

**Methodenentwicklung
und Durchführung
fortgeschrittener
Röntgenabsorptionsmessungen
am Mangan-Calcium-Komplex
des Photosystems II**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
CLAUDIA A. MÜLLER
aus Bremen

Dezember, 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Dau
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Saenger

Disputation am 28. Februar 2006

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Holger Dau für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit zu erstellen und PD Dr. Michael Haumann für meine Betreuung und die zahlreichen Diskussionen.

Marion Badow danke ich für ihr offenes Ohr in allen Lebenslagen, die unkomplizierte Hilfe bei administrativen Fragen und den unerschöpflichen Vorrat an Nervennahrung.

Roswitha Brunn und Ingrid Wallat danke ich für die vielen Hilfestellungen im Labor und dem Organisieren von Chemikalien und Geräten, ebenso Monika Fünning für die tatkräftige Unterstützung bei meinen Versuchen.

Dr. Markus Grabolle und Dr. Peter Liebisch danke ich für die Geduld, meine zahlreichen physikalischen und mathematischen Fragen zu beantworten. Marcos Barra danke ich für die Zusammenarbeit im bisher leider erfolglosen gemeinsamen Vorhaben zur Calcium-Freisetzung nach Temperaturbehandlung von PSII-Proben und für das Erlernen neuer biochemischer Labormethoden. Und natürlich allen drei für die gegenseitige Unterstützung bei den Synchrotronmessterminen.

Ich danke Detlef Müller und der Feinmechanikwerkstatt der FU Berlin, besonders für die Aufträge, die am besten gestern fertig sein sollten. Ebenso Reinhard Küssel und der Elektronikwerkstatt der FU Berlin, besonders bei den immer wiederkehrenden Problemen mit der Apparatur zur Sauerstoffmessung.

Weiterhin bin ich allen zu Dank verpflichtet, die im Verlauf der letzten Jahre durch ihre Kooperationen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dies gilt für die Synchrotronmessungen: Dr. T. Neisius am ESRF in Grenoble, Dr. W. Meyer-Klaucke am EMBL in Hamburg und Prof. Dr. A. Erko am BESSY. An der Technischen Universität Berlin für die EPR-Messungen Dr. F. Lenzian und Dr. M. Kammel, für die AAS-Messungen Dr. K. Irrgang und Dr. R. Steffen.

Für die finanzielle Förderung meiner Arbeit danke ich dem BMBF, dem SFB 498 und dem Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin.

Besonders möchte ich mich bei allen meinen Freunden bedanken, die immer an mich geglaubt und mir wieder Mut gemacht haben, wenn es mit der Arbeit nicht vorwärts ging. Und vor allem danke ich meiner Katze Tigger für ihre uneingeschränkte Liebe.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung dieser Arbeit	1
1.2	Die Lichtreaktionen der oxygenen Photosynthese	3
1.3	Struktur und Funktion des Photosystems II (PSII)	5
1.4	Der katalytische Mangan-Calcium-Komplex	7
1.5	BioXAS	17
2	Materialien und Methoden	21
2.1	Präparation von PSII-Membranfragmenten	21
2.2	Biochemische Methoden	24
2.3	Quantifizierung des Mn- und Ca-Gehalts mit AAS	26
2.4	Bestimmung der S-Zustandspopulation mit EPR	28
2.5	Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS)	30
3	Charakterisierung von PSII-Proben	37
3.1	Veränderte Trocknungsprozedur für XAS- und EPR-Proben	38
3.2	Bestimmung des Chlorophyllgehalts	39
3.3	Bestimmung der Membranfragment-Schichtdicke	39
3.4	Restwassergehalt und O ₂ -Aktivität in PSII-Proben	41
3.5	Mn- und Chl-Konzentration	43
3.6	Optimierung der S-Zustandspopulation	43
3.7	PSII-Proben für XAS-Messungen bei RT	47
3.8	Zusammenfassung	50
4	XAS an der Mangan-K-Kante bei RT	53
4.1	Experimenteller Aufbau	54
4.2	Verschiedene XAS-Techniken bei RT	58
4.3	Charakterisierung der Strahlenschädigung	60
4.4	Vergleich von XAS bei RT und 20 K	65
4.5	Zeitaufgelöste XAS bei RT	70
4.6	Änderungen des Mn ₄ Ca-Komplexes im Kok-Zyklus	74
4.7	Zusammenfassung	75
5	Calcium-XAS-Proben (<i>PSII</i>_{Ca}-Proben)	77
5.1	Entwicklung der Präparationsvorschrift	78
5.2	Präparationsvorschrift für <i>PSII</i> _{Ca} -Proben	81
5.3	Eigenschaften von <i>PSII</i> _{Ca} -Proben	82
5.4	Zusammenfassung	87
6	XAS an der Calcium-K-Kante	89
6.1	Experimenteller Aufbau	91
6.2	<i>PSII</i> _{Ca} -Proben im S ₁ -Zustand	93
6.3	Charakterisierung der Strahlenschädigung (Photoreduktion)	93

6.4	EXAFS-Messungen an <i>PSII_{Ca}</i> -Proben im S ₁ -Zustand	95
6.5	Einstellung des S ₂ -Zustands bei <i>PSII_{Ca}</i> -Proben	97
6.6	Modell der Calcium-Bindung im PSII	98
6.7	Zusammenfassung	101
7	Zusammenfassung	103
7.1	Ausblick	106
	Abstract	107
	Literaturverzeichnis	110
	Publikationen	124
	Lebenslauf	128
A	Anhang: Puffer	129
B	Anhang: <i>PSII_{Ca}</i>-Proben	133
C	Anhang: Umkristallisation von Phenyl-p-benzochinon	137

Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Acrylamid/BIS	Diacrylamidomethan (N,N'-Methylene-bis-acrylamide)
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BioXAS	Röntgenabsorptionsspektroskopie an biologischen Proben (X-ray Absorption Spectroscopy of Biological Samples)
BSA	Rinderserum Albumin (Bovine Serum Albumin)
Chl	Chlorophyll
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPR	Elektronen-Paramagnetische Resonanz-Spektroskopie
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
EXAFS	Erweiterte Röntgenabsorptions-Feinstruktur (Extended X-ray Absorption Fine-Structure)
FT	Fourier-Transformation
HDPE	High Density Polyethylene
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
kDa	kilo-Dalton (1 kDa = 1000 u)
LHC	Lichtsammelkomplex (Light Harvesting Complex)
LHCII	Lichtsammelkomplex des PSII
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
OEC	Sauerstoff-entwickelnder Komplex (Oxygen Evolving Complex)
P ₂ O ₅	Di-Phosphorpentoxid
P680	Primärer Elektronendonator des PSII
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PPBQ	Phenyl-p-benzochinon
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PVC	Polyvinylchlorid
Q _A	Primärer Plastochinon-Elektronenakzeptor des PSII
Q _B	Sekundärer Plastochinon-Elektronenakzeptor des PSII
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
S _i	Formale Oxidationszustände des Mn ₄ Ca-Komplexes
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
UZ	Ultrazentrifugation
XANES	Röntgenabsorptionskantennahstruktur (X-ray Absorption Near-Edge Structure)
XAS	Röntgenabsorptionsspektroskopie (X-ray Absorption Spectroscopy)
Y _D	Redoxaktiver Tyr160-Rest in der D2-Untereinheit des PSII
Y _Z	Redoxaktiver Tyr161-Rest in der D1-Untereinheit des PSII

