektiert werden konnten. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die hier verwendeten RC mit den in der Literatur beschriebenen vergleichbar sind.

2 Austausch von Kofaktoren im 6-Chl PS II-RC

Die in Kapitel C.3 vorgestellten Versuche (Überblick der gefundenen Pigmentstöchiometrien in Tab. 6) zeigten, dass es möglich war, ein Chl gegen ein chemisch modifiziertes Pigment zu ersetzen. Es konnte aber auch gezeigt werden, welche Kriterien ein Pigment zu erfüllen hat, um in das PS II-RC eingebaut zu werden.

Ergebnisse der Austauschversuche an „6-Chlorophyll“ Reaktionszentren mit modifiziertem Pigment:

Pigment	Pigmentgehalt nach Austausch (pro 2 Phe)		
	Chl	Car	Pigment
Chlorophyll a (Chl)	6,2±0,4	1,2±0,1	0
[Zn ²⁺]-Chlorophyll a (Zn-Chl)	4,7±0,2	1,2±0,2	4,0±0,5
[Zn ²⁺]-Methylchlorophyllid a (Zn-Me-Chlid)	4,8±0,1	1,4±0,1	3,0±0,4
[Ni ²⁺]-Chlorophyll a (Ni-Chl) ^[1]	4,9±0,3	1,4±0,1	0,6±0,2
Chlorophyll a (Chl) ^[1]	5,7±0,2	1,4±0,1	0
[3-Acetyl]-chlorophyll a (Ac-Chl)	5,2±0,2	1,6±0,1	0,8±0,2
[3-Acetyl]-chlorophyll a (Ac-Chl) ^[2]	4,8±0,2	1,7±0,1	1,7±0,1
[3-Acetyl]-desmethoxycarbonylchlorophyll a (Ac-Py-Chl)	4,6±0,1	1,4±0,1	0,7±0,1
Bakteriochlorophyll a (BChl)	5,8±0,2	1,4±0,1	0
[3-Vinyl]-bakteriochlorophyll a (Vi-BChl)	6,1±0,1	1,1±0,1	0
Protochlorophyll a (Proto-Chl)	6,1±0,1	1,4±0,1	0,5±0,1

^[1] Mit HPLC-System II analysiert; ^[2] Doppelaustauschexperiment.

Tab. 6: Pigmentstöchiometrien der mit unterschiedlich modifizierten Chlorophyllen behandelten 6-Chlorophyll Reaktionszentren und dessen Kontrollexperiment (inkubiert mit Zusatz von Chl) ermittelt durch HPLC-DAD Analyse.

Die Werte sind auf einen Pheophytin Gehalt von zwei normiert und stellen den Mittelwert über jeweils drei unabhängige HPLC- Analysen dar.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Chlorophyll a (Chl) gegen [Ni²⁺]-Chlorophyll a (Ni-Chl), [3-Acetyl]-chlorophyll a (Ac-Chl) sowie [3-Acetyl]-desmethoxycarbonylchlorophyll a (Ac-Py-Chl) (Kapitel C.3.2) ausgetauscht wird. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Pigment austausch mit [Zn²⁺]-Chlorophyll (Zn-Chl) und [Zn²⁺]-Methylchlorophyllid (Zn-Me-Chlid) sowie der zweifach durchgeführte Austausch mit Ac-Chl zwar zur Erniedrigung des Chlorophyllgehalts in PS II-RC führte, aber insgesamt eine Erhöhung des Gehalts an Tetrapyrrolpigmenten (Kapitel C.3.1) mit sich bringt. Der Pigmentaus-

D Diskussion

tausch mit Proto-Chlorophyll (als Vertreter der Porphyrine), Bakteriochlorophyll *a* und [3-Vinyl]-bakteriochlorophyll *a* (als Vertreter der Bakteriochlorine) führte zu keinem Ersatz eines nativen PS II-RC Pigments (Kapitel C.3.3). Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefasst. Die Daten zeigen, dass der Einbau von nicht-nativ vorhandenen Pigmenten, je nach Pigment, zu einem guten, mittleren oder keinem Einbau in das PS II-RC führte. In Abb. 50 sind die oben angeführten Ergebnisse in der chemischen Strukturformel farbkodiert zusammengetragen.

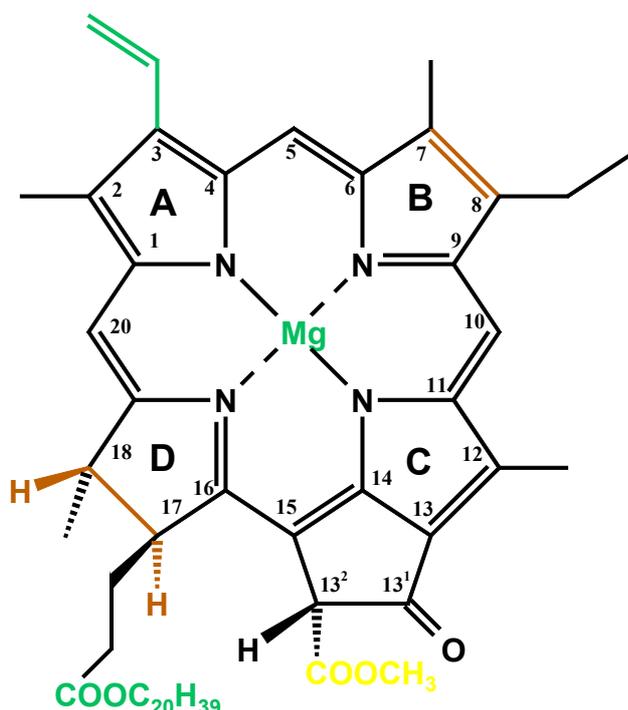


Abb. 50: **Strukturformel von Chlorophyll *a*. Die farbig markierten Bereiche deuten die Akzeptanz der modifizierbaren Bindungstasche innerhalb des PS II-RC an.**

Grün: volle, gelb: mittlere und rot keine Akzeptanz der Bindungsstelle gegenüber Modifikationen in diesen Bereichen. Die Namen der Pigmente sind der Abb. 16 und Tab. 2 zu entnehmen.

Die in Abb. 50 *grün* gekennzeichneten Bereiche sollen andeuten, dass Veränderungen an dieser Pigmentstelle das Bindevverhalten der Proteintasche nicht beeinträchtigt. Es war möglich, Mg^{2+} gegen Ni^{2+} oder Zn^{2+} zu ersetzen, wobei Ni-Chl in stöchiometrischen Mengen und Zn-Chl im Überschuss gebunden wird (C.3.1). Das Vorhandensein des Phitylrests ($-COOC_{20}H_{39}$) scheint hierbei unwesentlich zu sein (Kapitel C.3.1.1). Veränderungen an der Peripherie, v. a. an C-3 führten auch zum Einbau des entsprechenden Pigments (Ac-Chl). Die *gelben* Bereiche zeigen die Stelle am Pigment, die verändert nur einen partiellen Einbau erlaubt (Ac-Py-Chl). Die *rote* Kennzeichnung

markiert die Stellen des Pigments, an denen keine Modifikationen vorgenommen werden dürfen. Demnach verlangt die Bindungsstelle eine Chlorin-Ringstruktur und akzeptiert weder ein Porphyrin noch ein Bakteriochlorin.

2.1 „eins-zu-eins“ Austausch

Austausch mit [3-Acetyl]-chlorophyll a

Die Versuche des Kapitels C.3.2 stellen die Weiterführung des von Gall [60] entwickelten Austauschs von Ac-Chl in das PS II-RC dar. Möglich war dies durch die im Rahmen der Arbeit eingeführte Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation zur Aufreinigung des Austauschansatzes (siehe Kapitel C.3.1.1.1). Die Wiederauffindungsrate aktiver Reaktionszentren wurde deutlich von etwa 30-40 % bei Gall [60] auf nun 70-95 % erhöht.

Diese Optimierung ermöglichte es, Doppelaustauschexperimente an PS II-RC durchzuführen (C.3.2.2). Die HPLC-Daten des Einfachaustauschs (=1x Austausch), (C.3.2.1 und Tab. 5) zeigten, dass ein Chl gegen 0,8 Moleküle Ac-Chl ersetzt wurde. Die Anzahl der Tetrapyrrolpigmente des Austausch- und des Kontrollexperiments blieb gleich. Die Aktivität der einmal inkubierten Reaktionszentren war gegenüber unbehandelten RC um etwa 30 % erniedrigt, wobei die Anwesenheit von Ac-Chl keinen zusätzlichen Aktivitätsverlust bewirkte. Weitere Messungen zeigten, dass das Pigment im RC gebunden vorliegt. Diese RC wurden einer nochmaligen Inkubation unterzogen (Doppelaustausch (=2x-Austausch), Kapitel C.3.2.2). Ziel war es, eine möglichst homogene Besetzung der Bindungsstellen innerhalb des Reaktionszentren zu erhalten. Die Versuche zum Austausch der Kofaktoren an pb-RC zeigten, dass erst nach zweimaliger Inkubation ein vollständiger Austausch (Austauschrate ~99 %) erreicht werden konnte [52].

Die HPLC-DAD Analyse (Tab. 6) der nochmals mit Ac-Chl behandelten Reaktionszentren zeigte, dass die Anzahl der Chlorophylle nach Doppelaustausch nur geringfügig von 5,2 (1x Austausch) auf 4,8 (2x Austausch) reduziert, jedoch die Anzahl der vorhandenen Ac-Chl von 0,8 (1x Austausch) auf 1,7 (2x Austausch) deutlich erhöht wurde. Die Anzahl an Tetrapyrrolpigmenten war sowohl gegenüber dem Einfachaustausch als auch gegenüber dem Kontrollexperiment (zweifach mit Chl behandeltem RC) deutlich erhöht. Aufgrund der Fluoreszenzdaten ist es sehr wahrscheinlich, dass der Über-

D Diskussion

schuss an Ac-Chl ähnlich wie bei Zn-Chl (s.u.) gebunden vorliegt. Die Aktivitäten der zweimal inkubierten Proben (des Austausch- und des Kontrollexperiments) waren deutlich geringer und lagen hier bei einer Restaktivität von 45 % verglichen mit der nativer RC, wobei die Ursache hierfür die zweifache Inkubation bei erhöhter Temperatur zu sein scheint – und nicht die Anwesenheit von nicht-nativem Pigment.

Die Ergebnisse des Doppelaustauschs zeigen, dass es unter den hier verwendeten Austauschbedingungen nicht möglich ist, Proben von besserer Qualität (aktive RC mit einer hohen Austauschrate) zu erhalten. Die mehrmalige Inkubation führt zwar zu einer nochmaligen Reduktion des Chlorophyllgehalts, erhöht aber auch gleichzeitig den Gehalt an Ac-Chl, wobei sich die Pigmentstöchiometrie des Komplexes ändert. Bei diesen Versuchen konnte kein Hinweis gefunden werden, dass im PS II-RC durch mehrmalige Inkubation mehr als ein Chl konzertiert verdrängt werden kann. Die mehrmalige Inkubation führt hingegen zu stark destabilisierten RC.

Entgegen den oben beschriebenen Beobachtungen zum Doppelaustausch von modifizierten Chlorophyllen im PS II-RC konnten Germano et al. zeigen [64;65], dass sie durch mehrmalige Inkubation der PS II-RC in Anwesenheit von modifizierten Pheophytinen einen deutlich höheren Ersatz der nativen Phe detektierten, wobei die photochemische Aktivität fast vollständig erhalten blieb. Sie postulierten hierbei Austauschraten von 100 % beim inaktiven Phe (D2-Phe) und 50 % beim aktiven Phe (D1-Phe) [64], wobei letzteres vor allem im zweiten Austausch eingeführt wurde.

Austausch mit [3-Acetyl]-Demethoxycarbonyl-Chlorophyll a

Der Austauschversuch mit [3-Acetyl]-desmethoxycarbonylchlorophyll a (Ac-Py-Chl) (Kapitel C.3.2.3) zeigte, dass etwa 0,7 Moleküle Ac-Py-Chl unter Erhalt der Aktivität, eingebaut wurden (siehe Kapitel C.3.2.3). Es zeigte sich jedoch, dass mehr Chl verdrängt als Ac-Py-Chl gebunden wurde, denn die Anzahl an Tetrapyrrolpigmenten war nach dem Experiment erniedrigt. Eine Erniedrigung des Tetrapyrrolgehalts könnte dadurch geschehen, dass durch eine konzertierte Aktion zwar ein Chl durch ein Ac-Py-Chl ersetzt wird, letzteres aber nicht dauerhaft gebunden bleibt. Die Versuche zeigen aber klar, dass ein Austausch stattgefunden hat.

Bisher gab es noch keine Komplexe, bei denen ein Einbau von sog. „Pyro“-pigmenten (den 13²-Demethoxycarbonyl (Bakterio)Chlorophyllen siehe Abb. 16, Tab. 2) gelungen

D Diskussion

ist. Entsprechende Austauschversuche an pb-RC [78] und an der POR [131] führten zu keinem Ergebnis. Aufgrund dieser negativen Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass das Vorhandensein einer Carboxymethylgruppe an C13² für die Pigment-Proteinbindung wichtig zu sein scheint, wobei sich die Unterschiede der Pyro-pigmente zu den (B)Chlorophyllen dadurch ergeben, dass bei ersteren der große Rest an C13² fehlt. Der Tetrapyrrolring verändert seine Ringkonjugation, da die Enolisierung verhindert ist. Bisher konnten jedoch noch keine abschließenden Aussagen über die Notwendigkeit dieser Kriterien für die Bindung an Proteinkomplexen gemacht werden. In Chlorosomen kommen Pyro-Pigmente (BChl d und e) nahezu ausschließlich vor, jedoch sind das nahezu proteinfreie Komplexe. Das hier vorliegende Ergebnis ist somit der erste Pigment-Protein-Komplex in dem eine Pyro-Pigment ausgetauscht werden konnte.

Die Ergebnisse des Kapitel C.3.2.3 zeigen, dass durch die Inkubation von PS II-RC in Anwesenheit von Ac-Py-Chl mehr Chlorophylle verdrängt als modifizierte Pigmente gefunden werden. Dieses bedeutet, dass der Austausch gelingt, aber die Bindung von Ac-Py-Chl innerhalb der Bindungstasche weniger stabil als bei den übrigen getesteten Pigmenten ist, da diese wahrscheinlich in der Aufreinigung teilweise wieder aus der Bindungstasche gelöst werden. Die verbliebenen Ac-Py-Chl Pigmente liegen aber, laut der gefundenen spektroskopischen Daten, innerhalb des PS II-RC gebunden vor.

Austausch mit [Ni²⁺]-Chlorophyll a

Die Daten der mit Ni-Chl durchgeführten Austauschversuche zeigten (siehe Tab. 6 und C.3.1.2), dass Ni-Chl in PS II-RC eingebaut werden kann, wobei die Gesamtanzahl an Tetrapyrrolpigmenten in etwa konstant blieb (7,5 vs. 7,7 im Kontroll-experiment). Die spektroskopischen Daten zeigen, dass Ni-Chl unter Erhalt der Aktivität in das PS II-RC integriert ist. Es zeigt sich, dass die mit Ni-Chl modifizierten RC gegenüber dem Kontroll-RC eine um 20 % reduzierte Fluoreszenz besitzen. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, denn Ni-Chl baut sehr effizient Energie strahlungslos ab [132], weshalb eine erhebliche Reduktion erwartet wurde. Die nur partielle Fluoreszenzlöschung könnte aufgrund der Inhomogenität der Probe (Austauschrate >60-80 %) auftreten, da noch etwa 20-40 % nativen Pigmentgehalt aufweisen. Um diese Frage zu klären, wurden Rekonstitutionsversuche unternommen. Die Rolle des Ni-Chl in der Energieäquilibrierung wird dort wie auch in Kapitel D.5, in dem besonders auf die im angeregten Zustand ablaufenden Prozesse eingegangen wird, diskutiert.

Austausch mit [Zn²⁺]-Chlorophyll a und [Zn²⁺]-Methylchlorophyllid a

Die Versuche des Kapitel C.3.1.1 (Austausch mit Zn-Chl und Zn-Me-Chlid) zeigten, dass nach Inkubation mit Zn-Chl (bzw. Zn-Me-Chlid) ein Chl gegen Zn-Chl (Zn-Me-Chlid) ersetzt wurde, wobei aber deutlich mehr Zn-Chl (Zn-Me-Chlid) im Reaktionsansatz vorhanden war, als Chl verdrängt wurde. Der Austausch beider Pigmente Zn-Chl und Zn-Me-Chlid erbrachte sehr ähnliche Ergebnisse (Tab. 6) (siehe Versuche mit Zn-Me-Chlid, Kapitel C.3.1.1), weshalb das Vorhandensein eines Phytylrests (-CO₂C₂₀H₃₉) für den Austausch dieser Pigment unwichtig erscheint.

Es ist bekannt, dass der Austausch von [Mg]-(Bakterio)Chlorophyll gegen [Zn²⁺]- (Bakterio)Chlorophyll funktioniert (siehe u.a. [111]). In den entsprechenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die jeweiligen Komplexe nicht zwischen Mg und Zn diskriminieren. Der Austausch von Mg-(B)Chl gegen Zn-(B)Chl gelang unter anderen bei bakteriellen und pflanzlichen Lichtsammelkomplexen (Antennen) [51;55], bei den pb-RC [52] sowie der Protochlorophyllid-Oxidoreductase POR [133;134], wobei die Funktionen der Komplexe erhalten blieben.

Die in Kapitel C.3.1.1 beschriebenen Versuche führten, wie oben erwähnt, zu RC mit erhöhter Tetrapyrrolzahl [52;55]. Dieses konnte bei den mit Zn-Chl (und Derivaten) durchgeführten Versuchen reproduzierbar gesehen werden. Hierbei wurden nach Aufreinigung des Inkubationsansatzes in einem PS II-RC etwa 5 Chl und 4 Zn-Chl pro 2 Phe gefunden. Die Gesamtanzahl der Tetrapyrrolpigmente war somit deutlich erhöht. Sie stieg dabei von etwa 8 auf 11 (bzw. von 8 auf 10 im Falle des Zn-Me-Chlid). Die Bindung von Pigmentaggregaten konnte ausgeschlossen werden, da diese in der Regel (aber nicht immer, vgl. [135]) eine starke Rotverschiebung im Absorptionsspektrum zeigen, die allerdings in den Experimenten nicht beobachtet wurde (C.3.1). Der Anstieg von Tetrapyrrolpigmenten nach Inkubation von PS II-RC mit Zn-Pigmenten entspricht weitgehend dem von Gall et al. gefundenen Ergebnis [60;59], die nach Austauschversuchen mit Zn-Chl an PS II-RC eine Erhöhung der Anzahl an Tetrapyrrolpigmenten von etwa 8 auf 12 detektierten. Als möglich Ursache führten Gall et al. eine ungenügende Aufreinigung an. Diese Ursache konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Die Versuche zur Optimierung der Aufreinigung der Austauschansätze (Kapitel C.3.1.1) zeigten, dass eine verbesserte Aufreinigung diesen Pigmentüberschuss nicht

D Diskussion

entfernen kann. Es zeigte sich, dass mehrere Bemühungen zur Aufreinigung des Austauschansatzes nicht zur Abtrennung der überschüssigen Zn-Chl führen (Kapitel C.3.1.1.1). Deshalb kann eine Bindung der Pigmente an das RC nicht ausgeschlossen werden. In allen den hier durchgeführten Versuchen konnte eine konstante Zahl an überschüssigem Zn-Pigment gefunden werden (Tab. 6), was eine spezifische, d.h. gleichartige Bindung als wahrscheinlich erscheinen lässt. Des Weiteren konnte das Vorliegen von freiem Pigment durch die durchgeführten Fluoreszenzmessungen (Kapitel C.3.1.1.2) ausgeschlossen werden. Die Erhöhung der Tetrapyrrolanzahl zeigte sowohl auf die Form und Lage der CD-Spektren (Signale) als auch auf die photochemische Aktivität der PS II-RC keinen Einfluss.

Bisher ist keine solche spezifische Bindung von externen Pigmenten (v. a. von Zn-(B)Chl) an (Bakterio)Chlorophyll-bindenden Proteine bekannt (siehe u.a. [52;55;136]). Auffällig ist hier vor allem die Präferenz der Bindungsstellen oder -domänen des Proteins von Zink-Chlorophyllen gegenüber nativer Magnesiumchlorophylle, denn bei den analog durchgeführten Kontrollversuchen konnte keine Erhöhung der Anzahl an Tetrapyrrolpigmenten gesehen werden (Tab. 6 und Kapitel C.3).

Da bisher nur niedrig aufgelöste Kristallstrukturen vom Photosystem II existieren [4;5], kann an dieser Stelle über die Lage und die Natur dieser „Zn-Chl Bindungsstelle“ keine Aussage gemacht werden kann. Ein Hinweis über mögliche Bindungsstellen könnte die mittlerweile hochaufgelöste Röntgenstruktur des Photosystem I erbringen [3]. Aufgrund der hohen Auflösung konnte gesehen werden, dass die Chlorophylle über die Aminosäuren Histidin und Methionin sowie über ligandierende Sauerstoffatome aus vorhandenem Wasser gebunden werden. Es konnte erstmalig gesehen werden, dass ein Chl durch die Kopfgruppe eines fest an das Protein gebundenen Lipids gebunden (ligandiert) wird [3]. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht mehr möglich theoretische Arbeiten über potentielle Bindungsstellen an den Proteinen des PS II-RC durchzuführen, weshalb diese Frage ungeklärt bleiben muss. Andere Arbeiten, wie z.B. die Diplomarbeit von M. von Jan über die Bindungsmotive von (B)Chl an bakteriellen und pflanzlichen Pigmentproteinkomplexen (Botanisches Institut der LMU München), könnten dabei zur Aufklärung dieser Frage herangezogen werden. Die Ergebnisse aus der Arbeit werden in Kürze veröffentlicht.

2.2 Kein Austausch

Inkubation mit Bakteriochlorophyll a und [3-Vinyl]-bakteriochlorophyll a

Mit der verbesserten Aufreinigungsmethode und der verfeinerten Analytik wurde versucht, Bakteriochlorophyll a (BChl) in das PS II-RC einzutauschen. Die Ergebnisse des Austauschs sind in Tab. 5 dargestellt und sie zeigen, dass es nicht möglich war, den Pigmentgehalt von Reaktionszentren zu verändern. Der Austausch eines Chl gegen ein BChl ist so nicht möglich. Gleiches wurde bereits von Gall [60] gezeigt, der aber noch geringe Mengen an BChl (0,8 Moleküle pro 2 Pheophytine) detektierte. Diese Austauschversuche wurden durch die Verwendung von [3-Vinyl]-bakteriochlorophyll a (Vi-BChl) komplementiert, welches in der Konjugation dem BChl und in den Seitengruppen dem Chl entspricht (vgl. Abb. 16, Tab. 2). Die nach dem Versuch erhaltenen Daten (Kapitel C.3.3.1 und Tab. 5) zeigen auch hier, dass nach der Inkubation Reaktionszentren mit unveränderter Pigmentstöchiometrie wiedergefunden wurden. Der Vergleich der mit BChl und mit Vi-BChl durchgeführten Versuche zeigt, dass beide Pigmente nicht in der Lage sind, ein Chl aus der Bindungstasche zu verdrängen und dieses in einer konzertierten Aktion zu ersetzen. Folglich ist die Konjugation des Tetrapyrrolringes ein wichtiges Kriterium für die Akzeptanz der Bindungsstelle, wohingegen die Beschaffenheit der Seitengruppe an C-3 (Abb. 50) unwichtig ist. Dies wird dadurch bestätigt, dass der Austausch eines anderen C-3 substituierten Chlorophylls (Ac-Chl, siehe oben) funktioniert. Dieses Ergebnis ist komplementär zu den mit pb-RC gefundenen Ergebnissen. Diese diskriminieren ebenfalls zwischen Chlorinen und Porphyrinen [78;138], aber akzeptieren nur BChl. In beiden Fällen sind die Reste an der Peripherie des Ringes A variabel und die Stelle ist für den Einbau nicht entscheidend.

Inkubation mit Protochlorophyll a

Um die oben gesehene Selektion der Bindungstasche (bezüglich der elektronischen Ringstruktur) näher zu beschreiben, wurde noch das Protochlorophyll a (Proto-Chl) für den Austausch verwendet (Kapitel C.3.3.2), das bei ansonsten unveränderter Struktur zwischen C-17 und C-18 eine Doppelbindung mehr als Chl hat. Die Daten der HPLC Analyse (Tab. 6) zeigten auch hier einen gegenüber dem Kontroll-RC unveränderten Pigmentgehalt. Hier konnte, jedoch im Gegensatz zu den Versuchen mit Bakteriochlorinen, eine Erhöhung der Anzahl an Tetrapyrrolpigmenten gesehen werden. Es konnten etwa 0,5 Moleküle Proto-Chl (pro 2 Phe) detektiert werden. Jedoch lag das Proto-Chl nicht spezifisch gebunden vor, da es sich in den Fluoreszenzspektren

eindeutig als ungekoppelt manifestiert (Abb. 35), d.h. eine von dem nativen PS II-RC Pigmenten unabhängige Fluoreszenz zeigt. Hierin kann gesehen werden, dass die Bindungstasche des PS II-RC zwischen Chlorin und Porphyrin selektiert. Ähnliches wurde auch beim pb-RC und LH II gesehen: Beide Pigment-Protein-Komplexe binden keine Porphyrine. *Vice versa* konnte bisher auch noch kein Chlorin in die Porphyrinbindende POR eingebaut werden. Eine weitgehende flexible Bindungsstelle (gegenüber Chlorin und Porphyrin) zeigt das Apo-Myo- und Hämoglobin. Hier konnte sowohl ein Chlorin als auch eine Porphyrin in die Bindungsstelle integriert werden [139;140].

3 Rekonstitution der 5-Chl PS II-RC

Die in Kapitel C.4 vorgestellten Versuche zur Pigmentrekonstitution von chlorophyll-armen Reaktionszentren (5-Chl PS II-RC) mit Chlorophyll *a* (Chl) und ausgewählten modifizierten Chlorophyllen zeigen, dass das Wiederauffüllen mit Pigment gelingt. Die Rekonstitution gelang im wesentlichen unter gleichen Bedingungen wie beim Austausch der Kofaktoren (siehe Kapitel C.4.2). Die nach HPLC-DAD-Analyse der rekonstituierten Proben erhaltenen Daten sind in Tab. 7 zusammengefasst.

Ergebnisse der Rekonstitutionsversuche von „5-Chlorophyll“ Reaktionszentren mit nativen und modifizierten Pigment:

Pigment	Pigmentgehalt nach Rekonstitution (pro 2 Phe)			
	Chl	Car	Pigment	Tetrapyrrolpigmente
ohne ^[1]	5,2±0,2	1,2±0,2	0	7,2±0,2
Chlorophyll <i>a</i>	6,2±0,4	1,1±0,2	0	8,2±0,4
[Ni ²⁺]-Chlorophyll <i>a</i> ^[2]	5,3±0,2	1,2±0,1	0,8±0,1	8,1±0,3
[3-Acetyl]-chlorophyll <i>a</i>	5,1±0,2	1,1±0,1	0,5±0,2	7,6±0,4
[Zn ²⁺]-Chlorophyll <i>a</i>	5,1±0,2	1,1±0,1	4,0±0,5	11,1±0,7

^[1] Der Versuch diente als Kontrollexperiment; ^[2] mit HPLC-System II ermittelt.

Tab. 7: Pigmentstöchiometrien der mit unterschiedlich modifizierten Chlorophyllen behandelten 5-Chlorophyll Reaktionszentren und dessen Kontrollexperiment (inkubiert ohne Zusatz Pigment) ermittelt durch HPLC-DAD Analyse.

Die Werte sind auf einen Pheophytin Gehalt von zwei normiert und stellen den Mittelwert über jeweils drei unabhängige HPLC- Analysen dar.

D Diskussion

In allen vier Fällen wurde nach der Rekonstitution Reaktionszentren mit erhöhtem Gehalt an Tetrapyrrolpigmenten gefunden. Es zeigte sich, dass alle ausgewählten Pigmente (Chl, Ni-Chl, Ac-Chl und Zn-Chl) von der Bindungstasche des PS II-RC akzeptiert werden. Ein Austausch eines der in den 5-Chl PS II-RC noch vorhandenen Chlorophylle ist offensichtlich nicht möglich, da in keinem Fall der Einbau eines neuen Pigments detektiert werden konnte. Der Chlorophyllgehalt blieb bei allen Versuchen gleich (Ausnahme ist die Rekonstitution mit Chl, dort wurde der Chlorophyllgehalt erhöht). Es zeigte sich vielmehr, dass das zusätzliche Pigment in die leere Bindungsstelle rekonstituiert wurde. Dieser Prozess scheint gegenüber einem zusätzlichen Austausch favorisiert. Nach der Rekonstitution mit nativen Chl und Ni-Chl konnte eine fast vollständige Besetzung der vormals leeren Bindungstaschen detektiert werden, wobei in den Reaktionszentren zwischen 0,8 und 1,0 Moleküle (pro 2 Phe) zusätzliches Pigment vorhanden war. Im Gegensatz hierzu verlief die Rekonstitution mit Ac-Chl weniger effektiv: Es konnten lediglich 0,5 Ac-Chl pro 2 Phe detektiert werden. Das Experiment mit Zn-Chl führte auch hier (vgl. D. 2) zu einer starken Erhöhung der Gesamtzahl an Tetrapyrrolpigmenten durch den gefundenen Überschuss an Zn-Chl (4,0 Zn-Chl pro 2 Phe).

Die Rekonstitution und der Austausch von Pigmenten an 5-Chl bzw. 6-Chl PS II-RC gleichen sich, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass mit beiden Verfahren das gleiche Chlorophyll verändert wird. Dies heißt, dass der Extraktions- und der Austauschbindungsstelle gleich sind, und zwar dort, wo eines der peripheren Chl über Histidin 118 an die D1-Untereinheit des PS II-RC gebunden ist.

Untersuchungen zur Aktivität zeigten, dass die 5-Chl Kontroll-RC während der Temperaturbehandlung stark degradieren. Sie verloren knapp die Hälfte ihrer ursprünglichen Aktivität (bezogen auf unbehandelte RC) und besaßen danach nur noch eine Restaktivität von 55 %. Die mit Pigment versetzten und temperaturbehandelten Reaktionszentren zeigten hingegen eine weitaus geringere Deaktivierung, wobei die Restaktivität je nach zugesetztem Pigment zwischen 78 und 90 % lag. Hierbei konnten Abhängigkeiten der noch vorhandenen photochemischen Aktivität mit dem Besetzungsgrad der Bindungstasche gesehen werden, denn bei Anwesenheit von 0,8 Molekülen Chl bzw. Ni-Chl (Tab.7, C.4.2.1 und C.4.3.1) konnte eine Restaktivität von 90 % gefunden werden. Auch für die mit Zn-Chl rekonstituierten RC wurde eine Restaktivität von 85 % detektiert, obwohl 4 Zn-Chl gebunden wurden (C.4.3). Die Restaktivität der nur mit 0,5

D Diskussion

Molekülen Ac-Chl besetzten rekonstituierten Reaktionszentren war mit Werten von 78 % zwar geringer, aber immer noch höher als die der 5-Chl PS II-RC –Präparation.

Bereits frühere Untersuchungen zur Stabilität von nativen 5-Chl PS II-RC zeigten, dass diese gegenüber nativen 6-Chl PS II-RC schneller degenerieren, wobei Faktoren wie Licht und Temperatur eine große Rolle spielen [66]. Die dort gezeigten Stabilitätsunterschiede zwischen den 5- und 6-Chl RC konnten hier bestätigt werden. Hierbei wurde festgestellt, dass der Grad der Deaktivierung von der Besetzung der Bindungstasche abhängt. Das extrahier- und wiederauffüllbare Chl könnte somit innerhalb der Reaktionszentren eine stabilisierende Funktion besitzen.

In den rekonstituierten Proben (Ausnahme Rekonstitution mit Ac-Chl-Kapitel C.4.3.2) konnte ein Absorptionenzuwachs an der kurzwelligen Flanke der Q_y -Bande (670 nm) gesehen werden, der besonders gut bei tiefen Temperaturen sichtbar war (Abb. 37 und 42). Der Zuwachs korrespondiert mit dem Wiederauffüllen der leeren Bindungsstelle des 5-Chl PS II-RC, da diesem während der Präparation mittels Cu-Affinitätschromatographie ein bei 670 nm absorbierendes Chl entfernt wurde (siehe Kapitel C.4.1 und [66]).

Dieses extrahierbare Chl wurde bisher an der Peripherie der D2-Untereinheit lokalisiert, wobei es über die Aminosäure Histidin 118 gebunden (D2-118H) und allgemein als Chl_z-D2 bezeichnet wird [66]. Aufgrund der mittlerweile erhältlichen PS II-Röntgenstruktur [4] muss dieses Bild möglicherweise revidiert werden, denn diese Bindungsstelle wird von den Proteinen des Cyt_{b559} und Psb I abgeschirmt (Abb. 2) und sollte dadurch nur schwer für die Extraktion zugänglich sein. Laut der Struktur ist es deshalb wahrscheinlicher, dass dieses Chl von der Position D1-118H extrahiert wurde, die allgemein als Chl_z-D1 bezeichnet wird. Die Abschirmung eines peripheren Chlorophylls würde auch erklären, warum bisher keine Reaktionszentren isoliert werden konnten, deren Chlorophyllgehalt niedriger als 5 Chl pro 2 Phe ist. Von einer 4 Chl PS II-RC Präparation wurde zwar berichtet [15], diese konnte aber bisher nicht verifiziert werden. Auch durch die von uns und anderen ([63-65]) durchgeführte Modifikation der PS II-RC (Austausch und Rekonstitution) konnte bisher keine Reduzierung des Chl-Gehalts auf geringere Werte als 5 Chl pro 2 Phe gesehen werden (Tab. 6 und 7, Kapitel C.3, D.2 und C.4).

D Diskussion

Die Integrität des hinzugekommenen Pigments wurde durch die Aufnahme von Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren (Abb.39, siehe hierzu auch Kapitel C.1.4) und durch Messung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute bestätigt (C.4.2.2 und C.4.3.2). Die Daten der mit Ni-Chl rekonstituierten RC werden gesondert in Kapitel D.5 besprochen.

Die CD-Spektren der mit Chl rekonstituierten Komplexe zeigten gegenüber denen des Kontroll-RC (und auch gegenüber eines nativen RC (Abb.15)) nur geringfügige Unterschiede in der Lage der langwelligen Extrema (Verschiebungen um nur wenige Nanometer; Abb. 38 und 43). Die Form und im wesentlichen auch die Lage der Banden entsprechen den für native PS II-RC publizierten CD-Spektren [13;110]. Der Vergleich der CD-Spektren von 5-Chl PS II-RC mit 6-Chl PS II-RC zeigte, dass das CD-Signal durch das Entfernen eines Chlorophylls nicht verändert (gestört) wird [67]. Ebenso haben die durch den Eintausch von Chlorophyllderivaten modifizierten PS II-RC das gleiche CD-Signal wie unbehandelte [59]. Lange Zeit wurde die Herkunft des Signals auf die exzitonische Kopplung zwischen den beiden Chl, die den primären Donor P680 bilden, zurückgeführt [13;110].

Aufgrund der von Zouni [4] gefundenen äquidistanten Anordnung der vier „Kern“-Chlorophylle (sie befinden sich alle in Distanzen von $\sim 10 \text{ \AA}$ zueinander) ist es jedoch wahrscheinlicher, dass die Kopplung dieser vier Pigmente von vergleichbarer Größe ist und deshalb das CD-Spektrum von diesem Ensemble bestimmt wird. Es gibt auch Hinweise darauf, dass die Pheophytine mit zum CD-Spektrum beitragen. Sie sind ebenfalls nur ca. 10 \AA von den benachbarten Chl entfernt, und die Modifikation der Pheophytine des PS II-RC bewirkte ein stark verändertes langwelliges Signal [65]. Über das Mitwirken der peripheren Chlorophylle zum CD-Signal war bisher nichts bekannt. Neuere Arbeiten hierzu werden gerade von F. Vacha vorbereitet, sind aber bislang noch nicht veröffentlicht (persönliche Mitteilung von F. Vacha). Die CD-Spektren mit den manipulierten PS II-RC zeigten, dass die äußeren Chlorophylle das Signal nicht beeinflussen. Sie bestätigen die oben aufgeführten Beobachtung, wonach die Besetzung der Bindungstasche (mit oder ohne Chl oder Chl-derivat) keinen (oder nur geringen) Effekt auf die Lage und die Form der CD-Signale hat. Weitere Ergebnisse zur Funktion dieser peripheren Chl wird in Kapitel D.5 besprochen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Rekonstitution von 5-Chl PS II-RC zeigten, dass das Wiederauffüllen der Bindungstasche sowohl mit nativen als auch mit modifizierten Pigmenten gelingt. Die Extraktion des Chl aus dieser Bindungsstelle ist somit reversibel. Die nach der Rekonstitution erhaltenen wiederaufgefüllten RC zeigten gegenüber den analog (aber ohne Zusatz von Pigment) behandelten 5-Chl PS II-RC eine erhöhte Aktivität, weshalb dem extrahierbaren (sechsten) Chl eine stabilisierende Funktion zugeschrieben werden kann. Auch könnten die periphere Chlorophylle des PSII-RC in Analogie zum gesamten PSI eine Art Antennenfunktion besitzen. Im PSI besitzen die Mehrzahl der dort gefundenen Chlorophylle Antennen und strukturbildende Funktionen und nur sechs der insgesamt 96 Chlorophyllen nehmen an den Redoxreaktionen teil [3;141].

4 Vergleich der Austausch- mit den Rekonstitutionsversuchen

Die Absorptionsspektren der durch Rekonstitution und Austausch modifizierten Reaktionszentren waren sich sehr ähnlich (z. B. Abb. 29 und 45). Dabei konnten einige der Pigmente deutlich im Absorptionsspektrum gesehen werden (vgl. Ni-Chl Austausch und Rekonstitution C.3.1.2 und C.4.3.2 oder mit Ac-Chl C.3.2 und C.4.3.3). Die Austausch- bzw. die Besetzungseffizienz von Ni-Chl und Ac-Chl war je nach verwendeten RC (5 oder 6-Chl RC) verschieden. Nur bei Inkubation mit Zn-Chl war die gefundene Erhöhung der Anzahl an Zn-Chl in beiden Versuchsgruppen identisch (Tab. 6 und 7). Der Austausch eines Chl gegen ein Ac-Chl innerhalb eines 6-Chl PS II-RC war zum Beispiel effektiver als die Rekonstitution eines 5-Chl PS II-RC mit dem gleichen Pigment. Bei erstem konnten 0,8 Moleküle Ac-Chl pro 2 Phe und bei letztem nur 0,5 Moleküle nach dem Versuch detektiert werden. Hier ist eine konzertierte Aktion (beim Austausch gegenüber der zweistufigen Extraktion (bei Präparation) und Wiederauffüllen (bei der Rekonstitution) von Vorteil. Diese Aussage gilt aber nicht bei allen getesteten Pigmenten, denn Ni-Chl zeigte bei der Rekonstitution eine etwas höhere Besetzungsrate als beim Austausch (0,8 Moleküle Ni-Chl bei der Rekonstitution (Tab. 7) gegenüber 0,6 bei dem Austausch (Tab.6)). Die Effektivität der Rekonstitution und des Austauschs muss demnach von Fall zu Fall geprüft werden.

Wie bereits mehrfach in dieser Arbeit erwähnt, ist in den Absorptionsspektren der 5-Chl PS II-RC zu sehen, dass die Absorption bei 670 nm reduziert ist. Der Austausch der Kofaktoren erzeugt auch an dieser Stelle einen Absorptionsverlust, welcher besonders

D Diskussion

gut bei den Versuchen mit Ac-Chl zu sehen ist. In beiden Fällen fehlt für die Absorption an der kurzwelligen Flanke der Q_y -Bande verantwortliche(s) Pigment(e). Als fehlendes bzw. austauschbares Pigment kommt wegen der spektralen Lage nur eines der beide peripheren Chlorophylle [94] sowie ein inaktives Pheophytin [142;30] in Frage. Zu der spektralen Lage des zweiten peripheren Chlorophylls (Ch_z -D1 oder D2) gibt es jedoch verschiedene Meinungen. Die spektrale Lage dieses Chlorophylls wird je nach Autor angegeben als 670 nm [21;143] oder 684 nm [142;144]. Auf diese Diskussion braucht aber hier nicht weiter eingegangen werden, da wie oben erwähnt nur ein Pigment modifiziert wird, und dieses bei 670 nm absorbiert. Die gefundenen Pigmentstöchiometrie, d.h. das konstante Phe zu Car-Verhältnis (Tab. 6 und 7) lässt den Austausch eines Pheophytins gegen ein Chlorophyll ausschließen. Die absorptionsspektroskopisch gefundenen Veränderungen der ausgetauschten und rekonstituierten Komplexe sind sich sehr ähnlich und rühren von dem Verlust des gleichen Chlorophylls, welches das periphere Ch_lz der D1-Proteinuntereinheit ist.

5 Energieäquilibrierung und –transfer in modifizierten PS II-RC

Um die im angeregten Zustand ablaufende Prozesse untersuchen zu können, wurden die Reaktionszentren mit Ni-Chl ausgetauscht und rekonstituiert. Es ist bekannt, dass in gekoppelten Pigmentensembles, in denen Ni-BChl inkorporiert ist, die Anregungsenergie durch innere Konversion (IC) abgebaut wird [145]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Einbau von NiBChl in das purpurbakterielle LH I ein sehr schnelles (< 100 fs) quantitatives Quenchen der Fluoreszenz bewirkt [146]. Da diese schnelle Relaxation (IC) unabhängig vom Sättigungsgrad des Tetrapyrrols ist [147], sollte der Einbau von Ni-Chl in den gekoppelten Pigmentverbund des PS II-RC die Energie ähnlich effizient vernichten. Bei den mit Ni-Chl rekonstituierten (oder ausgetauschten) PS II-RC konnten innerhalb der quantitativen Fluoreszenzmessung aber noch 75-80 % der ursprünglichen Fluoreszenz gesehen werden (Kapitel C.4.3.2 und C.3.1.2).

Fluoreszenzmessungen bei Raumtemperatur (Steady-State) haben gezeigt, dass die Pigmente des RC bei Raumtemperatur energetisch gekoppelt sind [148]. Die Interpretation der Daten beruht im wesentlichen auf dem sogenannten Multimer-Modell nach Durrant [149], welches eine sehr effiziente Kopplung aller RC-Chlorine untereinander beschreibt. Diesem Modell zufolge äquilibriert die Anregungsenergie innerhalb

D Diskussion

von 0,1 ps über alle RC-Pigmente (dem Multimer), wobei die peripheren Chl mit eingeschlossen sind. Widersprüchlich hierzu konnte in den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Fluoreszenzspektren (Kapitel C.2-C.4) sämtlicher PS II-RC-Komplexe (sowohl nativer als auch modifizierter) eine Abhängigkeit der Anregungs- bzw. Emissionsspektren von der Emissions- bzw. Anregungswellenlänge gesehen werden. Dieses widerspricht der Annahme eines vollständig gekoppelten Multimers in dem die Zeitkonstante des Energietransfers innerhalb aller gekoppelten Pigmente größer ist als die Fluoreszenzlebensdauer des Pigmentverbundes nach Anregung. Auch deutet die nur geringe Löschung der Fluoreszenz (20-25 %) nach Einbau von Ni-Chl (s.o.) darauf hin, dass diese peripheren Bindungsstellen und die übrigen Pigmente energetisch schwächer miteinander gekoppelt sind als bisher angenommen.

Unterstützt wird diese, dem Multimex-Modell widersprechende Interpretation durch die in der Röntgenstruktur von PS II [4] gesehene Pigmentanordnungen (Abb. 2 und 3). Durch die gesehene Geometrie und in Analogie zu den pb-RC können die Pigmente des PS II-RC in Kern-Pigmente (4 Chl und 2 Phe) und periphere Chl (2 Chl) eingeordnet werden. Während die Pigmente des Kerns äquidistant im Abstand von etwa 10 Å voneinander angeordnet sind, sind die peripheren Pigmente in einem Abstand von 30 Å zu diesen entfernt. Diese räumliche Trennung lässt eine vollständige Äquilibrierung der Anregungsenergie innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer unwahrscheinlich erscheinen [41].

Bereits früher haben einige Studien gezeigt, dass der Energietransfer der Kern-Pigmente zu den peripheren Chl relativ langsam (in etwa 30 ps) ist [38] und die Fluoreszenz hauptsächlich von den Kern-Pigmenten ausgeht [23;150]. So war z.B. die Fluoreszenzquantenausbeute (als Funktion der Temperatur) der 5-Chl RC und die der 6-Chl PS II-RC identisch, wodurch die An- oder Abwesenheit des sechsten Chl also keinen Einfluss darauf hat [67]. Durch Lochbrennexperimente konnte gezeigt werden, dass der für die Fluoreszenzemission zuständige elektronische Zustand in den 5-Chl und in den 6-Chl PS II-RC der gleiche ist [68].

Das isolierte RC besitzt im Gegensatz zu seinen purpurbakteriellen Verwandten eine relativ starke Fluoreszenz. Die Voraussetzung für eine hohe Quantenausbeute bei der lichtinduzierten Radikalpaarbildung *in vivo* ist ein schneller Transfer der Anregungsenergie von der lichtabsorbierenden Antenne zum und innerhalb des RCs sowie eine

D Diskussion

schnelle und irreversible Ladungstrennung. Für den Energietransfer (ET) der Kernantenne zum RC wird im PS II eine Zeit von 20-30 ps, für den ET innerhalb des RC-Kerns eine von 0,5 ps angenommen [38;151;152]. Für die Ladungstrennung wird ein mehrstufiger Prozess mit Zeitkonstanten von 8, 20, und 50 ps beschrieben [153;154]. Verglichen mit den pb-RC, in dem der primäre Ladungstransfer bis zum Bakterio-*pheophytin* innerhalb von 4 ps erfolgt [155], ist der Prozess innerhalb des PS II-RC wesentlich langsamer. Bisher gibt es aber noch keine einheitliche Interpretation der Details der im angeregten Zustand ablaufenden Prozesse. Im nachfolgenden werden drei Modelle skizziert, die die experimentell beobachteten Kinetiken des PS II-RC beschreiben sollen.

Modell 1: Die verglichen mit dem pb-RC²⁴ deutlich langsamere Ladungstrennung wird als Folge der Delokalisierung der Anregungsenergie im PS II-RC über alle nahezu isoenergetischen Pigmente beschrieben [149]. Der beobachtete vergleichbar schnelle Energietransfer von und zum Primären Donor kann hier durch die Ausbildung von sogenannten Fallenzuständen innerhalb der gekoppelten Pigmente (Kern-Pigmente) erklärt werden. Diese Fallenzustände sind Energieniveaus, welche die Energie, die eigentlich zum Donor gelangen sollte einfangen [156;157].

Modell 2: Ein anderes Modell beschreibt die gesehenen Kinetiken mit Hilfe der Thermodynamik. Der ladungstrennte und angeregte Zustand besitzen nur eine geringe (bzw. keine) Freie-Energie-Differenz (ΔG), wodurch die Triebkraft der Ladungstrennung relativ gering ist. Erst die Relaxation des Proteins (Umlagerung) bewirkt die Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der Ladungstrennung, so dass dieser Prozess vorrangig abläuft. Diese Verschiebung der Gleichgewichte garantiert auch erst eine hohe Ausbeute an Ladungstrennungen. Obwohl die beobachtete effektive Zeit der Ladungstrennung sehr groß ist, kann die intrinsische Ladungstrennungskonstante sehr klein sein [158]. Zur Beschreibung dieser Prozesse ist deshalb eine mehrphasige Kinetik notwendig.

²⁴ Die Rate der Ladungstrennung ist proportional zu der Anregungswahrscheinlichkeit des Primären Donors. Diese Wahrscheinlichkeit lässt sich als $1/N$ ausdrücken. N ist hierbei die Anzahl der Pigmente über die die Anregung verteilt ist und entspricht im PS II-RC 6 oder 8 (je nachdem ob die peripheren Chlorophylle mitgezählt werden), im pb-RC hingegen nur 1.

D Diskussion

Modell 3: Im dritten Modell [159] bilden die vier Chl und zwei Phe (die Kern-Pigmente) ein energetisch gekoppeltes Multimer. Dem Energietransfer zwischen den Pigmenten einer Proteinuntereinheit (D1 oder D2) werden Zeiten von 0,1 ps, dem zwischen den Pigmenten unterschiedlicher Proteinuntereinheiten (D1 und D2) Zeiten von 0,5 ps zugeordnet. Der Energietransfer von einem der peripheren Chl zu diesem Multimer dauert hingegen 20 ps, d.h. er ist um etwa 20 Größenordnungen langsamer. In diesem Modell bedarf es für die Ladungstrennung weniger als eine Pikosekunde. Der Elektronentransfer besitzt eine Zeitkonstante von 8 ps, und die Relaxation der Umgebung (entspricht einer Konformationsänderung des Proteins) dauert ca. 50 ps. Alle diese Prozesse stehen miteinander im Gleichgewicht und stellen quasi-isoenergetische Prozesse dar, so dass die Zeitkonstanten sehr stark von Umgebung und Temperatur abhängen.

Alle drei Modelle gehen von einer Kopplung zumindest eines Teils der RC-Pigmente (bereits im Grundzustand [23] oder im angeregten Zustand [41]) aus, wodurch mehr oder weniger schnelle energetische Prozesse ablaufen. Wie bereits oben erwähnt, konnte über das Mitwirken der peripheren Chl zu diesen Kopplungen bisher wenig ausgesagt werden. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzmessungen an modifizierten RC-Komplexen lassen sich am besten mit Modell 3 beschreiben. Wesentlich hierfür sind nicht die dort gefundenen Zeitkonstanten, sondern vielmehr das Exkludieren der peripheren Chl zu den gekoppelten Pigmenten.

Denn für eine nur geringe Energieäquilibration innerhalb aller RC-Pigmente sprechen auch die bei der routinemäßigen Aufnahme von Fluoreszenzspektren (Anregungs- und Emissionsspektren bei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert bzw. aufgenommen) beobachteten geringen wellenlängenabhängigen Abweichungen der Bandenformen (vgl. Abb. 11 und Abb. 12). Obwohl diese Abhängigkeiten bereits von Gall in seiner Arbeit [60] gesehen wurde, kann dieser Effekt erst durch die hier durchgeführten Messungen interpretiert werden. Hierzu ist der Vergleich der Fluoreszenzspektren nativer 5-Chl PS II-RC (Abb. 12) mit den nativer 6-Chl PS II-RC (Abb. 11) nützlich, der aufzeigt, dass diese Abweichungen und somit die Wellenlängenabhängigkeiten der Fluoreszenzspektren bei den 6-Chl RC stärker ausgeprägt ist als bei den 5-Chl PS II-RC. Gleiche Abweichungen konnten auch bei den Austausch- und Rekonstitutionsversuchen mit modifizierten Pigment gesehen (C.3 und C.4) werden. Zusätzlich zeigte sich, dass der Einbau modifizierter Chl keine Veränderungen in der Form und Lage der

D Diskussion

Fluoreszenzbanden der RC bewirkt (Abb. 26, 30, 39). Es scheint, dass die im angeregten Zustand ablaufenden Prozesse durch die Modifikationen nicht beeinflusst werden (beschrieben in der Sektion D.3, D.4). Des Weiteren ist die bei der Rekonstitution von 5-Chl PS II-RC mit Ni-Chl beobachtete Fluoreszenzauslöschung von nur 25 % ein weiteres Indiz dafür, dass keine vollständige Energieäquilibrierung innerhalb aller RC-Pigmente stattfindet.

Für Modell 3 und gegen Modell 1 sprechen auch die nachfolgenden Betrachtungen: Unter der Annahme des Multimer-Modells von Durrant sowie eines Förstertransfermechanismus und einer Fluoreszenzlebensdauer von 100 ps liefert die nach der Rekonstitution mit Ni-Chl beobachtete Fluoreszenzauslöschung von 25 % eine Zeitkonstante von 75 ps für den Energietransfer der peripheren Chl zu den Kern-Pigmenten. Für diesen Prozess ist bisher nur eine einzige Zeitkonstante von 30 ps [38] publiziert. Dem kann aber entgegengehalten werden, dass der fast dreifach so große Wert daher kommt, dass die hier durchgeführten Kalkulationen zu wenig exakt sind, um Zeitkonstanten beschreiben zu können. Auch kann entgegengehalten werden, dass diese Kinetik daher kommt, dass das rekonstituierte Pigment nicht mehr exakt in der gleichen Position/Orientierung in der Bindungsstelle sitzt.

Diese möglichen Entgegenhaltungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, weshalb eine exaktere Beschreibung der hier gefundenen Fluoreszenzdaten nicht möglich ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse eindeutig darauf hinweisen, dass (mindestens) eines der peripheren Chl am Energietransfer und an der Energieäquilibrierung nicht (oder nur geringfügig) beteiligt ist. Zur endgültigen Klärung der im RC ablaufenden Prozesse bedarf es jedoch einer noch besser aufgelösten Kristallstruktur sowie weiterer biochemischer und biophysikalischer Untersuchungen.

6 Stabilität und Aktivität von PS II-RC in Amphipol

Da die Amphipole hier erstmals bei isolierten PS II-RC eingesetzt wurden, mussten zuerst Bedingungen gefunden werden, unter denen ein Amphipol-Detergenz Austausch stattfindet. Hierfür wurde der Wechsel durch Verdünnen des anwesenden Detergenz unter dessen CMC bei gleichzeitiger Anwesenheit von Amphipol durch-

D Diskussion

geführt. Hierdurch kann jedoch kein vollständiger Detergenzwechsel vollzogen werden, da das ursprüngliche Detergenz im Ansatz verbleibt. Die Methode ermöglicht ein schnelles Arbeiten und dadurch eine hohe Reproduzierbarkeit, was für die Beurteilung der RC-Stabilität wichtig ist. Bisherige Erfahrungen bei der Arbeit mit Amphipolen haben gezeigt (persönliche Mitteilung J-L. Popot), dass der Detergenzaustausch besonders gut bei zwitterionischen Detergentien (wie z.B. CHAPS) unter leicht basischen Bedingungen funktioniert. Aus diesen Gründen wurden für die Versuche Reaktionszentren verwendet, welche in zwei unterschiedlichen Detergenzien (DM und CHAPS) gelöst waren und sich in Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten (7,2 und 8) befanden. Für die Versuche wurde nur ein Typ an Amphipol verwendet (A8-35, siehe Abb. 46). Diese Methode des Detergenzwechsels erwies sich auch bei den PS II-RC als erfolgreich (C.5.2). Die RC blieben bei dem vorher ermittelten Protein- zu Amphipol-verhältnis von 1 : 5 (w/w) in Lösung. Die exakten Amphipol- zu Protein-Verhältnisse müssen für jedes Protein ermittelt werden, denn diese variieren je nach Amphipoltyp und Membranprotein [85]. Ein Vergleich der Mengenverhältnisse mit den bisher getesteten Membranproteinen war deshalb nicht möglich, zumal das vergleichbare pb-RC nicht in A8-35, sondern in A8-75²⁵ solubilisiert wurde [123].

Die RC der Amphipolprobe und der Kontrollprobe wurden auf ihre Aktivität bei 4 °C und 20 °C untersucht (C.5.3.2 und C.5.3.2). Hierbei zeigte sich, dass die Anwesenheit von Amphipolen die Absorptionsspektren beeinflusst, so dass die Anwendbarkeit der Braun'sche Messgröße %P680 zur Bestimmung der Aktivität in Frage gestellt wurde. Hierzu wurden die in Kapitel C.5.3.4 vorgestellten Versuche zur Korrelation des Braun'schen Parameters % P680 und der Phe- Akkumulierungsrate durchgeführt. Die dort beschriebenen Versuche (dargestellt in Tab. 4) zeigen, dass die nach der Braun'schen Methode ermittelte Aktivität und die Messung der Phe^{*}-Akkumulierungsrate (die photochemische Aktivität) unterschiedliche Ergebnisse liefern. Die Messung der photochemische Aktivität via Phe^{*}-Akkumulierung lieferte folgende Reihung über alle RC: Die Aktivität in CHAPS war hoch, in Amphipol mittel und in DM nur gering (Tab. 4). Die Daten der spektralphotometrisch ermittelte Aktivität (%P680) zeigten folgende Reihung: Die Aktivität von Reaktionszentren in CHAPS und DM war in etwa gleich hoch und die in Amphipol nur gering.

²⁵ Amphipol A8-75 unterscheidet sich von dem hier getesteten A8-35 durch die höhere Anzahl freier Carbonsäuren am Grundgerüst, indiziert durch die Zahlen 75 bzw. 35.

D Diskussion

Bei den bisher an den PS II-RC durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss von Detergenzien auf Aktivität und Stabilität von PS II-RC wurden durch einen Detergenzwechsel keine maßgeblich veränderten Absorptionen gefunden, obwohl Form und Lage der Absorptionsbanden generell von den Umgebungsbedingungen beeinflusst werden. Somit war eine spektralphotometrische Auswertung nach Braun et al. [13] gut anwendbar [81]. Die hierbei gefundenen Differenzen zwischen der „photochemisch“ und spektroskopisch ermittelten Aktivität der untersuchten Proben weisen darauf hin, dass sich das Absorptionsspektrum in Anwesenheit von Amphipol verändert. Als Folge hierfür kann die Braun'sche Methode nicht mehr angewendet werden. Deshalb sind auch die ermittelten Werte der in den Kapiteln C.5.3.2 und C.5.3.3 vorgestellten Versuche nicht quantitativ zu werten, sondern lediglich qualitativ, d.h. es kann aus diesen Daten nur die (tendenzielle) zeitabhängige Aktivitätsentwicklung entnommen werden.

Die Versuche bei 4 °C (C.5.3.2) zeigten, dass die Aktivitätsabnahme bei den in Amphipol und CHAPS gelösten Reaktionszentren über einen Zeitraum von 15 Stunden gleich war (Abb. 48). Die Kurven der PS II-RC in CHAPS und in Amphipol zeigten dabei starke Ähnlichkeit. Anders war dies bei 20 °C. Hier unterschieden sich die Kurvenverläufe stark. Das RC verlor in Amphipol während den 15 Stunden stärker an Aktivität als die in CHAPS gelösten RC. Die temperaturabhängigen Kurvenverläufe der Amphipol solubilisierten Proben könnte durch eine Ablösung des Amphipols vom Reaktionszentrum hervorgerufen sein, was aber aufgrund der Bindungseigenschaften der Amphipole eher unwahrscheinlich ist.

Die Konzentrationen der noch anwesenden Detergentien sind im sub-CMC Bereich, so dass bei einer vollständigen Dissoziation des Komplexes das Protein präzipitieren müsste, was aber nicht beobachtet wurde. Möglicherweise liegt ein Grund für die schnellere Degradierung der RC in Amphipol bei 20 °C darin, dass sich bei dieser Temperatur die Wechselwirkungen des Amphipol mit dem Protein schneller verändern. Aus Versuchen mit Detergenz-solubilisierten Proteinen ist bekannt, dass thermische Gleichgewichtsprozesse zwischen Protein-Detergens-Micellen und freien Detergens-Micellen Proteine destabilisieren können [125]. Sollten auch Amphipol-solubilierte PS II-RC vergleichbaren Wechselwirkungen unterliegen, so könnte hiermit der beobachtete höhere Aktivitäts- bzw. Stabilitätsverlust bei 20 °C gegenüber 4 °C erklärt werden.

D Diskussion

Die Langzeitmessung zeigt, dass die zeitliche Stabilität der durch Amphipol gelösten Reaktionszentren bei 4 °C mit der von CHAPS solubilisierten vergleichbar ist. Der Vergleich der Stabilitätsentwicklung von RC in Amphipol und in DM zeigt, dass erstere weniger stark an Aktivität verlieren. In der Kombination mit den Daten der „photochemischen Aktivität“ ergibt sich somit für die Amphipol solubilisierten Proben nur gegenüber den Reaktionszentren in DM ein Vorteil. Dieses gilt nicht mehr bei 20 °C. Dort führt die Anwesenheit von Amphipol zu einer erhöhten Deaktivierung, welche selbst das Maß an Deaktivierung von RC in DM übertrifft. Somit erscheint die Verwendung von Amphipole zur RC-Stabilisierung bei 20 °C als eher ungeeignet. Unter ausschließlicher Berücksichtigung der durch die Phe^{*}-Akkumulierung erhaltenen Daten kann gesehen werden, dass die Anwesenheit geringer Mengen an Detergenz (DM oder CHAPS) auf die Aktivität der in Amphipol solubilisierten RC keinen Einfluss hat. Alle amphipolsolubilisierten RC zeigten die gleiche Aktivität (Tab. 4). Gegenzugliches konnte in den Versuchen zur Aktivität der ATPase von Amphipol-solubilisierten Präparationen gesehen werden. Dort führte die Anwesenheit einer sub-CMC-Menge an DM zu einer Aktivitätserhöhung [124].

Unter alleiniger Berücksichtigung der durch Phe^{*} Akkumulierung ermittelten Daten kann ebenso gezeigt werden, dass die in Amphipol solubilisierten RC zwar gegenüber den in DM solubilisierten aktiver (stabiler) sind, jedoch gegenüber den in CHAPS solubilisierten deutlich inaktiver (instabiler). Deshalb liefert der Einsatz von Amphipol gegenüber CHAPS bezüglich der Aktivität keinen Vorteil.

Die Versuche zur Stabilität von PS II-RC in Amphipol können folgendermaßen zusammengefasst werden: Grundsätzlich ist es möglich, Reaktionszentren des Photosystem II durch Amphipole in Lösung zu halten, wobei die photochemische Aktivität erhalten bleibt. Zur Solubilisierung sollte ein Protein zu Amphipol-Verhältnis von 1:5 eingehalten werden. Es konnte aber festgestellt werden, dass in Gegenwart von Amphipolen die Absorption der PS II-RC dahingehend verändert wird, dass der spektroskopisch ermittelte Braun'sche Aktivitätsparameter %P680 [13] nicht mehr zur Beurteilung der Aktivität herangezogen werden kann. Des weiteren konnte festgestellt werden, dass der Ersatz von DM gegen Amphipole von Vorteil ist, da die photochemische Aktivität verdoppelt wird. Anders ist dies bei einem Austausch von CHAPS gegen Amphipol. Dieser führt zur Halbierung der ursprünglichen Aktivität. Die Solubilisierung von PS II-RC in Amphipol ist deshalb nicht geeignet, die Aktivität von RC zu erhöhen. Der Einsatz von Amphipol könnte dann von Vorteil sein, wenn die Anwesenheit von Detergenz-Mizellen stört.

E Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die von Gall [60] entwickelte Methode des Pigment austauschs am Photosystem II Reaktionszentrum zu optimieren. Gall konnte den Pigmentgehalt der RC verändern, wobei es aber nicht gelang, ausreichende Mengen veränderter RC herzustellen, um umfangreichere biochemische und/oder spektroskopische Untersuchungen durchzuführen. Auch konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Aussagen über den Pigment austauschort bzw. die Bindungsstelle innerhalb des Photosystem II Reaktionszentrums getroffen werden.

Um ausreichende Mengen an modifizierten Reaktionszentren zu erhalten, wurde die Aufreinigung verbessert. Hierfür wurde die Chromatographie gegen die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation ersetzt. Dadurch konnte die Wiederauffindungsrate aktiver RC nach Austausch auf etwa das doppelte erhöht werden (von vormals 40-50 % auf jetzt 70-95 %). Zusätzlich wurden ein geeichtes HPLC-DAD-System zu Pigmentanalyse entwickelt, wodurch ein Vergleich der aus unterschiedlichen Experimenten ermittelten Daten möglich war.

Es konnten eine Reihe von Chlorophyll-ähnlichen Pigmenten in das RC integriert werden. Dabei wurde ein Chlorophyll *a* (Chl) gegen ein $[\text{Ni}^{2+}]$ -Chlorophyll *a* (Ni-Chl), ein [3-Acetyl]-chlorophyll *a* (Ac-Chl) sowie ein [3-Acetyl]-Demethoxycarbonyl-Chlorophyll *a* (Ac-Py-Chl) ausgetauscht. Der Austausch mit $[\text{Zn}^{2+}]$ -Chlorophyll (Zn-Chl) und $[\text{Zn}^{2+}]$ -Methylchlorophyllid (Zn-Me-Chlid) führte ebenfalls zu den Ersatz eines Chl, wobei aber die Gesamtanzahl der Tetrapyrrolpigmente erhöht wurde. Mit Porphyrinen (Protochlorophyll) und Bakteriochlorinen (Bakteriochlorophyll *a* und [3-Vinyl]-bakteriochlorophyll *a*) konnte kein Austausch festgestellt werden. Die Bindungstasche ist demnach für Pigmente zugänglich, bei denen die Peripherie und/oder das Zentralmetall verändert wurde, während das Chlorinkonjugationssystem erhalten bleiben muss.

Das System zur Modifikation der Chlorin Kofaktoren am 6-Chlorophyll Reaktionszentrum (6-Chl PS II-RC) konnte auch für die Pigmentrekonstitution (d. h. das Wiederauffüllen einer leeren Pigmentbindungstasche) von 5-Chlorophyll-Reaktionszentren (5-Chl PS II-RC, ein Chl wurde bei der Isolierung durch Kupfer-Affinitätschromatographie entfernt [67]) verwendet werden. Durch die Einführung eines nativen Chl in das RC konnte gezeigt werden, dass die Extraktion des Chlorophylls reversibel ist. Die

E Zusammenfassung

Einführung von [3-Acetyl]-chlorophyll *a*, [Ni²⁺]-Chlorophyll *a* und [Zn²⁺]-Chlorophyll *a* war möglich, wobei nur das fehlende Chlorophyll ersetzt wurde. Die Produkte der Rekonstitution und des Austauschs von Pigmenten an 5-Chl bzw. 6-Chl PS II-RC gleichen sich, sodass es sehr wahrscheinlich ist, dass mit beiden Verfahren das gleiche Chlorophyll verändert wird. Aufgrund des langsameren Energietransfers (s.u.) und der kürzlich veröffentlichten Röntgenstruktur [4] wurde dies einem peripheren Chl zugeordnet, welches über Histidin 118 an die D1-Untereinheit gebunden ist.

Es wurden Hinweise auf eine unvollständige Energieäquilibrierung zwischen den peripheren Chlorophyllen und den Pigmenten im Kern des RC (vier Chlorophylle und zwei Pheophytine) gefunden. Das hierfür stärkste Argument ist, dass die Einführung einer effizienten Energiefalle (Ni-Chl) nur ein geringes Löschen der Fluoreszenz (um 25 %) bewirkt.

Damit konnte gezeigt werden, dass eine Modifikation der Chlorophylle im PS II-RC grundsätzlich möglich ist, wobei der Austausch selektiv auf eines der sechs beschränkt war, d.h. auf ein peripheres Chl gebunden an D1 über Histidin 118. Alle Versuche, unter drastischeren Bedingungen weitere Chlorophylle auszutauschen, führten zum totalen Verlust der Probe. Dies lässt den Schluss zu, dass die weiteren Bindungsstellen mit dieser Methode nicht zugänglich sind oder diese Chl so essentiell sind, dass selbst ein konzertiertes Entfernen und Hinzufügen zu einer irreversiblen Denaturierung führt.

In dieser Arbeit wurden erstmalig eine neuartige polymere Detergenzklasse, die Amphipole, zur Solubilisierung und Stabilisierung von PS II-RC verwendet. Untersuchungen zur Aktivität und Stabilität haben gezeigt, dass die mit Amphipolen solubilisierten Reaktionszentren gegenüber denen in CHAPS keine Stabilitätsvorteile besitzen.

Literaturverzeichnis

- [1] Albertsson, P.A. (2001) A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends Biochem. Sci.*, **6**, 349-354.
- [2] Rutherford, W.A. & Faller, P. (2001) The heart of Photosynthesis in glorious 3D. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 341-344.
- [3] Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., & Krauß, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, **411**, 909-917.
- [4] Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauß, N., Saenger, W., & Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, **409**, 739-743.
- [5] Rhee, K., Morris, E., Barber, J., & Kühlbrandt, W. (1998) Three-dimensional structure of the plant system II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature*, **396**, 283-286.
- [6] Da Fonseca, P., Morris, E.P., Hankamer, B., & Barber, J. (2002) Electron Crystallographic Study of Photosystem II of the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Biochemistry*, **41**, 5153-5167.
- [7] Hankamer, B., Morris, E., Nield, J., Carne, A., & Barber, J. (2001) Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II. *FEBS Lett.*, **504**, 142-151.
- [8] Youvan, D.C., Bylina, E.J., Alberti, M., Begusch, H., & Hearst, J.E. (1984) Nucleotide and deduced polypeptide sequences of the photosynthetic reaction center, B870 antenna and flanking polypeptides from *Rhodospseudomonas capsulata*. *Cell*, **37**, 949-957.
- [9] Williams, J.C., Steiner, L.A., Feher, G., & Simon, M.I. (1984) Primary structure of the L-subunit of the reaction center from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7303-7307.
- [10] Michel, H. & Deisenhofer, J. (1988) Relevance of the Photosynthetic Reaction Center from Purple Bacteria to the Structure of Photosystem II. *Biochemistry*, **27**, 1-7.
- [11] Stewart, D.H., Dexter, A.C., Chisholm, A., Diner, B.A., Bocian, D.F., & Brudvig, G.V. (1998) Identification of Histidine 118 in the D1 Polypeptide of Photosystem II as the Axial Ligand to Chlorophyll Z. *Biochemistry*, **37**, 10040-10046.
- [12] Barber, J. & De Las Rivas, J. (1993) A functional model of the role of Cytochrome b559 in the protection against donor and acceptor side photoinhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10942-10946.
- [13] Braun, P., Greenberg, P.M., & Scherz, A. (1990) D1-D2-Cytochrome b559 Complex from the Aquatic Plant *Spirodela oligorrhiza*: Correlation between Complex Integrity, Spectroscopy Properties, Photochemical Activity, and Pigment Composition. *Biochemistry*, **29**, 10376-10387.
- [14] Montoya, G., Yruela, I., & Picorel, R. (1991) Pigment stoichiometry of the newly isolated D1-D2-Cyt b₅₅₉ complex from higher plant *Beta vulgaris* L. *FEBS Lett.*, **283**, 255-258.

Literaturverzeichnis

- [15] Yruela, I., van Khan, P.J.M., Müller, M.G., & Holzwarth, A.R. (1994) Characterization of the D1-D2-Cyt b-559 complex containing 4 chlorophyll *a*/2 pheophytin *a* isolated with the use of MgSO₄. *FEBS Lett.*, **339**, 25-30.
- [16] Pascal, A., Telfer, A., & Robert, B. (1999) Fourier-transform resonance Raman spectra of cation carotenoid in photosystem II reaction centres. *FEBS Lett.*, **453**, 11-14.
- [17] De Las Rivas, J., Telfer, A., & Barber, J. (1993) Two coupled β -carotene molecules protect P680 from photodamage in isolated Photosystem II reaction centres. *Biochim. Biophys. Acta*, 155-164.
- [18] Eijkelhoff, C. & Dekker, J. (1997) A routine method to determine the chlorophyll *a*, pheophytin *a* and β -carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes. *Photosynth. Res.*, **37**, 69-73.
- [19] Satoh, K. Isolation and Properties of the Photosystem II Reaction Center. In: Deisenhofer, J.; Norris, J.R. (Hrsg.) *The Photosynthetic Reaction Center*, Bd. 1, Academic Press: San Diego, 1993, 289-318.
- [20] Kwa, S.L.S., Eijkelhoff, C., van Grondelle, R., & Dekker, J.P. (1994) Site-Selection Spectroscopy of the Reaction Center Complex of Photosystem II. 1. Triplet minus Singlet Absorption Difference: Search for a Second Exciton Band of P680. *J. Phys. Chem.*, **98**.
- [21] Durrant, J.R., Klug, D.R., Kwa, S.L.S., van Grondelle, R., Porter, G., & Dekker, J.P. (1995) A multimer model for P680, the primary electron donor of the photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4798-4802.
- [22] Xiong, J., Subramaniam, S., & Govindjee (1996) Modeling of the D1/D2 proteins and cofactors of the photosystem II reaction center: Implications for the herbicide and bicarbonate binding. *Prot. Sci.* **5**, 2054-2073.
- [23] Barber, J. & Archer, M.D. (2001) P680, the primary donor of the photosystem II. *J. Photochem. Photobiol. A*, **142**, 97-106.
- [24] Ruffle, S.V., Donnelly, D., Blundell, T.L., & Nugent, J.H.A. (1992) A three-dimensional model of the Photosystem II reaction center of *pisum sativum*. *Photosynth. Res.*, **34**, 287-300.
- [25] Seibert, M. Biochemical, Biophysical and Structural Characterization of the isolated Photosystem II Reaction Center Complex. In: Deisenhofer, J.; Norris, J.R. (Hrsg.) *The Photosynthetic Reaction Center*, Bd. 1, Academic Press: San Diego, 1993, 319-356.
- [26] Chapman, D.J., Gounaris, K., & Barber, J. (1989) The D1/D2/Cytochrome *b*₅₅₉ Photosystem Two Reaction Centre from *Pisum sativum* L: Isolation Characterization and Damage by Light. *Photosynthetica*, **23**, 411-426.
- [27] Eijkelhoff, C. & Dekker, J. (1995) Determination of pigment stoichiometry of the photochemical reaction center of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, **1231**, 21-28.
- [28] Nanba, O. & Satoh, K. (1987) Isolation of photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 108-112.
- [29] Tang, D., Jankowiak, R., Seibert, M., Yocum, C.F., & Small, G.J. (1990) Excited state structure and energy transfer dynamics of two different preparations of the reaction center of photosystem II: A hole burning study. *J. Phys. Chem.*, **94**, 6519-6524.

Literaturverzeichnis

- [30] Mimuro, M., Tomo, T., Nishimura, Y., Yamazaki, I., & Satoh, K. (1995) Identification of the photochemically inactive pheophytin molecule in the spinach D1-D2-cyt b559 complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **1232**, 81-88.
- [31] Nabedryk, E., Adrianambinintsoa, S., Berger, G., Leonhard, M., Mäntele, W., & Breton, J. (1990) Characterization of bonding interactions of the intermediary electron acceptor in the reaction center of photosystem II by FTIR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1016**, 49-54.
- [32] Giorgi, L.B., Nixon, P.J., Merry, S.A.P., Joseph D.M., Durrant J.R., Rivas J.D., Barber.J., Porter. G., & Klug, D.R. (1996) Comparison of primary charge separation in the photosystem-II reaction-center complex isolated from wild-type and D1-130 mutants of the cyanobacterium *Synechocystis PCC-6803*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2093-2101.
- [33] Lubitz, W., Isaacson, R.A., Okamura, M.Y., Abresch, E.C., Plato, M., & Feher, G. (1989) ENDOR studies of the intermediate electron acceptor radical-anion in photosystem II reaction centers (technical note). *Biochim. Biophys. Acta*, **977**, 227-232.
- [34] Zhou, Q., Robert, B., & Lutz, M. (1989) Protein prosthetic group-interactions in bacterial reaction centers-resonance raman spectroscopy of the reaction center of *Rhodopseudomonas viridis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **977**, 10-18.
- [35] Telfer, A., De Las Rivas, J., & Barber, J. (1991) β -Carotene within the isolated Photosystem II reaction centre: photooxidation and irreversible bleaching of this chromophore by oxidised P680. *Biochim. Biophys. Acta*, **1060**, 106-114.
- [36] Tracewell, C.A., Vrettos, J.S., Bautista, J.A., Frank, H.A., & Brudvig, G.W. (2001) Carotenoid Photooxidation in Photosystem II. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**, 61-69.
- [37] Faller, P., Pascal, A., & Rutherford, A.W. (2001) β -Carotene Redox Reactions in Photosystem II: Electron Transfer Pathways. *Biochemistry*, **40**, 6431-6440.
- [38] Schelvis, J., van Noort, P., Aartsma, H., & van Gorkom, H. (1994) Energy transfer, charge separation and pigment arrangement in the reaction center of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, **1184**, 242-250.
- [39] Xiong, J., Subramanian, S., & Govindjee (1998) A knowledge-based three dimensional model of the Photosystem II reaction center of *Clamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.*, **56**, 229-254.
- [40] Barber, J. (2002) P680: What is it and Where is it? *Bioelectrochemistry*, **55**, 135-138.
- [41] Vasil'ev, S., Orth, P., Zouni, A., Owens, T.G., & Bruce, D. (2001) Excited-state dynamics in photosystem II: Insights from the x-ray crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8602-8607.
- [42] Shuvalov, V.A., Shkuropatov, A.Ya., Kulakova, S.M., Ismailov, M.A., & Shkuropatova, V.A. (1986) Photoreactions of bacteriopheophytines and bacteriochlorophylls in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides* and *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **849**, 337-346.
- [43] Bixon, M., Jortner, J., & Michel-Beyerle, M.E. The primary charge separation in bacterial photosynthesis. What is new? In: Breton, J. and Verméglio, A. (Hrsg.) The photosynthetic bacterial reaction center II Structure, Spectroscopy, and Dynamics, Plenum Press: New York, 1992, 291-300.

Literaturverzeichnis

- [44] Friese, M., Hartwich, G., Ogorodnik, A., Scheer, H., & Michel-Beyerle, M.E. (1995) No change of primary charge separation rate on lowering the energy of P⁺B' by exchanging 13²-OH-Ni-BChl a for the accessory BChl a. *Biophys. J.*, **68**, A367.
- [45] Käss, H., Fromme, P., Witt, H.T., & Lubitz, W. (2001) Orientation and Electronic Structure of the Primary Donor Radical Cation P₇₀₀⁺ in Photosystem I: A Single Crystals EPR and ENDOR Study. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 1225-1239.
- [46] Vasil'ev, S. & Bruce, D. (2000) Picosecond Time-Resolved Fluorescence Studies on Excitation Energy Transfer in a Histidine 117 Mutant of the D2 Protein of Photosystem II in *Synechocystis* 6803. *Biochemistry*, **39**, 14211-14218.
- [47] Johnston, H.G., Wang, J., Ruffle, S.V., Sayre, R.T., & Gustafson, T.L. (2000) Fluorescence Decay kinetics of Wild-Type and D2-H117N Mutant Photosystem II Reaction Centers from *Clamydomonas reinhardtii*. *J. Phys. Chem. B*, **104**, 4777-4781.
- [48] Vavilin, D., Xu, H., & Vermaas, W. Functional *in vivo* replacement of the chlorophyll *a* by chlorophyll *b* in photosystem II of *synechocystis* sp. PCC 6803. In: *International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms*, 2001, 84.
- [49] Xu, H., Vavilin, D., & Vermaas, W. (2001) Chlorophyll *b* can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14168-14173.
- [50] Kleima, F.J., Hobe, S., Calkoen, F., Urbanus, M.L., Peterman, E.J.G., van Grondelle, R., Paulsen, H., & van Amerongen, H. (1999) Decreasing the chlorophyll *a/b* ratio in reconstituted LHCII: Structural and functional consequences. *Biochemistry* **38**, 6587-6596.
- [51] Paulsen, H., Hobe, S., & Eisen, C. Reconstitution of LHC II *in vitro* from mutant LHCP and pigment analogs. In: Argiridou-Akoyonoglou, J. H. (Hrsg.) Regulation of chloroplast biogenesis, Plenum Press: New York, 1991, 343-348.
- [52] Scheer, H. & Hartwich, G. Bacterial reaction centers with modified tetrapyrrol chromophores. In: Blankenship, R., Madigan, M. T., and Bauer, C. E. (Hrsg.) Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht 1995, 649-663.
- [53] Scheer, H. & Struck, A. Bacterial reaction centers with modified Tetrapyrrol Chromophores. In: Deisenhofer, J.; Norris, J.R. (Hrsg.) The Photosynthetic Reaction Center, Bd. 1, Academic Press: San Diego, 1993, 157-193.
- [54] Meyer, M. & Scheer, H. (1995) Reaction Centers of Rhodobacter Spheroides R26 containing C-3 acetyl and vinyl(bacterio)pheophytins at sites H_{A,B}. *Photosynth. Res.*, **44**, 55-65.
- [55] Bandilla, M. Rekonstitution der Antennen B875 und B800-B850 aus *Rhodobacter spheroides* 2.4.1 mit Eintausch chemisch modifizierter (Bakterio-)Chlorophylle. Dissertation Ludwigs-Maximilians-Universität, München, 1994.
- [56] Schubert, A., Voigt, B., Leupold, D., Beenken, W., Ehlert, J., Hoffmann, P., & Lokstein, H. (1997) Direct observation of the spectral substructure in the Q_y-absorbtion band of light harvesting complex II by nonlinear polarisation spectroscopy in the frequency domain at low temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, **1321**, 195-199.
- [57] Leupold, D., Lokstein, H., & Hoffmann, P. (1999) Structure-function relationships in the higher plant photosynthetic antenna complex LHC II as revealed by non-linear laser spectroscopy-the problem of "chlorophyll forms". *Photochem. Photobiol.*, **6**, 43-52.

Literaturverzeichnis

- [58] Fiedor, L., Scheer, H., Hunter, C.N., Tschirschwitz, F., Voigt, B., Ehlert, J., Nibbering, E., Leupold, D., & Elsaesser, T. (2000) Introduction of a 60 fs deactivation in the photosynthetic antenna LH1 by Ni-bacteriopheophytin a. *Chem. Phys. Lett.* **319**, 145-152.
- [59] Gall, B., Zehetner, A., Scherz, A., & Scheer, H. (1998) Modification of pigment composition in the isolated reaction center of photosystem II. *FEBS Lett.*, **434**, 88-92.
- [60] Gall, B. Untersuchungen zur Modifikation der Chlorin-Kofaktoren in isolierten Reaktionszentren von Photosystem II. Dissertation Ludwigs-Maximilians-Universität, München, 1997.
- [61] Shkuropatov, A., Khatypov, T., Volshchukova, T., Shkuropatova, V., Owens, T., & Shuvalov, V. (1997) Spectral and photochemical properties of borohydride-treated D1-D2-cytochrome b559 complex of photosystem II. *FEBS Lett.*, **420**, 171-174.
- [62] Gall, B., Zehetner, A., Snigula, H., Scherz, A., & Scheer, H. Towards a pigment-exchange-system for photosystem II reaction centers. In: Garab, G. (Hrsg.) *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Bd. II, Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, 1998, 1021-1024.
- [63] Shkuropatov, A.Ya., Khaypov, R.A., Shkuropatova, V.A., Zvereva, M.G., Owens, T.G., & Shuvalov, V.A. (1999) Reaction centers of Photosystem II with chemically-modified pigment composition: exchange of pheophytins with 13¹-deoxo-13¹-hydroxy-pheophytin a. *FEBS Lett.*, **450**, 163-167.
- [64] Germano, M., Shkuropatov, A.Ya., Permentier, H., Khatypov, R.A., Shuvalov, V.A., Hoff, A.J., & van Gorkom, H.J. (2000) Selective Replacement of the active and inactive pheophytin in reaction centres of Photosystem II by 13¹-deoxo-13¹-hydroxy-pheophytin a and comparison of their 6 K absorption spectra. *Photosynth. Res.*, **64**, 189-198.
- [65] Germano, M., Shkuropatov, A.Ya., Permentier, H., de Wijn, R., Hoff, A.J., Shuvalov, V.A., & van Gorkom, H.J. (2001) Pigment Organization and Their Interactions in Reaction Centers of Photosystem II: Optical Spectroscopy at 6 K of Reaction Centers with Modified Pheophytin Composition. *Biochemistry*, **40**, 11472-11482.
- [66] Vacha, F., Josephs, D.M., Durrant, J.R., Telfer, A., Klug, D.R., Porter, G., & Barber, J. (1995) Photochemistry of a five-chlorophyll reaction center of photosystem II isolated by using a Cu affinity column. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2929-2933.
- [67] Eijkelhoff, C., Vacha, F., van Grondelle, R., Dekker, J.P., & Barber, J. (1997) Spectroscopic characterization of a 5 Chl a photosystem II reaction center complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 266-274.
- [68] Den Hartog, F., Vacha, F., Lock, A., Barber, J., Dekker, J., & Völker, S. (1998) Comparison of the Excited-State Dynamics of the Five- and Six-Chlorophyll Photosystem II Reaction Center Complexes. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 9174-9180.
- [69] Dedic, R., Lovcinsky, M., Vacha, F., & Hala, J. (2000) Low-temperature absorption off-resonant hole burning spectroscopy of pheophytin a in photosystem II reaction center. *J. Lumin.*, **87-89**, 809-811.
- [70] Dedic, R., Lovcinsky, M., Vacha, F., & Hala, J. (2000) Laser-induced hole filling in reaction center of photosystem II. *J. Lumin.* **86**, 407-413.
- [71] Jankowiak, R., Rätsep, M., Picorel, R., Seibert, M., & Small, G. (1999) Excited States of the 5-Chlorophyll Photosystem II Reaction Center. *J. Phys. Chem. B*, **103**, 9759-9769.

Literaturverzeichnis

- [72] Omata, T. & Murata, N. (1983) Preparation of Chlorophyll a, Chlorophyll b and Bacteriochlorophyll a by column chromatography with DEAE-Sepharose Cl-6B and Sepharose Cl-6B. *Plant Cell Physiol.*, **24**, 1093-1100.
- [73] Mazaki, H. & Watanabe, T. (1988) Pheophytinization of Chlorophyll a and Chlorophyll a' in aqueous Acetone. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **61**, 2969-2970.
- [74] Strell, M. & Urumow, T. (1977) Neue Methoden zur Einführung von Metallen in Chlorophyll-derivate. *Liebig's Ann. Chem.*, **1977**, 970-974.
- [75] Fuhrhop, J.-H. & Smith, K.M. Laboratory Methods. In: Porphyrin and Metalloporphyrin research. Elsevier scientific publishing company: Amsterdam, 1975, 856-861.
- [76] Smith, J. & Calvin, M. (1966) Studies on the Chemical and Photochemical Oxidation of Bacteriochlorophyll. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 4500-4506.
- [77] Pennington, F.C., Strain, H.H., Svec, W.A., & Katz, J.J. (1964) Preparation and properties of Pyrochlorophyll a, Methyl-Pyrochlorophyllide a, Pyropheophytin a and Methyl-Pyropheophorbide a derived from Chlorophyll by decarbomethoxylation. *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 1418-1426.
- [78] Struck, A. Chemisch modifizierte Bacteriochlorophylle und-phäophytine in den Bindungsstellen B_{A,B} und H_{A,B} von photosynthetischen Reaktionszentren aus *Rhodobacter spheroides* R26: Pigmentsynthese, Pigmenttausch und Spektroskopie. Dissertation, Ludwigs-Maximilians-Universität, München, 1990.
- [79] Helfrich, M. Chemisch Modifikation von Chlorophyll-Vorstufen und deren Verwendung zur Charakterisierung von Enzymen der Chlorophyll-Biosynthese. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1995.
- [80] Barber, J., Chapman, D.J., & Telfer, A. (1987) Characterization of a PS II reaction centre isolated from the chloroplasts of *Pisum sativum*. *FEBS Lett.*, **220**, 67-73.
- [81] Gall, B. & Scheer, H. (1998) Stabilization of Photosystem II reaction centers: influence of bile salt detergents and low pH. *FEBS Lett.*, **431**, 161-166.
- [82] Braun, P. Pigment and Protein Conformation of The Photosystem II Reaction Center. Dissertation, The Weizman Institut of Science, Rehovot, 1993.
- [83] Lämmler U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- [84] Müller, B. Biogenese des Photosyntheseapparates der Gerste: Regulation der Assemblierung des Photosystems I und II. Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2000.
- [85] Tribet, C., Audebert, R., & Popot, J. (1996) Amphipols: Polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15047-15050.
- [86] Schagger, H. & von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, **199**, 223-231.
- [87] Tsohis, G., Psylinakis, M., Woplensinger, B., Lustig, A., Engel, A., & Ghanotakis, D. (1999) Investigation of the structure of spinach photosystem II reaction center complex. *Eur. J. Biochem.*, **259**, 320-324.

Literaturverzeichnis

- [88] Boucher, L.J. & Katz, J.J. (1967) Aggregation of Metallochlorophylls. *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 4703-4708.
- [89] Rüdiger, W. & Schoch, S. Chlorophylls. In: Goodwin, W. S. (Hrsg.) *Plant Pigments*. Bd. 1, Academic Press: New York, 1988, 2-59.
- [90] Scheer, H. Chlorophylls: Chromatographic methods for the separation of chlorophylls. In: Köst, H.-P. (Hrsg.) *Handbook of Chromatography: Plant Pigments*, Bd.1, CRC-Press: Boca Raton, 1988, 235-307.
- [91] Köst, H.-P. *Plant pigments*. CRC Press: Boca Raton, 1988, 253-255.
- [92] Jones, I., White, R., Gipps, E., & Butler, L. (1977) Estimation of zinc pheophytins, chlorophylls, and pheophytins in mixtures in diethylether or 80 % acetone by spectrophotometry and fluorometry. *Agric. Food.Chem.*, **25**, 146-149.
- [93] Urumov, T., *Metallkomplexe von Chlorophyllderivaten*, Dissertation, Technische Universität, München, 1975.
- [94] Zheleva, D., Vacha, F., Hankamer, B., Telfer, A., & Barber, J. Determination of the complex Homogeneity and Pigment Stoichiometry of Isolated PS II Reaction Centers. In: Mathis, P. (Hrsg.) *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Bd. 1, Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, 1995, 759-762.
- [95] Setlikova, E., Ritter, S., Hienerwald, R., Kopecky, J., Komenda, J., Welte, W., & Setlik, I. (1995) Purification of a Photosystem II reaction center from the thermophilic cyanobacterium using immobilized metal affinity chromatography. *Photosynth. Res.* **43**, 201-211.
- [96] Eijkelhoff, C., van Roon, H., Groot, M.L., van Grondelle, R., & Dekker, J. (1996) Purification and Spectroscopic Characterization of Photosystem II Reaction Center complexes Isolated with or without Triton X-100. *Biochemistry*, **35**, 12864-12872.
- [97] Yruela, I., Tomas, R., Sanjuan, M.L., Torrado, E., Aured, E., & Picorel, R. (1998) The configuration of β -Carotene in the Photosystem II Reaction Center. *Photochem. Photobiol.*, **68**, 729-737.
- [98] Telfer, A., He, W.-Z., & Barber, J. (1990) Spectral resolution of more than one chlorophyll electron donor in the isolated Photosystem II reaction centre complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **1017**, 143-151.
- [99] Mimuro, M., Yamazaki, I., Itoh, S., Tamai, N., & Satoh, K. (1988) Dynamics fluorescence properties of the D1-D2-cytochrome b-559 complex isolated from spinach chloroplasts: analysis by means of the time-resolved fluorescence spectra in picosecond time range. *Biochim. Biophys. Acta*, **933**, 478-486.
- [100] Booth, P.J., Crystall, B., Giorgi, L.B., Barber, J., Klug, D.R., & Porter, G. (1990) Thermodynamic properties of D1/D2cytochrome b-559 reaction centres investigated by time-resolved fluorescence measurements. *Biochim. Biophys. Acta*, **1016**, 141-152.
- [101] Kwa, S.L.S., Newell, W.R., van Grondelle, R., & Dekker, J.P. (1992) The reaction center of Photosystem II studied with polarized fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1099**, 193-202.
- [102] van Dorssen, R.J., Breton J., Plijter, J.J., Satoh, K., van Gorkom, H.J., & Ames, J. (1987) Spectroscopic properties of the reaction center and of the 47 kDa chlorophyll protein of the photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, **893**, 267-274.

Literaturverzeichnis

- [103] Kühlbrandt, W. (1994) Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHC-II. *Struct. Biol.*, **4**, 519-528.
- [104] Zucchelli, G., Garlaschi, F.M., Croce, R., Bassi, R., & Jennings, R.C. (1995) A Stepanov relation analysis of the steady-state absorption and fluorescence spectra in the isolated D1/D2/cytochrome *b*-559 complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **1229**, 59-63.
- [105] Gounaris, K., Chapman, D.J., Booth, P., Crystall, B., Giorgi, L.B., Klug, D.R., Porter, G., & Barber, J. (1990) Comparison of the D1/D2/cytochrome *b*559 reaction centre complex of photosystem two isolated by two different methods. *FEBS Lett.*, **265**, 88-92.
- [106] Klimov, V.V., Klevanik, A.V., Shuvalov, V.A., & Krasnovsky, A.A. (1977) Reduction of Pheophytin in the primary light reaction of photosystem II. *FEBS Lett.*, **82**, 183-186.
- [107] Chapman, D.J., Gounaris, K., & Barber, J. (1988) Electrontransportproperties of the isolated D1-D2-cytochrome *b*-559 photosystem II reaction center. *Biochim. Biophys. Acta*, **933**, 423-431.
- [108] Noguchi, T., Tomo, T., & Inoue, Y. (1998) Fourier Transform Infrared Study of the Cation Radical of P680 in the Photosystem II Reaction Center: Evidence for Charge Delocalization on the Chlorophyll Dimer. *Biochemistry*, **37**, 13614-13625.
- [109] Scherz, A. & Rosenbach-Belkin, V. (1989) Comparative study of optical absorption and circular dichroism of Bacteriochlorophyll oligomers in Triton-X100, the antenna pigment B850, and the primary donor P-860 of photosynthetic bacteria indicates that all are similar dimers of Bacteriochlorophyll *a*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1505-1509.
- [110] Montoya, G., Cases, R., Rodriguez, R., Aures, M., & Picorel, R. (1994) Detergent-Induced Reversible Denaturation of the Photosystem II Reaction Center: Implication for the Pigment Protein Interactions. *Biochemistry*, **33**, 11798-11804.
- [111] Helfrich, M., Schoch, S., Schäfer, W., Ryberg, M., & Rüdiger, W. (1996) Absolute configuration of protochlorophyllide *a* and substrate specificity of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2606-2611.
- [112] Helfrich, M., Schoch, S., Lempert, U., Cmiel, E., & Rüdiger, W. (1994) Chlorophyll Synthetase Cannot Synthesize Chlorophyll A'. *Eur. J. Biochem.*, **219**, 267-275.
- [113] Hartwich, G., Scheer, H., Aust, V., & Angerhofer, A. (1995) Absorption and ADMR studies on bacterial photosynthetic reaction centers with modified pigments. *Biochim. Biophys. Acta*, **1230**, 97-113.
- [114] Beese, D. Untersuchung zur Modifikation der Bakteriochlorophyll-Chromophore in bakterielle photosynthetischen Reaktionszentren. Dissertation, Ludwigs-Maximilians-Universität, München, 1989.
- [115] Krasnovsky, A.A. & Bystrova, M.I. (1980) Self-assembly of Chlorophyll aggregated structures. *Biosystems*, **12**, 181-194.
- [116] Katz, J.J., Shipman, L.L., Cotton, T.M., & Janson, T.R. Chlorophyll aggregation: Coordination interactions in Chlorophyll monomers, dimers and oligomers. In: Dolphin, D. (Hrsg.), Academic Press: New York, 1978, 402-458.
- [117] Scherz, A. & Parson, W.W. (1984) Oligomers of Bacteriochlorophyll and Bacteriopheophytin with spectroscopic properties resembling those found in photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **766**, 653-665.

Literaturverzeichnis

- [118] Gottstein J. & Scheer H. (1983) Long-wavelength-absorbing forms of bacteriochlorophyll a in solutions of Triton X100. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2231-2234.
- [119] Catucci, L. & Agostiano, A. Studi di Autoaggragazione di Clorofille in Sistemi Biomimetici. Dissertation, Università degli Studi, Bari, 1998.
- [120] Agostiano, A., Catucci, L., Colafemmina, G., & Scheer, H. (2001) Role of functional groups and surfactant charge in regulating chlorophyll aggregation in micellar solutions. *J. Phys. Chem. B*, **106**, 1446-1454.
- [121] Seibert, M., Picorel, R., Rubin, A.B., & Conolly, J.S. (1988) Spectral, Photophysical, and Stability Properties of Isolated Photosystem II Reaction Center. *Plant Physiol.* **87**, 303-306.
- [122] Yruela, I., Tomas, R., Alfonso, M., & Picorel, R. (1999) Effects on the pH on the absorption spectrum of the isolated D1-D2-cytochrome *b559* complex of photosystem II. *J. Photochem. Photobiol. B*, **50**, 129-136.
- [123] Tribet, C., Audebert, R., & Popot, J.-L. (1997) Stabilization of Hydrophobic Colloidal Dispersions in Water with Amphiphilic Polymers: Application to Integral Membrane Proteins. *Langmuir*, **13**, 5570-5576.
- [124] Champeil, P., Menguy, T., Tribet, C., Popot, J.-L., & le Maire, M. (2000) Interaction of Amphipoles with Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.*, 18623-18637.
- [125] Tang, D., Jankowiak, R., Seibert, M., & Small, G.J. (1991) Effects of detergent on the excited state structure and relaxation dynamics of the photosystem II reaction center: A high resolution hole burning study. *Photosynth. Res.*, **27**, 19-25.
- [126] Ikeuchi, M. & Inoue, Y. (1988) Partial characterization of the iodination site in D1 protein of manganese-retaining and manganese-depleted photosystem-II membranes. *Plant Cell Physiol.*, **29**, 695-705.
- [127] Irrgang, K.D., Shi, L.X., Funk, C., & Schröder, W.P. (1995) A nuclear-encoded subunit of the photosystem II reaction center. *J. Biol. Chem.*, **270**, 17588-17593.
- [128] Kobayashi, M., Maeda, H., Watanabe, T., Nakane, H., & Satoh, K. (1990) Chlorophyll a and β -carotene content in the D1/D2/cytochrome b-559 reaction center complex from spinach. *FEBS Lett.*, **260**, 138-140.
- [129] Konermann, L., Yruela, I., & Holzwarth, A. (1997) Pigment Assignment in the Absorption Spectrum of the Photosystem II Reaction Center by Site-Selection Fluorescence Spectroscopy. *Biochemistry*, **36**, 7498-7502.
- [130] Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., & Michel, P. (1984) X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å (ångström) resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Mol. Biol.*, **180**, 385-398.
- [131] Klement, H., Helfrich, M., Oster, U., Schoch, S., & Rüdiger, W. (1999) Pigment-free NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase from *Avena sativa* L. *Eur. J. Biochem.*, **265**, 862-874.
- [132] Kobayashi, T., Straub, K.D., & Rentzepis, P.M. (1979) Energy relaxation mechanism in Ni(II), Pd(II), Pt(II), Zn(II) Porphyrins. *Photochem. Photobiol.*, **29**, 925-931.

Literaturverzeichnis

- [133] Schoch, S., Helfrich, M., Wiktorsson, B., Sundqvist, C., Rüdiger, W., & Ryberg, M. (1995) Photoreduction of Zinc-protopheophorbide b with NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase from etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.). *Eur. J. Biochem.*, **229**, 291-298.
- [134] Scheumann, V., Ito, H., Tanaka, A., Schoch, S., & Rüdiger, W. (1996) Substrate specificity of chlorophyll(ide) b reductase in etioplasts of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Eur. J. Biochem.*, **242**, 163-170.
- [135] Gottstein, J., Scherz, A., & Scheer, H. (1993) Bacteriochlorophyll aggregates in positively charged micelles. *Biochim. Biophys. Acta*, **1183**, 413-416.
- [136] Lapouge, K., Näveke, A., Robert, B., Scheer, H., & Sturgis, J.N. (2000) Exchanging cofactors in the core antennae from purple bacteria: Structure and properties of Zn-Bacteriopheophytin containing LH1. *Biochemistry*, **39**, 1091-1099.
- [137] Rutherford, A.W. (2001) Photosystem I: Both sides now. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 411.
- [138] Struck, A., Beese, D., Cmiel, E., Fischer, M., Müller, A., Schäfer, W., & Scheer, H. Modified bacterial reaction centers: 3. Chemically modified chromophores at sites B_A, B_B and H_A, H_B. In: Michel-Beyerle, M. E. (Hrsg.) Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria, Springer: Berlin, 1990, 313-327.
- [139] Zahavy, E. & Willner, I. (1996) Photoinduced electron transfer in Eosin-modified Co(II)-Protoporphyrin IX reconstituted Myoglobin and alpha-or beta-Hemoglobin subunits: Photocatalytic transformations by the reconstituted photoenzymes. *J. Amer. Chem. Soc.*, **118**, 12499-12514.
- [140] Martinsson, P., Zigmantas, D., Pascher, T., Akesson, E., & Sundström, V. (1999) Ultrafast dynamics of excited Zn-myoglobin and Zn-porphyrin in solution. *unpublished*.
- [141] Kühlbrandt, W. (2001) Chlorophylls galore. *Nature*, **411**, 896-899.
- [142] Konerman, L. & Holzwarth, A.R. (1996) Analysis of the Absorption Spectrum of Photosystem II Reaction Centers: Temperature Dependence, Pigment Assignment, and Inhomogeneous Broadening. *Biochemistry*, **38**, 829-842.
- [143] Merry, S.A.P., Kumazaki, S., Tachibani, Y., Josephs, D.M., Porter, G., Yoshihara, K., Barber, J., Durrant, J.R., & Klug, D.R. (1996) Sub-picosecond Equilibration of Excitation Energy in Isolated Photosystem II Reaction Centers Revisited: Time-Dependent Anisotropy. *J. Phys. Chem. B*, **100**, 10469-10478.
- [144] Chang, H.-C., Jankowiak, R., Reddy, N.R.S., Yocum, C.F., Picorel, R., Seibert, M., & Small, G.J. (1994) On the Question of the Chlorophyll a Content of the Photosystem II Reaction Center. *J. Phys. Chem.*, **98**, 7725-7735.
- [145] Hartwich, G., Friese, M., Scheer, H., Ogradnik, A., & Michel-Beyerle, M.E. (1995) Ultrafast internal conversion in 13²-OH-Ni-bacteriochlorophyll in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R26. *Chem. Phys.*, **197**, 423-434.
- [146] Fiedor, L., Leupold, D., Teuchner, K., Voigt, B., Hunter, C.N., Scherz, A., & Scheer, H. (2001) Excitation Trap Approach to Analyze Size and Pigment-Pigment Coupling: Reconstitution of LH 1 Antenna of *Rhodobacter sphaeroides* with Ni-Substituted Bacteriochlorophyll. *Biochemistry*, **40**, 3737-3747.
- [147] Rodriguez, J., Kirmaier, C., & Holten, D. (1989) Optical properties of Metalloporphyrin excited states. *J. Amer. Chem. Soc.*, **111**, 6500-6506.

Literaturverzeichnis

- [148] Freiberg, A., Timpmann, K., Moskalenko, A.A., & Kuznetsova, N.Y. (1994) Pico- and nanosecond fluorescence kinetics of the Photosystem II reaction centre and its complex with CP47 antenna. *Biochim. Biophys. Acta*, **1184**, 45-53.
- [149] Durrant, J.R., Hastings, G., Josephs, D.M., Barber, J., Porter, G., & Klug, D.R. (1992) Subpicosecond equilibration of excitation energy in isolated photosystem II reaction centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11632-11636.
- [150] Barter, L.M.C., Bianchiotti, M., Jeans, C., Schilstra, M.J., Hankamer, B., Diner, B.A., Barber, J., Durrant, J.R., & Klug, D.R. (2001) Relationship between Excitation Energy Transfer, Trapping, and Antenna Size in Photosystem II. *Biochemistry*, **40**, 4026-4034.
- [151] Roelofs, T.A., Kwa, S.L.S., van Grondelle, R., Dekker, J.P., & Holzwarth, A.R. (1993) Primary Processes and Structure of the Photosystem-II Reaction Center. 2. Low-Temperature Picosecond Fluorescence Kinetics of a D1-D2-cyt-b-559 Reaction Center Complex Isolated by Short Triton Exposure. *Biochim. Biophys. Acta*, **1143**, 147-157.
- [152] Rech, T., Durrant, J.R., Joseph, D.M., Barber, J., Porter, G., & Klug, D.R. (1994) Does slow energy transfer limit the observed time constant for radical pair formation in photosystem II reaction centers? *Biochemistry*, **33**, 14768-14774.
- [153] Greenfield, S.R., Seibert, M., Govindjee, & Wasielewski, M.R. (1997) Direct Measurements of the Effective Rate Constant for Primary Charge Separation in Isolated Photosystem II Reaction Centers. *J. Phys. Chem. B*, **101**, 2251-2255.
- [154] Wasielewski, M.R., Johnson, D.G., Seibert, M., & Govindjee (1989) Determination of the primary charge separation rate in isolated photosystem II reaction centers with 500 fs time resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 524-528.
- [155] Breton, J., Martin, J.L., Petrich, J., Migus, A., & Antonetti, A. (1986) The absence of a spectroscopically resolved intermediate state P^+B^- in bacterial photosynthesis. *FEBS Lett.*, **209**, 37-43.
- [156] Groot, M.-L., Petermann, J.G., van Khan, P.J.M., van Stokkum, I.H.M., Dekker, J.P., & van Grondelle, R. (1994) Temperature-Dependent Triplet and Fluorescence Quantum Yields of the Photosynthetic Reaction Center Described in a Thermodynamic Model. *Biophys. J.*, **67**, 318-330.
- [157] Groot, M.-L., van Mourik, F., Eijkelhoff, C., van Stokum, I.H.M., & Dekker, J.P. (1997) Charge separation in the reaction center of the photosystem II studied as a function of temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4389-4394.
- [158] Konermann, L., Gatzert, G., & Holzwarth, A.R. (1997) Primary Processes and Structure of the Photosystem II Reaction Center. 5. Modeling of the Fluorescence Kinetics of the D1-D2-cyt-*b*₅₅₉ Complex at 77 K. *J. Phys. Chem. B*, **101**, 2933-2944.
- [159] Dekker, J.P. & van Grondelle, R. (2000) Primary charge separation in Photosystem II. *Photosynth. Res.*, **63**, 195-208.
- [160] Peterman, E., van Amerongen, H., van Grondelle, R., & Dekker, J. (1998) The nature of the excited state of the reaction center of photosystem II of green plants: A high-resolution fluorescence spectroscopy study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6128-6133.
- [161] Prokhorenko, V.I. & Holzwarth, A.R. (2000) Primary Processes and Structure of the Photosystem II Reaction Center: A Photon Echo Study. *J. Phys. Chem. B* **104**, 11563-11578.

Literaturverzeichnis

- [162] Finzi, L., Elli, G., Zucchelli, G., Garlaschi, F., & Jennings, R. (1998) Long wavelength absorption transitions in the D1/D2/cytochrome b-559 complex as revealed by selective pigment photobleaching and circular dichroism measurements. *Biochim. Biophys. Acta*, **1366**, 256-264.
- [163] Stepanov, B.I. (1957) Universal relationship between absorption and luminescence spectra of complex molecules. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.*, **112**, 839-841.
- [164] Matysik, J., Gast, P., van Gorkom, H.J., Hoff, A.J., & de Groot, H.J.M. (2000) Photochemically induced nuclear spin polarization in reaction centers of photosystem II observed by ^{13}C -solid-state NMR reveals a strongly asymmetric electronic structure of the P680^+ primary donor chlorophyll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9865-9870.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andrea Christine Zehetner
Geburtsdatum/-ort 11.05.1971 in Hausham
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit Österreich

Schulbildung

1977-1981 Grundschule Aschau im Chiemgau
1981-1990 Ludwig-Thoma-Gymnasium Prien am Chiemsee

Hochschulbildung

11/90-02/97 Studium der Chemie
an der Ludwigs-Maximilians-Universität München
Abschluss: Diplom Chemikerin
09/97-08/00 Promotionsstudium Biologie
an der Ludwigs-Maximilians-Universität München

Berufstätigkeit

08/97-04/02 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Department I (Botanisches
Institut) der Ludwigs-Maximilians-Universität München
seit 10/02 Patentanwaltskandidatin

