

Kapitel 2

Materialien und Methoden

Die Zusammensetzungen der in diesem Kapitel eingesetzten Puffer und Gele sind, soweit nicht anders angegeben, in Anhang A aufgelistet. Es wurden alle Arbeiten in Dunkelheit oder bei gedämpften Grünlicht durchgeführt, die Proben, die Puffer und die Gefäße wurden auf Eis gelagert. Messparameter und Lösungen für AAS-Messungen (Abschnitt 2.3) sind in Anhang B aufgeführt.

2.1 Präparation von PSII-Membranfragmenten aus Spinat (*Spinacia oleracea*)

Für alle PSII-Präparationen in dieser Arbeit wurde Spinat (*Spinacia oleracea*) als Ausgangsmaterial eingesetzt. Die Herstellung von PSII-Proben aus Spinat ist, verglichen mit Präparationen aus z.B. Cyanobakterien, weniger aufwändig und ergibt eine sehr gute Ausbeute mit hoher Sauerstoffaktivität.

2.1.1 Isolation und Aufreinigung

Eine Vorschrift zur Herstellung von PSII-angereicherten Membranfragmenten (auch als *BBY*-Präparation, nach den Autoren Berthold, Babcock und Yocum bezeichnet) wurde erstmals 1981 beschrieben [Berthold et al., 1981]. Die von L. Iuzzolino [1999] beschriebene Weiterentwicklung wurde während dieser Arbeit im Labor der AG Dau an der FU Berlin etabliert und verbessert.

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 2-4 °C in einer Kühlzentrifuge (RC 26 Plus, Sorvall) mit den Rotoren SLA3000 und SS-34 (beide Sorvall) durchgeführt. Der Spinat wurde für die Zeit der Vorbereitungen im Dunkeln und kühl gelagert, um durch Dephosphorylierung der Lichtsammelkomplexe (LHCII) die Stapelung der Grana zu fördern [Dau und Canaani, 1992; Nilsson et al., 1997; Allen und Forsberg, 2001]. Die Stapelung der Thylakoide basiert auf den molekularen Wechselwirkungen zwischen den LHCIIs und wird durch das Gleichgewicht zwischen hydrophoben Wechselwirkungen und abstoßenden Ionenkräften kontrolliert [Allen, 1992]. Die Abschirmung der Oberflächenladung durch divalente Ionen wie z.B. Mg^{2+} verstärkt die Granastapelung [Carter und Staehelin, 1980; Rubin et al., 1981].

Präparationsprotokoll:

1. ZELLAUFBRUCH: 2 kg frischen Spinat mit Eiswasser waschen, grüne intakte Blätter von der Mittelrippe befreien und mit einer Schere grob zerkleinern. Das Material in einen Mixer (GT 800, Rotor) geben und 1 l Puffer A (Ascorbat und BSA frisch hinzufügen) dazugeben. 2-3 mal mixen, dabei kontrollieren ob alles erfasst wird. Danach 20-30 Sekunden bei höchster Stufe pürieren. Das Homogenat durch drei Lagen Verbandsmull filtrieren und kräftig auspressen. Das Filtrat durch drei Lagen Verbandsmull mit einer Lage Watte dazwischen filtrieren. Dieses Filtrat 10 Minuten bei 6200 g (SLA3000) zentrifugieren.
2. AUFBRUCH DER CHLOROPLASTEN UND GEWINNUNG VON THYLAKOIDEN: Den Überstand verwerfen und den oberen dunkelgrünen Teil der Pellets mit einem Pinsel im gleichen Volumen Puffer B homogenisieren. Die Suspensionen vereinigen, insgesamt 300 ml Puffer B hinzufügen und alles mischen. 2 Minuten bei 1100 g (SS-34) zentrifugieren. Die Pellets verwerfen und den Überstand erst 2 Minuten bei 4400 g (SS-34) und anschließend 5 Minuten bei 50000 g (SS-34) zentrifugieren. Die Pellets in ~40 ml Puffer C gründlich homogenisieren.
3. AUFREINIGUNG DER GRANASTAPEL ZUR PSII-ANREICHERUNG: Das Gesamtvolumen und die Chl-Konzentration bestimmen. Puffer C und Triton X-100-Stammlösung so zugeben, dass die Chl-Endkonzentration bei 2 mg Chl/ml liegt und das Verhältnis Triton X-100 zu Chlorophyll 1:25 (w/w) beträgt. Erst den Puffer C zugeben, dann die Triton-Stammlösung langsam zutropfen und 1 Minute auf Eis rühren lassen. Die Suspension 2 Minuten bei 1100 g (SS-34) zentrifugieren. Die Pellets verwerfen und den Überstand 12 Minuten bei 50000 g (SS-34) zentrifugieren.
4. REINIGUNG UND LAGERUNG DER PSII-MEMBRANFRAGMENTE: Überstand verwerfen und den stärkefreien, dunkelgrüne Teil der Pellets in Puffer D mit einem Pinsel homogenisieren. Die Suspension nochmals 12 Minuten bei 50000 g (SS-34) zentrifugieren. Diesen Reinigungsschritt mindestens zweimal wiederholen, bis die Pellets keine Stärke mehr enthalten. Abschließend die Pellets in 20-50 ml Puffer D homogenisieren (Chl-Gehalt: ca. 2-3 mg/ml). Das Gesamtvolumen bestimmen, Aliquots für die Chl-Bestimmung und Sauerstoffmessung entnehmen und die Membranfragmente bei -80 °C einfrieren.

Die Ausbeute solcher PSII-Präparationen lag bei ca. 100 mg Chl-Gesamtmenge mit einer Aktivität von 1200-1400 $\mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$ und einem mittleren Chl *a* : Chl *b*-Verhältnis von 2,4.

2.1.2 Herstellung partiell orientierter PSII-Membranfragment-Proben

Mit dem hier beschriebenen Verfahren werden Proben hergestellt, die einen verringerten Wassergehalt aufweisen. Dadurch kommt es zur Minimierung der Streuung von Röntgenstrahlung an Wassermolekülen und zur Verringerung der Reflexion von Röntgenstrahlung an Eiskristallen bei Tieftemperatur-Messungen. Somit werden bessere XAS-Ergebnisse erzielt. Außerdem sind in solchen Proben die PSII-Membranen vorzugsweise parallel zur Probenoberfläche orientiert, wodurch winkelabhängige spektroskopische Untersuchungen möglich werden.

Die Vorschrift zur Herstellung partiell orientierter PSII-Membranfragment-Proben ist aus [Iuzzolino, 1999] entnommen und den gegebenen Bedingungen im Labor und den speziellen Bedürfnissen der verschiedenen Experimente angepasst worden.

Es wird zwischen zwei Typen von Proben unterschieden: (1) *Freeze-quick*-Proben mit einem Gehalt von $\sim 100 \mu\text{g}$ Chl. Diese Proben wurden für Untersuchungen des katalytischen Kok-Zyklus bei verschiedenen Temperaturen verwendet. (2) *Dichroismus*-Proben mit einem Gehalt von $\sim 400 \mu\text{g}$ Chl. An diesen Proben wurde nur der S_1 - und S_2 -Zustand des Mn_4Ca -Komplexes bei tiefen Temperaturen untersucht [Schiller et al., 1998; Dittmer und Dau, 1998].

Alle Zentrifugationen wurden bei 2-4 °C in einer Kühlzentrifuge (RC 26 Plus, Rotor SS-34, Sorvall) und einer Ultrazentrifuge (Ultra Pro 80, Rotor SW-28, Sorvall) durchgeführt. Der im letzten Präparationsschritt verwendete Puffer D wurde bei dieser Vorschrift mit 10 % Glycerol versetzt, um die Proben zum einen vor Schädigungen infolge des Einfrierens zu schützen [Haumann et al., 1997; Halverson und Barry, 2003] und zum anderen die Intensität des S_2 -*Multiline* EPR-Signals auf Kosten des „g4“-Signals zu erhöhen [Zimmermann und Rutherford, 1986; Schiller und Dau, 2000].

Als XAS-Probenräher wurden Rähmchen aus farblosem Plexiglas verwendet (Abb. 2.1). Eine Seite jedes Probenrähers wurde mit einem Polyimid-Klebefilm (Kapton, DuPont) versehen. Dort hinein wurden in einem zweiphasigen Ultrazentrifugationsschritt die PSII-Membranfragmente aufgetragen. In Abb. 2.2 (A, B) ist der Kunststoff-Einsatz für die Ultrazentrifugation dargestellt, mit dem drei Probenräher fixiert wurden. In (C) ist dieser Einsatz in einem UZ-Röhrchen skizziert.

Präparationsprotokoll:

1. **VORREINIGUNG:** Suspension aus PSII-Membranfragmenten langsam (1 - 2 Stunden) im Dunkeln auf Eis auftauen lassen. Mit Puffer D verdünnen und 12 Minuten bei 50000 g (SS-34) zentrifugieren.
2. **EINSTELLUNG DER KONZENTRATION:** Pellets in Puffer D mit 10 % Glycerol mit einem Pinsel resuspendieren. Das Gesamtvolumen und die Chl-Konzentration bestimmen. Zugabe von PPBQ-Stammlösung bis zur gewünschten Konzentration. Mit Puffer D mit Glycerol auf eine Chl-Endkonzentration von 1 mg Chl/ml verdünnen. Den Elektronenakzeptor PPBQ zuvor in Ethanol frisch umkristallisieren, die Vorschrift dazu steht in Anhang C.
3. **BELADUNG DER XAS-PROBENTRÄGER:** Zentrifugenröhrchen mit jeweils drei Probenrähern in den passenden Einsätzen aus PVC (siehe Abb. 2.2) versehen. Für *Freeze-quick*-Proben jeweils 1 mg Chl, für *Dichroismus*-Proben jeweils 5 mg Chl in jedes Röhrchen (= 3 Proben) geben. Probenräher 15 Minuten bei 71000 g (SW-28) zentrifugieren. Überstand verwerfen und PVC-Aufsätze herausnehmen. PPBQ-Stammlösung zu 120 ml Puffer D mit Glycerol geben (Endkonzentration siehe oben). 1 Stunde 45 Minuten bei 112000 g (SW-28) zentrifugieren. Überstand abgießen, Probenräher vorsichtig aus den PVC-Halterungen herausnehmen, trocken wischen und beidseitig mit einem Blitzlampenblitz belichten (siehe Abschnitt 2.4.3). *)
4. **TROCKNUNG:** Proben in einen mit Orangegel (Merck) befüllten Exsikkator legen und mit einer Membranpumpe (MZ 2C, vacuubrand) den Druck auf 250 mbar reduzieren. Im Dunkeln eine Stunde (*Freeze-quick*-Proben) bzw. 1,5 Stunden

(*Dichroismus*-Proben) bei 4 °C im Kühlraum trocknen lassen. Die partiell getrockneten Proben in flüssigem Stickstoff lagern.

*) Nach dem Vorblitz in Kombination mit der Dunkeladaption während der Trocknung maximiert sich die Zahl der Reaktionszentren im S_1 und die Anzahl der Zentren mit oxidiertem Y_D [Iuzzolino et al., 1998b; Schiller und Dau, 2000].

Auf die veränderte Trocknungsprozedur und die danach ermittelten Raten für die Sauerstoffaktivitäten wird in Abschnitt 3.1 näher eingegangen.

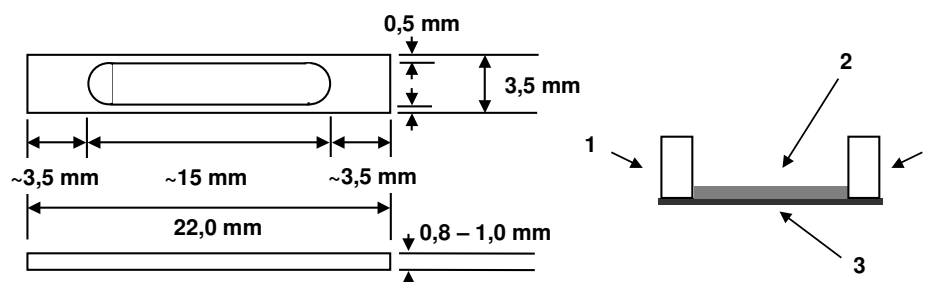


Abbildung 2.1: Schematische Zeichnung eines XAS-Probenträgers aus Plexiglas für partiell orientierte PSII-Proben mit einem Schnitt durch die fertige Probe. 1: Probenträger; 2: Schicht aus PSII-Membranfragmenten; 3: Kaptonfolie.

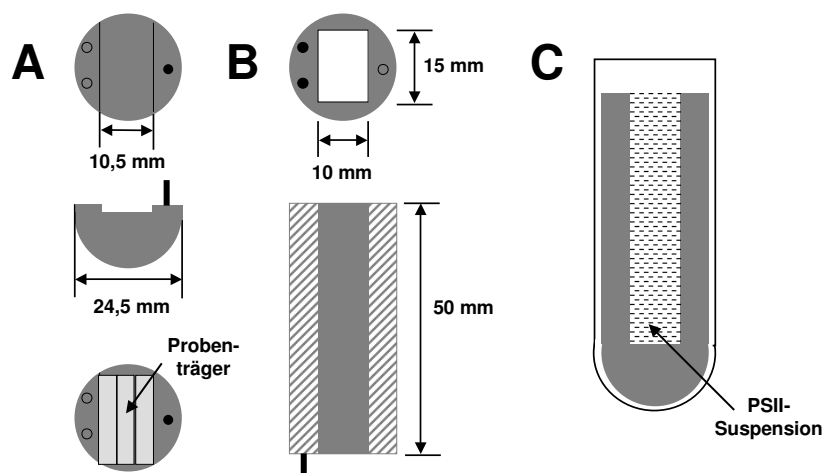


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Kunststoff-Einsatzes für die Ultrazentrifugation bei der Herstellung partiell orientierter Proben. (A) Halbkugel, in die drei XAS-Probenträger gelegt werden. (B) Zylindrischer Aufsatz mit rechteckiger Bohrung, der mit Metallstiften an der Halbkugel fixiert wird. (C) Kompletter Einsatz in einem Zentrifugenröhrchen.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Bestimmung des Chlorophyllgehalts von PSII-Proben

Durch die Bestimmung des Chlorophyllgehalts und der Annahme von 230 Chl-Molekülen pro PSII kann relativ schnell und einfach die Konzentration an Manganatomen bestimmt werden. Durch die Bestimmung des Verhältnisses von Chl *a* zu Chl *b* kann festgestellt werden, ob PSI während einer Präparation weitgehend abgetrennt wurde, denn in den beiden Proteinkomplexen PSI und PSII liegen verschiedene Chl *a/b*-Verhältnisse vor [Hankamer et al., 1997; Eshaghi et al., 1999].

Für die Bestimmung des Chl-Gehalts der in dieser Arbeit hergestellten Proben wurde jeweils eine 50-100 μg Chl enthaltende Menge an PSII-Membranfragment-Suspension in 10 ml eines Aceton-Wasser-Gemisches (80:20 (v/v)) gegeben und mindestens eine Minute inkubiert, um die Pigmente des PSII-Komplexes zu extrahieren [Porra, 2002]. Anschließend wurden die Proben in einer Tischzentrifuge (Rotofix 32, Hettich) fünf Minuten bei 1600 g zentrifugiert, um die ausgefallenen Proteine abzutrennen. Die Absorption des klaren Überstandes wurde mit einem UV-Vis-Spektrometer (Cary 50 Conc, Varian) bei den Wellenlängen 646 nm und 663 nm bestimmt. Die Konzentrationen von Chl *a* und Chl *b* wurden aus den Extinktionen (E), unter Verwendung der von Lichtenthaler [1987] beschriebenen spezifischen Extinktionskoeffizienten, bestimmt:

$$C_{\text{Chl } a} [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}] = 12.21 \times E_{663} - 2.81 \times E_{646}$$

$$C_{\text{Chl } b} [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}] = 20.13 \times E_{646} - 5.03 \times E_{663}$$

Chl-Konzentration in der unverdünnten Suspension (V_{Chl} : Volumen an PSII-Suspension im Aceton-Wasser-Gemisch [ml]):

$$C_{\text{Chl}_{\text{gesamt}}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}] = (C_{\text{Chl } a} + C_{\text{Chl } b}) \times (10 / V_{\text{Chl}})$$

2.2.2 Polarographische Sauerstoffmessung zur Quantifizierung der Aktivität

Die Rate der Sauerstoffentwicklung ist bei PSII-Proben ein Maß für die Intaktheit des Mn_4Ca -Komplexes.

Zur Quantifizierung der Sauerstoffaktivität der PSII-Fragmente wurden polarographische Messungen mit einer Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ (5331 Oxygen Probe, YSI; High Sense Membrane) durchgeführt. Es wurde in einer auf 28 °C temperierten Glaszelle gemessen. Die Kalibrierung der Messsignale erfolgte mit Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) oder Stickstoff durch vollständiges Entfernen von Sauerstoff aus der Lösung. Die Zugabe der einzelnen Reagenzien erfolgte in der Reihenfolge: (1) 1,5 ml O_2 -Messpuffer (pH 6,3), (2) 1 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), (3) PSII-Membranfragmente entsprechend 5 μg Chl ml^{-1} , (4) 250 μM 2,6-Dichlor-p-benzochinon (2,6-DCBQ). Der Verlauf der Sauerstoffbildung wurde mit einem x-t-Schreiber (Servogor 330, BBC Goerz) aufgezeichnet. Aus den Messkurven wurde die Rate der Sauerstoffbildung der PSII-Membranpartikel wie folgt berechnet:

$$\text{Aktivität} [\mu\text{mol O}_2 \times (\text{mg Chl})^{-1} \times \text{h}^{-1}] = \frac{\text{Steigung} \times C_{\text{O}_2}^{\text{sätt}} \times V_{\text{Papier}} \times 60}{Y \times C_{\text{Chl}} \times F_V}$$

Steigung	[cm cm ⁻¹]	Anfangssteigung
$C_{\text{O}_2}^{\text{sätt}}$	[$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Sauerstoffkonzentration in luftgesättigtem Wasser, 245 $\mu\text{mol l}^{-1}$ bei 28 °C nach [Estabrook, 1967]
V_{Papier}	[cm min ⁻¹]	Papiervorschubgeschwindigkeit
Y	[cm]	negativer Vollausschlag der Eichkurve bei O_2 -Entfernung mit Natriumdithionit oder N_2
C_{Chl}	[$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Chl-Konzentration
F_V		Verstärkungsfaktor bei der Messung

2.2.3 Gelelektrophorese zur Bestimmung der Polypeptid-zusammensetzung

Die Proteinzusammensetzung kann Hinweise auf die Zersetzung des PSII-Proteinkomplexes während verschiedener Versuchsbedingungen liefern.

Zur Quantifizierung der Proteinzusammensetzung der verschiedenen PSII-Präparationen wurde SDS-PAGE (Natriumaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) verwendet. Die SDS-Gele wurden nach der Methode von Laemmli [1970] in einer veränderten Vorschrift von Barra et al. [2005] durchgeführt, die eine deutliche Trennung und Zuordnung der drei extrinsischen Polypeptide 17kDa, 23kDa und 33kDa ermöglichte.

Die Gelelektrophorese wurde in einem 18%-Polyacrylamid-Trenngel ($10,5 \times 10 \times 0,75 \text{ cm}^3$; Biorad, Mini-Protean 3 Cell; Biometra, Standard Power Pack P25) durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurden die PSII-Proben zentrifugiert (10 Minuten bei 22000 g), Biofuge primo R, Heraeus), der Überstand verworfen und das Pellet in Puffer D bis zu einer Konzentration von 1 mg Chl ml^{-1} resuspendiert. $50 \mu\text{l}$ dieser Lösung wurden dann mit $50 \mu\text{l}$ Probenpuffer gemischt und zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden jeweils $10 \mu\text{g}$ Protein pro Geltasche aufgetragen. Zwei verschiedene Peptid-Marker (Serva, Invitrogen) wurden zur Bestimmung der Molekulargewichte eingesetzt. Der Gellauf fand bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ statt. Das fertige Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue eingefärbt und anschließend in die Entfärbelösung bis zur gewünschten Kontrastierung gelegt.

2.3 Quantifizierung des Mangan- und Calciumgehalts mit Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Der Mangan- und Calciumgehalt der PSII-Proben wurden mit Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (hier mit AAS abgekürzt) quantifiziert. Die Vorteile von Graphitrohr- gegenüber Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie sind geringe spektrale und chemische Interferenzen durch angepasste Temperaturprogramme sowie Nachweisgrenzen im ppm-Bereich durch längere Aufenthaltszeiten der Atome im Absorptionsvolumen und damit verbunden ein sehr viel kleineres Probenvolumen [Butcher und Sneddon, 1998]. Im Vergleich mit parallel durchgeführten Chl-Bestimmungen konnte die Anzahl von Calciumionen pro Mn_4Ca -Komplex sowie die mittlere Anzahl der intakten Komplexe pro PSII (4 Mn/PSII) bestimmt werden.

Die AAS-Messungen wurden an der Technischen Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Dr. K. Irrgang durchgeführt. Zum Einsatz kam ein PerkinElmer AAnalyst 800 mit angeschlossenem AS-800 Probenwechsler (Einzelheiten siehe unten und Anhang B). Die Daten wurden mit dem integrierten Programm WinLab32 erfasst und ausgewertet.

Eine besondere Schwierigkeit stellten Kontaminationen durch Calcium dar. Die Problematik und die daraus resultierenden Vorsichtsmaßnahmen werden in Kapitel 6 ausführlich beschrieben und diskutiert.

2.3.1 Proben-Vorbereitung für AAS

Vor den AAS-Messungen muss die vollständige Zersetzung der Proteine zur Freisetzung darin enthaltener Metallionen gewährleistet sein. Durch Vorversuche mit chemischen und physikalischen Behandlungen unter Verwendung von Literaturangaben [Wieteska et al., 1996; Welz und Sperling, 1997; Eilola und Peramaki, 2001] wurde die bestmögliche Zersetzung der PSII-Membranfragmenten bei gleichzeitig möglichst geringer Probenmenge getestet. Beim Einwirken von 65 % HNO_3 über mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur auf die PSII-Proben zeigten sich die besten Ergebnisse.

Vor den AAS-Messungen wurde jeweils 40 - 80 μl PSII-Probe in 200 μl 65 % HNO_3 (Suprapur, Merck) in Gefäßen aus Polypropylen für mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur vollständig aufgelöst. Danach wurden die Proben mit 1600 μl frischem Reinstwasser (entmineralisiertes Wasser, das zusätzlich durch eine Milli-Q PF Plus-Anlage mit QPak 2E Purification Pack (Millipore Corporation) gereinigt wurde) verdünnt und bis zur Messung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Bei allen Versuchen in dieser Arbeit wurden jeweils drei parallele Proben genommen, um Kontaminationen (besonders durch Calcium) während der Probenherstellung erkennen zu können und eine höhere Messgenauigkeit zu erreichen.

2.3.2 Messbedingungen für AAS

Der lineare Messbereich lag für Calcium bei 1 - 10 $\mu\text{g Ca/l}$, der nichtlineare Messbereich für Mangan bei 10 - 40 $\mu\text{g Mn/l}$. Alle Gefäße und Pipettenspitzen wurden vor dem Gebrauch mehrmals mit 0,2 % HNO_3 (HNO_3 :Wasser (w/w)) gespült. Bei den Mangan-Messungen wurde Magnesiumnitrat-Hexahydrat ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Suprapur, Merck) als spektrochemischer Puffer dazu gegeben [Welz und Sperling, 1997]. Der Blindwert bestand jeweils aus 0,2 % HNO_3 , mit der auch die Standardlösungen und alle notwendigen Verdünnungen angesetzt wurden. Vor ihrer Verwendung wurden alle Lösungen auf Kontaminationen getestet und nur bei Calcium-Werten unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1 $\mu\text{g Ca/l}$ eingesetzt. Jede Probe wurde automatisch in dreifacher Wiederholung gemessen. Bei allen Proben wurde zuerst der Calciumgehalt und anschließend der Mangangehalt bestimmt.

Bei den Calcium-Messungen musste besonders sorgfältig darauf geachtet werden, dass keine Kontaminationen in Lösungen, Gefäße oder Pipettenspitzen eingeschleppt wurden. Besonders bei langen Messreihen von mehr als 40 Proben konnte dies z.B. durch Abrieb oder Verschmutzung des Graphitrohres auftreten.

Messprotokoll für die Quantifizierung von Calcium und Mangan:

- 1: Graphitrohr durch Messungen mit 0,2 % HNO_3 auf Verunreinigungen testen. Bei Bedarf mit Brennszyklen (0,2 % HNO_3 oder Luft) reinigen oder austauschen.
- 2: Probenwechsler mit Blindwert, höchstem Standard und spektrochemischem Puffer (bei Mn) befüllen.
- 3: Kalibrierung anhand von vier automatisch hergestellten Standards.
- 4: Ca-/Mn-Gehalt der einzelnen Proben anhand der Chl-Konzentration abschätzen und Proben passend zum Messbereich mit 0,2 % HNO_3 verdünnen (1:1 bis 1:5).
- 5: Proben automatisch in dreifacher Wiederholung mit Mittelwertsbestimmung messen.

- 6: Nach jeweils 5-10 Proben Kontrollmessungen mit Blindwert und Luft durchführen, um Kontaminationen erkennen zu können. Bei Messwerten von $\geq 0,2 \mu\text{g Ca/l}$ bzw. $> 0,1 \mu\text{g Mn/l}$ das Graphitrohr manuell mehrmals auf $2600 \text{ }^\circ\text{C}$ aufheizen und einige Brennzyklen mit $0,2 \text{ } \%$ HNO_3 durchführen. Zusätzlich die Spitze des Probenwechslers mehrmals spülen. Prozedur so lange wiederholen, bis eine Messung mit dem Blindwert wieder einen Wert von $\leq 0,2 \mu\text{g Ca/l}$ bzw. $< 0,1 \mu\text{g Mn/l}$ zeigt.
- 7: Nach spätestens 20 Proben einen Standard mit $10 \mu\text{g Ca/l}$ bzw. $40 \mu\text{g Mn/l}$ messen, um eine Abweichung von der Kalibrierung beobachten zu können. Wenn die Abweichung des Messwertes von der Kalibrierkurve mehr als $10 \text{ } \%$ beträgt, Messreihe unterbrechen und eine neue Kalibrierung starten.

2.4 Bestimmung der S-Zustandspopulation mit Elektronen-Paramagnetischer Resonanz-Spektroskopie (EPR)

2.4.1 EPR-Messungen am Mn_4Ca -Komplex des PSII

Ziel der EPR-Messungen war es (1) die S-Zustandskompositionen unabhängig von den XAS-Messungen anhand des S_2 -*Multiline*-Signals zu bestimmen und (2) die Versuchsparameter zur Einstellung der S-Zustände (Konzentration an Elektronenakzeptor und Probendicke, Abschnitt 3.6) zu optimieren.

Dem S_2 -Zustand des Mn_4Ca -Komplexes werden zwei verschiedene EPR-Signale zugeordnet [Zimmermann und Rutherford, 1986]. Es wird ein Signal mit ausgeprägter Hyperfeinstruktur um $g=2$ und ein weiteres Signal ohne Feinstruktur in der Nähe von $g=4,1$ beobachtet [Miller und Brudvig, 1991]. Das Signal bei $g=2$ wird als sogenanntes S_2 -*Multiline* EPR-Signal bezeichnet [Dismukes und Siderer, 1981] und einem Gesamtspin $S=1/2$ im Mn_4Ca -Komplex zugeordnet [Hansson et al., 1987]. Das Signal bei $g=4,1$ wird auch „ $g4$ “-Signal genannt [Zimmermann und Rutherford, 1986] und einem Spin $S=3/2$ [Hansson et al., 1987] oder $S=5/2$ [Horner et al., 1998] im Mn_4Ca -Komplex zugeordnet. Zur Quantifizierung der S-Zustandspopulation wurde in dieser Arbeit die Intensität des S_2 -*Multiline* EPR-Signal verwendet [Dau et al., 2001; Messinger et al., 2001]. An dunkeladaptierten PSII-Proben wird ein zusätzliches Signal sichtbar, das des D2-Tyr161-Radikals (Y_D^{\bullet}). Die Amplitude dieses EPR-Signals wurde bei den Untersuchungen der S-Zustände in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Um den Anteil von PSII-Reaktionszentren, die im S_2 -Zustand das „ $g4$ “-Signal zeigen, zu minimieren, wurde bei der Probenherstellung in dieser Arbeit im letzten Zentrifugationsschritt $10 \text{ } \%$ Glycerol (v/v) zum Puffer D gegeben [Zimmermann und Rutherford, 1986; Iuzzolino et al., 1998b]. Außerdem wurde für die vollständige Oxidation von Y_D und die Maximierung des S_1 -Zustandes die Proben einmal vorbelichtet (siehe Abschnitt 2.4.3) und anschließend während der Trocknung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für mindestens eine Stunde dunkeladaptiert.

Die EPR-Messungen wurden im Labor von Dr. F. Lenzian (Technische Universität Berlin) in Zusammenarbeit mit Dr. M. Kammel und Dr. M. Galander an einem Bruker ESP-300E Spektrometer mit Heliumkryosystem (Oxford, GB) bei 8 K durchgeführt. Die weiteren Parameter waren 10 mW Mikrowellenleistung, $9,6 \text{ GHz}$ Mikrowellenfrequenz, 20 G Modulationsamplitude und 100 kHz Modulationsfrequenz.

2.4.2 Auswertung der EPR-Spektren von PSII-Proben

Die Quantifizierung des S_2 -*Multiline* EPR-Signals erfolgte nach dem ursprünglich von J. Dittmer [1999] entwickelten Verfahren in der verbesserten Version von P. Liebisch [2005]: (1) Vergleich der unter gleichen Bedingungen gemessenen EPR-Spektren von aus gleichen Ausgangspräparationen hergestellten Proben. Dabei erfolgte die Normierung auf das Signal des rhombischen Eisens bei $g \approx 4$ durch Minimierung der quadratischen Differenz zwischen den einzelnen Spektren und einem ausgewählten Standard- S_2 -Spektrum zwischen $B = 1550 - 1650$ G. (2) Subtraktion eines glatten Untergrundbeitrages im Bereich des S_2 -*Multiline*-Signals. (3) Fourier-Filterung der EPR-Spektren über einen Bereich von $B = 2800 - 3300$ G (*Lowfield*-Anteil) und $B = 3500 - 4300$ G (*Highfield*-Anteil) sowie Bildung der Korrelationsfunktion zwischen einer S_2 -Standardprobe und den zu messenden Spektren von mit Laserblitzen belichteten Proben mit

$$\text{Amplitude}_{\text{Multiline}} = \frac{\int I_{\text{Standard}}(H) I_{\text{Probe}}(H) dH}{(\int I_{\text{Standard}}(H) dH)^2}$$

Die S_2 -Standardprobe wurde durch fünf Minuten Belichtung bei 200 K (Trockeneis/Ethanol) hergestellt. Die Probe wurde durch zwei Halogenlampen (jeweils $P = 250$ W) gleichzeitig von beiden Seiten bestrahlt. Zwischen der Proben und den Lampen befanden sich jeweils ein Wasserfilter und ein Kantenfilter zum Abschneiden des Infrarotanteils ab einer Wellenlänge von 750 nm.

Zur Simulation der Oszillationsmuster des S_2 -Signals in Abhängigkeit von der Blitznummer wurde das konventionelle Kok-Modell verwendet [Kok et al., 1970]. Die variierten Parameter dieses Modells sind der *Miss*-Parameter (es findet kein S-Übergang statt), die Wahrscheinlichkeit für *Double-hits* (das Voranschreiten um zwei Schritte im S-Zyklus), die Anzahl der inaktiven Reaktionszentren (*non- Q_B* -Zentren) und die Dunkelpopulation (Ausgangsverteilung) der S-Zustände. Wenn die Anregung der Photosysteme, wie in dieser Arbeit, mit ns-Laserpulsen erfolgt, treten keine *Double-hits* auf. Durch die Dunkeladaptation und Vorbelichtung der Proben vor der Messung wird sichergestellt, dass in der Ausgangsverteilung nur S_1 vorhanden ist. Die Parameter der Simulation sind damit lediglich die Wahrscheinlichkeit für *Misses* und der Anteil inaktiver Zentren. Vereinfachend wurde angenommen, dass der *Miss*-Parameter für alle S-Übergänge gleich ist. Die S-Zustandszusammensetzung nach dem n-ten Blitz einer Blitzserie ergibt sich dann durch die folgende Rekursionsformel:

$$\begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix}_{n+1} = \begin{bmatrix} m & 0 & 0 & (1-m) \\ (1-m) & m & 0 & 0 \\ 0 & (1-m) & m & 0 \\ 0 & 0 & (1-m) & m \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix}_n$$

Hierbei bezeichnet m den *Miss*-Parameter und S_i die Besetzungswahrscheinlichkeit der einzelnen S-Zustände.

2.4.3 Vorbelichtung zur Einstellung des S_1 -Zustandes

Wenn in einem Teil der PSII-Zentren Y_D im reduzierten Zustand vorliegt, kann durch den ersten Lichtblitz anstelle eines $S_1 \rightarrow S_2$ -Überganges die Oxidation des Y_D erfolgen. Um sicher zu stellen, dass in 100 % der PSII-Zentren $Y_D^{+\bullet}$ bereits vor dem ersten Blitz vorliegt, wird nach Iuzzolino et al. [1998b] ein Vorblitz gegeben. Außerdem liegt in dunkeladaptierten PSII-Proben ohne Vorblitz eine $\sim 75/25$ -Mischung

von S_1/S_0 vor. Die Ausbeute an S_1 kann durch die Verwendung eines Vorblitzes maximiert werden, da PSII-Zentren nach einem $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang im S_1 -Zustand verbleiben (dunkelstabiler Zustand) und Zentren nach einem $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang mit einer Zeitkonstante im Minutenbereich wieder zu S_1 relaxieren [Messinger et al., 1993]. Daher wurden in dieser Arbeit alle PSII-Proben vor der Trocknung beidseitig mit zwei Xenon-Gasentladungslampen (FX 134, EG&G Electron Optics, Blitzdauer $5 \mu\text{s}$, $410 \text{ nm} < \lambda < 750 \text{ nm}$) belichtet und anschließend dunkeladaptiert.

2.5 Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS)

Die wichtigste in dieser Arbeit verwendete Methode, um strukturelle und kinetische Informationen über den Mn_4Ca -Komplex des PSII zu erlangen, ist die Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS). Im Folgenden wird die der Auswertung von XAS-Spektren zugrunde liegende Theorie erläutert und die angewendete Methode der Datenanalyse erklärt.

In der Röntgenabsorptionsspektroskopie wird die Stärke der Absorption als Funktion der Energie E der Röntgenphotonen gemessen. Das resultierende XAS-Spektrum kann in drei energetische Bereiche unterteilt werden: (1) der Vorkantenbereich (*Pre-edge Region*); (2) die Region, die den sprunghaften Anstieg in der Absorption, die sogenannte Absorptionskante, beinhaltet und sich bis ca. 50 eV oberhalb der Kante erstreckt (*X-ray Absorption Near-Edge Structure*, XANES); (3) der ausgedehnte Bereich oberhalb der Kante, der oszillatorisches Verhalten zeigt (*Extended X-ray Absorption Fine-Structure*, EXAFS).

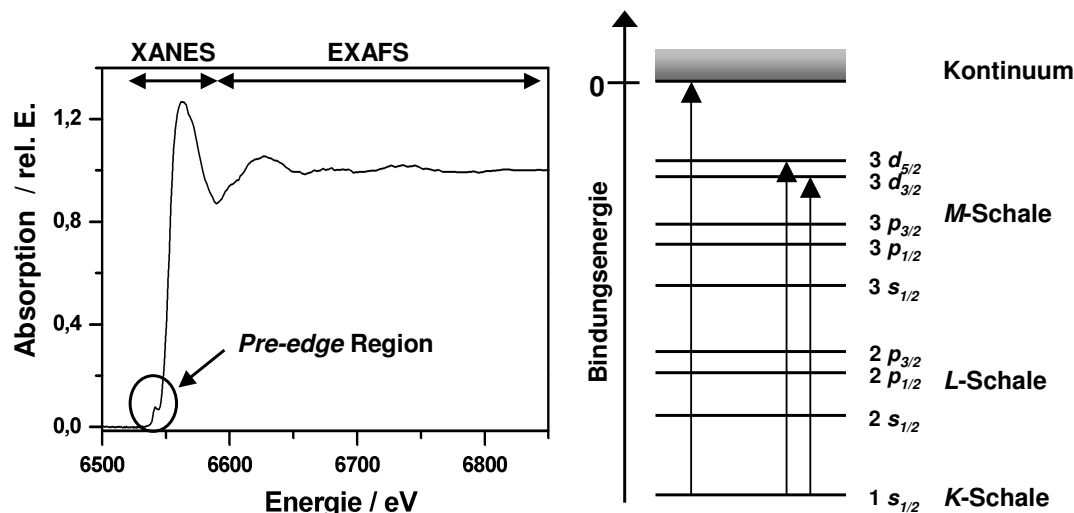


Abbildung 2.3: **Links:** Röntgenabsorptionsspektrum an der Mangan-K-Kante. **Rechts:** Elektronische Übergänge durch die Absorption von Röntgenstrahlung im Vorkantenbereich und an der K-Kante. Übergänge in das Kontinuum führen zur Emission eines Photoelektrons.

Der Vorkantenbereich und das Auftreten einer Absorptionskante können aus der Struktur der Elektronenhülle des Absorbers und deren Wechselwirkungen mit der Röntgenstrahlung verstanden werden. Im Vorkantenbereich entspricht die Energie des Röntgenphotons einem nach den Auswahlregeln für Dipolübergänge verbotenen $1s \rightarrow 3d$ -Übergang. Daher die geringe Intensität der Absorption in diesem Bereich (Abb. 2.3).

Reicht die Energie der Röntgenstrahlung aus, um den Absorber Mangan zu photoionisieren, d.h. ein $1s$ -Elektron aus der K-Schale ins Kontinuum anzuheben, ver-

zeichnet man im Spektrum einen sprunghaften Anstieg der Absorption, die sogenannte K-Kante (Abb. 2.3). Die ausgehende Photoelektronenwelle wird an benachbarten Atomen (Rückstreuer) als Sekundärwelle zurückgestreut (Abb. 2.4). Die Primär- und Sekundärwelle interferieren, so dass es zu einer Veränderung des Absorptionskoeffizienten aufgrund einer Zunahme der Amplitude der resultierenden Photoelektronenwelle durch konstruktive bzw. einer Abnahme durch destruktive Interferenzen kommt. Oberhalb der Absorptionskante ist daher ein oszillierendes Verhalten der Absorption zu beobachten (EXAFS, Abb. 2.4). In der Kante kommt es zu Anregungen mit $1s \rightarrow 4p$ -Übergängen in gebundene unbesetzte Zustände.

Durch die Ordnungszahl des rückstreuenden Atoms und seinen Abstand zum Absorberatom wird die Phase der Sekundärwelle bestimmt. Die Amplitude der EXAFS-Oszillation hängt im Wesentlichen von der Anzahl und dem Abstand der Rückstreuer der benachbarten Koordinationsschalen ab.

Die bei der Erzeugung des Photoelektrons entstandene Elektronenlücke wird durch Elektronen aus höheren Energieniveaus aufgefüllt. Die frei werdende Energie wird in Form von Röntgenfluoreszenzstrahlung emittiert.

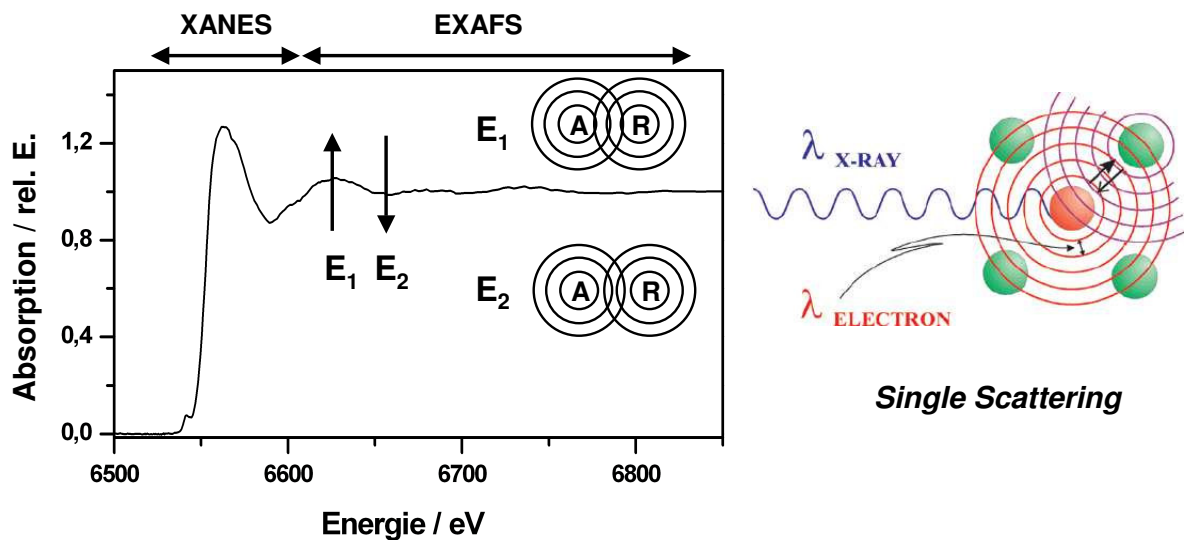


Abbildung 2.4: **Links:** Schematische Darstellung eines XAS-Spektrums an der Mangan-K-Kante. E_1 : konstruktive Überlagerung von Wellen im Bereich der EXAFS-Feinstruktur, E_2 : destruktive Überlagerungen; A: Absorber; R: Rückstreuer. **Rechts:** Muster der ausgehenden und zurückgestreuten Elektronenwelle für direkte Rückstreuung (*Single Scattering*). Entnommen aus [Bressler und Chergui, 2004].

Die EXAFS-Modulationen sind die direkte Konsequenz der Wellennatur des Photoelektrons, dessen Wellenlänge durch die DE BROGLIE-Beziehung gegeben ist:

$$\lambda = \frac{h}{m_e v} \quad (2.1)$$

h : Plancksche Konstante; m_e : Masse eines Elektrons; v : Geschwindigkeit des Photoelektrons.

Einfacher gestaltet sich die Beschreibung der EXAFS-Modulationen als Funktion des Wellenzahlvektors k , dessen Betrag gegeben ist durch:

$$k = \sqrt{\frac{2 m_e}{\hbar^2} (E - E_0)} \quad (2.2)$$

Die erste theoretische Beschreibung des EXAFS-Phänomens als Streuung der Photoelektronenwelle an punktförmigen Streuern erfolgte durch Sayers et al. [1971]. Ausführliche Darstellungen zur EXAFS-Theorie finden sich in [Teo, 1986; Rehr und Albers, 2000; Koningsberger et al., 2000].

Die EXAFS-Feinstruktur $\chi(k)$ kann als relative Änderung des experimentell gemessenen Röntgenabsorptionskoeffizienten $\mu(k)$ zum Röntgenabsorptionskoeffizienten $\mu_0(k)$ des freien Atoms in Abhängigkeit von der Energie E beschrieben werden. Bezogen auf den Wellenvektor k und normalisiert auf den Beitrag des freien Atoms folgt damit:

$$\chi(k) = \frac{\mu(k) - \mu_0(k)}{\mu_0(k)} \quad (2.3)$$

Für den Fall, das ein monoatomares Gas in geringer Konzentration vorliegt, kann keine Welle zurückgestreut werden. In diesem Fall ist $\mu(k) = \mu_0(k)$, so dass $\chi(k) = 0$ ist. In diesem Fall existiert keine Feinstruktur $\chi(k)$.

Der Absorptionskoeffizient $\mu(k)$ ist proportional zum Quadrat des elektrischen Dipolübergangsmoment $|M|^2$, welches sich aus

$$\mu(k) \propto |M|^2 \sim |\langle f | \mathbf{r} | i \rangle|^2 \quad (2.4)$$

ergibt. \mathbf{r} : Operator des elektrischen Dipolmomentes; f : Wellenfunktion des Endzustandes; i : Wellenfunktion des Ausgangszustandes.

Die Wellenfunktion des Endzustandes beinhaltet die Überlagerung aus auslaufender und den an den Nachbaratomen gestreuten Elektronenwellen. Die EXAFS-Feinstruktur $\chi(k)$ ergibt sich als Summe der Rückstreubeiträge aller Nachbaratome i (Einfachstreuung vorausgesetzt):

$$\chi(k) = \sum \frac{N_i |f_i(\pi, k)|}{k R_{ai}^2} \sin(2k R_{ai} + \alpha_{ai}(k)) \quad (2.5)$$

N_i : Anzahl äquivalenter rückstreuender Atome im Abstand R_{ai} zum absorbierenden Atom; $f_i(\pi, k)$: Amplitude der rückgestreuten Welle des Rückstreuatoms i . Die Phase $\alpha_{ai}(k)$ bezieht die Phasenverschiebung durch das Absorberatom a und durch den Rückstreuer i mit ein.

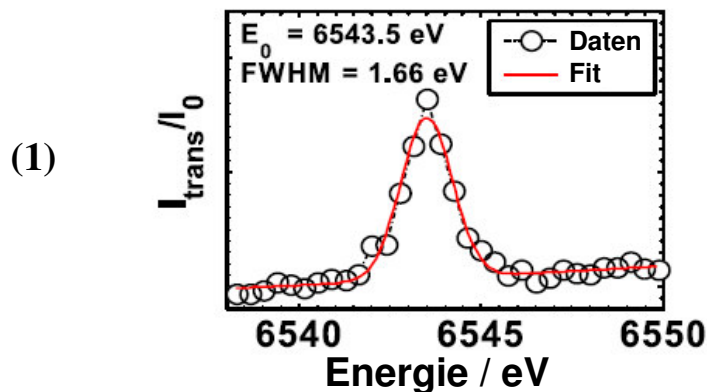
In realen Systemen besteht ein statistische Unordnung, die durch den Term $e^{-2\sigma_{ai}^2 k^2}$ berücksichtigt wird. Der darin enthaltene Debye-Waller-Faktor σ_{ai}^2 ist ein Parameter für die statische und dynamische Varianz des Abstandes eines Rückstreuatoms und berücksichtigt damit die Auslenkung (Schwingung) der einzelnen Atome aus ihrer Ruhelage und die statistische Fehlordnung. Der Verlust an Photoelektronen durch inelastische Streuprozesse wird durch die Einführung eines Terms $e^{\frac{-2R_i}{\lambda(k)}}$ berücksichtigt, in dem $\lambda(k)$ die mittlere freie Weglänge des Photoelektrons beschreibt. Damit ergibt sich folgende EXAFS-Formel:

$$\chi(k) = \sum \frac{N_i |f_i(\pi, k)|}{k R_{ai}^2} e^{-2\sigma_{ai}^2 k^2} e^{\frac{-2R_i}{\lambda(k)}} \sin(2k R_{ai} + \alpha_{ai}(k)) \quad (2.6)$$

2.5.1 Analyse der XAS-Spektren an der K-Kante von PSII-Proben

Aus den experimentell ermittelten Spektren wurden über mehrere Auswertungsschritte strukturelle und elektronische Informationen gewonnen. Für jeden Scan musste die komplette EXAFS-Aufbereitung durchgeführt werden. Die dabei entstandene Datenmenge ließ sich mit Standardsoftware nicht mehr bewältigen. Daher wurde von P. Liebisch [2005] im Rahmen seiner Dissertation ein Programmpaket entwickelt. Dabei steuert eine Parameterdatei die Kalibrierung und die Datenaufbereitung. Dies ermöglicht sowohl die interaktive Selektion als auch die Selektion anhand kritischer Parameter. Weiterhin wurde eine Übersicht über die Datenqualität wie auch eine Summation nach statistischer Wichtung möglich. Nachfolgend sind die einzelnen Schritte der Datenanalyse einzeln aufgeführt.

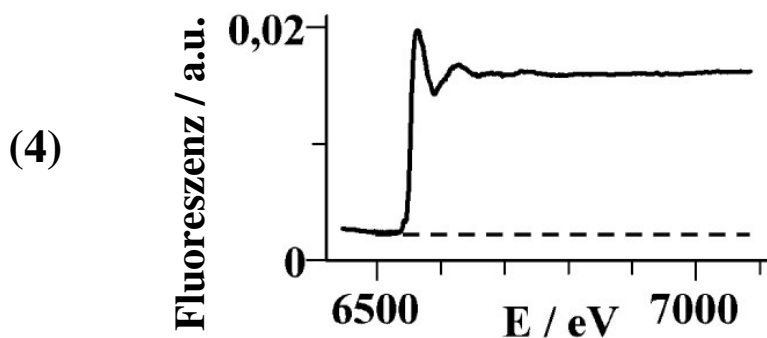
(1) **Energiekalibrierung:** Durch die Bestimmung der Energie eines genau erfassbaren spektralen Merkmales des simultan gemessenen KMnO_4 - (bei Mn-XAS) bzw. CaCl_2 -Standardspektrums (bei Ca-XAS) wurde die Energieachse kalibriert. Durch Anpassung einer Gauß-Funktion an das Vorkanten-Maximum wurde dessen Position bestimmt. Der Mittelwert der Gaußkurve wurde auf 6543,3 eV bzw. 4030 eV gesetzt, die erreichte Genauigkeit betrug $\pm 0,1$ eV [Iuzzolino et al., 1998a; Meinke et al., 2000]. Die Energieachse wurde entsprechend ihre Abweichung vom Sollwert korrigiert.



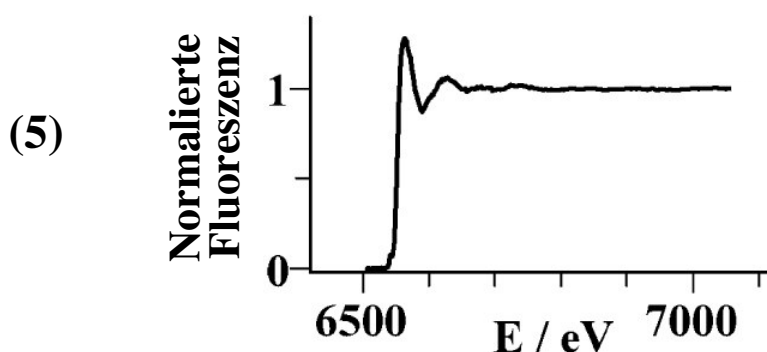
(2) **Linearisierung der Energieachse:** Durch Interpolation auf eine temporäre Energieachse mit sehr großer Punktdichte und anschließender Bildung eines laufenden Mittelwertes wurden alle Spektren auf eine einheitliche Energieachse transformiert.

(3) **Summation:** Alle energiekalibrierten Einzelspektren wurden aufsummiert. Für die Raumtemperaturdaten (Kapitel 4) waren dies 30 bis 100 Einzelspektren. Die Spektren wurden zuvor gewichtet, um die unterschiedlichen Signal-zu-Rausch-Verhältnisse aufgrund von Unterschieden in der Probendicke, der Stärke des Streuuntergrundes und der Intensität des Röntgenstrahls zu berücksichtigen.

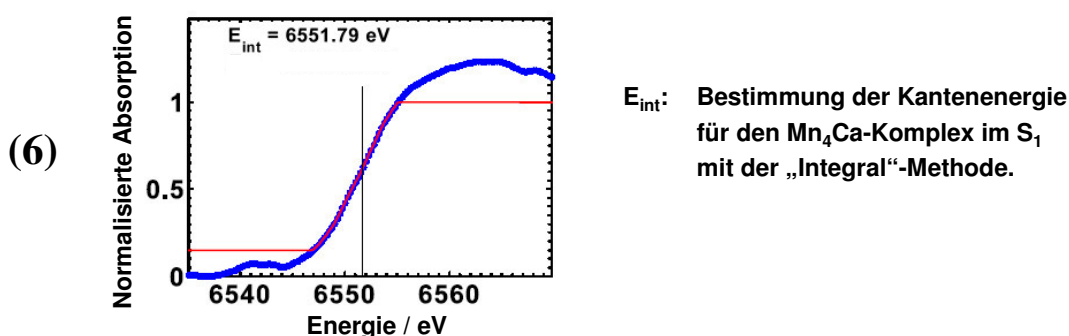
(4) **Subtraktion des Streuuntergrundes:** Von der auf das Eingangssignal (Röntgenabsorption vor der Probe) bezogenen Fluoreszenz-detektierten Absorption wurde ein Untergrund abgezogen, der durch einen linearen Fit an dem Vorkantenbereich bestimmt wurde.



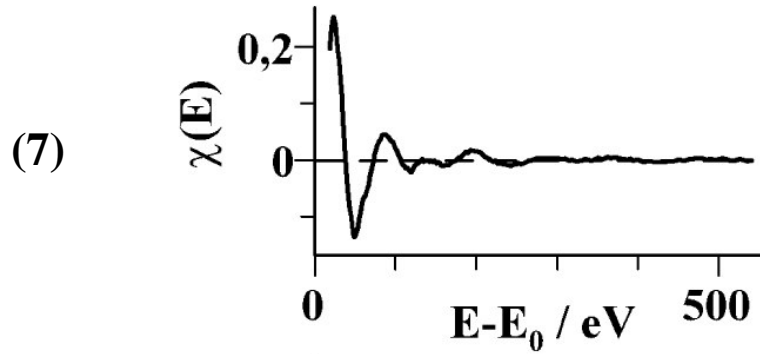
(5) **Normierung:** Das so erhaltene Absorptionssignal wurde dann auf einen nur langsam veränderlichen atomaren Hintergrund normiert [Teo, 1986; Rehr und Albers, 2000]. Dieser wurde durch die Anpassung eines Polynoms niedriger Ordnung bestimmt.



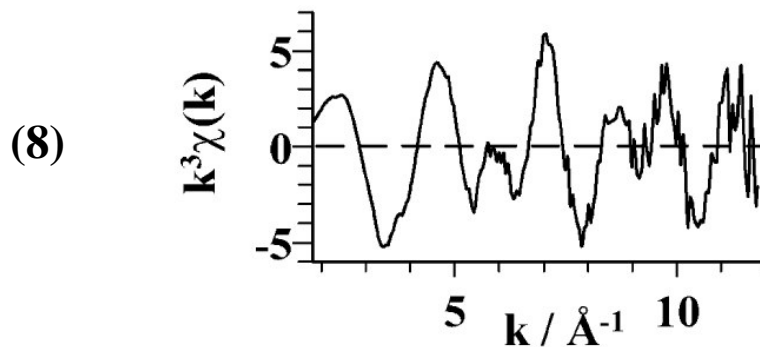
(6) **Bestimmung der Kantenposition:** Aus dem normierten Röntgenabsorptionssignal können Parameter wie die Kantenposition berechnet werden. Darüber hinaus gewährleistet die Bestimmung der Kantenposition für jedes Einzelspektrum, dass das Auftreten von Photoreduktion kontrolliert werden konnte. Zur Bestimmung der Kantenposition wurde die sogenannte Integralmethode [Dittmer und Dau, 1998] angewendet, die auf der Berechnung des Schwerpunktes des Kantenverlaufes beruht.



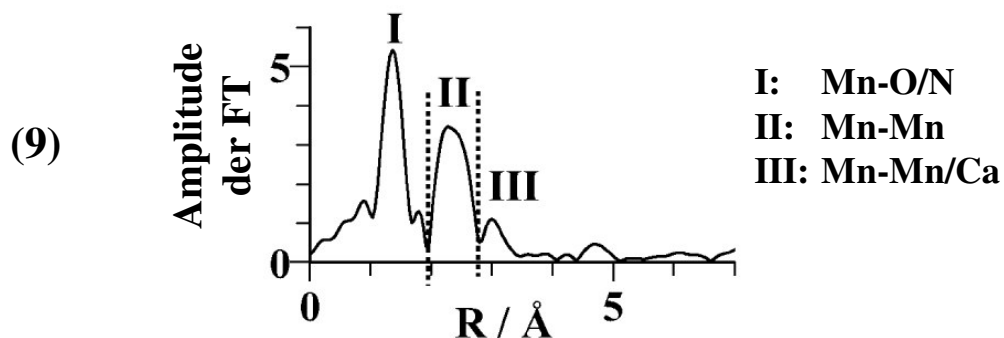
(7) **Extraktion der EXAFS-Oszillationen:** Die Extraktion der EXAFS-Oszillationen $\chi(E)$ erfolgte üblicherweise durch Anpassung eines Splines zur Beschreibung des atomaren Hintergrundes μ_0^{bg} und anschließender Division gemäß $\mu = \mu_0(1 + \chi)$. Dabei wurde die Energie des absorbierten Röntgenphotons E in den Betrag des Wellenzahlvektors k des Photonelektrons umgerechnet (Gl. 2.2). Um die im Debye-Waller-Faktor beschriebene Dämpfung der Oszillationen $\chi(k)$ bei hohen Wellenzahlen auszugleichen, ist es üblich, die EXAFS-Spektren zu gewichten. Eine annähernd gleiche Amplitude der EXAFS-Oszillationen über den gesamten Wellenzahlbereich wird durch die Gewichtung $\chi_w(k) = \chi(k) \times k^3$ erreicht.



(8) **Fourier-Transformation:** Durch Fourier-Transformation (FT) des EXAFS-Spektrums $\chi(k)$ lassen sich die Rückstreuerschalen um den Absorber visualisieren. Für den Übergang von der Energie- auf die Wellenzahlachse wurde eine Nullpunktsenergie von $E_0 = 6540$ eV bei Mn-EXAFS und $E_0 = 4030$ eV bei Ca-EXAFS gewählt. Die Anzahl der Datenpunkte wurde auf 200 äquidistante Werte auf der k -Achse reduziert. Um die Auswirkungen des endlichen k -Bereiches in der FT zu reduzieren, wurde die Funktion $\chi(k)$ vor der Transformation mit einer \cos^2 -Fensterfunktion über 10 % an beiden Enden der k -Achse multipliziert.



(9) **EXAFS-Simulation:** Die eigentliche EXAFS-Analyse erfolgte durch Kurvenanpassung an $\chi(k)$. Die EXAFS-Simulationen wurden an ungefilterten k^3 -gewichteten Oszillationen ausgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden die EXAFS-Simulationen mit der in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Software SimX, die in [Dittmer, 1999] beschrieben ist, durchgeführt. Die Berechnung der Phasenfunktionen für die verschiedenen Rückstreuer erfolgte mit dem Programm FEFF 7.0 [Rehr et al., 1991] auf der Basis eines Modells, bestehend aus zwei di- μ -oxo-verbrückten Mangan-Dimeren, die über eine mono- μ -oxo-Brücke verbunden sind. Die Qualität der Simulation wurde durch einen aus den Fourier-gefilterten Spektren ermittelten R-Wert (R_F) erfasst [Dittmer, 1999; Meinke et al., 2000].



Aus den EXAFS-Oszillationen können die Absorber-Rückstreuer-Abstände mit einer Genauigkeit besser als $\pm 0,02 \text{ \AA}$ bestimmt werden. Atome mit einem Abstand von $>5 \text{ \AA}$ zum Absorber können normalerweise nicht detektiert werden. Rückstreuer gleicher chemischer Natur können nur bei über $0,1 \text{ \AA}$ Abstandsunterschied aufgelöst werden. Die Genauigkeit zur Bestimmung der Koordinationszahl ist im Allgemeinen $\pm 20 \%$. Zwischen Atomen ähnlicher Größe (z.B. S und Cl) kann nur schwer differenziert werden [George et al., 1998].