

Biologische Sonnenenergienutzung durch photosynthetische Wasserspaltung

Von Gernot Renger*

Die Spaltung von Wasser durch Sonnenlicht in Sauerstoff und metabolisch gebundenen Wasserstoff bei der Photosynthese ist von zentraler Bedeutung für die Existenz höher organisierter Lebewesen auf der Erde. Die Realisierung dieses Prozesses in biologischen Organismen ermöglichte es nicht nur, das riesige Wasserreservoir unseres Planeten als Substrat für die Sonnenenergie zu nutzen, sondern führte zugleich auch zur Bildung einer aeroben Atmosphäre. Der so bereitgestellte Sauerstoff ist ein Reagens, das einen energetisch äußerst effizienten Nährstoffumsatz bewirkt. In den letzten Jahren sind beträchtliche Fortschritte im Verständnis der funktionellen und strukturellen Organisation der photosynthetischen Wasserspaltung erzielt worden. Dieser Beitrag versucht, einen Überblick über unsere heutigen Vorstellungen zu geben, wobei der Schwerpunkt auf Aspekten der Realisierung eines Teilschrittes der Wasserspaltung in biologischen Systemen liegt: der Wasseroxidation zu O_2 .

1. Einleitung

Die Bedeutung der Sonnenenergie als Voraussetzung für die Existenz der Biosphäre wurde bereits 1845 von *R. J. Maier* erkannt und von *L. Boltzmann*^[1] 1886 im Sinne der Thermodynamik richtig interpretiert und wie folgt formuliert:

„Der allgemeine Lebenskampf ist daher nicht ein Kampf um die Grundstoffe, auch nicht um die Energie, welche in Form von Wärme, leider unwandelbar in jedem Körper reichlich vorhanden ist, sondern ein Kampf um die Entropie, welche durch den Übergang von der heißen

Sonne zur kalten Erde disponibel wird. Diesen Übergang möglichst auszunutzen, breiten die Pflanzen die unermeßlichen Flächen ihrer Blätter aus und zwingen die Sonnenenergie in noch unerforschter Weise, ehe sie auf das Temperaturniveau der Erdoberfläche herabsinkt, chemische Synthesen auszuführen, von denen man in unseren Laboratorien noch keine Ahnung hat.“

Der zweite Teil der Boltzmannschen Formulierung kann erheblich relativiert werden, da in den vergangenen hundert Jahren beträchtliche Fortschritte im Verständnis der Prinzipien der biologischen Sonnenenergienutzung erzielt wurden. Das Grundprinzip der funktionellen und struktu-

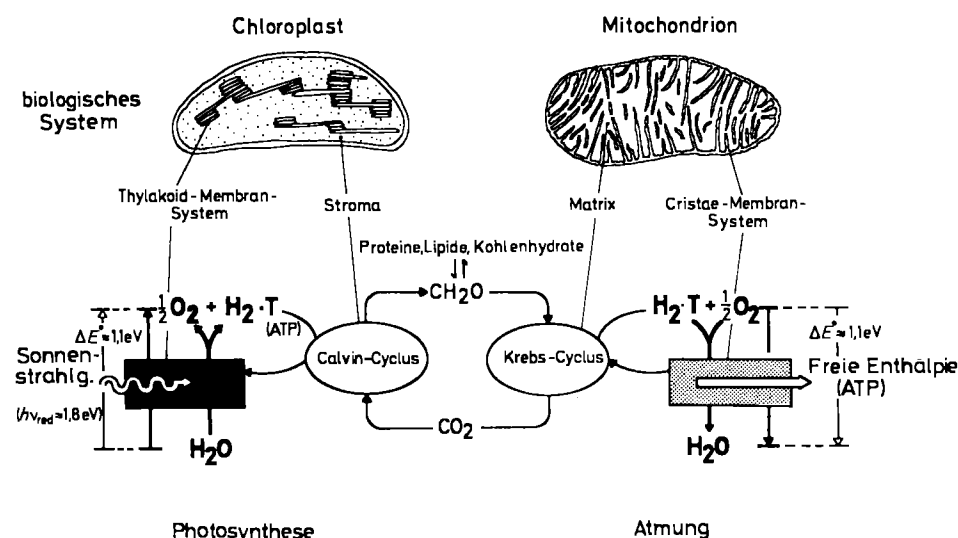


Abb. 1. Gesamtorganisationsschema der Bioenergetik höherer Lebewesen (der Übersichtlichkeit halber sind die Energiedifferenzen nicht maßstabsgerecht gezeichnet). Die bioenergetisch entscheidenden Prozesse sind durch einen schwarzen (Primärprozesse der Photosynthese) oder einen grauen (Atmungskette) Kasten symbolisiert. Die komplexen Anabolismen und Katabolismen, die zum Auf- bzw. Abbau allen biologischen Materials führen, sind zur Vereinfachung nur durch Pfeile gekennzeichnet, da sie für die Bioenergetik nicht die gleiche zentrale Bedeutung haben wie die Primärprozesse der Photosynthese und der Atmungskette (Übersicht siehe [4]). – Abkürzungen: T = Metabolit, an welchem Wasserstoff chemisch gebunden ist; im Falle der Chloroplasten ist T = NADP⁺ (Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat), im Falle der Mitochondrien repräsentiert $H_2 \cdot T$ mehrere Formen gebundenen Wasserstoffs (z. B. NADH, Succinat). CH_2O symbolisiert einen Kohlenhydratbaustein.

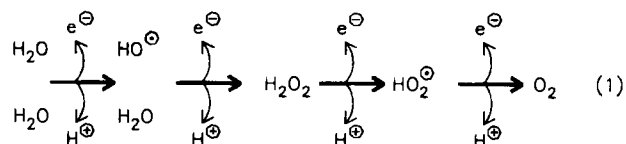
[*] Prof. Dr. G. Renger
Max-Volmer-Institut für Biophysikalische und Physikalische Chemie
der Technischen Universität Berlin
Straße des 17. Juni 135, D-1000 Berlin 12

rellen Organisation der bioenergetischen Prozesse in allen höheren Lebewesen ist in Abbildung 1 dargestellt. Der evolutionsgeschichtlich entscheidende Schritt der biologi-

schen Sonnenenergienutzung war die „Erfindung“ eines Systems zur photolytischen Wasserspaltung, die vor zwei bis drei Milliarden Jahren auf der Stufe der Cyanobakterien gelang. Damit wurde nicht nur das gewaltige Wasserreservoir der Erdoberfläche als Rohstoff für die komplexe Chemie metabolisch gebundenen Wasserstoffs verfügbar, sondern zugleich die bis dahin anaerobe Erdatmosphäre mit O_2 angereichert^[2]. Dies ermöglichte über die oxidative „Verbrennung“ der Nährstoffe eine nahezu zehnfach intensivere Ausnutzung des Gehalts an Freier Enthalpie und schuf damit die Voraussetzung für die Entwicklung hochorganisierter heterotropher Organismen (Übersicht siehe ^[3]). Die komplexe Vielfalt enzymkatalysierter Reaktionsketten, auf denen letztlich die gesamte Mannigfaltigkeit biologischer Organisationsformen der Materie beruht, ist bioenergetisch (bezogen auf die Einheit des gebundenen Wasserstoffs) weit weniger wichtig als die lichtgetriebene Wasserspaltung und die Umkehrreaktion, die Wasserbildung, die im Dunkeln in heterotrophen Organismen abläuft. Die Zelldifferenzierung höherer Lebewesen ermöglichte eine räumliche Separierung des gesamten Reaktionsgeschehens durch Kompartimentierung, wobei spezielle Organellen für bestimmte Funktionen ausgebildet wurden. Die für die Bioenergetik entscheidenden Prozesse laufen in hochorganisierten Membransystemen ab:

- a) Die photosynthetische Wasserspaltung durch sichtbares Licht findet in der Thylakoid-Membran der Chloroplasten statt (Abb. 1).
- b) Die oxidative Umsetzung von gebundenem Wasserstoff (H_2 -T) mit O_2 unter Speicherung der Freien Enthalpie in Form von ATP vollzieht sich in der Innenmembran der Mitochondrien (Abb. 1).

Aus Abbildung 1 folgt, daß Ausgangs- und Endpunkt des chemischen Globalprozesses aller höheren Organismen Reaktionen der Redoxkette $H_2 \cdot T / H_2O / O_2$ sind, wobei die „Handhabung“ des Redoxsystems H_2O / O_2 von entscheidender Bedeutung für die Realisierung der Gesamtreaktion ist. In der Redoxreaktionsfolge, die von H_2O ohne Beteiligung weiterer Komponenten zu O_2 führt [Gl. (1)], treten Zwischenprodukte auf, die rasch zur Zerstörung



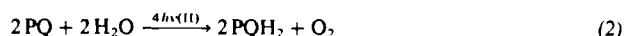
des biologischen Materials führen würden. Somit mußte die Natur spezielle Katalysatorsysteme (Enzyme) entwickeln, die einen „gefahrlosen“ Ablauf der Reaktionsfolge ermöglichen. Die Realisierung der Wasserspaltung nach Gleichung (1) erfordert Freie Enthalpie aus einer geeigneten Quelle, während die Umkehrreaktion Freie Enthalpie liefert. Daher unterscheiden sich die natürlichen Katalysatorsysteme: Die Wasseroxidation mit hinreichend stark oxidierenden Redoxäquivalenten, die durch eine Lichtreaktion unter Verbrauch Freier Enthalpie erzeugt werden, wird durch das wasseroxidierende Enzymsystem katalysiert, während die Umkehrreaktion an einem als Cytochrom-Oxidase bezeichneten Komplex abläuft.

Zur Klärung der Begriffe sei hier angemerkt, daß unter „Wasserspaltung“ der Gesamtprozeß der Zerlegung von Wasser durch Licht bei der Photosynthese verstanden werden soll. Diese Reaktion führt zu O_2 und gebundenem Wasserstoff. Mit „Wasseroxidation“ wird ein Teilschritt der Wasserspaltung bezeichnet, und zwar die Umwandlung von $2H_2O$ in O_2 , $4H^+$ und $4e^-$.

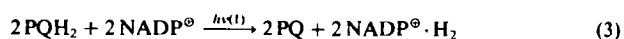
In Zeiten intensiver Überlegungen zur Lösung zivilisatorisch bedingter Energieprobleme ist es sicher reizvoll, sich mit den chemischen Reaktionen zu beschäftigen, die die Natur aus einer großen Anzahl von Möglichkeiten in einem langen Evolutionsprozeß selektiert hat, um die Sonnenenergie effektiv nutzen zu können. Im vorliegenden Beitrag sollen daher ausschließlich die Reaktionen untersucht werden, die zur Sonnenenergiespeicherung durch Wasserspaltung führen.

2. Das Organisationsschema der photosynthetischen Wasserspaltung

Die Wasserspaltung findet über eine Folge von Redoxprozessen und damit gekoppelten protolytischen Reaktionen statt, die durch zwei Lichtreaktionen energetisch angetrieben wird. Die Reaktionspartner sind anisotrop in der Thylakoid-Membran angeordnet (Übersicht siehe ^[4]). Die essentiellen Schritte der Wasserspaltung laufen im Photosystem II (PS II) ab, dessen Reaktionskette durch die Bruttogleichung (2) beschrieben werden kann (PQ symbolisiert ein Plastochinon-, PQH_2 ein Plastohydrochinonmolekül):



In der nachgeschalteten Lichtreaktion im Photosystem I wird der Wasserstoff formal von PQH_2 auf oxidiertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat ($NADP^+$) übertragen und gewinnt damit fast (bis auf 0.1 V) die Reduktionswirkung von freiem H_2 ^[4]. Für diese Reaktionsfolge im Photosystem I ergibt sich die Bruttogleichung (3):



Wegen ihrer zentralen Bedeutung für die gesamte Bioenergetik soll in diesem Beitrag die Realisierung der durch Gleichung (2) beschriebenen Reaktionsfolge in Algen und höheren Pflanzen beschrieben werden; auf die Behandlung der anderen Prozesse muß aus Platzgründen verzichtet werden (siehe ^[4]).

Die photosynthetische Wasserspaltung findet über lichtinduzierte Redoxreaktionen statt, wobei die PQ-Reduktion und die H_2O -Oxidation auch räumlich voneinander getrennt ablaufen. Entsprechend sind am Gesamtprozeß drei funktionell unterscheidbare Prozeßtypen beteiligt [Gl. (4)–(6)]:

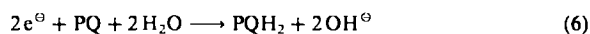
- a) Die Transformation eines durch Lichtabsorption erzeugten elektronischen Anregungszustandes in ein Elektron-Defektelektron-Paar von hinreichender Stabilität und Reduktions- bzw. Oxidationswirkung (P und A symbolisieren ein photochemisch aktives Pigment bzw. einen Elektronenacceptor; siehe Abb. 2):



- b) Die kooperative Reaktion von vier Defektelektronen (\oplus) mit H_2O :



- c) Die kooperative Reaktion von zwei Elektronen mit PQ und H_2O :



Wegen der anisotropen Anordnung der Reaktionspartner besteht der Gesamtprozeß aus vektoriellen Teilprozessen, so daß die mit den Redoxprozessen gekoppelten protolytischen Reaktionen zum Aufbau einer elektrochemischen Potentialdifferenz für Protonen führen, die zur ATP-Synthese genutzt wird (dies ist nicht Gegenstand des vorliegenden Beitrags; siehe z. B. [3,4]).

Der Ablauf chemischer Reaktionen ist nicht nur durch die direkt beteiligten Reaktanten, sondern auch durch deren Umgebung bestimmt. Biologischen Systemen steht für die Steuerung von Reaktionen durch die Umgebung ein einzigartiges Material zur Verfügung: Proteine. Ihre große Variabilität ermöglicht es ihnen, sich den Gegebenheiten praktisch ideal anzupassen, so daß nahezu jeder „gewünschte“ Grad an Spezifität, Effizienz und regulatorischer Kontrolle, die für eine spezifische biologische Funktion notwendig sind, zu erreichen ist. Um daher den Prozeß der Wasserspaltung verstehen zu können, ist es notwendig, das reaktive Verhalten der Redoxkomponenten *in situ* zu analysieren und die reaktiven Gruppen zusammen mit der Proteinmatrix als Funktionseinheiten aufzufassen. Dies bedeutet, daß für den Prozeß der Wasserspaltung die Kooperation von drei Funktionseinheiten erforderlich ist: 1) ein Photogenerator zur lichtinduzierten Ladungsseparierung, 2) das wasseroxidierende Enzymsystem und 3) das Plastochinon-reduzierende Enzym. Damit ergibt sich das formal auf die Stöchiometrie eines O_2 -Moleküls bezogene Bruttoorganisationsschema der photosynthetischen Wasserspaltung im Photosystem II (Abb. 2). Die Funktionsprinzipien des Reaktionszentrums und des Plastochinon-

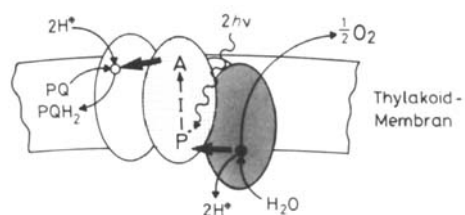


Abb. 2. Prinzipielles Organisationsschema der photosynthetischen Wasserspaltung in der Thylakoid-Membran. Die im Text näher beschriebenen Funktionseinheiten sind durch unterschiedliche Tönung gekennzeichnet: Reaktionszentrum (punktirt), wasseroxidierendes Enzymsystem (dunkelgrau) und Plastochinon-reduzierendes Enzym (hellgrau). Dicke Pfeile symbolisieren den Elektronentransportweg im System, weiße und schwarze Kreise den katalytischen Wirkort für die PQ-Reduktion [siehe Gl. (6)] bzw. die H_2O -Oxidation [siehe Gl. (5)]. Der Anregungsenergietransfer von den Pigment-Protein-Komplexen, die als Antennen wirken, zum Reaktionszentrum ist der Übersichtlichkeit halber weggelassen worden (siehe Abb. 3). – Abkürzungen: P^* = photochemisch aktives Pigment im elektronisch angeregten Singulettzustand [$P = P680$, siehe Text und Gl. (4)], I = intermediäre Redoxkomponente(n) (I enthält Pheo, siehe Text), A = Elektronenacceptor für die „stabile“ Ladungsseparierung (als solcher wirkt ein speziell gebundenes Plastochinon-molekül Q_A , siehe Text).

reduzierenden Proteins wurden bereits auf der Stufe der photosynthetisierenden Bakterien etabliert, die leicht oxidierbare Verbindungen als Substrat verwenden (Übersicht siehe [5]). Entscheidend für die Realisierung der Wasserspaltung zur biologischen Sonnenenergienutzung waren daher zwei Schritte: 1) eine geeignete Modifizierung des Reaktionszentrums, so daß hinreichend stark oxidierende Redoxäquivalente gebildet werden, 2) die „Erfindung“ eines wasseroxidierenden Enzymsystems. Wir wollen deshalb in diesem Beitrag den Mechanismus der Wasseroxidation und dabei speziell die „Handhabbarkeit“ des Redoxsystems H_2O/O_2 eingehender behandeln, während die Bildung von Wasserstoff und seine Bindung als PQH_2 vergleichsweise knapp dargestellt sind.

3. Der Reaktionszentrenkomplex im Photosystem II

Die Umwandlung von Licht in elektrochemische Nutzarbeit findet in allen Photosyntheseorganismen in speziellen Pigment-Protein-Komplexen statt, die als Reaktionszentrenkomplexe bezeichnet werden. Für die Wasseroxidation ist nur der Reaktionszentrenkomplex des Photosystems II essentiell, der im folgenden als RC II bezeichnet wird.

Zur optimalen Anpassung an die unterschiedliche Belichtung sind die Reaktionszentren über Anregungsenergietransfer mit Pigment-Protein-Komplexen gekoppelt, die als Antennen wirken und den optischen Einfangquerschnitt des photoaktiven Chromophors P [Gl. (4)] um mehr als zwei Größenordnungen erhöhen (Übersicht siehe [6,7]). Zugleich wird durch den Einbau von Carotinoiden, die als Triplettlöcher fungieren, bei höherer Strahlungsbelastung die Gefahr einer photodynamischen Zerstörung durch O_2 weitgehend ausgeschaltet^[8,9].

3.1. Das Organisationsschema des Reaktionszentrenkomplexes im Photosystem II

Nach Gleichung (4) muß jeder Photogenerator mindestens zwei funktionelle Gruppen enthalten: 1) einen Chromophor P , an dem der elektronisch angeregte Zustand P^* erzeugt wird, der zur Photoreaktion führt, und 2) ein Acceptorsystem A , das in einem Photoredoxprozeß ein Elektron von P^* aufnimmt und zugleich die Ladungsseparierung hinreichend stabilisiert.

Das Funktionsschema von RC II ist in Abbildung 3 dargestellt. Das photoaktive Pigment P ist in RC II ein speziell gebundenes Chlorophyll- a -Molekül^[10], das entsprechend seiner Absorptionsbande bei 680 nm als Pigment 680 ($P680$) bezeichnet wird. Es ist bislang noch nicht eindeutig geklärt, ob $P680$ monomeres Chlorophyll a (Chl) oder einen speziellen Dimerkomplex enthält, doch scheint nach Vergleichen mit anderen Reaktionszentrentypen (siehe unten) eine Dimerstruktur wahrscheinlicher zu sein^[11,12]. $P680$ wird im ersten angeregten Singulettzustand $^1P680^*$ in ≤ 1 ps photooxidiert (diese Zeit wurde indirekt aus Fluoreszenzmessungen abgeschätzt, siehe [13]). Als primärer Elektronenacceptor I wirkt wahrscheinlich ein Phäophytin- a -Molekül (Pheo). Das so gebildete Radikalienpaar [$P680^{\oplus}$ Pheo $^{\ominus}$] ist extrem instabil^[15,16]. Eine hinreichende Stabilisierung der primären Ladungsseparierung,

die zur Wasseroxidation genutzt werden kann^[17], ist nur zu erreichen, wenn das Elektron von I^{\ominus} (d.h. wahrscheinlich Pheo[⊖]) auf ein speziell gebundenes Plastochinonmolekül übergeht, das durch Q_A symbolisiert wird. Ob der (die) in Abbildung 3 mit I bezeichnete(n) intermediäre(n) Elektronenüberträger mit Pheo identisch ist (sind), oder ob sich weitere Redoxgruppen am Elektronentransport zwischen P680 und Q_A beteiligen^[18–20], bleibt noch zu klären. Q_A ist mit einem $Fe^{2\oplus}$ (high spin) komplexiert^[21,22] und kann nur als Einelektronen-Acceptor wirken^[23] (die für Chemiker interessante Möglichkeit der Stabilisierung von Semichinonstufen wird in den Abschnitten 4 und 5 etwas eingehender behandelt). Die funktionelle Rolle von $Fe^{2\oplus}$ ist noch unverstanden, doch ist nach vergleichenden Untersuchungen an Reaktionszentren von Purpurbakterien (Entfernung von $Fe^{2\oplus}$ und Ersatz durch $Zn^{2\oplus}$ und andere Kationen) wahrscheinlich die elektrostatische Ladung von $Fe^{2\oplus}$ und kaum dessen spezielle 3d-Elektronenkonfiguration wichtig für die Stabilisierung der primären Ladungsseparierung durch Q_A ^[24].

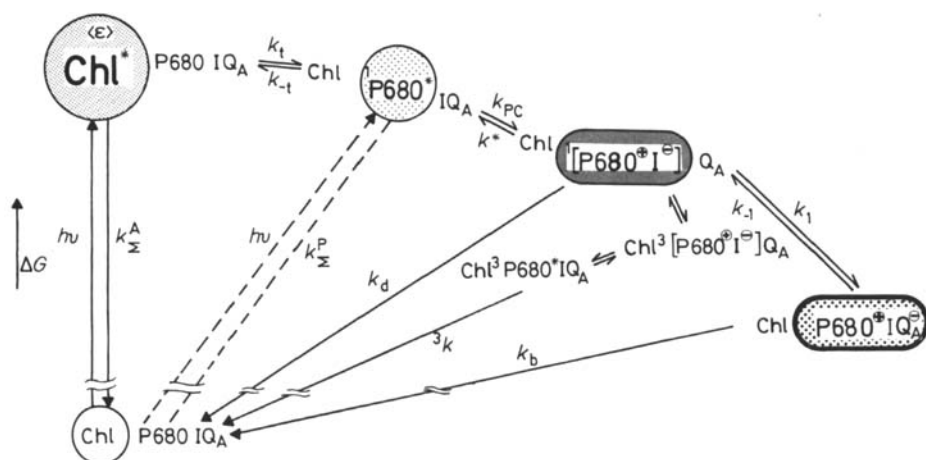


Abb. 3. Funktionsschema der lichtinduzierten Ladungsseparierung im Photosystem II. Durch Lichtabsorption wird in Chlorophyll a (Chl), einem Antennenpigment, ein Singulettexciton (ϵ) erzeugt (die elektronisch angeregte Antenne ist durch einen grauen Kreis dargestellt). Dieser elektronisch angeregte Zustand wandert zum Reaktionszentrum (siehe [6, 7]) und führt zur Bildung des ersten angeregten Singulets im photoredoaktiven Pigment P680, einem speziell gebundenen Chlorophyll a (durch gepunkteten Kreis symbolisiert). Durch Oxidation von $P680^*$ entsteht das primäre Radikalkationenpaar $[P680^{\oplus}I^{\ominus}]$ (schwarzes Oval), das durch Elektronentransfer von der (den) intermediären Komponente(n) I^{\ominus} zum Acceptor Q_A (Komponente A in Abb. 2) in das „stabile“ Radikalkationenpaar $P680^{\oplus}IQ_A^{\ominus}$ (gepunktetes Oval) übergeht. Q_A ist ein speziell gebundenes Plastochinon. Die Geschwindigkeitskonstanten gelten für folgende Prozesse: Anregungsenergieübertragung zum Reaktionszentrum (k_t) und zurück zur Antenne (k_{-t}), Elektronentransferprozesse (k_{PC} , k^* , k_1 , k_{-1}), Abbauprozesse angeregter Zustände in der Antenne (k_A^{\ominus}) oder von $P680^*$ (k_t^{\ominus}), dissipative Rekombinationsreaktionen (k_n , k_d) und Abbau des Triplettzustandes von $^3P680^*$ (3k), der durch einen Radikalpaarmechanismus gebildet wird (die Geschwindigkeitskonstanten dieser Prozesse sind nicht explizit angegeben). Die Energieskala ist unterbrochen, da die Energiedifferenz zwischen Chl^* und Chl mit 1.83 eV sehr viel größer ist als zwischen Chl^* und $P680^{\oplus}IQ_A^{\ominus}$ (0.5–0.6 eV).

Nach unserem derzeitigen Kenntnisstand sind an den Redoxreaktionen von RC II nur π -Elektronen direkt beteiligt. Ein analoges Funktionsprinzip wurde bereits in den phylogenetisch älteren Reaktionszentren der Purpurbakterien verwirklicht^[25]. Dabei ist das photoaktive Pigment ein Bacteriochlorophyll dimer, das sein Elektron aus dem angeregten Singulettzustand über Bacteriopheophytin an ein mit $Fe^{2\oplus}$ (high spin) komplexiertes Ubichinon (*Rhodospseudomonas sphaeroides*) oder Menachinon (*Rhodospseudomonas viridis*) abgibt.

Der wesentliche funktionelle Unterschied der beiden „ π -Elektronen“-Reaktionszentrentypen in RC II und Purpurbakterien besteht darin, daß im Gegensatz zu $P680^{\oplus}$ das

gebildete Radikalkation des dimeren Bacteriochlorophylls aus thermodynamischen Gründen keine Wasseroxidation ermöglichen kann. Daher war die „Erfindung“ von $P680$ eine notwendige Voraussetzung für die Evolution O_2 -bildender Photosyntheseorganismen. Man könnte vermuten, daß dieses Problem einfach durch den Ersatz des Bacteriochlorophyll dimers durch Chlorophyll a (Chl) gelöst worden sei, da der erste angeregte Singulettzustand von Chl um ca. 0.4 eV energiereicher ist als der von Bacteriochlorophyll (BChl) und sich die Redoxpotentiale für die Reduktion von Bacteriopheophytin (BP) und Phäophytin (Pheo) nicht sehr stark unterscheiden^[25]. Die Benutzung von Chl war eine notwendige, aber keine hinreichende Voraussetzung, wie das Beispiel von Chl ($P700$) im Reaktionszentrum des Photosystems I zeigt. Das Radikalkation $P700^{\oplus}$ ermöglicht ebenfalls keine Wasseroxidation, da das Redoxpotential von $P700/P700^{\oplus}$ im Bereich von +0.5 V liegt (Übersicht siehe [25]). Von entscheidender funktioneller Bedeutung für die Oxidationswirkung des Radikalkations Chl^{\oplus} ist daher sicher die Natur der Proteinmatrix.

Wie groß der Einfluß des Apoproteins sein kann, läßt sich sehr eindrucksvoll am Beispiel der Cytochrome zeigen, für deren funktionelle Hämgruppe eine Redoxpotentialspanne von nahezu 800 mV ermittelt wurde^[26,27]. In diesem Falle besteht der Effekt des Proteins nach Modellrechnungen im wesentlichen in der Etablierung einer Umgebung mit geringer Dielektrizitätskonstante um die Hämgruppe^[28].

Neben ihrer Bedeutung für die Oxidationswirkung von $P680^{\oplus}$ hat die Proteinmatrix noch eine weitere essentielle Funktion, da sie die Geschwindigkeitskonstanten der Elementarprozesse determiniert, die durch schwingungsgespeistes Tunneln stattfinden^[29,30]. Die Feinabstimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die einzelnen Elemen-

tarprozesse des Elektronentransfers im Reaktionszentrum ist entscheidend für eine hohe Quantenausbeute der Gesamtreaktion^[31]; für RC II wurde die Quantenausbeute zu nahezu 1.0 bestimmt^[32]. Das Matrixprotein muß daher als Apoenzym von RC II aufgefaßt werden, das die Eigenschaften der π -Elektronen-Redoxchemie dieser Funktionseinheit bestimmt^[33]. Die Natur dieser Matrix ist daher von großer mechanistischer Bedeutung und Gegenstand der aktuellen Forschung [siehe Abschnitt 3.2]. Wie die Reaktion durch die Proteinmatrix im einzelnen gesteuert wird, ist noch völlig ungeklärt.

3.2. Der strukturelle Aufbau des Reaktionszentrenkomplexes im Photosystem II

Der entscheidende Durchbruch für das Verständnis der Struktur von Reaktionszentren photosynthetisierender Organismen gelang Michel und Deisenhofer et al. mit der Kristallisation und Röntgen-Strukturanalyse dieser Funktionseinheiten aus *Rhodospseudomonas viridis* (Übersicht siehe^[34]). Dabei wurden sowohl die Anordnung der prosthetischen Gruppen als auch wesentliche Details der Struktur des Apoproteins aufgeklärt. Dieses besteht aus zwei Polypeptiden, die als L- und M-Untereinheit bezeichnet werden und jeweils fünf Transmembranhelices aufweisen^[34]. Der prinzipielle Aufbau dieser Bakterienreaktionszentren ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Die Purpurbakterien sind nicht imstande, H_2O unter O_2 -Bildung zu oxidieren. Damit ergibt sich als entscheidende Frage, ob die phylogenetische Weiterentwicklung der L- und M-Untereinheiten der Purpurbakterien und der Ersatz von Bacteriochlorophyll (bzw. Bacteriophäophytin) durch Chlorophyll a (bzw. Phäophytin a) ausreichte, um ein Photosystem-II(PSII)-Reaktionszentrum mit Verbindung zu einem wasseroxidierenden Enzymsystem zu bilden, oder ob sich neue (zusätzliche) Polypeptide entwickeln mußten^[35]. Im Organisationsschema des Elektronentransports in den Reaktionszentren vom photochemisch aktiven Pigment zu den Chinonen, die als Acceptoren wirken, bestehen frappierende Analogien zwischen Purpurbakterien und PS II^[36]. Darüber hinaus existieren im Photosystem II wasserspaltender Photosyntheseorganismen zwei Polypeptide mit einer relativen Molmasse von 32–34 kDa (diese werden durch D-1 und D-2 symbolisiert), die auffallende Sequenzhomologien mit den L- und M-Untereinheiten bakterieller Reaktionszentren aufweisen^[37]. Sowohl D-1 als auch die L-Untereinheit sind essentiell für die Hydrochinonbindung; beide Polypeptide enthalten auch spezifische Bindungsorte für Herbizide^[38,39]. Aus den Hydrophobie-Eigenschaften der Proteinsequenzen^[40] folgt außerdem, daß D-1 und D-2 ebenso wie die L- und M-Untereinheiten jeweils fünf Transmembranhelices bilden^[34,41]. Diese auffallenden Analogien führten zu dem Schluß, daß D-1 und D-2 das RC-II-Apoprotein sind. Wenn dies der Fall ist, dann müssen diese Polypeptide auch Chlorophyll a binden. Es gelang uns kürzlich, an PS-II-Präparationen aus Spinat zwei Chl-haltige Polypeptide im Bereich von 30–34 kDa zu identifizieren^[42], doch bleibt noch zu klären, ob die Polypeptide tatsächlich D-1 und D-2 sind.

Die obengenannten Befunde stützen die Hypothese, daß die PS-II-Reaktionszentren in O_2 -bildenden Organismen

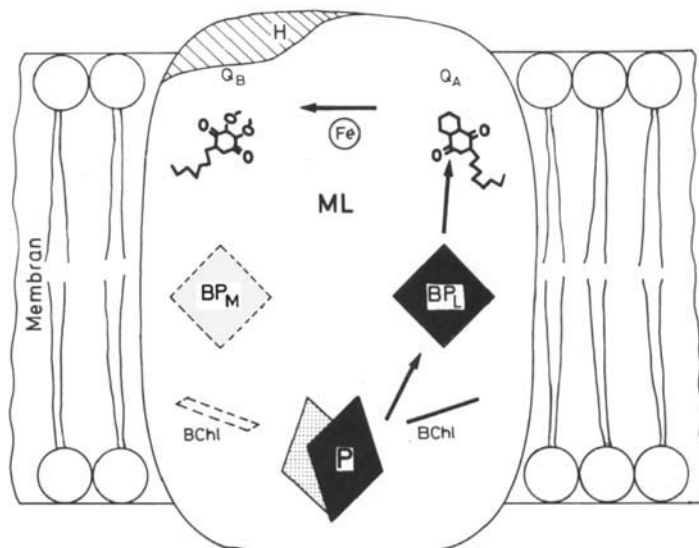


Abb. 4. Strukturelles Organisationsschema des Reaktionszentrenkomplexes (RC) in photosynthetisierenden Bakterien (*Rhodospseudomonas viridis*) nach Michel und Deisenhofer et al. (siehe [34]). Die Bacteriochlorophylle des photoaktiven Dimers P und die Bacteriophäophytine (BP) sind durch kantenverknüpfte verzerrte Quadrate bzw. durch Quadrate gekennzeichnet, während die praktisch senkrecht zur Zeichenebene angeordneten monomeren Bacteriochlorophylle (BChl) durch ein sehr flaches Viereck und einen Balken symbolisiert sind. Die beiden funktionellen Chinone dieser Reaktionszentren sind Menachinon (Q_A) und Ubichinon (Q_B), zwischen denen ein high-spin- Fe^{2+} angeordnet ist. Das Apoprotein, das aus L- und M-Untereinheiten besteht, ist nicht besonders gekennzeichnet; die regulatorische H-Untereinheit ist schraffiert, und die Strukturen der Chinone sind nur angedeutet.

prinzipiell die gleiche Struktur wie in Purpurbakterien haben^[34,41]. Allerdings wurde in allen PS-II-RC-Präparationen ein Chl-haltiges 47-kDa-Polypeptid (CP47) gefunden, das sehr eng mit D-1 und D-2 assoziiert ist. Damit ergibt sich die Frage nach der funktionellen Bedeutung von CP47. Es wurde zunächst vermutet, daß CP47 selbst das RC-II-Apoprotein ist^[43–45]; nach der D-1/D-2-Hypothese sollte CP47 jedoch nur eine spezielle Antenne für P680 bilden^[34,41]. In einem alternativen Modell wurde die Möglichkeit diskutiert, daß D-1, D-2 und CP47 als Untereinheiten des RC-II-Apoproteins wirken^[35]. Es ist kürzlich gelungen, Chl-haltige Komplexe zu isolieren, die entweder kein CP47 oder keine Polypeptide im Bereich von 30–34 kDa enthalten^[46a]. Funktionsuntersuchungen an diesen Präparationen führten aber bislang noch zu keinen eindeutigen Schlußfolgerungen.

Jüngste Untersuchungen zeigen, daß ein isolierter Komplex, der nur D-1, D-2, Cytochrom b 559, Chl a und Pheo (auch β -Carotin) enthält, die charakteristischen Eigenschaften (lichtinduzierte Absorptionsänderungen) für die Bildung des Radikationenpaars $[P680^+Pheo^-]$ aufweist^[46b–d]. Diese Ergebnisse stützen das D-1/D-2-Reaktionszentrenmodell.

Die Strukturaufklärung des Reaktionszentrums von PS II wird in den nächsten Jahren ein wichtiger Gegenstand der Grundlagenforschung über den Prozeß der photosynthetischen Wasserspaltung sein.

Der Reaktionszentrenkomplex RC II ist anisotrop in die Thylakoid-Membran eingebaut, wobei P680 zur Innenseite (Lumen) und Q_A zur Außenseite (Stroma) der Thylakoide hin orientiert sind (siehe Abb. 2). Dadurch führt der lichtinduzierte Elektronentransfer von P680 zu Q_A zum Aufbau einer elektrischen Potentialdifferenz über die Thylakoid-

Membran^[47] (auch die anderen Reaktionszentrenkomplexe sind anisotrop in die Membran eingebaut; siehe Abb. 4).

4. Das wasseroxidierende Enzymsystem

4.1. Das Organisationsschema der photosynthetischen Wasseroxidation

Einen Meilenstein für das Verständnis der funktionellen Organisation der photosynthetischen Wasseroxidation bildeten die grundlegenden Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Joliot und Kok^[48–50]. Es wurde gefunden, daß die O₂-Bildung bei Anregung von dunkeladaptierten Algen und Chloroplasten mit einer Folge kurzer Blitze ein charakteristisches Oszillationsmuster aufweist, das durch eine Periodizität von vier gekennzeichnet ist. Eine typische Meßkurve ist in Abbildung 5 dargestellt. Aus den Ergeb-

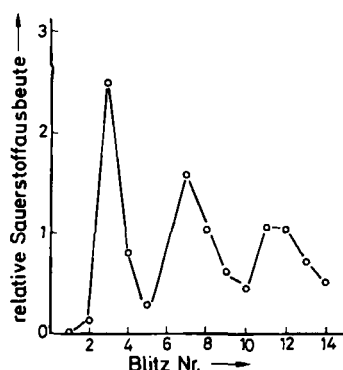


Abb. 5. Relative Sauerstoffausbeute als Funktion der Nummer des Blitzes in einer Folge kurzer (10 µs) sättigender Blitze an dunkeladaptierten Chloroplasten. Die Werte wurden aus der Dissertation von G. Dohnt (Technische Universität Berlin 1984) übernommen.

nissen folgt, daß jedes Reaktionszentrum praktisch nur mit einem wasseroxidierenden Enzymsystem funktionell gekoppelt ist (Übersicht siehe ^[51]). Dies bedeutet, daß die Wasseroxidation über eine Folge von Einelektronen-Redoxreaktionen verläuft, die sich durch das in Abbildung 6 dargestellte Schema beschreiben läßt. Dabei symbolisiert

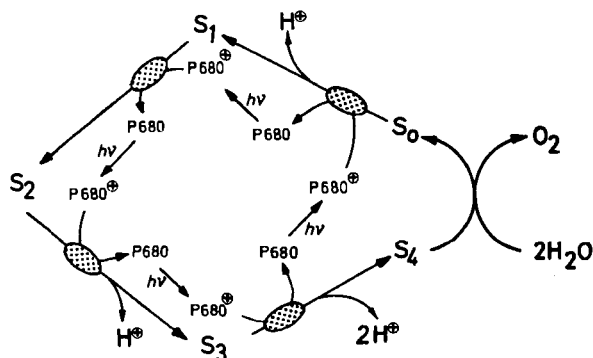


Abb. 6. Funktionelles Organisationsschema der photosynthetischen Wasseroxidation über eine Folge von vier Einelektronen-Redoxreaktionen. S_i (i=0,...,4) bezeichnet die Redoxzustände des katalytischen Wirkortes. P680 die photoaktive Chlorophyll-a-Komponente des Reaktionszentrums (siehe Abb. 2, 3); die Akzeptorkomponenten sind zur Vereinfachung weggelassen. Die funktionelle Kopplung zwischen dem Reaktionszentrum und dem wasseroxidierenden Enzymsystem ist durch punktierte Ovale symbolisiert.

S_i (i=0,...,4) den Redoxzustand des wasseroxidierenden Enzymsystems (i=0 entspricht dem Redoxzustand des Wassers, i=4 dem des molekularen Sauerstoffs). Die Kopplung zwischen dem Pigment P680 des Reaktionszentrums und dem wasseroxidierenden Enzymsystem Y ist in Abbildung 6 durch die punktierten Ovale angedeutet. Die Art dieser Kopplung soll im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

4.2. Die Kopplung zwischen Reaktionszentrum und wasseroxidierendem Enzymsystem

Da die P680⁰-Reduktion wesentlich schneller (ns- bis µs-Bereich, siehe ^[52–55]) abläuft als die Redoxübergänge im wasseroxidierenden Enzymsystem Y^[56,57], ist zu schließen, daß die funktionelle Kopplung mit RC II über mindestens eine Redoxkomponente bewirkt wird^[51], die man üblicherweise als Z bezeichnet. Damit ergibt sich die Frage nach der Natur von Z und der möglichen Beteiligung weiterer Redoxkomponenten. Z wurde zuerst EPR-spektroskopisch nachgewiesen^[58]. Bei Belichtung von dunkeladaptierten Chloroplasten mit einer Folge kurzer Blitze wurde ein als Signal II_ν^[1] bezeichnetes EPR-Signal bei g=2.0046 beobachtet, dessen Relaxationskinetik vom Redoxzustand S_i des wasseroxidierenden Enzymsystems Y abhängt^[59]. Signal II_ν wird der oxidierten Form Z^{ox} zugeordnet. Die Zerstörung des Systems Y ändert sowohl die Kinetik^[60] des EPR-Signals signifikant (entsprechend wurde dieses Signal als II_ν^[1] bezeichnet) als auch seine Mikrowellensättigung^[61]. Gleichzeitig verlangsamt sich die P680⁰-Reduktion. In diesem Fall stimmt die Kinetik der Signal-II_ν-Bildung mit der der P680⁰-Reduktion überein. Beide Reaktionen zeigen eine charakteristische pH-Abhängigkeit mit Halbwertszeiten im Bereich von 2–40 µs^[62–64]. Liegt Z^{ox} vor, so wird P680⁰ mit einer Halbwertszeit von 100–200 µs über eine Rückreaktion mit Q_A⁰ reduziert^[65,66].

Eine detaillierte Analyse des EPR-Spektrums von Signal II_ν führte im Vergleich mit entsprechenden Analysen an in-vitro-Modellsystemen zu dem Schluß, daß die redoxaktive Gruppe in der oxidierten Form Z^{ox} ein Plastosemichinon-Radikalkation ist, dessen Ringe senkrecht zur Membran angeordnet ist^[67,68]. Spektroskopische Untersuchungen im UV/VIS-Bereich stehen nicht im Widerspruch zu dieser Zuordnung^[69–72]. In Abbildung 7 sind die UV-Differenzspektren für Z^{ox} und Z dargestellt, die man aus der Analyse von blitzinduzierten Absorptionsänderungen erhält^[69]. Die Messungen wurden an PS-II-Membranfragmenten (der Anteil an Photosystem I ist ≤5%) ausgeführt, bei denen das wasseroxidierende Enzymsystem Y in einem Fall funktionell intakt, im anderen Fall vollständig zerstört war.

Ein Vergleich mit dem System Durosemichinon/Durohydrochinon in 9 M H₂SO₄ und 1 M Methanol^[73] zeigt, daß im UV-Bereich die Differenzspektren für die oxidative Bildung des Durosemichinon-Radikalkations in Lösung und für Z^{ox} im Photosystem II ähnlich sind. Die hypsochrome Bandenverschiebung von 275 nach 260 nm und die leicht bathochrome Verschiebung der 305-nm-Bande (nach

[*] Die Indices „ν“ (very fast) und „f“ (fast) beziehen sich auf die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Relaxation.

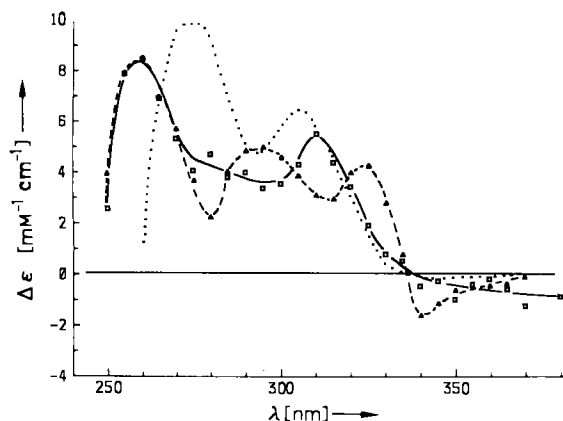


Abb. 7. Differenzspektren der Redoxkomponenten Z^{ox} und Z in PS-II-Membranfragmenten mit intaktem (gestrichelte Kurve) und zerstörtem (ausgezogene Kurve) wasseroxidierendem Enzymsystem (experimentelle Details siehe [69]) und für PQH_2^+/PQH_2 in 9 M H_2SO_4 und 1 M CH_3OH (siehe [73]) (punktierte Kurve).

310 nm) sind durch die Bindung des Plastohydrochinons an die Proteinmatrix erklärbar. Es muß aber betont werden, daß die prosthetische Gruppe von Z dadurch noch nicht eindeutig als PQH_2 identifiziert worden ist, so daß sich alternative Zuordnungen (z. B. Flavine, siehe [74], oder Tyrosinreste) nicht vollständig ausschließen lassen. Sollte allerdings das Plastohydrochinon-Modell für Z zweifelsfrei bestätigt werden, so ergäben sich zwei mechanistisch sehr interessante Aspekte:

- 1) In Lösung sind Semichinon-Radikalkationen wegen des negativen pK -Wertes^[75] nur in stark saurem Medium existenzfähig. Die Bildung eines vergleichsweise stabilen Plastosemichinon-Radikalkations in Biomembranen erfordert daher dessen Einbau in eine spezielle Proteinmatrix, die eine rasche Deprotonierung verhindert^[69, 72] und somit als Apoprotein eine essentielle Funktion hat. Einen experimentellen Hinweis für die sehr starke Isolierung der funktionellen Gruppe von Z liefert der Befund, daß kein Deuterium mit der Mikroumgebung der prosthetischen Gruppe ausgetauscht wird, wenn PS-II-Membranfragmente in D_2O inkubiert werden^[76a]. Neueste Markierungsexperimente mit ^{125}I zeigen, daß sich der Bindungsort für die prosthetische Gruppe von Z in der Untereinheit D-1 selbst oder in deren nächster Umgebung befindet^[76b, c].
- 2) Da der primäre Acceptor ein speziell gebundenes und mit Fe^{2+} (high spin) assoziiertes Plastochinonmolekül (siehe Abschnitt 3) ist, ergibt sich aus der Identifizierung der funktionellen Redoxgruppe von Z als ein ebenfalls spezifisch in ein Protein inkorporiertes Plastohydrochinon eine äußerst interessante Konsequenz: Das im Licht primär gebildete Radikationenpaar [$P680^+Pheo^-$] bewirkt die Bildung eines Radikationenpaares aus zwei räumlich getrennten und fixierten Semichinonen^[77], das mindestens 60% der Freien Enthalpie des ersten angeregten Singulettzustandes von $P680^*$ enthält. Dies impliziert, daß zur intermediären Sonnenenergiespeicherung (im μs -Bereich) ein System etabliert worden ist, bei dem unter Benutzung gleicher prosthetischer Gruppen (Plastosemichinone) eine vergleichsweise hohe elektrochemische Potentialdifferenz von ca.

1 V aufrecht erhalten wird, und zwar allein aufgrund des durch die Spezifizierung der Mikroumgebung realisierbaren drastischen Unterschiedes im Protonierungsgrad.

Mechanistisch interessant ist ferner, daß im Gegensatz zur üblichen Zweielektronen-Redoxchemie chinoider Systeme beide prosthetischen Plastochinon- bzw. Plastohydrochinon-Gruppen jeweils nur als Einelektronen-Redoxsysteme wirken^[7]. Dabei wird wahrscheinlich die Oxidation des funktionellen Plastohydrochinons in Z zur Chinonstufe durch eine wirksame Protonierung verhindert (die Bildung eines zweifach protonierten Chinons erfordert ein sehr hohes Oxidationspotential, siehe [75]). Die Redox Eigenschaften des Plastochinons werden auf der Acceptorseite möglicherweise durch die Wechselwirkung mit dem Fe^{2+} -Zentrum reguliert, doch ist diese Frage mechanistisch noch nicht eindeutig geklärt (siehe Abschnitt 5).

Die Differenzspektren (Abb. 7) für Z^{ox}/Z an PS-II-Membranfragmenten, deren wasseroxidierendes Enzymsystem Y entweder funktionell intakt ist oder durch eine selektive Behandlung zerstört wurde, unterscheiden sich deutlich. Die Abweichungen zwischen beiden Differenzspektren sind typisch für Verschiebungen, die durch elektrochrome Effekte hervorgerufen werden. Es ist daher denkbar, daß elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen im wasseroxidierenden Enzymsystem Y und dem Reaktionszentrum des Photosystems II zusätzlich elektrochrome Bandenverschiebungen bewirken^[69]. Inwieweit diese Wechselwirkungen auch die EPR-Spektren der Signale II_v und II_r beeinflussen, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt.

Aus kinetischen Befunden zur $P680^+$ -Reduktion wurde indirekt geschlossen, daß zwei Redoxkomponenten an der Kopplung zwischen RC II und dem wasseroxidierenden Enzymsystem beteiligt sind^[79, 80]. Da die Kinetik der Signal- II_v -Relaxation^[59] gut mit der der Redoxübergänge $S_i \rightarrow S_{i-1}$ ^[56, 57] übereinstimmt, ist zu schließen, daß Z direkt mit dem wasseroxidierenden Enzymsystem verbunden ist. Daher sollte eine weitere Redoxkomponente D_x , falls sie existiert, zwischen Z und $P680$ lokalisiert sein. Ein direkter experimenteller Beweis für die Existenz von D_x ist bislang nicht gelungen (ausführliche Diskussion siehe [69]).

Ein interessantes Problem bezüglich der Kopplung zwischen Reaktionszentrum und System Y besteht darin, ob und inwieweit der Redoxzustand S_i im System Y die Kinetik der $P680^+$ -Reduktion beeinflusst. Wenn keinerlei Wechselwirkung zwischen beiden Funktionseinheiten vorhanden wäre, sollte die Kinetik des Elektronentransfers allein durch die elektronische und vibronische Kopplung zwischen $P680$ und Z bestimmt sein und damit nicht von S_i abhängen. Tatsächlich schloß man aus den gemessenen Absorptionsänderungen bei 690 nm, die den Umsatz von $P680$ anzeigen, daß die Kinetik der $P680^+$ -Reduktion vom Redoxzustand des wasseroxidierenden Enzymsystems abhängt^[79]. Neuere Messungen mit wesentlich höherer Zeitauflösung bestätigen diese Schlußfolgerung^[80]. Die Regulation der Kinetik des Elektronentransfers zwischen $P680^+$ und Z wurde elektrostatischen Effekten zwischen den

[*] Unter unphysiologischen experimentellen Bedingungen kann in Gegenwart von $Na_2S_2O_4$ eine Reduktion von Q_A zur Hydrochinonstufe erzwungen werden [78].

funktionellen Gruppen zugeordnet^[80]. Der mögliche Einfluß von Änderungen in der Polypeptidstruktur bei Redoxübergängen der prosthetischen Gruppe bleibt dabei unberücksichtigt. Am Beispiel von Cytochrom c wurde aber gezeigt, daß sich die Struktur des Apoenzyms bei der Oxidation der funktionellen Hämgruppe signifikant ändert^[26]. Kürzlich wurde auch für Plastocyanin nachgewiesen, daß die Oxidation des funktionellen Kations Cu^+ zu Cu^{2+} Konformationsänderungen induziert, die möglicherweise wesentlich für eine Feinabstimmung des Elektronentransfers sind^[81]. Es bleibt daher zu prüfen, ob die beobachteten Abhängigkeiten des Zeitgesetzes der P680^+ -Reduktion vom Redoxzustand des wasseroxidierenden Enzymsystems nicht primär durch Einflüsse der Polypeptidstruktur auf den Elektronentransfer bestimmt sind.

4.3. Funktionsmechanismus und struktureller Aufbau des wasseroxidierenden Enzymsystems

Aus einer formalen Betrachtung des Schemas der *in vitro*-Reaktion von zwei H_2O -Molekülen zu O_2 und 4H^+ (Abb. 8) folgt unmittelbar, daß das zentrale Problem für

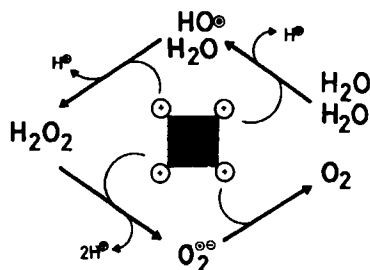


Abb. 8. Reaktionsschema für die Oxidation von zwei H_2O -Molekülen zu O_2 und 4H^+ durch eine Folge von vier Einelektronen-Redoxreaktionen. Die graue Fläche symbolisiert eine nicht näher charakterisierte Defektelektronenquelle. Bezüglich der protolytischen Reaktionen wurde angenommen, daß die Reaktion bei einem pH-Wert abläuft, der groß gegenüber dem pK-Wert von HO_2 ist.

die Realisierung der Wasseroxidation zu O_2 und 4H^+ in biologischen Membransystemen die Stabilisierung der intermediären Redoxzustände ist^[82]. Die Werte der Freien Bildungsenthalpien für die Oxidationsprodukte, die durch schrittweisen Entzug von Elektronen und Protonen aus Wassermolekülen entstehen (HO^\bullet , H_2O_2 , HO_2^\bullet), zeigen sofort, daß diese Redoxstufen nicht als freie Spezies bei der photosynthetischen Wasseroxidation gebildet werden können^[83, 84]. Darüber hinaus würden diese äußerst reaktiven Verbindungen die empfindlichen Biomoleküle sehr rasch oxidativ abbauen. Daraus folgt, daß an der Redoxreaktionsfolge der Wasseroxidation geeignete funktionelle Gruppen direkt beteiligt sein müssen. Bei der Gesamtreaktion werden die Bindungen zwischen O und H gelöst und zwischen zwei O-Atomen neu geknüpft. Es ist zu vermuten, daß Systeme mit π -Elektronensystemen und/oder Übergangsmetalle mit unvollständig besetzten d-Orbitalen als funktionelle Gruppen besonders geeignet sind. Untersuchungen über die Enzymologie von O_2 ^[85] zeigen, daß solche Systeme (Flavine und Chinone bzw. Fe, Cu, Mn und Mo) tatsächlich als funktionelle Gruppen eine essentielle Rolle spielen. Es ist seit langem bekannt, daß Mangan ein unerläßlicher Cofaktor der photosynthetischen

Wasserspaltung ist (Übersicht siehe ^[51, 86–88]). Daher scheint es plausibel und logisch zu sein, das wasseroxidierende Enzymsystem als ein *Manganprotein* anzusehen, dessen Metallzentren mit ihrer spezifischen Koordinationssphäre als die redoxaktiven funktionellen Gruppen des Enzyms wirken^[89, 90]. Aus diesem Grundpostulat und dem Vergleich der in Abbildung 6 und 8 dargestellten Reaktionsschemata ergeben sich einige wichtige Fragen für die Realisierung der photosynthetischen Wasseroxidation:

- 1) Wie ist der katalytische Wirkort aufgebaut, an dem sich O_2 aus zwei H_2O -Molekülen bildet?
- 2) Wie sind die elektronische Struktur und die Anordnung der Metallatome in der prosthetischen Gruppe, die den Redoxzuständen S_i (siehe Abb. 6) entspricht?
- 3) Wie ist zu erklären, daß das wasseroxidierende Enzymsystem nach hinreichender Dunkeladaptation praktisch vollständig den Redoxzustand S_1 besetzt^[51, 91]?
- 4) Welche Deprotonierungsreaktionen sind mit den Redoxübergängen $\text{S}_i \rightarrow \text{S}_{i+1}$ gekoppelt?
- 5) Wie ist das Apoenzym strukturell aufgebaut und wie beeinflusst es funktionell die Redoxübergänge?
- 6) Welche regulatorischen Einheiten steuern zusätzlich die Funktion des wasseroxidierenden Enzymsystems?

4.4. Der katalytische Wirkort und die funktionelle Rolle des Mangans

Der mechanistisch entscheidende Schritt für die O_2 -Bildung aus zwei Wassermolekülen ist die Bildung einer Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung. Dies erfordert eine geeignete geometrische Anordnung der Reaktionspartner, die sicher dann zu erreichen ist, wenn der katalytische Wirkort mindestens zwei Zentren enthält. Damit wird zugleich auch die Bildung einer peroxidischen Vorstufe ermöglicht. Setzt man voraus, daß die essentiellen Redoxübergänge an diesen Zentren stattfinden, so bilden diese zusammen mit ihrer Ligandenhülle die prosthetische Gruppe des wasseroxidierenden Enzymsystems. Redoxaktive Gruppen, die nur zur elektronischen Kopplung mit dem Reaktionszentrum (über die Komponente Z, siehe Abschnitt 4.2) dienen, oder Moleküle und Aminosäurereste, die ausschließlich an Deprotonierungsprozessen beteiligt sind (z. B. über H-Brückenbildung), die nicht unmittelbar am reaktiven Zentrum ablaufen, sollen dagegen nicht als Bestandteil der prosthetischen Gruppe betrachtet werden.

Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen wird gefolgert: Die *prosthetische Gruppe* des wasseroxidierenden Enzymsystems Y ist ein *zweikerniger Mangankomplex*. Stöchiometrische Untersuchungen zeigen, daß vier Mn-Zentren pro System Y existieren^[92, 93]. Es wird aber angenommen, daß sich diese vier Mn-Zentren in ihrer Funktion unterscheiden. Dabei sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß selbst ein strukturell symmetrischer vierkerniger Mangankomplex durch den Einbau in eine asymmetrische Proteinmatrix als zweikernige Gruppe fungieren kann (ausführliche Diskussion siehe ^[94]). Es gibt mehrere Befunde, nach denen die vier Mn-Zentren im System Y nicht äquivalent sind. Sie unterscheiden sich in der magnetischen Wechselwirkung mit Z^{ox} ^[61], in der Wechselwirkung mit Cl^- ^[95], in der Bindungsstärke nach Ablösung der regulatorischen

rischen 33-kDa-Untereinheit (siehe Abschnitt 4.6.2)^[96] und schließlich im Mechanismus der Photoaktivierung des Systems Y^[97]. Nach partieller Freisetzung von Mn ist eine Reaktivierung der O₂-Bildung ohne Mn-Zugabe möglich^[98]. Es gibt außerdem Hinweise dafür, daß sich zwei der vier Mangan-Ionen durch andere zweiwertige Metall-Ionen ersetzen lassen^[99].

Ein zweikerniger Mangankomplex als prosthetische Gruppe der Wasseroxidation wurde bereits früher^[100, 101] vorgeschlagen. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, daß an Enzymsystemen, die die Reduktion von O₂ zu H₂O katalysieren (Cytochrom-Oxidase, Laccase etc.; Übersicht siehe ^[85]) von den ebenfalls vier Metallzentren nur zwei den katalytischen Wirkort bilden. Auch bei in-vitro-Katalysatorsystemen wirken zweikernige Metallzentren als funktionelle Gruppen der Wasseroxidation^[102, 103].

Setzt man daher voraus, daß die prosthetische Gruppe des wasseroxidierenden Enzymsystems ein zweikerniger Mangankomplex ist, so ergeben sich unmittelbar drei Fragen: 1) Welchen Valenzzustand haben die beiden Manganzentren in den Redoxzuständen S_i? 2) Wie sind die Manganzentren im Protein koordinativ verankert, und in welcher Form wird das Substrat (H₂O) gebunden? 3) Existieren weitere redoxaktive Komponenten (z. B. in der Liganbenhülle), die an den Elektronentransferprozessen des katalytischen Zentrums beteiligt sind?

Zur Charakterisierung elektronischer Zustände von funktionellen Gruppen, die Übergangsmetalle als redoxaktive Spezies enthalten, eignen sich mehrere spektroskopische Verfahren: NMR-, EPR-, UV/VIS-, IR-, EXAFS^[*] und XAES^[*]-Spektroskopie. Bei Untersuchungen an komplizierten biologischen Systemen treten zwei prinzipielle Schwierigkeiten auf: 1) Es können Überlagerungen mit den Differenzspektren von Komponenten eintreten, die an der zu analysierenden Reaktionsfolge gar nicht beteiligt sind. 2) Selbst bei der Separierung der interessierenden Reaktionen ergeben sich erhebliche Interpretationsprobleme, wenn weder die Bestandteile noch die Struktur der Liganbenhülle bekannt sind. Beides erschwert die Analyse der Reaktionsfolge im wasseroxidierenden Enzymsystem so stark, daß eine befriedigende Antwort auf die drei Fragen und damit eine Aufklärung des Mechanismus der H₂O-Spaltung bislang nicht möglich war. Es sollen daher im folgenden zunächst nur die Mosaiksteinchen unseres noch sehr fragmentarischen gegenwärtigen Kenntnisstandes beschrieben werden, die mit mehreren spektroskopischen Methoden gefunden wurden. Im zweiten Schritt der Analyse wird dann versucht, die bislang bekannten Puzzleteile zu einem Gesamtbild zusammenzufügen. Da es noch nicht gelungen ist, das wasseroxidierende Enzymsystem so zu isolieren, daß es funktionell intakt bleibt, müssen die Experimente an Systemen ausgeführt werden, an denen mindestens auch die Prozesse des Reaktionszentrums und der Elektronenübergang zu exogenen Acceptoren ablaufen. Um gemessene spektrale Eigenschaften zu bestimmten Redoxzuständen S_i im wasseroxidierenden Enzymsystem zuzuordnen, wird daher das charakteristische Oszillationsmuster (siehe Abb. 5) zur „Markierung“ der S_i-Zustände (oder der Redoxübergänge S_i → S_{i+1}) genutzt.

[*] EXAFS = Extended X-Ray Absorption Fine Structure; XAES = X-Ray Absorption Edge Structure.

4.4.1. NMR-spektroskopische Untersuchungen

Stark relaxierende paramagnetische Metallzentren mit geeigneter Elektronenkonfiguration (Orbitalsingulettzustände mit geringer statischer Nullfeldaufspaltung) beeinflussen die Relaxationskinetik der Wasserprotonen^[104]. Bei einem Valenzwechsel der Manganzentren im katalytischen Wirkort sind daher Änderungen in der Kinetik der Spin-Gitter- oder Spin-Spin-Relaxation zu erwarten, die Rückschlüsse auf den Redoxzustand in den S_i-Zuständen des wasseroxidierenden Enzymsystems ermöglichen sollten. Bei Anregung von dunkeladaptierten Chloroplasten mit einer Blitzfolge wurde eine Oszillation der Relaxation gefunden und den S_i-Zuständen zugeordnet^[105]. Diese Methode erfordert die Wahl geeigneter experimenteller Bedingungen, um Nebeneffekte durch nicht funktionelle Zentren auszuschließen (Übersicht siehe ^[106]). Neueste Messungen zeigen eindeutig, daß Änderungen in der Relaxationskinetik mit S_i-Zustandsänderungen gekoppelt sind^[107]. Die Ergebnisse führten zu dem vorläufigen Schluß, daß beim Übergang S₁ → S₂ sehr wahrscheinlich Mn^{III} zu Mn^{IV} oxidiert wird, während bei der Reaktion S₂ → S₃ möglicherweise kein Valenzwechsel an den Manganzentren stattfindet. Die Oxidation von S₀ zu S₁ könnte ein Mn^{II} → Mn^{III}-Übergang sein^[108]. Die bisher vorliegenden NMR-Ergebnisse ermöglichen allerdings keine eindeutigen Schlußfolgerungen über den Redoxzustand des Mangans im katalytischen Wirkort.

4.4.2. EPR-spektroskopische Untersuchungen

Das im Photosystem II gebundene Mangan ist bei Raumtemperatur EPR-inaktiv (Übersicht siehe ^[87, 88]). Wird das wasseroxidierende Enzymsystem zerstört, so tritt das für [Mn(H₂O)₆]²⁺ typische Hyperfein-EPR-Signal auf. Es wurde daher versucht, nach Besetzung bestimmter S_i-Zustände das Mangan durch hinreichend rasche Zerstörung des Enzymsystems freizusetzen und aus der Amplitude des gemessenen EPR-Signals Rückschlüsse auf den Valenzzustand des Mangans zu ziehen^[109]. Mit dieser indirekten Methode wurde gefolgert, daß Mangan im Redoxcyclus als Mn^{II} und Mn^{III} auftritt, wobei intermediär auch Mn^{IV} gebildet wird (beim Übergang S₁ → S₂ → S₃)^[109].

Wesentlich für die Anwendung von EPR-Methoden zur Analyse des katalytischen Wirkortes der Wasseroxidation war die Entdeckung eines Tieftemperatur-EPR-Signals, das bei der Bildung des S₂-Zustandes auftritt^[110]. Die spektrale Simulation der charakteristischen Hyperfeinstruktur führte zu dem Schluß, daß das „S₂-multiline-Signal“ durch den gemischtvalenten Zustand eines zwei- oder vierkernigen Mangankomplexes bedingt ist, wobei sowohl eine Mn^{II}-Mn^{III}- als auch eine Mn^{III}-Mn^{IV}-Konfiguration möglich ist^[110-116]. Untersuchungen an Modellkomplexen schließen auch die Existenz eines Peroxo-verbrückten [Mn^{II}...O₂...Mn^{III}]-Zustandes nicht aus^[117]. Aus dem Einfluß von H₂¹⁷O auf die Hyperfeinlinien wurde gefolgert, daß H₂O direkt mit dem katalytisch wirkenden Mangan verbunden ist, wenn der Zustand S₂ gebildet wird^[118]. Das „S₂-multiline-Signal“ verschwindet, wenn das wasseroxidierende Enzymsystem zerstört wird, wie Abbildung 9 zeigt^[119]. Neben dem „multiline-Signal“ existiert ein weite-

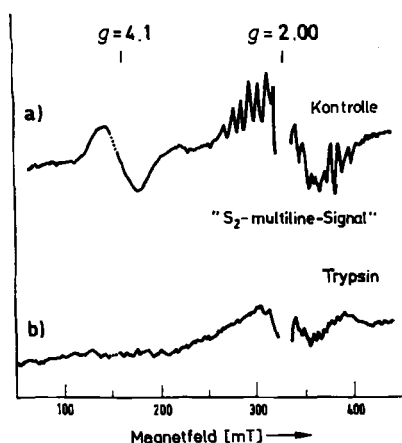


Abb. 9. Lichtinduzierte EPR-Signale an a) unbehandelten und b) trypsinierten PS-II-Membranfragmenten bei pH=7.5. In den unbehandelten Chloroplasten ist das charakteristische „S₂-multiline-Signal“ (siehe Text) deutlich sichtbar, wobei der enge Bereich um $g=2.0$ der Übersichtlichkeit halber ausgeblendet wurde (in diesem Bereich treten sehr starke Signale auf, die durch andere Radikale bedingt sind) (experimentelle Details siehe [119]).

res Signal bei $g=4.1$ ^[115, 120], das ebenfalls S₂ zugeordnet wird^[121, 122]. Aus den Eigenschaften der Signale wurde gefolgert, daß das Signal bei $g=4.1$ durch den Spingrundzustand ($S=3/2$) und das „S₂-multiline-Signal“ durch den angeregten Spinzustand ($S=1/2$) einer antiferromagnetisch austausch-gekoppelten zweikernigen Mnⁿ-Mnⁿ⁺¹-Gruppe bedingt ist, die ferromagnetisch mit einem zweiten ($S=1$)-Zentrum gekoppelt ist^[116, 121]. Möglicherweise handelt es sich um das zweite Mn-Dimer eines verzerrten Mn-Tetramers. Nach neuesten Modellvorstellungen wird eine verzerrte Cuban-analoge Mn₄O₄-Struktur diskutiert^[122a]. Ein direkter experimenteller Hinweis dafür fehlt bisher. Die Spinzustandsanalyse allein liefert keine eindeutige Aussage über n . Gegenwärtig erscheint ein Wert von $n=3$ am wahrscheinlichsten^[115, 116], wobei im „Cuban“-Modell eine Konfiguration Mn^{III}-Mn^{IV} angenommen wird^[122a].

Informationen über die Struktur der Ligandenhülle der funktionellen Manganzentren, insbesondere über die Elektronendichteverteilung, konnten bislang nicht erhalten werden. In diesem Zusammenhang sollte auf ein prinzipielles Problem der Tieftemperatur-EPR-Spektroskopie hingewiesen werden: Es ist nach Messungen an Mangan-Modellkomplexen mit redoxaktiven Liganden^[123, 124] nicht auszuschließen, daß die Elektronendichteverteilung zwischen Liganden und Zentralatomen temperaturabhängig ist. Sollte dies auch im wasseroxidierenden Enzymsystem der Fall sein, dann könnten Tieftemperatur-EPR-Messungen im Prinzip keine Informationen über die Elektronendichteverteilung und damit den Redoxzustand der Manganzentren am katalytischen Wirkort bei Raumtemperatur liefern.

4.4.3. UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen

Die Bestimmung der UV/VIS-Differenzspektren für die Redoxübergänge $S_i \rightarrow S_{i+1}$ sollte im Prinzip aus blitzinduzierten Absorptionsänderungen aufgrund des charakteristischen Oszillationsmusters (vgl. Abb. 5) möglich sein. Allerdings ergeben sich wegen der Überlagerung mit Binäroszillationen, die durch die PQ-Reduktion bedingt sind

(siehe Abschnitt 5), erhebliche Schwierigkeiten (Diskussion siehe [94, 125]). Durch eine geeignete Modifizierung des Apoproteins (milde Trypsin-Behandlung bei pH ≤ 6.5) gelingt es, die PQH₂-Bildung an Thylakoiden zu verhindern, wobei gleichzeitig Q_A[•] durch K₃[Fe(CN)₆] leicht oxidierbar wird^[126–128]. Bei Anregung dunkeladaptierter trypsinierter Thylakoide mit einer Folge kurzer Blitze erhält man in Gegenwart von K₃[Fe(CN)₆] die in Abbildung 10 dargestell-

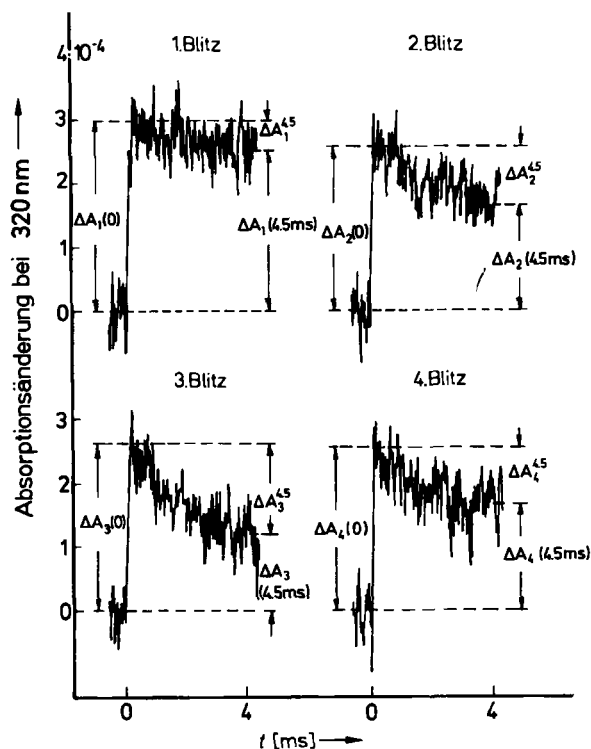
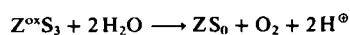


Abb. 10. Absorptionsänderungen bei 320 nm als Funktion der Nummer der Blitze bei einer Folge kurzer (10 μs) sättigender Blitze an dunkeladaptierten trypsinierten Thylakoiden. $\Delta A_n(0)$ beschreibt die zeitlich nicht aufgelöste Anfangsamplitude im n -ten Blitz, $\Delta A_n(4.5 \text{ ms})$ die entsprechende Amplitude 4.5 ms nach dem Blitz und $\Delta A_n^{4.5} = \Delta A_n(0) - \Delta A_n(4.5 \text{ ms})$ die Differenz beider Größen; diese ist ein Maß für den relativen Anteil der 1-ms-Relaxation an der Gesamtelaxation (experimentelle Details siehe [129]).

ten Absorptionsänderungen bei 320 nm^[129]. Man erkennt, daß an der Gesamtelaxation eine 1-ms-Relaxation beteiligt ist, deren Amplitude je nach Nummer des Blitzes charakteristisch oszilliert. Die Halbwertszeit von ca. 1 ms stimmt mit der Zeit überein, die für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der O₂-Bildung aus polarographischen Messungen ermittelt wurde^[130]. Abbildung 11 zeigt, daß die Amplitude der 1-ms-Relaxation von Absorptionsänderungen bei 320 nm und die O₂-Ausbeute pro Blitz an dunkeladaptierten Thylakoiden praktisch das gleiche Oszillationsmuster aufweisen. Aus kinetischen Überlegungen folgt, daß die Amplitude der 1-ms-Relaxation an Trypsin-behandelten Thylakoiden die Reaktion



beschreibt^[131]. Damit ist es möglich, das Differenzspektrum dieser Reaktion zu ermitteln (Abb. 11, kleines Bild). Eine Separierung der Differenzspektren für die Redoxübergänge $S_i \rightarrow S_{i+1}$ konnte wegen der ungünstigen optischen

Eigenschaften von Thylakoidsuspensionen nicht erreicht werden.

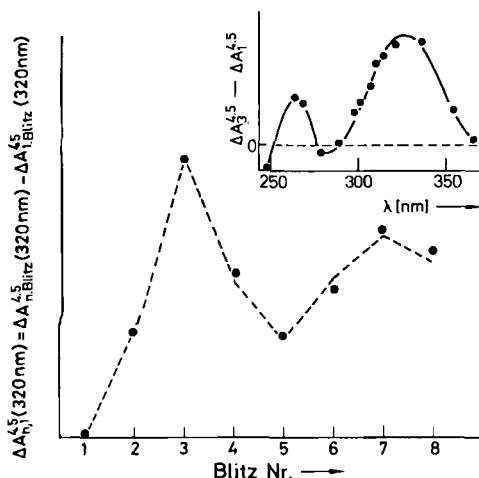


Abb. 11. Großes Bild: Amplitudendifferenz (●) der 1-ms-Relaxation zwischen n -tem und erstem Blitz, $\Delta A_{n,1}^{45}$ sowie relative Sauerstoffausbeute (—) als Funktion der Nummer des Blitzes in einer Folge kurzer (10 μ s) sättigender Blitze an dunkeladaptierten trypsinierten Thylakoiden. Kleines Bild: Amplitudendifferenz (●) der 1-ms-Relaxation zwischen 3. und 1. Blitz als Funktion der Wellenlänge (weitere Details siehe [53]).

Einen wesentlichen Fortschritt für alle spektroskopischen Untersuchungen am Photosystem II brachte die Entwicklung präparativer Methoden zur Isolierung von Membranfragmenten, die praktisch kein Photosystem I mehr enthalten, volle O_2 -Bildungsaktivität haben und günstige optische Eigenschaften (geringe Streuung, kleine Partikelgröße) aufweisen^[131, 132]. Messungen blitzinduzierter Absorptionsänderungen an PS-II-Partikeln und die Analyse der Ergebnisse im Rahmen des Kok-Schemas (siehe Abschnitt 4.2) wurden von mehreren Arbeitsgruppen ausgeführt^[125, 133, 134]. Dabei kam man zu unterschiedlichen Schlußfolgerungen. Ohne die Details hier behandeln zu können (siehe dazu^[125, 133, 134]), bleibt als wesentlichste ungeklärte Frage, ob jeder Redoxübergang $S_i \rightarrow S_{i+1}$ praktisch zum gleichen Differenzspektrum führt, für alle $i=0, 1$ und 2^[133], oder ob signifikante Unterschiede auftreten^[125, 134].

Jüngste Modellrechnungen zeigen, daß sogar im idealen Falle der vollständigen Abwesenheit störender Prozesse die Absorptionsänderungen allein nicht genügen, um daraus eindeutig die Differenzspektren $\Delta \epsilon_{i+1,i}(\lambda)$ für die Redoxübergänge $S_i \rightarrow S_{i+1}$ abzuleiten^[135].

Es wurde versucht, aus den erhaltenen Differenzspektren Informationen über die Natur der beteiligten Redoxgruppen zu erhalten. Aus dem Vergleich mit den Spektren von Manganguconat-Komplexen wurde gefolgert, daß bei jedem $S_i \rightarrow S_{i+1}$ -Übergang für $i=0, 1, 2$ eine Oxidation $Mn^{III} \rightarrow Mn^{IV}$ stattfindet^[133].

Diese Zuordnung ist aber nicht stichhaltig, denn – unabhängig von möglichen Unterschieden zwischen den jeweiligen Redoxübergängen^[125, 134a] – ermöglichen die Differenzspektren allein prinzipiell keine eindeutigen Aussagen über die Elektronenkonfiguration der Manganzentren in den S_i -Zuständen, da die UV-Spektren von Mangankomplexen primär durch die Struktur der Liganden bestimmt sind^[136a]. Jüngste Untersuchungen^[136b] bestätigen diese Schlußfolgerung.

4.4.4. IR-spektroskopische Untersuchungen

Bei Anregung von dunkeladaptierten PS-II-Membranfragmenten mit einer Folge von Laserblitzen wurden Absorptionsänderungen mit einem Maximum bei 820 nm ($\Delta \epsilon$ in der Größenordnung von $100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) gefunden, die eine charakteristische Abhängigkeit von der Nummer des Blitzes einer Folge von Anregungsblitzen aufweisen^[137]. Diese Absorptionsänderungen zeigen typische Eigenschaften eines Intervallenzüberganges in zweikernigen Mangankomplexen. Aus den Ergebnissen wurde gefolgert, daß beim Übergang $S_1 \rightarrow S_2$ eine $Mn^{III}-Mn^{IV}$ -Konfiguration entsteht, die beim $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ -Übergang wieder abgebaut wird. Diese Zuordnung impliziert, daß sich bei den Redoxübergängen $S_0 \rightarrow S_1$ und $S_2 \rightarrow S_3$ die Valenz des Mangans im katalytischen Zentrum nicht ändert.

4.4.5. EXAFS- und XAES-spektroskopische Untersuchungen

Erste Versuche zur Messung der K-Kante am Mangan (XAES-Messungen) von Thylakoiden führten zum Schluß, daß im wasseroxidierenden Enzymsystem ein $Mn^{II,III}$ -Zustand vorliegt^[138]. Neuere Untersuchungen an PS-II-Membranfragmenten zeigen, daß drastische Änderungen in den Kanteneigenschaften der Probe (Verschiebung um 2.5 eV sowie Verbreiterung des Hauptabsorptionspeaks) beim Übergang $S_1 \rightarrow S_2$ auftreten^[139]. Demgegenüber werden beim Übergang $S_2 \rightarrow S_3$ nur marginale Änderungen beobachtet. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß Mangan im zweikernigen katalytischen Zentrum nur in den Zuständen $Mn^{II}-Mn^{III}$ und $Mn^{III}-Mn^{IV}$ auftritt und der $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang ein Zweielektronen-Übergang bezüglich des Redoxzustandes des Mangans ist; dabei ist eine weitere redoxaktive Komponente an der Reaktion beteiligt^[139]. Aus EXAFS-Analysen wurde ferner geschlossen, daß in S_1 und S_2 ein zweikerniger Mangankomplex vorliegt, in welchem der Mn-Mn-Abstand 270 pm beträgt^[140]. Neueste EXAFS-Untersuchungen bestätigen diesen Wert. Sie zeigen ferner, daß sich das Mangan im zweikernigen Komplex in einer speziellen, nicht zentrosymmetrischen Umgebung befindet, wobei jedes Mn-Atom im Abstand von 198 pm 3 ± 1 terminale Liganden (N- oder O-Atome) und 2 ± 1 Brückenliganden (ebenfalls N- oder O-Atome) im Abstand von 175 pm enthält. Es handelt sich wahrscheinlich um eine μ -Oxo-Brückenstruktur. In der Umgebung befindet sich sehr wahrscheinlich ein weiteres zweikerniges Mn-Zentrum oder ein einzelnes Mn-Atom^[141].

4.5. Modellvorstellungen zum molekularen Mechanismus der photosynthetischen Wasseroxidation

Die in Abschnitt 4.4 beschriebenen Ergebnisse lassen zunächst zwei Schlußfolgerungen zu: 1) Im Zustand S_2 liegt wahrscheinlich eine gemischtvalente Konfiguration $Mn^n \cdots Mn^{n+1}$ vor; 2) Wasser ist direkt in der ersten Koordinationssphäre des Mangans gebunden.

Ferner scheint sich beim Redoxübergang $S_2 \rightarrow S_3$ der Oxidationszustand an den Manganzentren des katalytischen Wirkortes nicht signifikant zu ändern, d.h. die Oxidation findet im wesentlichen in der Ligandenhülle oder an einer zusätzlichen Redoxkomponente statt. Thermodynamische Überlegungen führten außerdem zu dem Schluß,

daß am Redoxübergang $S_0 \rightarrow S_1$ eine redoxaktive Komponente mit relativ niedrigem Redoxpotential beteiligt ist^[100, 101], die durch M symbolisiert wurde. Ob es sich dabei um einen redoxaktiven Liganden^[53] oder um einen speziellen Redoxübergang am Mangan handelt^[142], bleibt noch zu klären. Faßt man diese Überlegungen zusammen, so erscheint ein Mechanismus des in Abbildung 12 dargestellten Typs plausibel zu sein^[142].

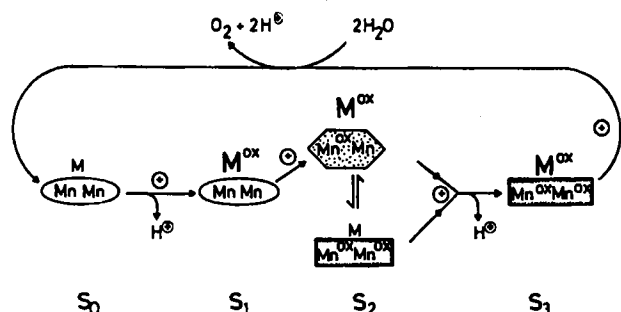


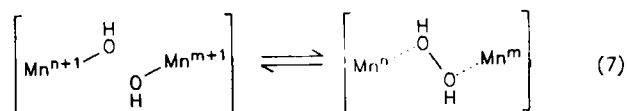
Abb. 12. Reaktionsschema für die Oxidation von zwei H_2O -Molekülen zu O_2 und $4H^+$ unter Beteiligung eines zweikernigen Manganzentrums und einer redoxaktiven Komponente M (siehe Text). \ominus symbolisiert ein Defektelektron.

In Abbildung 12 beschreiben die Symbole $(MnMn)$, $(Mn^{ox}Mn)$ und $(Mn^{ox}Mn^{ox})$ das funktionelle zweikernige Manganzentrum in verschiedenen Oxidationszuständen; die unterschiedlichen Symbole (Ellipsen, Sechseck, Rechteck) sollen Konformationsänderungen im Apoenzym bei Redoxübergängen andeuten. Die Existenz von zwei prinzipiell verschiedenen Konformationen (S_0 , S_1 unterscheiden sich deutlich von S_2 , S_3) wurde kürzlich aus Cl^- -Affinitätsuntersuchungen (siehe Abschnitt 4.6.1) geschlossen^[143a]. Diese Annahme wird durch neueste Messungen der Temperaturabhängigkeit der Redoxübergänge $S_i \rightarrow S_{i+1}$ ($i = 1, 2, 3$) gestützt, aus denen Informationen über Aktivierungsenthalpien und -entropien erhalten wurden^[143b]. Es bleibt zu prüfen, ob diese Strukturunterschiede auch die Kinetik der P680⁺-Reduktion beeinflussen (siehe Abschnitt 4.2). Die Elektronendichteverteilung zwischen Zentralatom und Ligandenhülle wird in Abbildung 12 nicht explizit berücksichtigt (siehe nachfolgende Betrachtungen).

In Abbildung 12 entspricht der „obere“ Reaktionsweg unserem früher vorgeschlagenen Schema^[100, 101], während der „untere“ Reaktionsweg einige neuere Befunde^[108, 125, 139] besser beschreibt. Es bleibt zu prüfen, ob das für den Zustand S_2 postulierte Gleichgewicht in der hier dargestellten Form existiert. Sollte dies der Fall sein, so ergibt sich mit der Möglichkeit einer Verschiebung der Gleichgewichtskonstante als Konsequenz, daß die gemessenen Differenzspektren für die Redoxübergänge $S_1 \rightarrow S_2$ und $S_2 \rightarrow S_3$ von den experimentellen Bedingungen abhängig sein könnten^[142].

Wir hatten bislang die mögliche Beteiligung des Wassers als Reaktant an den Redoxübergängen $S_i \rightarrow S_{i+1}$ ausgeklammert. Wasser kann sowohl an protolytischen als auch an Redoxreaktionen beteiligt sein. Von zentraler mechanistischer Bedeutung für die O_2 -Bildung ist die Frage: Auf welcher Redoxstufe entsteht die notwendige O—O-Bindung? Auf der Grundlage von Analogiebetrachtungen zur Realisierung der Umkehrreaktion (d.h. der O_2 -Reduktion zu H_2O) in biologischen Systemen (Übersicht siehe ^[85])

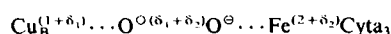
wurde gefolgert, daß die O—O-Bindung in Form eines zweikernigen verbrückten Peroxids auf der Redoxstufe S_3 gebildet wird^[100, 101]. Unter Berücksichtigung des in Abbildung 12 formulierten Gleichgewichts für S_2 ist eine Peroxidbildung bereits in S_2 möglich. Dies gilt auch, falls $M \rightarrow M^{ox} + e^-$ eine spezielle Änderung des Oxidationszustandes am katalytisch wirksamen Mn ist. Generell kann die O—O-Bildung auf der Redoxstufe des Peroxides durch eine Gleichgewichtsreaktion des in Gleichung (7) formulierten Typs beschrieben werden.



In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß an der Cytochrom-Oxidase die O—O-Bindung nach Dreielektronen-Reduktion des zweikernig komplexierten Sauerstoffs gespalten wird. Diese Reaktion ist stark entropiegetrieben^[144]. Analog könnte im wasseroxidierenden Enzymsystem eine O—O-Bindung auf der Redoxstufe von zwei oder drei Defektelektronen (S_2 oder S_3) gebildet werden. Damit ergibt sich die Frage, in welchem Redoxzustand die enthalpischen und entropischen Voraussetzungen für eine signifikante Besetzung der peroxidischen Form in Gleichung (7) erfüllt sind. Dieses Problem ist bislang nicht geklärt. Es existieren experimentelle Befunde, die mit der Existenz einer μ -Peroxobrücke in S_2 verträglich sind^[117, 118]. Auch die Verstärkung der lichtinduzierten H_2O_2 -Bildung nach Entfernung regulatorischer Untereinheiten des wasseroxidierenden Enzymsystems (siehe Abschnitt 4.6.2) könnte durch eine Destabilisierung peroxidischer Zwischenstufen in S_2 und/oder S_3 gedeutet werden^[145].

Demgegenüber wurde aus massenspektroskopischen Analysen der blitzinduzierten O_2 -Bildung nach Inkubation mit $H_2^{18}O$ gefolgert, daß keine peroxidische Zwischenstufe auf der Stufe von S_3 (oder S_2) gebildet wird^[146]. Diese Schlußfolgerung ist aus kinetischen Gründen aber nicht eindeutig (ausführliche Diskussion siehe ^[94, 125]). Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, daß ein sehr stabiler S_3 -Zustand existiert, dessen O-Atome nicht austauschbar sind^[147]. Eindeutige Ergebnisse über die mögliche Existenz peroxidischer Zwischenstufen sind nur dann zu erwarten, wenn entweder die zeitliche Auflösung bei der Aufnahme von Massenspektren erheblich verbessert wird oder andere spektroskopische Verfahren (IR-Spektroskopie, Raman-Spektroskopie) zur selektiven Detektion von OH- und O—O-Schwingungen im wasseroxidierenden Enzymsystem für die Redoxzustände S_i zur Verfügung stehen. Die Elektronenkonfiguration des katalytischen Wirkortes in den verschiedenen Redoxzuständen ist durch die aktuelle Elektronendichteverteilung zwischen dem zweikernigen Manganzentrum, der postulierten Komponente M und dem Substratliganden bestimmt. In Modellsystemen tritt bei Assoziationen von O_2 an Übergangsmetallzentren mit nicht vollständig besetzten d-Orbitalen eine Verteilung der Elektronendichte zwischen Ligand und Zentralatomen auf, die im Bereich zwischen O_2 und einer peroxidischen Konfiguration liegen kann; die Gesamtligandenhülle spielt dabei eine wesentliche Rolle^[148–152].

Analoge Phänomene können auch in enzymatischen Systemen auftreten. So wurde z. B. in einer pflanzlichen Cytochrom-Oxidase eine Ladungsdichteverteilung der Form



ermittelt, wobei $\delta_1 + \delta_2 \approx 1$, $\delta_1 > 0.5$ und $\delta_2 < 0.5$ sind^[153]. Eine wesentliche Rolle für die aktuelle Ladungsverteilung spielt die Möglichkeit der Bildung von H-Brücken, wie quantenmechanische Modellrechnungen für eine Zn-Cu-Superoxid-Dismutase zeigen^[154].

Die mögliche Bedeutung einer Ladungsdelokalisierung zwischen Ligand und Zentralatom für die Stabilisierung der intermediären Redoxstufen der Wasseroxidation wurde bei früheren Modellvorschlägen^[100, 101] ausführlich diskutiert. Diese Überlegungen führten zu dem Schluß, daß in der photosynthetischen Wasseroxidation die Redoxübergänge $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$ und $S_3 \rightarrow S_0$ etwa die gleiche Redoxpotentialdifferenz ($\Delta E \approx 1 \text{ V}$) aufweisen, während der Übergang $S_0 \rightarrow S_1$ eine deutlich niedrigere Redoxpotentialdifferenz hat (siehe Abb. 13). Ähnliche Werte wurden aus Ergebnissen für die verzögerte Fluoreszenz abgeschätzt^[155]. Messungen der Thermolumineszenz bestätigen, daß die Übergänge $S_1 \rightarrow S_2$ und $S_2 \rightarrow S_3$ praktisch die

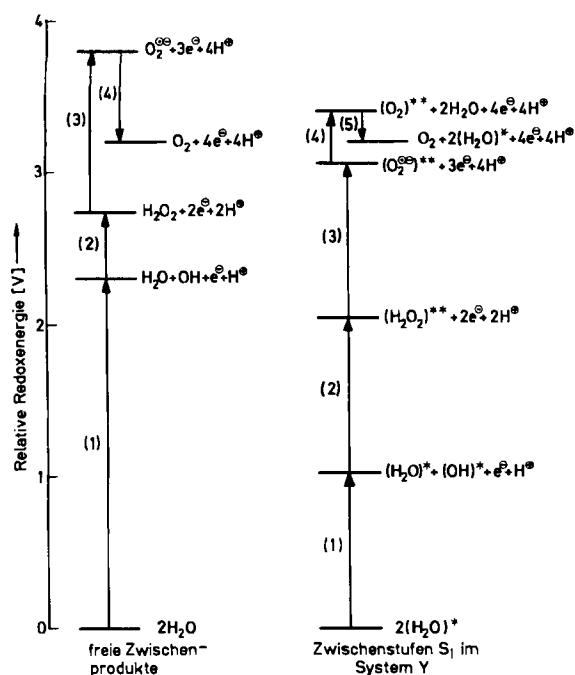


Abb. 13. Redoxenergieschema der Oxidation von zwei H_2O -Molekülen zu O_2 und 4H^+ durch eine Sequenz von vier Eielektronen-Redoxreaktionen in vitro (linke Seite) und im wasseroxidierenden Enzymsystem (rechte Seite). Dabei ist zur Vereinfachung die Energie der H_2O -Moleküle in vitro und im katalytischen Zentrum des wasseroxidierenden Enzymsystems auf das gleiche Niveau gelegt, obgleich sich die Absolutbeträge beträchtlich unterscheiden können. $(\text{OH})^+$, $(\text{H}_2\text{O}_2)^{++}$ und $(\text{O}_2^{\ominus})^{**}$ bedeuten die bezüglich des Redoxzustandes formalen Zwischenstufen der Wasseroxidation im Photosyntheseapparat. Dabei ist ausdrücklich zu betonen, daß diese Stufen den Zustand des gesamten katalytischen Wirkortes beschreiben. Die Stufen (1), (2), (3) bzw. (4) auf der rechten Seite des Bildes gelten für die Übergänge $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$, $S_3 \rightarrow S_4$ bzw. $S_0 \rightarrow S_1$. Die formale Analogie sagt nichts über die reale Reaktionsfolge aus. Der Vergleich soll nur ausdrücken, daß die Oxidationsstufe, die dem Zustand S_1 entspricht (M^{++}), erst im letzten Schritt der Folge als Oxidans wirken kann: $(S_1) \cdot S_4 \rightarrow (S_0) \cdot S_4$. Auf welcher Stufe sich tatsächlich eine O—O-Bindung bildet, ist noch zu klären (siehe Text). In diesem Schema wurde zur Vereinfachung nicht die Möglichkeit berücksichtigt, daß eine μ -Peroxybrücke bereits im Zustand S_1 gebildet werden kann [siehe Abb. 12 und Gleichung (7)] (weitere Details siehe [94, 101]).

gleiche Redoxenergie haben^[156]. Dies impliziert, daß bei signifikanter Besetzung des Zustandes $\text{M}(\text{Mn}^{\text{ox}}\text{Mn}^{\text{ox}})$ in S_2 das Redoxpotential von $\text{M}/\text{M}^{\text{ox}}$ für den Übergang $S_2 \rightarrow S_3$ sehr stark gegenüber dem der Reaktion $S_0 \rightarrow S_1$ verschoben ist. Dies kann durch starke elektrostatische Wechselwirkungen plausibel erklärt werden. Mechanistisch interessant ist außerdem, daß durch ADRY-Substanzen^{[157][*]} die Lebensdauer von S_2 und S_3 drastisch verkürzt wird^[158, 159], während S_1 unbeeinflusst bleibt. Thermodynamische Betrachtungen führten ferner zu dem Schluß, daß der Edukt-Produkt-Austausch am katalytischen Zentrum



(X symbolisiert koordinativ an Mn gebundene Spezies) ein exergonischer Prozeß ist^[100, 101]. Für diese Reaktion könnten H-Brücken ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen. H-Brücken sind wesentlich für die Stärke der O_2 -Bindung an Hämoglobine und Modellsysteme; die Geometrie der Bindung von O_2 an das Metallzentrum kann sich dabei beträchtlich ändern^[160].

Bezüglich der mit der H_2O -Oxidation gekoppelten protolytischen Reaktionen wurde durch Messungen mit hochempfindlichen Glaselektroden oder geeigneten pH-Indikatoren gezeigt, daß die H^+ -Freisetzung nicht synchron mit der O_2 -Bildung verläuft^[161–163]. Ein Deprotonierungsmuster von 1, 0, 1, 2 H^+ pro PS II scheint mit den Redoxübergängen $S_i \rightarrow S_{i+1}$ ($i=0–3$) gekoppelt zu sein^[162–168]. Dabei muß allerdings betont werden, daß dieses Muster nicht zwingend die tatsächlichen Deprotonierungsreaktionen der an die Manganzentren gebundenen Wassermoleküle (oder anderer Redoxstufen des Wassers) wiedergibt, da pK_a -Verschiebungen anderer deprotonierbarer Gruppen in der Proteinmatrix ebenfalls zur Freisetzung von Protonen führen. Man muß daher zwischen dem intrinsischen Deprotonierungsmuster der Ligandenhülle des katalytisch wirksamen Mangans und dem gemessenen Muster der Protonenfreisetzung mechanistisch genau unterscheiden^[101]. Diese Überlegung impliziert auch die Möglichkeit einer apparenten stöchiometrischen Kopplung mit nicht ganzzahligen Werten für die H^+ -Freisetzung bei den Redoxübergängen $S_i \rightarrow S_{i+1}$ im wasseroxidierenden Enzymsystem. In diesem Fall sollte man eine pH-Abhängigkeit für das H^+ -Freisetzungsmuster erwarten. Dies wurde bei Messungen zwischen $\text{pH}=6.0$ und 8.0 und bei Verwendung verschiedener Präparationen^[166–168] nicht beobachtet. Nach neuesten Messungen scheint bei $\text{pH} < 6$ eine Verschiebung in Richtung auf eine 1,1,1-Stöchiometrie einzusetzen^[167b]. Bislang gibt es keine Methode, um das intrinsische Deprotonierungsmuster direkt zu messen.

4.6. Polypeptide und weitere Cofaktoren im wasseroxidierenden Enzymsystem

In unseren bisherigen Überlegungen wurde ausschließlich die Natur der redoxaktiven Manganzentren (einschließlich der postulierten Komponente M) und des daran gebundenen Wassers diskutiert. Von essentieller Bedeutung für den Reaktionsablauf sind aber auch die umge-

[*] Beispiele für ADRY-Substanzen: Derivate von Carbonylcyanid- und α -Acyl- α -cyancarbonylphenylhydrazonen und 2-Anilino-3,5-dinitrothiophen [158b] sowie Dipicrylamin [158c].

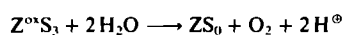
bende Proteinmatrix und weitere Cofaktoren, die sowohl die Redoxprozesse als auch die Thermodynamik der $S_i \rightarrow S_{i+1}$ -Übergänge beeinflussen. Der Mechanismus dieser „Feinabstimmung“ in der vierstufigen Oxidation von H_2O zu O_2 ist noch unverstanden. Es soll daher nur ein kurzer Abriss über einige experimentell gesicherte Ergebnisse gegeben werden.

4.6.1. Die Rolle von Cl^- und Ca^{2+} als Cofaktoren

Es ist seit langem bekannt, daß Cl^- eine wichtige Rolle bei der photosynthetischen H_2O -Oxidation spielt (Übersicht siehe [169–171]). Im Gegensatz zur absoluten Spezifität von Mangan kann Cl^- durch andere Anionen (z. B. Br^- , I^-) ersetzt werden. Aus ^{35}Cl -NMR-Messungen folgt, daß Cl^- reversibel mit einer mittleren Austauschgeschwindigkeit von $> 3 \cdot 10^4 s^{-1}$ ($25^\circ C$) gebunden wird [172]. Die Affinität für Cl^- hängt dabei vom Redoxzustand des wasseroxidierenden Enzymsystems ab: Sie ist niedrig in S_0 und S_1 , hoch in S_2 und S_3 [174]. Bindungsstudien mit dem Radioisotop $^{36}Cl^-$ führten zu dem Schluß, daß vier Cl^- pro PS II zur Reaktivierung der O_2 -Bildung an Cl^- -„freien“ Thylakoiden erforderlich sind [173]. Es existieren zwei spezifische Bindungsstellen für Cl^- [175, 176], deren Affinität sich um ca. eine Größenordnung unterscheidet [176]. An Cl^- -verarmten PS-II-Membranfragmenten sind bestimmte $S_i \rightarrow S_{i+1}$ -Übergänge blockiert [177–180]. Bei Cl^- -Mangel entsteht ein licht-induzierter S_2^* -Zustand mit ungewöhnlichen Eigenschaften [181]. Dieser S_2^* -Zustand zeigt kein „multiline“-Signal im EPR-Spektrum, aber das Signal bei $g = 4.1$. Nach Cl^- -Zugabe wird bei völliger Dunkelheit S_2^* in S_2 mit normalem „multiline-Signal“ umgewandelt.

Hinsichtlich der Funktion wird angenommen, daß Cl^- zur Ladungskompensation bei Redoxübergängen im wasseroxidierenden Enzymsystem dienen könnte und an Protonierungs-/Deprotonierungsreaktionen bei der H_2O -Oxidation beteiligt ist [170, 182, 183]. Eine reversible Cl^- -Bindung an mehrere Redoxzustände S_i kann außerdem die thermodynamischen Eigenschaften beeinflussen [181, 184]. Die Möglichkeit, daß Cl^- als Brückenligand zwischen den Manganzentren des wasseroxidierenden Enzymsystems gebunden wird [183, 185] – mit ähnlicher Funktion wie bei „inner-sphere“-Elektronentransferprozessen zwischen komplexierten Übergangsmetall-Ionen in Lösung (Übersicht siehe [186]) – ist nach EXAFS-Messungen praktisch auszuschließen. Diese zeigen, daß der Abstand zwischen gebundenem Cl^- und gebundenem Mn mindestens 3–4 Å beträgt [141]. Außerdem ist aus der Superhyperfeinaufspaltung des „multiline-Signals“ zu schließen, daß Cl^- sehr wahrscheinlich nicht direkt mit dem Mn der funktionellen Gruppe assoziiert ist [187].

Einen ersten Hinweis auf die mögliche Rolle von Ca^{2+} lieferten Messungen der O_2 -Bildung an Cyanobakterien [188, 189]. Nach Entfernung regulatorischer Untereinheiten (siehe Abschnitt 4.6.2) aus Fragmenten der PS-II-Membran höherer Pflanzen (z. B. durch Salzbehandlung, siehe [190, 191]) kann eine Restaurierung der O_2 -Bildungsaktivität allein durch Zugabe von $CaCl_2$ erreicht werden [192, 193]. Es wurde gefolgert, daß bei Ca^{2+} -Mangel die Reaktion



blockiert wird [194]. Kürzlich wurde an PS-II-Membranfragmenten, die durch milde Proteolyse modifiziert wurden, eine partielle Restaurierung der im ns-Bereich ablaufenden P680⁺-Reduktion gefunden, die spezifisch für Ca^{2+} ist [195]. Daraus ist zu schließen, daß Ca^{2+} essentiell für die funktionelle Kopplung des katalytischen Wirkortes mit dem Reaktionszentrum ist [195, 196]. Die Entfernung von Ca^{2+} aus seinem nativen Bindungsort führt wahrscheinlich zur vollständigen Blockierung des wasseroxidierenden Enzymsystems [197]. Ca^{2+} ist an ein intrinsisches Membranprotein gebunden, dessen Konformation durch ein extrinsisch gebundenes 24-kDa-Protein (siehe Abschnitt 4.6.2) beeinflusst wird [198]. Die Natur des Ca^{2+} -Bindungsproteins und die Funktion von Ca^{2+} sind noch ungeklärt. Wahrscheinlich sind strukturelle Effekte in der Umgebung des katalytischen Wirkortes wesentlich [195].

4.6.2. Die Polypeptidstruktur des wasseroxidierenden Enzymsystems

Die am katalytischen Zentrum eines Enzyms ablaufenden Prozesse werden direkt durch das Apoenzym beeinflusst. Darüber hinaus können Polypeptide, die nicht den katalytischen Wirkort enthalten, als regulatorische Einheiten den Reaktionsablauf über Strukturänderungen indirekt beeinflussen. Dies wurde sehr deutlich für das Enzymsystem der Cytochrom-Oxidase demonstriert, das die Umkehrreaktion, d. h. die O_2 -Reduktion zu H_2O , katalysiert (Übersicht siehe [199, 200]). Interessanterweise hat sich in diesem Enzym die Natur der Polypeptide, die das katalytische Zentrum (Cu_B , $Cyt a_3$) tragen, während der Evolution vergleichsweise wenig verändert, während die Zahl der regulatorischen Untereinheiten bei der phylogenetischen Entwicklung deutlich zunahm [201]. Es wurde daher vermutet, daß ein analoges Phänomen auch beim wasseroxidierenden Enzymsystem auftritt [51]. Damit ergibt sich die Frage sowohl nach der Natur des Polypeptids (der Polypeptide), das (die) das katalytische, zweikernige Manganzentrum enthält (enthalten), als auch nach Proteinen, die als regulatorische Untereinheiten wirken.

Das Apoprotein der funktionellen Mangangruppe ist noch nicht zweifelsfrei identifiziert. Als mögliche Kandidaten werden das in Abschnitt 3.2 beschriebene Polypeptid CP47 [96, 202] oder ein integrales 34-kDa-Polypeptid [203], das D-1 oder D-2 sein könnte [204], diskutiert.

Die Manganbindung wird durch ein oberflächengebundenes Lysin-reiches 33-kDa-Polypeptid wesentlich verstärkt, das nicht mit dem integralen 34-kDa-Polypeptid verwandt ist (die 34-kDa-Spezies ist in der Plastiden-DNA, die 33-kDa-Spezies in der Kern-DNA codiert [205]). Mehrere Befunde zeigen, daß das 33-kDa-Polypeptid an der Manganbindung nicht direkt beteiligt ist: 1) Bei der Photoaktivierung wird Mn auch dann in den katalytischen Wirkort eingebaut, wenn dieses Polypeptid fehlt [206]. 2) Es enthält kein Histidin [207], das eine wichtige Rolle bei der Komplexierung von Metallzentren spielt [208]. 3) Die selektive Ablösung des 33-kDa-Polypeptids führt zwar zum Verlust der Fähigkeit zur O_2 -Bildung, nicht aber zum Mn-Verlust [96]; die Bindung von Mn wird allerdings destabilisiert.

Aus SERS (Surface Enhanced Raman Scattering Spectroscopy)-Messungen ist zu schließen, daß die zweikernige Mn-Gruppe des katalytischen Zentrums im Bindungsprotein an der Grenzfläche zum assoziierten 33-kDa-Polypeptid angeordnet ist, wobei die gemessene Raman-Frequenz von 225 cm^{-1} sowohl mit einer Mn-O- oder Mn-N- als auch einer Mn-Cl-Schwingung übereinstimmt^[209]. Aus Untersuchungen mit den analogen Substraten NH_2OH und NH_2NH_2 wird gefolgert, daß der H_2O -Bindungsort an der funktionellen Gruppe eine Dimension von $4 \times 2.5 \times 1.5\text{ \AA}$ hat^[210]. Neueste Untersuchungen zeigen allerdings, daß eine kooperative Bindung von zwei NH_2NH_2 -Molekülen am katalytischen Zentrum stattfindet^[211, 212]. Dies bedeutet, daß entweder die Größe des H_2O -Bindungsorts variabel oder obige Abschätzung zu modifizieren ist.

Das 33-kDa-Polypeptid ist eine essentielle regulatorische Untereinheit, die in allen bislang untersuchten O_2 -bildenden Photosyntheseorganismen vorkommt. Die enge Verwandtschaft dieser Einheit aus sehr verschiedenen Spezies folgt aus den immunologischen Kreuzreaktionen mit den entsprechenden Antikörpern^[213] und aus Rekonstitutionsexperimenten^[214]. Neben dieser universellen regulatorischen Untereinheit des wasseroxidierenden Enzymsystems existieren weitere Polypeptide mit Steuerfunktion. In ähnlicher Weise wie bei der Cytochrom-Oxidase^[201] wurden diese Polypeptiduntereinheiten in der phylogenetischen Entwicklung stark variiert. Es scheint, daß dies ein generelles Phänomen bei Enzymsystemen ist, die das Redoxsystem $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$ bei der Photosynthese und bei der Atmung biologisch „nutzbar machen“ können. In höheren Pflanzen sind bislang ein 17-kDa- und ein 24-kDa-Polypeptid^[215] charakterisiert worden, die in Cyanobakterien nicht auftreten^[216]. Das 24-kDa-Polypeptid beeinflußt die Ca^{2+} -Wirkung^[198] und erhöht zugleich auch die effektive Konzentration an Cl^- ^[217]. Nach Entfernung des 24-kDa-Polypeptids (durch NaCl-Behandlung) ist ein Teil des wasseroxidierenden Enzymsystems funktionell vom Reaktionszentrum entkoppelt; die Rückbindung führt zur Rekonstitution der O_2 -Bildung^[218, 219]. Inwieweit dieser Effekt mit einer Ca^{2+} -Affinitätsänderung korreliert, muß quantitativ noch gezeigt werden. Das 17-kDa-Polypeptid bindet spezifisch an die 24-kDa-Untereinheit^[220] und erhöht ebenfalls die effektive Cl^- -Konzentration im wasseroxidierenden Enzymsystem.

Kürzlich wurden weitere Polypeptide im Bereich von 4–6 kDa entdeckt^[221], deren Funktion im Photosystem II allerdings noch ungeklärt ist.

Faßt man die hier kurz beschriebenen Ergebnisse zusammen, so ergibt sich stark vereinfachend das in Abbildung 14 dargestellte Schema der strukturellen Organisation des wasseroxidierenden Enzymsystems. Dabei wurde nur das zweikernige Mn-Zentrum gezeichnet, an dem die H_2O -Oxidation stattfindet. Die beiden anderen Manganionen, die wahrscheinlich ebenfalls für die H_2O -Oxidation von Bedeutung sind^[94], wurden weggelassen, da ihre Rolle und genaue strukturelle Anordnung noch nicht eindeutig geklärt sind. Man könnte in Analogie zur Laccase^[222] oder zur Cytochrom-Oxidase^[85] vermuten, daß diese beiden Mn-Ionen am Elektronentransport vom katalytischen Wirkort zum Reaktionszentrum beteiligt sind^[51] oder die Komponente M bilden^[125] oder über H-Brücken von H_2O -Molekülen der Ligandenhülle zur Stabilisierung der räum-

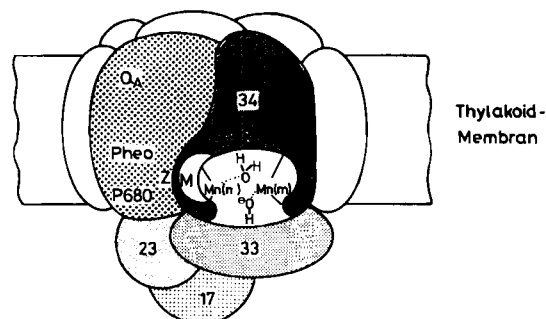


Abb. 14. Schema der strukturellen Organisation des wasseroxidierenden Enzymsystems in höheren Pflanzen. Anders als in Abb. 2 wurden der katalytische Wirkort der Wasseroxidation (schwarzer Kreis in Abb. 2) spezifiziert und die drei bislang gut charakterisierten regulatorischen Polypeptide von 17, 23 und 33 kDa explizit angegeben. Weitere Polypeptide, deren Rolle noch nicht geklärt ist, wurden ebenso weggelassen wie Ca^{2+} und Cl^- , deren Bindungsorte noch unbekannt sind (siehe Text). Die Komponenten P, I und A von Abb. 2 sind in ihrer bislang identifizierten Form (P680, Pheo, Q_A) angegeben. Die unterschiedliche Tönung des Polypeptidkomplexes in der Membran bezieht sich ausschließlich auf die Funktion (Reaktionszentrum = gepunktet; wasseroxidierendes Enzymsystem: dunkelgrau; PQ-reduzierendes Enzym: weiß). Es muß betont werden, daß diese Unterscheidung nicht zwingend auch verschiedene Polypeptide impliziert (z. B. könnte das gesamte 34-kDa-Polypeptid an der Bindung von Komponenten sowohl des Reaktionszentrums als auch des katalytischen Wirkortes der Wasseroxidation beteiligt sein, siehe Abschnitt 3.2 und 4.6.2).

lichen Verhältnisse am katalytischen Wirkort beitragen^[223]. Von den regulatorischen Untereinheiten wurden neben dem universellen 33-kDa-Protein ebenfalls zur Vereinfachung nur die gut charakterisierten 17-kDa- und 23-kDa-Polypeptide in Abbildung 14 eingezeichnet.

4.6.3. Die mögliche Rolle von Lipiden im wasseroxidierenden Enzymsystem

Aus dem Vergleich der strukturellen und funktionellen Organisation des wasseroxidierenden Enzymsystems und der Cytochrom-Oxidase ergibt sich unmittelbar eine weitere grundsätzliche Frage: Welche Rolle spielen Lipide als essentielle und spezifische Bestandteile für die Funktion dieser Enzymkomplexe? Das negativ geladene Lipid Cardiolipin ist über eine vergleichsweise feste nichtkovalente Bindung mit Cytochrom-Oxidase assoziiert und hat für dessen katalytische Aktivität wesentliche Bedeutung^[224, 225]. Ein analoger Effekt existiert möglicherweise auch für das wasseroxidierende Enzymsystem, da das ebenfalls negativ geladene Lipid Sulfochinovosyldiacylglycerin relativ fest an PS-II-Proteinkomplexe gebunden ist^[226]. An PS-II-Membranfragmenten, deren Lipidgehalt durch Detergensbehandlung bei der Präparation vermindert war, wird die O_2 -Bildungsgeschwindigkeit durch Zusatz von Lipiden um bis zu 80% stimuliert^[227]. Daraus folgt, daß Lipide auch für die Aktivität des wasseroxidierenden Enzymsystems von funktioneller Bedeutung sein können. Interessanterweise enthält Sulfochinovosyldiacylglycerin im Gegensatz zu den meisten Lipiden der Thylakoid-Membran einen hohen Anteil gesättigter Fettsäuren. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, daß das saure Lipid an Protein gebunden ist. Es muß aber betont werden, daß die mögliche funktionelle Rolle von Lipiden in Enzymsystemen und speziell eine mögliche Bedeutung für das wasseroxidierende Enzymsystem noch völlig ungeklärt sind. Deshalb wurden Lipide in Abbildung 14 nicht berücksichtigt.

5. Das PQ-reduzierende Enzym

Die Bildung von Plastohydrochinon (PQH_2) aus Plastochinon (PQ) erfordert die Kooperation von zwei Elektronen. In Analogie zur Wasseroxidation findet die Reduktion von PQ zu PQH_2 durch eine Sequenz von Einelektronen-Redoxschritten statt^[228, 229]. Dabei wird ein PQ-Molekül des Speichers statistisch an einen speziellen Bindungs-ort assoziiert. Nach Aufnahme eines Elektrons aus dem $\text{Q}_\text{A}^\ominus$ des Reaktionszentrums (siehe Abschnitt 3.1) ist die gebildete Semichinonform, die als $\text{Q}_\text{B}^\ominus$ bezeichnet wird, am Bindungs-ort hoch stabilisiert^[1]. Durch Aufnahme eines zweiten Elektrons bildet sich dann PQH_2 .

Das durch Protonierung entstandene Plastohydrochinon ist relativ schwach gebunden und tauscht gegen ein oxidiertes PQ-Molekül des Speichers aus (Übersicht siehe^[230]). Der Bindungs-ort von Q_B befindet sich in einem als D-1 bezeichneten 32-kDa-Polypeptid (siehe Abschnitt 3.2). Zwischen Q_A und Q_B ist ein high-spin- Fe^{2+} angeordnet, das sehr wahrscheinlich an vier Histidinreste der Polypeptide D-1 und D-2 koordinativ gebunden ist (Übersicht siehe^[231]). Es wurde diskutiert, daß dieses Fe^{2+} unter Oxidation zum Fe^{3+} über einen „push-pull“-Mechanismus direkt am Elektronentransport von $\text{Q}_\text{A}^\ominus$ zu Q_B oder $\text{Q}_\text{B}^\ominus$ beteiligt ist^[232]. Jüngste Ergebnisse an isolierten Reaktionszentren photosynthetisierender Purpurbakterien zeigen aller-

dings, daß die Entfernung von Fe^{2+} die Elektronentransferkinetik praktisch nicht beeinflußt^[233]. Interessant ist, daß nach Entfernung von Fe^{2+} die photochemische Quantenausbeute der $\text{Q}_\text{A}^\ominus$ -Bildung im Reaktionszentrum deutlich abnimmt. Dies beruht auf einer 20- bis 50fachen Verlangsamung des Elektronentransfers von Bacteriopheophytin zu $\text{Q}_\text{A}^\ominus$ ^[24]. Der Einbau anderer zweiwertiger Kationen (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , nicht aber Mg^{2+} oder Ca^{2+}) am Fe^{2+} -Bindungs-ort führt zur Rekonstitution der Elektronentransportgeschwindigkeit und der hohen Quantenausbeute^[24, 233]. Die Ergebnisse zeigen, daß weder Fe^{2+} noch ein anderes zweiwertiges Kation für einen schnellen Elektronentransfer von $\text{Q}_\text{A}^\ominus$ zu Q_B ($\text{Q}_\text{B}^\ominus$) erforderlich ist. Das Fe^{2+} in situ ist vielmehr notwendig, um die speziellen funktionellen Eigenschaften von Q_A zu etablieren.

Es wurde kürzlich gezeigt, daß sich die Eigenschaften des PQ-reduzierenden Enzyms durch Detergensbehandlung deutlich ändern^[234–236]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Wechselwirkung mit speziellen Lipiden auch für dieses Polypeptid funktionelle Bedeutung hat.

6. Reaktionsschema der photosynthetischen Wasserspaltung

Faßt man die in diesem Beitrag beschriebenen Ergebnisse und Modellvorstellungen zusammen, so läßt sich die Reaktionsfolge der photosynthetischen Wasserspaltung durch das Schema in Abbildung 15 darstellen.

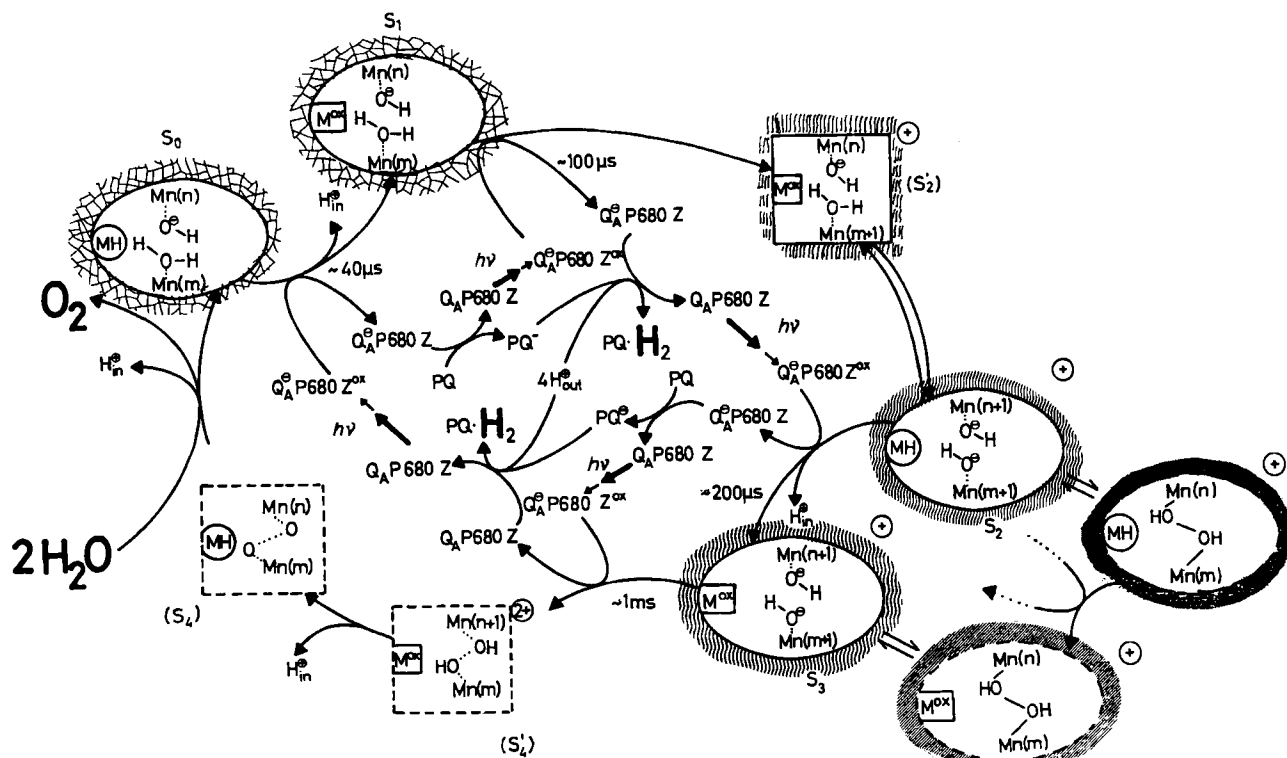


Abb. 15. Reaktionsschema der photosynthetischen Wasserspaltung im Photosystem II. Die Reaktionsfolgen der Funktionseinheiten sind durch unterschiedliche Grautönungen gekennzeichnet: 1) Der mittlere graue Ring symbolisiert die Reaktionsfolge im Reaktionszentrum, wobei die Oxidation von Z durch P680^\ominus nicht explizit angegeben wurde. 2) Der äußere Ring beschreibt die Reaktionsfolge am katalytischen Wirkort des wasseroxidierenden Enzymsystems und die innere weiße Fläche die Reaktionsfolge im PQ-reduzierenden Enzym. Der katalytische Wirkort der Wasseroxidation ist nur symbolisch dargestellt, da weder die Ligandenhülle noch die Natur von M bekannt sind; n und m charakterisieren den Oxidationszustand des Mangans (siehe Text). Die Proteinumgebung ist durch schraffierte Flächen angedeutet, wobei unterschiedliche Symbole zur Unterscheidung der verschiedenen Konformationszustände in S_0 , S_1 und S_2 , S_3 (siehe Abschnitt 4.5 und [143a]) benutzt wurden. Die übrigen Symbole sind im Text erklärt. Es wird angenommen, daß S_2 und S_3 positiv gegenüber den anderen Redoxzuständen geladen sind. Eine Lokalisierung dieser Ladung ist bislang nicht möglich. Bezüglich der Deprotonierung wird angenommen, daß sich m und n unterscheiden, so daß beim $\text{O}_2/2\text{H}_2\text{O}$ -Ligandenaustausch eine Deprotonierung am höherwertigen Mangan ($n > m$) erfolgt. Sollte die Oxidation $\text{M} \rightarrow \text{M}^\text{ox}$ nur einen speziellen Redoxübergang am katalytischen Mangan mit kleiner Redoxpotentialdifferenz indizieren (siehe Abschnitt 4.5), so ist wahrscheinlich $n = m$, und in S_0 liegt Mn in n und $n - 1$ vor. Die Möglichkeit eines Ladungstransfers von den Substratligenanden zu den Zentralatomen unter Bildung einer μ -Peroxo-Brücke [siehe Gl. (7)] ist in der Abbildung berücksichtigt worden. Ferner wird in Übereinstimmung mit dem extrinsischen Deprotonierungsmuster vorausgesetzt, daß M bei der Oxidation ein H^\oplus abgibt.

7. Ausblick

In dieser kurzen Übersicht wurde versucht zu zeigen, welche Funktions- und Strukturprinzipien von biologischen Systemen angewendet werden, um die Sonnenenergienutzung durch Wasserspaltung und damit den Aufbau einer „biologischen Knallgaskette“ mit gebundenem Wasserstoff zu realisieren. Durch die intensive Forschungsarbeit der letzten beiden Jahrzehnte konnten wichtige Erkenntnisse über das Organisationsschema des Gesamtprozesses erhalten werden. Wesentliche mechanistische Aspekte sind noch weitgehend unverstanden. Die Bedeutung dynamischer Strukturänderungen der Proteinmatrizen für die Steuerung einzelner Reaktionsschritte und für deren Kopplung zum Gesamtprozeß ist noch ungeklärt. Es bleibt zu hoffen, daß neue Erkenntnisse insbesondere auf dem Gebiet der Proteinphysik und dem sich rasch entwickelnden Feld der Moleküldynamik zu einem tieferen mechanistischen Verständnis der photosynthetischen Wasserspaltung als zentralem Prozeß der biologischen Sonnenenergienutzung führen werden.

Ich danke allen meinen Mitarbeitern sehr herzlich für Einsatzfreude, Begeisterung und hervorragende Zusammenarbeit. Ohne ihr Engagement wären viele Arbeiten, die hier zitiert wurden, nicht möglich gewesen. Für besondere Beiträge, kritische Durchsicht des Manuskriptes und wertvolle Hinweise danke ich H. J. Eckert, P. Gräber, B. Hanssum, K.-D. Irrgang und M. Völker. Frau A. Bove-Gräber danke ich für das Anfertigen der Zeichnungen. Mein Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Einzelprojekte und SFB 312), dem Fonds der Chemischen Industrie, dem Bundesministerium für Forschung und Technologie und dem EPR-Sondervermögen für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeiten.

Eingegangen am 12. August 1986,
veränderte Fassung am 8. Januar 1987 [A 625]

- [1] L. Boltzmann: *Der zweite Hauptsatz der Wärmetheorie*. In: *Populäre Schriften*, J. A. Barth, Leipzig 1904.
- [2] E. A. Berghorn, *Sci. Am.* 224 (1971) S. 30.
- [3] a) W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler (Hrsg.): *Biophysics*, Springer, Berlin 1983; b) G. Renger in [3a], S. 515–542.
- [4] G. Renger in [3a], S. 347–371.
- [5] a) Govindjee (Hrsg.): *Photosynthesis, Energy Conservation by Plants and Bacteria*, Vol. 1, Academic Press, New York 1982; b) M. Y. Okamura, G. Feher, N. Nelson in [5a], S. 195–272.
- [6] a) Govindjee (Hrsg.): *Bioenergetics of Photosynthesis*, Academic Press, New York 1975; b) R. S. Knox in [6a], S. 183–221.
- [7] A. C. Ley, D. Mauzerall, *Biochim. Biophys. Acta* 680 (1982) 95.
- [8] C. C. Wolff, H. T. Witt, *Z. Naturforsch.* B 24 (1969) 1031.
- [9] G. Renger, C. Wolff, *Biochim. Biophys. Acta* 460 (1977) 57.
- [10] G. Döring, G. Renger, J. Vater, H. T. Witt, *Z. Naturforsch.* B 24 (1969) 1139.
- [11] M. S. Davis, A. Forman, J. Fajer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4170.
- [12] a) H. J. den Blanken, A. J. Hoff, A. P. J. M. Jongenelis, B. A. Diner, *FEBS-Lett.* 157 (1983) 21; b) M. E. Michel-Beyerle (Hrsg.): *Antennas and Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria*, Springer, Berlin 1985; c) A. J. Hoff in [12b], S. 150–163.
- [13] W. L. Butler, D. Madge, S. J. Berens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1984) 7510.
- [14] V. V. Klimov, A. V. Klevanik, V. A. Shuvalov, A. A. Krasnovsky, *FEBS-Lett.* 82 (1977) 183.
- [15] a) J. Biggins (Hrsg.): *Progress in Photosynthetic Research*, Nijhoff, Dordrecht 1987; b) A. R. Holzwarth, H. Brock, G. H. Schatz in [15a], Vol. 1, S. 61–65.
- [16] H. J. Eckert, G. Renger, J. Bernarding, P. Faust, H. J. Eichler, J. Salk, *Biochim. Biophys. Acta* (1987), im Druck.
- [17] H. J. Eckert, G. Renger, *Photochem. Photobiol.* 31 (1980) 501.
- [18] G. Renger, Y. Koike, M. Yuasa, Y. Inoue, *FEBS-Lett.* 163 (1983) 89.

- [19] M. C. W. Evans, Y. E. Atkinson, R. C. Ford, *Biochim. Biophys. Acta* 806 (1985) 247.
- [20] A. J. Hoff, I. I. Proskuryakov, *Biochim. Biophys. Acta* 808 (1985) 343.
- [21] J. H. A. Nugent, B. A. Diner, M. C. W. Evans, *FEBS-Lett.* 154 (1981) 328.
- [22] A. W. Rutherford, P. Mathis, *FEBS-Lett.* 154 (1983) 328.
- [23] K. Witt, *FEBS-Lett.* 38 (1973) 116.
- [24] C. Kirmeier, D. Holton, R. J. Debus, G. Feher, M. Y. Okamura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 6407.
- [25] W. W. Parson, B. Ke in [5a], S. 331–385.
- [26] R. P. J. Williams, G. R. Moore, P. E. Wright in A. W. Addison, W. R. Cullen, D. Dolphin, B. R. James (Hrsg.): *Biological Aspects of Inorganic Chemistry*, Wiley, New York 1977, S. 369–401.
- [27] A. V. Xavier, J. J. G. Moura, I. Moura, *Struct. Bonding (Berlin)* 43 (1981) 187.
- [28] A. K. Churg, A. Warshel, *Biochemistry* 25 (1986) 1675.
- [29] D. De Vault, *Q. Rev. Biophys.* 13 (1980) 387.
- [30] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* 811 (1985) 265.
- [31] R. T. Ross, R. J. Anderson, T. L. Hsia, *Photochem. Photobiol.* 24 (1976) 267.
- [32] A. S. K. Sun, K. Sauer, *Biochim. Biophys. Acta* 234 (1971) 399.
- [33] G. Renger, H. J. Eckert, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 7 (1980) 101.
- [34] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, H. Michel, R. Huber, *Nature (London)* 318 (1985) 618.
- [35] G. Renger, *Physiol. Veg.* 24 (1986) 509.
- [36] A. W. Rutherford, *Biochem. Soc. Trans.* 14 (1985) 12.
- [37] J. D. Rochaix, M. Dron, M. Raire, P. Malnoe, *Plant Mol. Biol.* 3 (1984) 363.
- [38] D. J. Kyle, *Photochem. Photobiol.* 41 (1985) 107.
- [39] A. A. Brown, C. W. Gilbert, R. Guy, C. J. Arntzen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6310.
- [40] J. Kyte, R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105.
- [41] A. Trebst, B. Depka in [13a], S. 216–224.
- [42] K.-D. Irrgang, G. Renger, J. Vater, *FEBS-Lett.* 204 (1986) 67.
- [43] a) Y. Inoue, A. R. Crofts, Govindjee, N. Murata, G. Renger, K. Satoh (Hrsg.): *The Oxygen Evolving System in Photosynthesis*, Academic Press (Japan) 1983; b) A. Yamagishi, K. Satoh in [43a], S. 39–48.
- [44] H. Y. Nakatani in [43a], S. 49–54.
- [45] C. de Vitry, F. A. Wollmann, P. Deleplaire, *Biochim. Biophys. Acta* 767 (1984) 415.
- [46] a) K. D. Irrgang, H. J. Eckert, G. Renger, J. Vater, unveröffentlicht; b) O. Nanba, K. Satoh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 109; c) R. V. Danielius, K. Satoh, P. J. M. van Kan, J. J. Plijter, A. M. Nuijs, H. van Gorkum, *FEBS-Lett.* 213 (1987) 241; d) J. B. Marder, D. J. Chapman, A. Telfer, P. J. Nixon, J. Barber, *Plant. Mol. Biol.* (1987), im Druck.
- [47] W. Junge, H. T. Witt, *Z. Naturforsch.* B 23 (1968) 244.
- [48] P. Joliot, G. Barbieri, R. Chabaud, *Photochem. Photobiol.* 10 (1969) 302.
- [49] B. Kok, B. Forbush, M. P. McGloin, *Photochem. Photobiol.* 11 (1970) 457.
- [50] P. Joliot, B. Kok in [6a], S. 387–412.
- [51] G. Renger, Govindjee, *Photosynth. Res.* 6 (1985) 33.
- [52] J. A. van Best, P. Mathis, *Biochim. Biophys. Acta* 503 (1978) 178.
- [53] G. Renger, H. J. Eckert, W. Weiss in [43a], S. 73–82.
- [54] K. Brettel, H. T. Witt, *Photobiochem. Photobiophys.* 6 (1983) 253.
- [55] H. J. Eckert, G. Renger, H. T. Witt, *FEBS-Lett.* 167 (1984) 316.
- [56] J. P. Dekker, J. J. Plijter, L. Ouwehand, H. J. van Gorkum, *Biochim. Biophys. Acta* 767 (1984) 176.
- [57] G. Renger, W. Weiss, *Biochem. Soc. Trans.* 14 (1985) 17.
- [58] G. T. Babcock, K. Sauer, *Biochim. Biophys. Acta* 376 (1975) 315.
- [59] G. T. Babcock, R. E. Blankenship, K. Sauer, *FEBS-Lett.* 61 (1976) 286.
- [60] J. T. Warden, R. E. Blankenship, K. Sauer, *Biochim. Biophys. Acta* 432 (1976) 462.
- [61] C. F. Yocum, C. T. Yerkes, R. E. Blankenship, R. R. Sharp, G. T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 7507.
- [62] H. Conjeaud, P. Mathis, *Biochim. Biophys. Acta* 590 (1980) 353.
- [63] M. Boska, K. Sauer, W. Buttner, G. T. Babcock, *Biochim. Biophys. Acta* 722 (1983) 327.
- [64] G. Renger, M. Völker, W. Weiss, *Biochim. Biophys. Acta* 766 (1984) 582.
- [65] G. Renger, C. Wolff, *Biochim. Biophys. Acta* 423 (1976) 610.
- [66] G. Havemann, P. Mathis, *Biochim. Biophys. Acta* 440 (1976) 346.
- [67] P. J. O'Malley, G. T. Babcock, R. C. Prince, *Biochim. Biophys. Acta* 766 (1984) 283.
- [68] M. Brok, F. C. Ebskamp, A. J. Hoff, *Biochim. Biophys. Acta* 809 (1985) 421.
- [69] W. Weiss, G. Renger, *Biochim. Biophys. Acta* 850 (1986) 173.
- [70] B. A. Diner, C. de Vitry, *Adv. Photosynth. Res. Proc. Int. Congr. Photosynth.* 6th 1983 1 (1984) 407.

- [71] J. P. Dekker, M. Brok, H. G. van Gorkom, *Adv. Photosynth. Res. Proc. Int. Congr. Photosynth. 6th 1983 I* (1984) 171.
- [72] W. Weiss, G. Renger, *FEBS-Lett.* 169 (1984) 219.
- [73] E. J. Land in [71].
- [74] E. K. Pistorius, A. E. Gau, *FEBS-Lett.* 206 (1986) 243.
- [75] P. Rich, *Photosynth. Res.* 6 (1985) 335.
- [76] a) W. C. Rodriguez, T. K. Chandraseker, G. T. Babcock in [15a], Vol. 1, S. 471; b) Y. Takahashi, M. Takahashi, K. Satoh, *FEBS-Lett.* 208 (1986) 347; c) M. Ikeuchi, Y. Inoue, *ibid.* 210 (1987) 71.
- [77] G. Renger, W. Weiss, *Adv. Photosynth. Res. Proc. Int. Congr. Photosynth. 6th 1983 I* (1984) 253.
- [78] J. Fajer, M. S. Davis, A. Forman, V. K. Klimov, E. Dolan, B. Ke, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7143.
- [79] M. Gläser, C. Wolff, G. Renger, *Z. Naturforsch. C31* (1976) 712.
- [80] K. Brettel, E. Schlodder, H. T. Witt, *Biochim. Biophys. Acta* 766 (1984) 403.
- [81] G. P. Anderson, J. E. Draheim, E. L. Gross, *Biochim. Biophys. Acta* 810 (1985) 123.
- [82] G. Renger, *Top. Curr. Chem.* 69 (1977) 39.
- [83] P. George in T. E. King, H. S. Mason, M. Morrison (Hrsg.): *Oxidases and Related Redox Systems, Vol. 1*, Wiley, New York 1965, S. 3–36.
- [84] L. T. Krishalik, *Biochim. Biophys. Acta* 849 (1986) 162.
- [85] B. G. Malmström, *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 21.
- [86] R. Radmer, G. Cheniae in J. Barber (Hrsg.): *Primary Processes of Photosynthesis*, Elsevier/North Holland, Amsterdam 1977.
- [87] T. Wydrzynski in [5a], S. 469–506.
- [88] J. Ames, *Biochim. Biophys. Acta* 726 (1983) 1.
- [89] J. M. Olson, *Science* 168 (1970) 438.
- [90] a) G. Renger, *Z. Naturforsch. C25* (1970) 966; *Eur. J. Biochem.* 27 (1972) 259.
- [91] W. J. F. Vermaas, G. Renger, G. Dohnt, *Biochim. Biophys. Acta* 704 (1984) 194.
- [92] G. M. Cheniae, I. F. Martin, *Biochim. Biophys. Acta* 197 (1971) 219.
- [93] N. Tamura, G. M. Cheniae, *Biochim. Biophys. Acta* 809 (1985) 245.
- [94] G. Renger, *Photosynthetica* 21 (1987), im Druck.
- [95] G. Mavankal, D. C. McCain, T. M. Bricker, *FEBS-Lett.* 202 (1986) 235.
- [96] T. Ono, Y. Inoue, *FEBS-Lett.* 168 (1984) 281.
- [97] T. Ono, H. Kajikawa, Y. Inoue, *Plant Physiol.* 80 (1986) 85.
- [98] J. Barber, H. Y. Nakatani, R. Mansfield, *Isr. J. Chem.* 21 (1981) 243.
- [99] S. T. Allakhverdiev, M. A. Shafiev, V. V. Klimov, *Photobiochem. Photobiophys.* 12 (1986) 61.
- [100] G. Renger, *FEBS-Lett.* 81 (1977) 223.
- [101] G. Renger in H. Metzner (Hrsg.): *Photosynthetic Water Oxidation*, Academic Press, London 1978, S. 229–248.
- [102] J. A. Gilbert, D. S. Eggleston, W. R. Murphy, Jr., D. A. Geselowitz, D. J. Hodgson, T. J. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3855.
- [103] R. Ramaraj, A. Kira, M. Kaneko, *Angew. Chem.* 98 (1986) 1012; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 1009.
- [104] W. B. Lewis, L. O. Morgan in R. L. Carloer (Hrsg.): *Paramagnetic Relaxation in Solutions in Transitional Metal Chemistry, Vol. 4*, Marcel Dekker, New York 1986, S. 33–112.
- [105] T. Wydrzynski, N. Zumbulyadis, P. G. Schmidt, Govindjee, *Biochim. Biophys. Acta* 408 (1975) 349.
- [106] T. Wydrzynski, G. Renger, *Biochim. Biophys. Acta* 851 (1986) 65.
- [107] A. N. Srinivasan, R. R. Sharp, *Biochim. Biophys. Acta* 850 (1986) 211.
- [108] A. N. Srinivasan, R. R. Sharp, *Biochim. Biophys. Acta* 851 (1986) 369.
- [109] T. Wydrzynski, K. Sauer, *Biochim. Biophys. Acta* 589 (1980) 56.
- [110] G. C. Dismukes, Y. Siderer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 274.
- [111] G. C. Dismukes, Y. Siderer, *FEBS-Lett.* 121 (1980) 78.
- [112] Ö. Hansson, L.-E. Andreasson, *Biochim. Biophys. Acta* 679 (1982) 261.
- [113] L.-E. Andreasson, Ö. Hansson, T. Vänngård, *Chim. Scr.* 21 (1983) 71.
- [114] G. W. Brudvig, J. L. Casey, K. Sauer, *Biochim. Biophys. Acta* 723 (1983) 366.
- [115] J.-L. Zimmermann, A. W. Rutherford, *Biochim. Biophys. Acta* 767 (1984) 160.
- [116] J. C. de Paula, G. W. Brudvig, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 2643.
- [117] B. Mabad, J. P. Tuchagues, Y. T. Hwang, D. N. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 2801.
- [118] Ö. Hansson, L.-E. Andreasson, T. Vänngård, *FEBS-Lett.* 195 (1986) 151.
- [119] M. Völker, G. Renger, A. W. Rutherford, *Biochim. Biophys. Acta* 851 (1986) 424.
- [120] J. L. Casey, K. Sauer, *Biochim. Biophys. Acta* 767 (1984) 21.
- [121] J. L. Zimmermann, A. W. Rutherford, *Biochemistry* 25 (1986) 4609.
- [122] a) J. C. de Paula, W. F. Beck, G. W. Brudvig, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 4002; b) J. Cole, V. K. Yachandra, R. D. Guiles, A. E. McDermott, R. D. Britt, S. L. Dexheimer, K. Sauer, M. P. Klein, *Biochim. Biophys. Acta* 890 (1987) 395.
- [123] M. W. Lynch, D. N. Hendrickson, B. Y. Fitzgerald, C. G. Pierport, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 2041.
- [124] M. W. Lynch, D. N. Hendrickson, B. J. Fitzgerald, C. G. Pierport, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 3961.
- [125] G. Renger, W. Weiss, *Biochim. Biophys. Acta* 850 (1986) 184.
- [126] G. Renger, *Biochim. Biophys. Acta* 440 (1976) 287.
- [127] G. Renger, *FEBS-Lett.* 137 (1976) 217.
- [128] G. Renger, W. Weiss, *FEBS-Lett.* 137 (1982) 217.
- [129] G. Renger, W. Weiss, *Biochim. Biophys. Acta* 722 (1983) 1.
- [130] P. Joliot, M. Hoffnung, R. Chabaud, *J. Chim. Phys.* 63 (1966) 1423.
- [131] D. A. Berthold, G. T. Babcock, C. F. Yocum, *FEBS-Lett.* 134 (1981) 231.
- [132] R. Kuwabara, N. Murata, *Plant Cell Physiol.* 23 (1982) 583.
- [133] J. P. Dekker, H. J. van Gorkom, J. Wessink, L. Ouweland, *Biochim. Biophys. Acta* 767 (1984) 1.
- [134] a) J. Lavergne, *Photochem. Photobiol.* 43 (1986) 311; b) Ö. Saygin, H. T. Witt in [15a], Vol. 1, S. 537.
- [135] G. Renger, B. Hanssum, U. Wacker, *Chim. Scr.* (1987), im Druck.
- [136] a) L. J. Boucher, C. G. Coe, *Inorg. Chem.* 14 (1975) 1289; b) J. B. Vincent, G. Christou, *FEBS-Lett.* 207 (1986) 250.
- [137] G. C. Dismukes, P. Mathis, *FEBS-Lett.* 178 (1984) 51.
- [138] J. A. Kirby, D. B. Goodin, T. J. Wydrzynski, A. S. Robertson, M. P. Klein, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5537.
- [139] D. B. Goodin, V. K. Yachandra, R. D. Britt, K. Sauer, M. Klein, *Biochim. Biophys. Acta* 767 (1984) 209.
- [140] J. A. Kirby, A. S. Robertson, J. P. Smith, A. C. Thompson, R. S. Cooper, M. P. Klein, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5529.
- [141] V. K. Yachandra, R. D. Guiles, A. McDermott, R. D. Britt, S. L. Dexheimer, K. Sauer, M. P. Klein, *Biochim. Biophys. Acta* 850 (1986) 324.
- [142] G. Renger, B. Hanssum, W. Weiss in [15a], Vol. 1, S. 541–544.
- [143] a) C. Preston, R. J. Pace, *Biophys. J.* 49 (1986) 25a; b) H. Koike, B. Hanssum, Y. Inoue, G. Renger, *Biochim. Biophys. Acta* (1987), im Druck.
- [144] D. F. Blair, S. N. Witt, S. I. Chaer, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 1389.
- [145] W. P. Schröder, H. E. Akerlund, *Biochim. Biophys. Acta* 848 (1986) 359.
- [146] R. Radmer, O. Ollinger, *FEBS-Lett.* 195 (1986) 285.
- [147] K. P. Bader, P. Thibault, G. H. Schmidt in [15a], Vol. 1, S. 549–552.
- [148] B. M. Hoffmann, T. Szymanski, T. G. Brown, F. Basolo, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 7253.
- [149] A. B. P. Lever, J. P. Wilshire, S. K. Onan, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 3368.
- [150] T. G. Taylor, D. K. White, D. H. Campbell, A. P. Berzinis, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 4932.
- [151] D. E. Hamilton, R. S. Drago, J. Telser, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 5353.
- [152] K. D. Karlin, R. W. Cruse, Y. Gultneh, J. C. Hayes, J. Zubietta, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 3372.
- [153] M. Denis, G. M. Clore, *Plant Physiol.* 68 (1981) 229.
- [154] R. Osman, H. Basch, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 5710.
- [155] B. Bouges-Bocquet, *Biochim. Biophys. Acta* 594 (1980) 85.
- [156] A. W. Rutherford, G. Renger, H. Koike, Y. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta* 767 (1984) 548.
- [157] G. Renger, *Biochim. Biophys. Acta* 256 (1972) 428.
- [158] a) G. Renger, B. Bouges-Bocquet, R. Delosme, *Biochim. Biophys. Acta* 292 (1973) 796; b) G. Renger, B. Bouges-Bocquet, K. H. Büchel, *J. Bioenerg.* 4 (1973) 491; c) W. Oettmeier, G. Renger, *Biochim. Biophys. Acta* 593 (1980) 113.
- [159] B. Hanssum, G. Dohnt, G. Renger, *Biochim. Biophys. Acta* 806 (1985) 210.
- [160] G. F. Jameson, R. S. Drago, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3017.
- [161] W. Junge, G. Renger, W. Ausländer, *FEBS-Lett.* 79 (1977) 155.
- [162] S. Saphon, A. R. Crofts, *Z. Naturforsch. C32* (1977) 617.
- [163] C. F. Fowler, *Biochim. Biophys. Acta* 462 (1977) 414.
- [164] B. R. Velthuys, *FEBS-Lett.* 115 (1980) 167.
- [165] B. Wille, J. Lavergne, *Photobiochem. Photobiophys.* 4 (1982) 131.
- [166] W. Förster, W. Junge, *Photochem. Photobiol.* 41 (1985) 183.
- [167] a) G. Renger, U. Wacker, M. Völker, *Photosynth. Res.* (1987), im Druck; b) U. Wacker, G. Renger, unveröffentlicht.
- [168] R. Dietrich-Glaubitz, M. Völker, G. Renger, P. Gräber in [15a], Vol. 1, S. 519–522.
- [169] S. Izawa, A. Muallen, N. K. Ramaswamy in [43a], S. 293–302.
- [170] Govindjee, *Adv. Photosynth. Res. Proc. Int. Congr. Photosynth. 6th 1983 I* (1984) 227.
- [171] C. Critchley, *Biochim. Biophys. Acta* 811 (1985) 33.
- [172] I. C. Bainu, C. Critchley, Govindjee, H. S. Gutowsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 3713.
- [173] S. M. Theg, P. H. Homann, *Biochim. Biophys. Acta* 679 (1982) 22.
- [174] C. Preston, R. J. Pace, *Biochim. Biophys. Acta* 810 (1985) 388.
- [175] J. Sinclair, *Biochim. Biophys. Acta* 764 (1984) 247.
- [176] P. O. Sandusky, C. F. Yocum, *Biochim. Biophys. Acta* 766 (1984) 603.
- [177] S. M. Theg, P. A. Jursinic, P. H. Homann, *Biochim. Biophys. Acta* 766 (1984) 636.
- [178] S. Itoh, C. T. Yerkes, H. Koike, H. H. Robinson, A. R. Crofts, *Biochim. Biophys. Acta* 766 (1984) 612.
- [179] T. Ono, Y. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta* 806 (1985) 331.

- [180] P. H. Homann, H. Gleiter, T. Ono, Y. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta* 850 (1986) 10.
- [181] T. Ono, J. L. Zimmermann, Y. Inoue, A. W. Rutherford, *Biochim. Biophys. Acta* 851 (1986) 193.
- [182] R. Damoder, V. V. Klimov, G. C. Dismukes, *Biochim. Biophys. Acta* 848 (1986) 378.
- [183] P. H. Homann, *Biochim. Biophys. Acta* 809 (1985) 311.
- [184] a) G. C. Dismukes, *Photochem. Photobiol.* 43 (1986) 99; b) T. Ono, H. Nakayama, H. Gleiter, Y. Inoue, A. Kawamori, *Arch. Biochem. Biophys.* (1987), im Druck.
- [185] P. O. Sandusky, C. F. Yocum, *FEBS-Lett.* 162 (1983) 339.
- [186] H. Taube, *Angew. Chem.* 96 (1984) 315; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 329.
- [187] V. K. Yachandra, R. D. Guiles, K. Sauer, H. M. Klein, *Biochim. Biophys. Acta* 850 (1986) 333.
- [188] R. Piccioni, D. Mauzerall, *Biochim. Biophys. Acta* 504 (1978) 384.
- [189] J. J. Brand, P. Mohanty, D. C. Fork, *FEBS-Lett.* 155 (1983) 120.
- [190] H. E. Akerlund in [43a], S. 201–208.
- [191] N. Murata, M. Miyao, T. Kubawara in [43a], S. 213–222.
- [192] T. Ono, Y. Inoue, *FEBS-Lett.* 166 (1983) 381.
- [193] D. F. Ghanotakis, G. T. Babcock, C. F. Yocum, *FEBS-Lett.* 167 (1984) 127.
- [194] A. Boussac, B. Maisson-Peteri, C. Vernotte, A. L. Etienne, *Biochim. Biophys. Acta* 808 (1985) 225.
- [195] M. Völker, H. J. Eckert, G. Renger, *Biochim. Biophys. Acta* 890 (1987) 66.
- [196] M. Völker, H. J. Eckert, G. Renger in [15a], Vol. 1, S. 545–548.
- [197] T. Ono, Y. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta* 850 (1986) 380.
- [198] M. Miyao, N. Murata, *Photosynth. Res.* 10 (1986) 489.
- [199] B. G. Malmström, *Biochim. Biophys. Acta* 549 (1979) 281.
- [200] L. Powers, B. Chauce, Y. Cling, P. Angiohillo, *Biophys. J.* 39 (1981) 465.
- [201] J. J. Jarausch, B. Kadenbach, *Eur. J. Biochem.* 146 (1985) 211.
- [202] M. Miyao, N. Murata, *FEBS-Lett.* 170 (1984) 350.
- [203] N. I. Bishop, *Adv. Photosynth. Res. Proc. Int. Congr. Photosynth.* 6th 1983 1 (1984) 321.
- [204] J. G. Metz, H. B. Pakrasi, M. Seibert, C. J. Arntzen, *FEBS-Lett.* 205 (1986) 269.
- [205] T. M. Bricker, J. G. Metz, D. Miles, L. A. Sherman, *Biochim. Biophys. Acta* 724 (1983) 447.
- [206] N. Tamura, G. M. Cheniae, *FEBS-Lett.* 200 (1986) 231.
- [207] H. Oh-Oka, S. Tanaka, K. Wada, T. Kuwabara, N. Murata, *FEBS-Lett.* 197 (1986) 63.
- [208] R. J. Sundberg, R. B. Martin, *Chem. Rev.* 74 (1974) 471.
- [209] M. Seibert, T. M. Cotton, *FEBS-Lett.* 182 (1985) 34.
- [210] R. Radmer in [43a], S. 135–144.
- [211] B. Hanssum, G. Renger, *Biochim. Biophys. Acta* 810 (1985) 234.
- [212] V. Förster, W. Junge, *Photosynth. Res.* 9 (1986) 197.
- [213] K. L. Greer, F. G. Plumley, G. W. Schmidt, *Plant. Physiol.* 82 (1986) 114.
- [214] H. Koike, Y. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta* 807 (1985) 64.
- [215] B. Andersson in L. A. Staehelin, C. J. Arntzen (Hrsg.): *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Vol. 19*, Springer, Berlin 1986, S. 447–456.
- [216] A. C. Stewart, M. Siczkowski, U. Ljungberg, *FEBS-Lett.* 193 (1985) 175.
- [217] D. F. Ghanotakis, G. T. Babcock, C. F. Yocum, *FEBS-Lett.* 192 (1985) 1.
- [218] G. Renger, H. E. Akerlund in [43a], S. 209–212.
- [219] H. E. Akerlund, G. Renger, W. Weiss, R. Hagemann, *Biochim. Biophys. Acta* 765 (1984) 1.
- [220] T. Kuwabara, T. Murata, M. Miyao, N. Murata, *Biochim. Biophys. Acta* 850 (1986) 146.
- [221] U. Ljungberg, T. Henrysson, C. P. Rochester, H. E. Akerlund, B. Andersson, *Biochim. Biophys. Acta* 849 (1986) 112.
- [222] J. Cline, B. Reinhammer, P. Jensen, R. Venters, B. M. Hoffmann, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 5124.
- [223] S. Padhye, T. Kambara, D. N. Hendrickson, Govindjee, *Photosynth. Res.* 9 (1986) 103.
- [224] N. C. Robinson, F. Strey, L. Talbert, *Biochemistry* 19 (1980) 3656.
- [225] N. C. Robinson, *Biochemistry* 21 (1982) 184.
- [226] K. Gounaris, J. Barber, *FEBS-Lett.* 188 (1985) 68.
- [227] K. Gounaris, D. Whitford, J. Barber, *FEBS-Lett.* 163 (1983) 230.
- [228] B. Bouges-Bocquet, *Biochim. Biophys. Acta* 314 (1973) 250.
- [229] B. Velthuys, J. Amesz, *Biochim. Biophys. Acta* 333 (1974) 85.
- [230] A. R. Crofts, C. A. Wraight, *Biochim. Biophys. Acta* 726 (1983) 149.
- [231] A. Trebst, *Z. Naturforsch. C* 41 (1986) 240.
- [232] V. Petrouleas, B. A. Diner, *Biochim. Biophys. Acta* 849 (1986) 193.
- [233] R. J. Debus, G. Feher, M. Y. Okamura, *Biochemistry* 25 (1986) 2276.
- [234] G. Renger, R. Hagemann, R. Fromme, *FEBS-Lett.* 203 (1986) 210.
- [235] N. Adir, I. Ohad, *Biochim. Biophys. Acta* 850 (1986) 264.
- [236] R. Fromme, R. Hagemann, G. Renger in [15a], Vol. 3, S. 783–786.