

Kapitel 3

Charakterisierung von PSII-Membranfragment-Proben für EPR- und XAS-Messungen an der Mn-K-Kante

In diesem Kapitel werden die verbesserte Trocknungsprozedur für PSII-Membranfragment-Proben und die Optimierungsexperimente für die möglichst vollständige Einstellung der zu untersuchenden S-Zustände dargestellt. Die PSII-Proben werden zusätzlich ausführlich charakterisiert. Zum Schluss wird die Entwicklung einer Präparation zur Massenherstellung von PSII-Proben für XAS bei Raumtemperatur beschrieben.

Eine wesentliche Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung von aussagekräftigen spektroskopischen Messungen am PSII sind hoch aktive und stabile Proben. Diese sollten auch nach Behandlungen wie Zentrifugation und Trocknung möglichst unverändert sein. In dieser Arbeit wurden für EPR- und XAS-Messungen ausschließlich PSII-Membranfragmente aus Spinat (siehe Abschnitt 2.1) eingesetzt. Durch Zentrifugation auf einen XAS-Probenträger lassen sich die Membrandoppelschichten weitgehend parallel zur Trägeroberfläche orientieren. Ausgehend von den Ergebnissen von L. Iuzolino [1999] wurde die Herstellung von PSII-Membranfragment-Proben für XAS- und EPR-Messungen weiter verbessert.

In der vorliegenden Arbeit wird zwischen zwei Typen von Proben unterschieden, die mit dem in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Verfahren für partiell orientierte PSII-Membranfragmente hergestellt werden: (1) *Freeze-quick*-Proben mit einem Gehalt von $\sim 100 \mu\text{g}$ Chl. Diese Proben können mit Laserblitzen durch den S-Zustandszyklus geschaltet werden. Sie wurden für XAS-Untersuchungen des S-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].

3.1 Veränderte Trocknungsprozedur für partiell orientierte XAS- und EPR-PSII-Proben

Eine wichtige Veränderung der Präparation gegenüber [Iuzzolino, 1999] betrifft die Trocknungsprozedur. Während der Herstellung orientierter XAS- und EPR-Proben wurde die Sauerstoffaktivität zu Beginn der Präparation überprüft. Die mittlere Aktivität der PSII-Membranfragmente in den orientierten Proben vor der Trocknung lag bei 1200-1400 $\mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$. Durch die Lagerung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ verloren die PSII-Proben innerhalb eines Jahres weniger als 5 % der Aktivität.

Als Neuerung wurde ein Exsikkator eingesetzt, da dadurch die Trocknung schneller und besser reproduzierbar wurde. Als Trocknungsmittel wurde Orangegel (Merck) eingesetzt und ein Luftdruck von 250 mbar eingestellt. Zur Überprüfung der Trocknungsprozedur wurde die Sauerstoffaktivität der Proben zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Nach 60 Minuten waren die Proben soweit getrocknet, dass kein Oberflächenwasser mehr zu sehen war, jedoch wurde noch keine Bildung von Rissen, wie es nach kompletter Trocknung zu beobachten ist, festgestellt. Während einer Trocknungsdauer von 1-2 Stunden blieb die Sauerstoffaktivität nahezu unverändert hoch (Abb. 3.1).

Als Ergebnis wurde folgende verbesserte Trocknungsprozedur eingeführt:

- In einem mit Orangegel befüllten Exsikkator wurden die PSII-Proben bei einem Druck von 250 mbar im Dunkeln bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ für eine Stunde (*Freeze-quick*-Proben) bzw. 1,5 Stunden (*Dichroismus*-Proben) getrocknet.

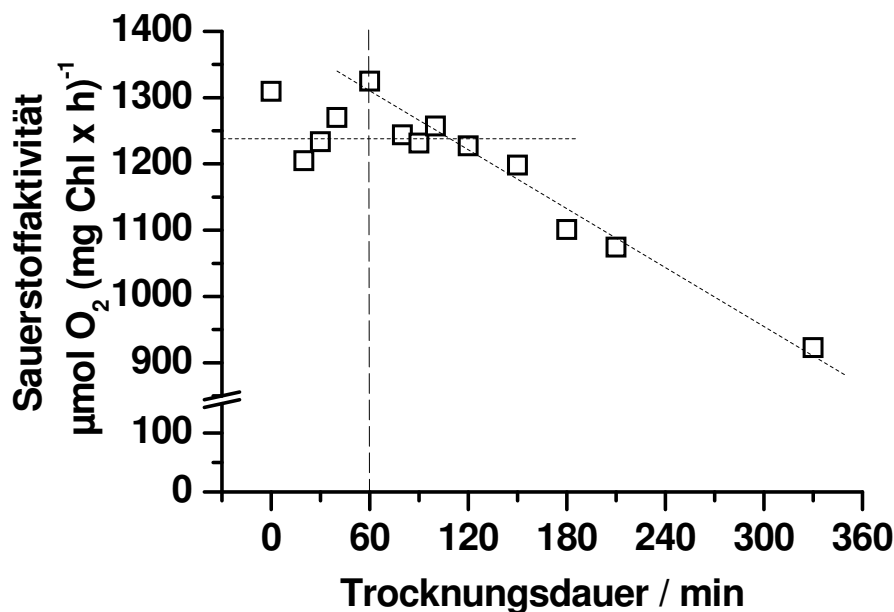


Abbildung 3.1: Sauerstoffaktivität als Funktion der Trocknungsdauer bei partiell orientierten *Freeze-quick*-Proben. Darstellung der zeitliche Entwicklung der Aktivität während der Trocknung im Exsikkator im Dunkeln bei $4\text{ }^\circ\text{C}$. Datenpunkte gemittelt aus drei Versuchsreihen.

3.2 Bestimmung des Chlorophyllgehalts in partiell orientierten PSII-Proben

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Präparationsvorschriften wurde bei einer großen Anzahl an XAS-Probenträgern die aufgetragene Gesamt-Chl-Menge bestimmt. Durch die dabei ermittelten Werte entfiel eine nachträgliche Chl-Bestimmung an gemessenen XAS-Proben.

Die Herstellung der zur Chl-Bestimmung benötigten Proben wurde wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben durchgeführt. Die fertigen Proben wurden jedoch nicht getrocknet, sondern nach dem letzten Zentrifugationsschritt sofort weiter verwendet. Dazu wurde die Schicht aus PSII-Membranfragmenten mit einem speziellen Pinsel mit 500 μl Puffer D vollständig von den XAS-Probenträgern herunter gewaschen, die Probenhalter danach mit 500 μl Puffer D gespült und die erhaltenen Chl-Lösungen gründlich homogenisiert. Es wurden die Chlorophyll-Konzentrationen von 36 *Freeze-quick*- und 18 *Dichroismus*-Proben aus unterschiedlichen Chargen gemessen. Die Chl-Bestimmung in den Homogenaten erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben.

Freeze-quick-Proben enthielten im Mittel $104 \pm 23 \mu\text{g}$ Chl, das entspricht einem Anteil von $\sim 30\%$ der in der Zentrifugation eingesetzten Ausgangsmenge von $330 \mu\text{g}$ Chl. *Dichroismus*-Proben enthielten im Mittel $414 \pm 15 \mu\text{g}$ Chl, das entspricht einem Anteil von $\sim 25\%$ der eingesetzten Ausgangsmenge von $1,67 \text{ mg}$ Chl.

Somit wurde bei der Herstellung partiell orientierter XAS-Proben nur jeweils $1/4$ - $1/3$ des eingesetzten PSII-Materials auf die Probenträger aufgetragen, der Rest wurde durch die Ultrazentrifugation aus den Einsätzen für die XAS-Probenträger (Abb. 2.2, S. 24) heraus gedrückt.

⇒ Bei den Berechnungen der tatsächlich auf den XAS-Probenträger befindlichen Chl-Konzentration mussten die eingesetzte Chl-Ausgangsmengen daher um folgende Faktoren reduziert werden: um den Faktor 3 bei *Freeze-quick*-Proben und um den Faktor 4 bei *Dichroismus*-Proben.

3.3 Bestimmung der Membranfragment-Schichtdicke in partiell orientierten PSII-Proben

Die Schichtdicke von partiell orientierten Membranfragment-Proben ist für die sättigende Anregung der Photosysteme mit Lichtblitzen von ausschlaggebender Bedeutung. Für die reproduzierbare Einstellung bestimmter S-Zustände muss die Anregung möglichst aller Reaktionszentren erreicht werden. Die Probendicke wird dabei für die Abschätzung der optischen Eindringtiefe benötigt.

Die Dicke von partiell orientierten PSII-Membranfragment-Proben wurden für beide Typen von Proben bestimmt. In Abb. 3.2 ist der Versuchsaufbau dargestellt.

Für die Messungen wurden von beiden Typen partiell orientierter PSII-Membranfragmente je drei Probenserien mit jeweils neun Proben hergestellt. An jeweils vier verschiedenen Positionen wurde die Dicke der PSII-Membranfragment-Schicht gemessen. Die Dicke betrug im Mittel bei *Freeze-quick*-Proben $94 \pm 10 \mu\text{m}$, bei *Dichroismus*-Proben $213 \pm 25 \mu\text{m}$.

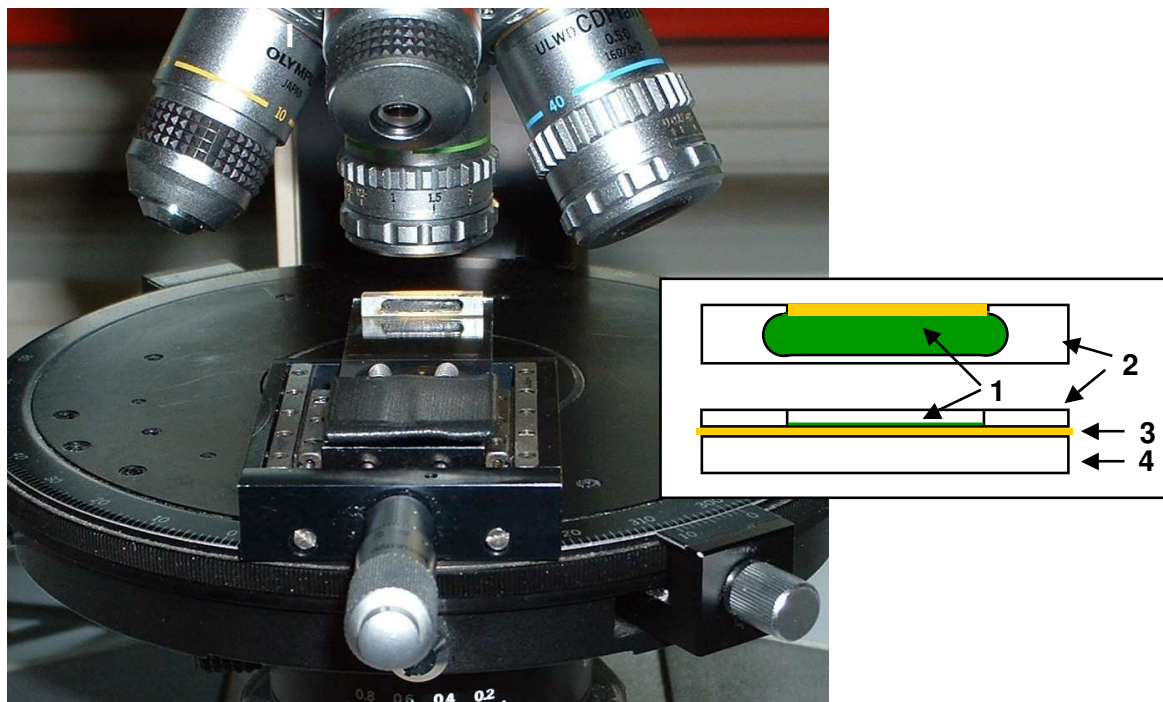


Abbildung 3.2: Bestimmung der Dicke von partiell orientierten PSII-Membranfragmenten. **Links:** Aufbau für die Dickenmessung. Es wurde ein Durchlichtmikroskop (BH-2, Olympus; Okular WHK 10x20, Objektive A10P0 und A4P0, Olympus) verwendet, auf dessen Objektisch ein linear- μm -Manipulator befestigt wurde. Über Vergleiche mit einem Objektmikrometer (MIC1111, Mikroskope BeyerDörfer; 2 mm, 200 Einteilungen) konnten die Schichtdicken bestimmt werden. **Rechts:** Schematischer Aufbau einer partiell orientierten Probe. 1: PSII-Membranfragment-Schicht; 2: XAS-Proben-träger aus Plexiglas mit einem fehlenden Seitensteg; 3: doppelseitiges Klebeband; 4: Plexiglas-Block für die Standfestigkeit. Um die Schicht der PSII-Membranfragmenten direkt betrachten zu können, wurde nach der Präparation einer der seitlichen Stege aus dem XAS-Proben-träger herausgeschnitten und die Probe mit dieser Seite nach oben unter dem Mikroskop aufgestellt.

Da *Dichroismus*-Proben gegenüber *Freeze-quick*-Proben im Mittel die vierfache Menge an Chl enthalten (siehe Abschnitt 3.2), aber nur doppelt so dick sind, ist die Konzentration an PSII-Reaktionszentren pro Volumeneinheit doppelt so hoch wie bei *Freeze-quick*-Proben.

Zur Untersuchung des Lichtsättigungsverhaltens in Blitz-Belichtungsexperimenten wurden von M. Grabolle [2005] Absorptionsmessungen an PSII-Membranfragmenten durchgeführt. Mit Hilfe des durch diese Messungen bestimmten Absorptionsquerschnitts σ_{Abs} und dem photochemischen Wirkungsquerschnitt σ_{Wirk} lassen sich aus der Schichtdicke und der Blitzintensität der Prozentsatz an angeregten Photosystemen in der Probe bestimmen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass

⇒ bei einer Laserpuls-Energie von 100 mJ/cm^2 je Probenseite eine vollständige Sättigung der *Freeze-quick*-Proben erfolgt.

(Die Sättigung von *Dichroismus*-Proben durch Laserblitze ist nicht notwendig, da diese nur im S_1 -Zustand gemessen wurden bzw. der S_2 -Zustand durch Dauerbelichtung angereichert wurde.)

3.4 Bestimmung des Restwassergehalts und der O₂-Aktivität in partiell dehydrierten PSII-Proben

Der Restwassergehalt in orientierten PSII-Membranfragmenten spielt bei XAS-Messungen eine große Rolle. Der Wassergehalt sollte so niedrig wie möglich sein um (1) die Streuung von Röntgenstrahlung an Wassermolekülen zu minimieren, (2) maximal konzentrierte Proben zu erhalten und (3) bei Tieftemperaturmessungen die Beugung von Röntgenstrahlung an Eiskristallen zu verringern. Andererseits ist zu berücksichtigen, dass vollständig dehydrierte Proben inaktiv sind.

Versuche zur Verringerung des Wassergehalts wurden mit beiden Typen von PSII-Proben durchgeführt. Während der Trocknungsprozedur wurden zu verschiedenen Zeiten einzelne XAS-Proben-träger gewogen (BasicLite 210S, Sartorius; $\pm 0,1$ mg) und die Sauerstoffaktivität bestimmt. Die vollständige Trocknung der Proben erfolgte mittels langsamen Erwärmens der Proben auf 80 °C, dann einer Erhöhung der Temperatur auf 100 °C und abschließend einer weiteren Trocknung über zwei Stunden bei 120 °C in einem Ofen (Tv15, Memmert). Eine schnellere Trocknung führte zur Deformation der Proben-träger und dadurch zum Abplatzen der PSII-Schicht.

In Abb. 3.3 (A) ist der Gewichtsverlust von *Dichroismus*-Proben durch Wasserverdunstung während der Trocknung dargestellt. Der Wassergehalt der frischen Proben lag im Mittel bei ~ 70 Gewichts-%. Während der Trocknung im Exsikkator reduzierte sich das Gewicht um ~ 40 % und der Wassergehalt sank auf ~ 40 %. Bei vollständiger Trocknung verloren die Proben 2/3 ihres Gewichtes (Trockenmasse 11 ± 1 mg).

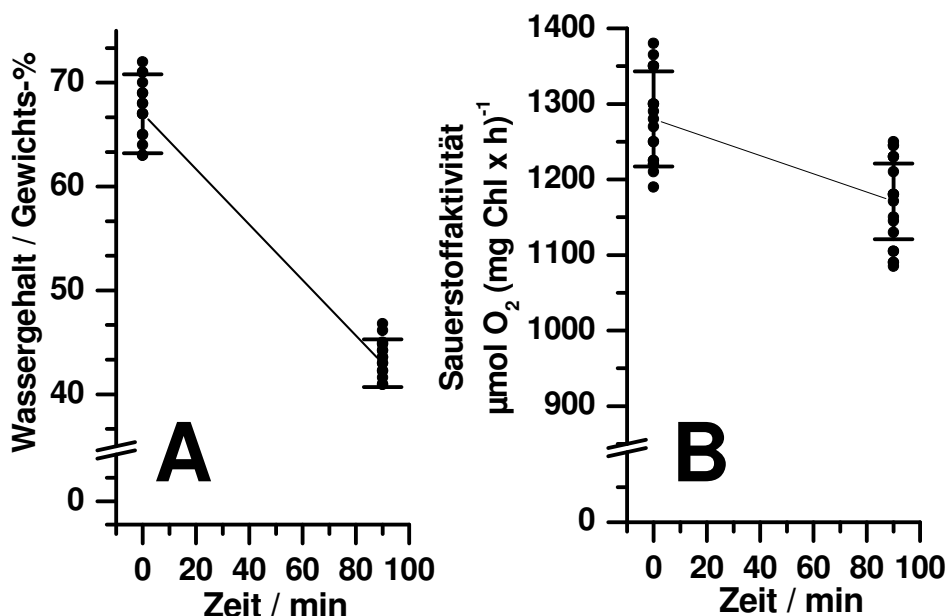


Abbildung 3.3: Der Wassergehalt und die Sauerstoffaktivität während der Trocknung von *Dichroismus*-Proben mit 10 % Glycerol. (A) Wassergehalt in Gewichts-%, (B) Sauerstoffaktivität. Trocknungsprozedur: 1,5 h im Exsikkator über Orangegel bei 250 mbar Druck und 4 °C im Dunkeln. Es wurden jeweils drei XAS-Proben-träger zusammen gewogen und die Daten über sechs Versuchsreihen gemittelt.

In Abb. 3.4 ist der Gewichtsverlust von *Freeze-quick*-Proben dargestellt. Der Ausgangswassergehalt lag im Mittel mit ~ 77 % etwas höher als bei den *Dichroismus*-Proben. Nach einer Stunde im Exsikkator fiel der Wassergehalt auf ~ 60 Gewichts-% ab und das Gewicht reduzierte sich um ~ 35 %. Bei vollständiger Trocknung verloren

die Proben $\sim 70\%$ ihres Gewichtes (Trockenmasse $4,3 \pm 0,8$ mg). Es kann ein zwei-phasiges Trocknungsverhalten angenommen werden. In der ersten Phase findet ein schneller Verlust des „Oberflächen“-Wassers ohne Aktivitätsverlust innerhalb der ersten zwei Stunden statt. In der nachfolgenden zweiten Phase kommt es zur langsameren Dehydrierung der Membranen mit Aktivitätsverlust.

Messungen der Sauerstoffaktivität zeigten, dass *Dichroismus*-Proben während der Trocknungsprozedur nach 1,5 Stunden im Exsikkator im Mittel $\sim 15\%$ ihrer Sauerstoffaktivität verloren hatten (Abb. 3.3 (B)).

Bei *Freeze-quick*-Proben verringerte sich die Sauerstoffaktivität während der oben beschriebenen Trocknungsprozedur innerhalb von 120 Minuten sehr geringfügig, nahezu 100 % der Ausgangsaktivität blieben erhalten (Abb. 3.4).

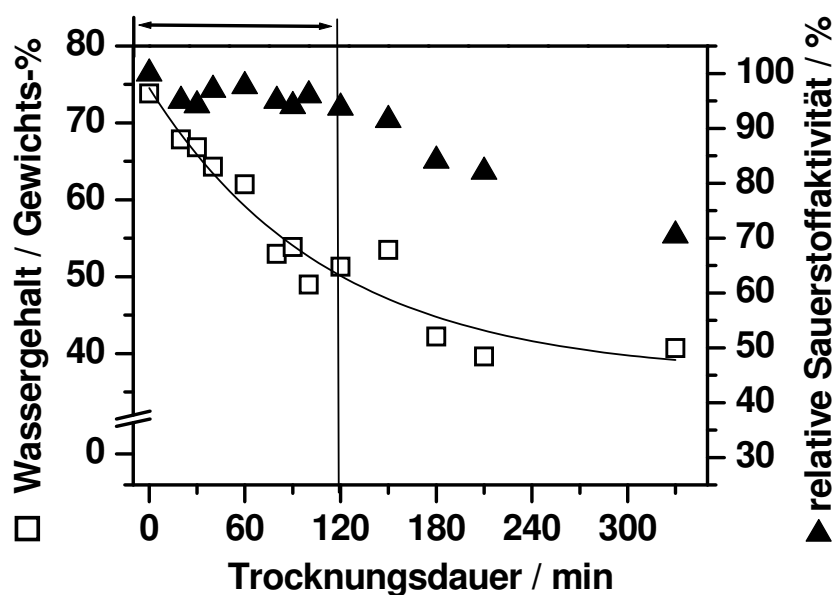


Abbildung 3.4: Die Sauerstoffaktivität und der Wassergehalt während der Trocknung von *Freeze-quick*-PSII-Proben mit 10 % Glycerol. Die Trocknung erfolgte im Exsikkator über Orangegel bei 250 mbar Druck und 4 °C im Dunkeln. Es wurden jeweils drei XAS-Proben-träger gleichzeitig gewogen und ein Proben-träger für die Bestimmung der Sauerstoffaktivität verwendet. Die Daten aus zwei Versuchsreihen wurden gemittelt. Zur Verdeutlichung des zeitlichen Verhaltens des Wasserverlustes wurde eine Exponentialfunktion angepasst (durchgezogene Linie mit $y_0 = 37,1$; $A = 37,4$; $\tau = 113,4$ min).

- ⇒ Bei der neu entwickelten schnelleren Trocknungsprozedur ist die Reproduzierbarkeit des Wassergehalts bei beiden Typen an partiell orientierte PSII-Proben annähernd gleich hoch.
- ⇒ Ein Vorteil gegenüber der Trocknungsprozedur nach [Iuzzolino, 1999] ist der deutlich niedrigere Wassergehalt und damit die höhere Konzentration von Manganatomen.
- ⇒ Bei *Freeze-quick*-Proben zeigte sich, dass die Sauerstoffaktivität auch nach längerer Trocknungsdauer von bis zu ~ 120 Minuten nahezu unverändert blieb.

3.5 Mangan- und Chlorophyll-Konzentration in partiell orientierten PSII-Proben

In der nachfolgenden Tabelle sind alle ermittelten Charakteristika für beide Typen von PSII-Membranfragment-Proben aufgelistet. Von besonderem Interesse für die XAS- und EPR-Untersuchungen sind (1) ein möglichst niedriger Wassergehalt, um die Streuung von Röntgenstrahlung an Wassermolekülen zu minimieren und bei Tieftemperaturmessungen die Beugung von Röntgenstrahlung an Eiskristallen zu verringern; (2) die Schichtdicke, um eine Sättigung durch Laserblitze zum Einstellen der verschiedenen S-Zustände gewährleisten zu können; (3) die Mn-Konzentration, um die Anzahl der angeregten Manganatome pro Scan abschätzen zu können.

	<i>Freeze-quench</i> -Proben	<i>Dichroismus</i> -Proben
Chl / Probe ^a	104 ± 23 µg	414 ± 15 µg
Gewicht trockener Proben ^{b,d}	4,3 ± 0,8 mg	11 ± 1 mg
Chl / trockene Probe	24 µg · mg ⁻¹	39 µg · mg ⁻¹
Schichtdicke ^c	94 ± 10 µm	213 ± 25 µm
Chl / Fläche	2,8 µg · mm ⁻²	11,1 µg · mm ⁻²
Chl / Volumen	29,8 µg · mm ⁻³	52,1 µg · mm ⁻³
Mangan / Fläche	5,4 × 10 ⁻¹¹ mol · mm ⁻²	2,1 × 10 ⁻¹⁰ mol · mm ⁻²
Mangan-Konzentration	0,57 mmol · l ⁻¹	0,99 mmol · l ⁻¹

Mit Probe bedeckte Fläche auf dem XAS-Probenträger	37,2 mm ²
Molekulargewicht von Chl	900 g/mol
Chl-Moleküle pro Photosystem II	230
Manganatome pro Photosystem II	4
^a Mittelung über 36 bzw. 18 Proben	
^b Mittelung über jeweils 36 Proben	
^c Mittelung über jeweils 27 Proben	
^d vollständig dehydrierte Probe	

3.6 Optimierung der S-Zustandspopulation in partiell orientierten PSII-Proben

Bei XAS-Messung an PSII-Proben in den einzelnen S-Zuständen sollte gewährleistet sein, dass möglichst alle Zentren im gewünschten S-Zustand vorliegen.

Die Optimierung des Einstellens verschiedener S-Zustände durch Laserblitze erfolgte mit *Freeze-quench*-Proben (siehe Abschnitt 2.1.2). Vor der Belichtung wurden die einzelnen Proben eine Minute aufgetaut, dann von beiden Seiten mit 1 bis 6 ns-Laserblitzen (frequenzverdoppelter, gütegeschalteter Nd:YAG Laser, Quantel Brilliant, 532 nm, abgeschwächt auf ~100 mJ/cm²) belichtet und innerhalb von ~1 Sekunde wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Folgende Parameter wurden variiert:

- **Blitzabstand:** Der optimale Blitzabstand von 0,5-1 s wurde in Fluoreszenzexperimenten von M. Grabolle [2005] ermittelt.
- **Probendicke:** Es wurden partiell orientierte PSII-Proben mit drei unterschiedlichen Chlorophyllmengen (= Schichtdicken) hergestellt: 50 μg , 100 μg und 200 μg Chl pro Probe. Die PPBQ-Konzentration wurde dabei jeweils auf 200 nmol/(mg Chl) eingestellt.
- **Konzentration des Elektronenakzeptors:** Der Einfluss der PPBQ-Konzentration wurde getestet mit 100 nmol, 200 nmol und 400 nmol PPBQ pro mg Chl; alle Proben enthielten 100 μg Chl. PPBQ wurde vor jeder Präparation frisch in Ethanol umkristallisiert, um Zersetzungsprodukte, die als Inhibitoren wirken können, zu entfernen (siehe Anhang C).

Mit jeder der fünf PPBQ-Probendicke-Kombinationen wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt. Eingesetzt wurden nur PSII-Ausgangspräparationen mit einer Aktivität von $\geq 1200 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$. Es wurde von mindestens fünf verschiedenen Proben mit jeweils gleicher Anzahl von Laserblitzen ein EPR-Spektrum gemessen. Die S-Zustandsverteilung wurde durch die Quantifizierung des S_2 -*Multiline* EPR-Signals bestimmt (Abb. 3.5). Die EPR-Messungen und die Auswertungen der Spektren wurden zusammen mit Peter Liebisch durchgeführt.

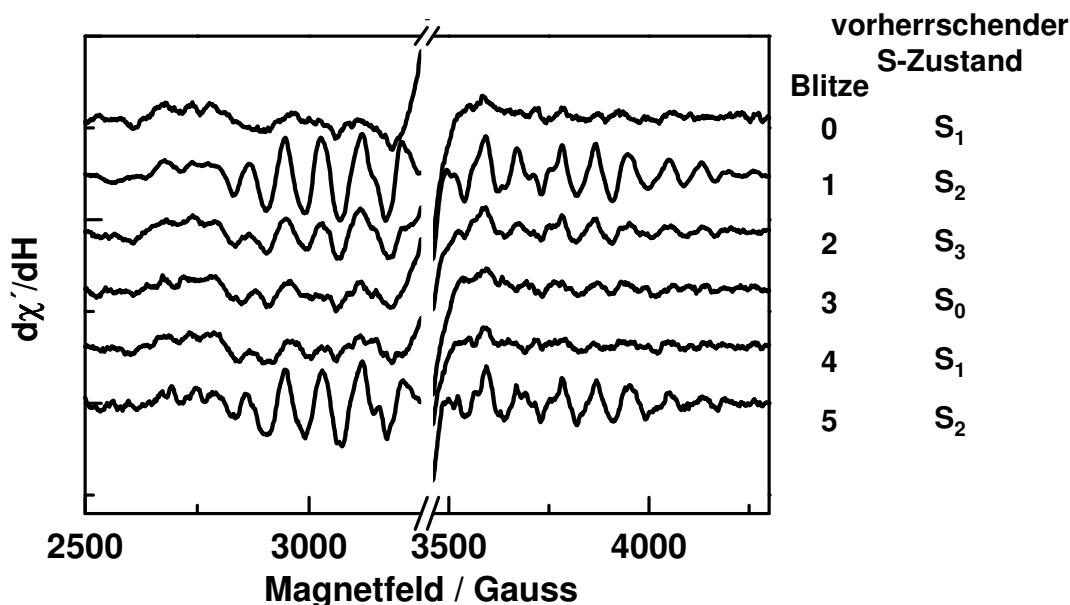


Abbildung 3.5: S_2 -*Multiline* EPR-Signal in Abhängigkeit von der Anzahl an Laserblitzen in partiell orientierten PSII-Proben. Dargestellt ist die aus jeweils fünf Proben gemittelte Intensität für 0 bis 5 Blitze. Zu erkennen ist eine ausgeprägte *Multiline*-Oszillation für Blitz 1 und 5. Messparameter: 8 K, 10 mW Mikrowellenleistung, 9,6 GHz Mikrowellenfrequenz, 20 G Modulationsamplitude, 100 kHz Modulationsfrequenz. PSII-Proben mit 100 μg Chl und 100 nmol PPBQ/(mg Chl).

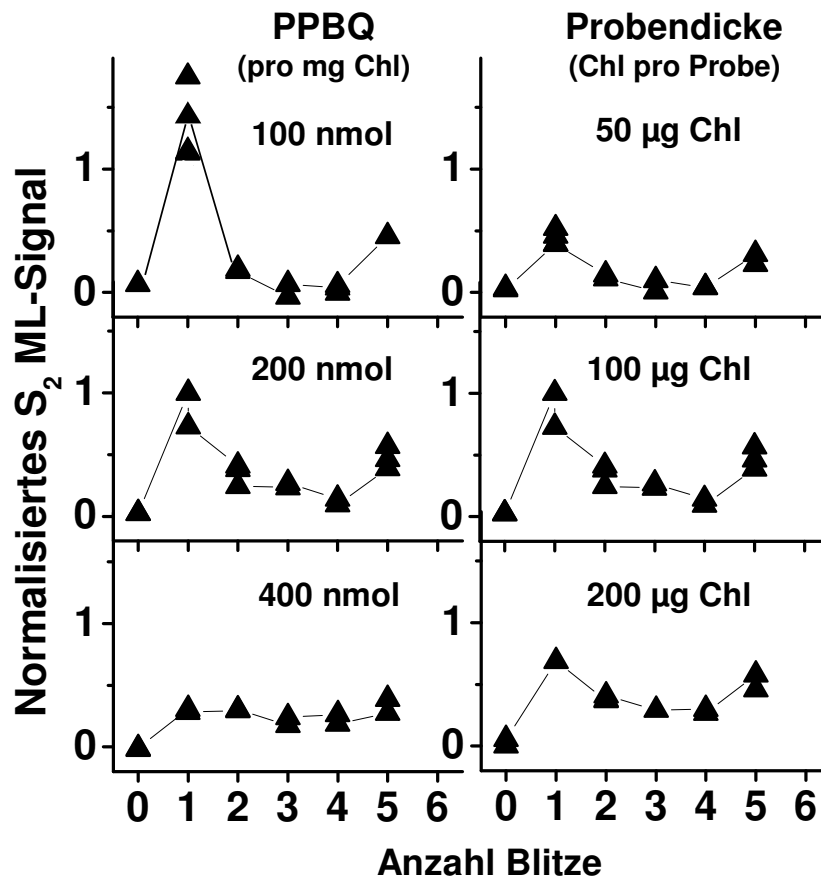


Abbildung 3.6: Quantifizierung des S_2 -Multiline EPR-Signals von partiell orientierten Membranfragment-Proben für verschiedene Versuchsparameter. Abgebildet sind die Amplituden des S_2 -Multiline EPR-Signals nach 0 bis 6 Blitzen bei drei unterschiedlichen Probendicken und drei unterschiedlichen Konzentrationen an PPBQ. Ermittelte Fit-Parameter siehe Tabelle 3.1.

PPBQ-Konzentration nmol/(mg Chl)	Probendicke $\mu\text{g Chl}$	Fit-Parameter	
		<i>Misses</i> %	<i>non-Q_B-Zentren</i> %
100	100	11,2	1,7
200	100	16,9	11,6
400	100	26,7	10,2
200	50	13,1	4,5
200	100	16,9	11,6
200	200	22,5	10,5

Tabelle 3.1: Parameter aus den Simulationen in Abb. 3.6. Die S_2 -Dunkelpopulation wird mit 0 % angenommen.

In Abb. 3.6 ist die Intensität des S_2 -*Multiline* EPR-Signals nach einer Serie von Laserblitzen in den verschiedenen Probentypen gezeigt, die Parameter der Simulationen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Es ergaben sich folgende optimale Parameter für die Einstellung der einzelnen S-Zustände in partiell orientierten PSII-Probren für XAS-Messungen:

- 100 μg Chl pro Probe und
- 100 nmol PPBQ/(mg Chl).

Diese Bedingungen wurden bei die Herstellung von XAS-Probren für Messungen sowohl bei tiefen Temperaturen als auch bei Raumtemperatur verwendet. Zur Kontrolle wurde vor den XAS-Messungen jeweils bei einem repräsentativen Anteil der Probren die S-Zustandspopulation durch EPR-Untersuchungen bestimmt. In Abb. 3.7 ist die Amplitude des S_2 -*Multiline* EPR-Signals nach 0 bis 6 Blitzen von Probren aus drei verschiedenen Ausgangspräparationen dargestellt, in Tabelle 3.2 sind die zugehörigen Verteilungen der S-Zustände angegeben.

Mit den Parametern von 100 μg Chl pro Probe und 100 nmol PPBQ/(mg Chl) für die Herstellung von *Freeze-quench*-Probren können auch die Zustände S_2 , S_3 und S_0 in ausreichendem Umfang eingestellt werden.

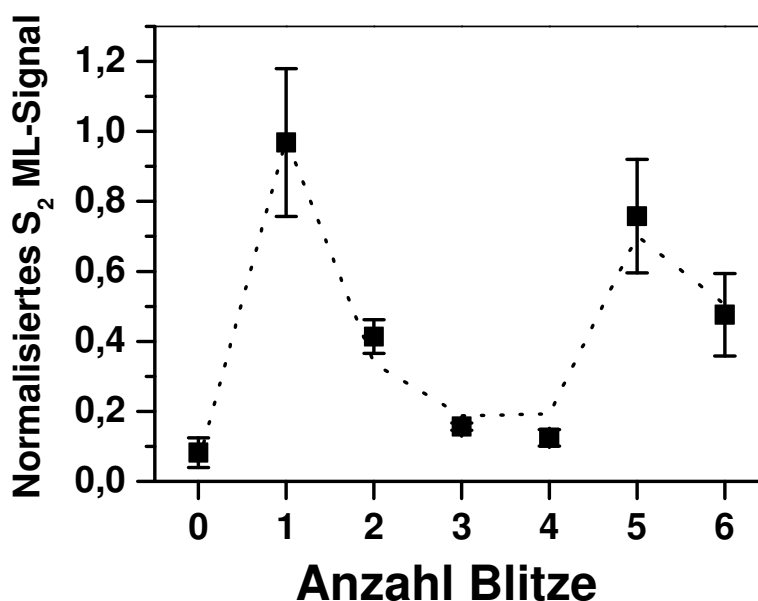


Abbildung 3.7: Quantifizierung des S_2 -*Multiline* EPR-Signals in partiell orientierten PSII-Membranfragment-Probren. Abgebildet ist die Amplitude des *Multiline*-Signals nach 0 bis 6 Blitzen bei Probren mit den optimierten Versuchsparametern von $\sim 100 \mu\text{g}$ Chl pro Probe und 100 nmol PPBQ/(mg Chl). Die Fehlerbalken sind die Standardabweichungen aus Messungen an 8 bis 14 verschiedenen Probren. Die durch Kurvenanpassung bestimmten Parameter sind: *Misses* 10,8 %, *non- Q_B* -Zentren 4,1 %, S_2 -Dunkelpopulation 4,8 %. Gepunktete Linie: Simulation.

	0F	1F	2F	3F
S_0	0	0	0,0328	0,5917
S_1	0,952	0,1028	0,0111	0,0305
S_2	0,048	0,8604	0,2967	0,1654
S_3	0	0,0368	0,6594	0,2124

Tabelle 3.2: S-Zustandpopulation nach 0-3 Blitzen (0F-3F). Eingesetzte Parameter für die Berechnung der S-Zustände: *Misses* 10,8 %, *non- Q_B* -Zentren 4,1 %, S_2 -Dunkelpopulation 4,8 %. Zugrunde liegen die EPR-Messungen an PSII-Proben mit $\sim 100 \mu\text{g}$ Chl pro Probe und 100 nmol PPBQ/(mg Chl).

3.7 Massen-Herstellung von PSII-Proben für XAS-Messungen bei Raumtemperatur

Für eine Synchrotron-Messperiode von einer Woche Dauer wurden für RT-XAS-Untersuchungen bis zu 6000 PSII-Proben benötigt. Es wurden zwei Typen von Proben für XAS-Messungen bei Raumtemperatur eingesetzt: (1) partiell orientierte PSII-Proben (siehe Abschnitt 2.1.2) und (2) *Drop-and-dry*-Proben, die nach der im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Prozedur (siehe nachfolgenden Abschnitt) hergestellt wurden. An Stelle einzelner XAS-Probenträger wurden Streifen aus schwarzem PVC eingesetzt, die einseitig mit Kaptonfolie beklebt waren (Abb. 3.8).

Es waren folgende Verbesserungen und Entwicklungen notwendig: (1) Eine Prozedur zur Massen-Herstellung von PSII-XAS-Proben, die auch direkt an Synchrotron durchgeführt werden konnte. Mit der neuen *Drop-and-dry*-Methode konnten bis zu 900 Proben an einem Tag hergestellt werden. (2) Eine Trocknungsprozedur für die *Drop-and-dry*-Proben. Es konnten damit bis zu 300 Proben gleichzeitig getrocknet werden. (3) Die Anpassung des bereits bestehenden Aufbaus für die Vorbelichtung an den XAS-Probenträger in Streifenform.

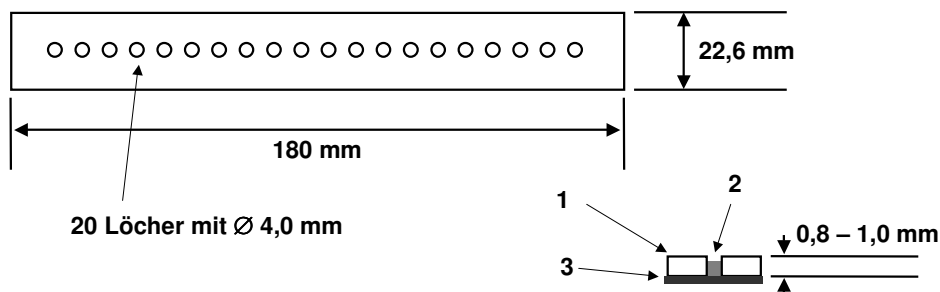


Abbildung 3.8: Schematische Zeichnung eines Streifens aus schwarzem PVC als XAS-Probenträger für PSII-Proben mit Schnitt durch die fertige Probe. In die Bohrungen wurden PSII-Membranfragmente mit der *Drop-and-dry*-Technik für XAS-Messungen bei Raumtemperatur aufgetragen. 1: Probenträger; 2: Schicht aus PSII-Membranfragmenten; 3: Kaptonfolie.

3.7.1 Entwicklung einer Präparationsvorschrift für die Massen-Herstellung von PSII-Proben (*Drop-and-dry-Technik*)

Durch zahlreiche Versuche mit unterschiedlichen Rotoren, Umdrehungsgeschwindigkeiten und Zentrifugationszeiten wurde eine Prozedur entwickelt, die die Herstellung einer hoch konzentrierten PSII-Suspension, die gerade noch pipettiert werden konnte, ermöglichte. Mit dieser Methode konnte eine bestimmte, reproduzierbare Chl-Konzentration eingestellt werden. Bei allen Versuchen lag die Chl-Endkonzentration zwischen 6 und 9 mg Chl/ml.

Als optimale Methode, um reproduzierbar hoch konzentrierte PSII-Suspension auf die XAS-Probenräger aufzutragen, hat sich die Auftragung mit einer Automatikpipette (EDOS 5222, Eppendorf) erwiesen. Tabelle 3.3 zeigt einen Vergleich berechneter und tatsächlicher gemessener Chlorophyllmenge pro Probe sowie die geringen Schwankungen innerhalb einer Versuchsreihe.

Probenkonzentration [mg Chl ml ⁻¹]	5,8	6,6	7,1	7,4
pipettiertes Volumen [μ l]	35	30	28	25
theoretische Probenmenge [mg Chl]	203	197	198	186
tatsächliche Probenmenge [mg Chl]	192 \pm 15	174 \pm 8	178 \pm 13	180 \pm 17

Tabelle 3.3: Bestimmung des Chlorophyllgehalts in PSII-Membranfragment-Proben, pipettiert auf die XAS-Probenräger aus Abb. 3.8. Messungen der Ausgangs-Chl-Konzentrationen nach vorheriger 1:5-Verdünnung in Puffer D. Werte über sechs Präparationen gemittelt.

Für die Trocknung wurden die mit PSII-Suspension gefüllten XAS-Probenräger in einem Exsikkator gestapelt. Um eine große Anzahl dieser „Streifen“ schnell trocknen zu können, wurden Plexiglas-Einsätze passend für die Exsikkatoren gefertigt. Dadurch konnten pro Exsikkator drei Lagen mit jeweils vier bis fünf „Streifen“ gleichzeitig getrocknet werden. Die Trocknungsprozedur wurde durch eine Reihe von Versuchen in Bezug auf die Dauer der Trocknung, das Trocknungsmittel (Orangegel, Phosphor-pentoxid (P₂O₅)) und den Druck im Exsikkator verbessert. Die Proben sollten danach folgende Kriterien erfüllen: (1) möglichst geringer Wassergehalt zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnis bei den XAS-Messungen; (2) möglichste hohe Sauerstoffrate und damit große Anzahl intakter Reaktionszentren. Als optimale Bedingungen wurden ermittelt:

⇒ Trocknung im Exsikkator für drei Stunden bei 4 °C und 250 mbar über P₂O₅ im Dunkeln.

Die Sauerstoffaktivität fiel infolge der Trocknungsprozedur im Mittel von $\sim 1250 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$ auf $\sim 1150 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$ (92 %) ab (Daten aus 12 Versuchen gemittelt). Die geringe Verringerung der Sauerstoffaktivität bei *Drop-and-dry*-Proben ist mit der von partiell orientierten Membranfragment-Proben vergleichbar (siehe Abschnitt 3.4).

Die oben beschriebenen Versuche führten zu einer Präparationsvorschrift, die sowohl für die Herstellung von Proben im Labor als auch vor Ort am Synchrotron geeignet war. Für die Probenherstellung vor Ort wurden hoch konzentrierte PSII-Lösungen in flüssigem Stickstoff eingefroren, zum Synchrotron transportiert, bei Bedarf wieder langsam auf Eis aufgetaut und auf die XAS-Probenräger pipettiert.

3.7.2 Apparatur zur Vorbelichtung von Probenträgern für RT-XAS

Um die Ausbeute an S_1 in den Proben zu maximieren, wurden alle Proben vor der partiellen Trocknung vorbelichtet, siehe Abschnitt 2.4.3. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit der bereits bestehende Aufbau weiterentwickelt (Abb. 3.9). Die Vorbelichtung wurde bei gedämpftem Grünlicht, und wenn möglich im Kühlraum bei 4 °C, durchgeführt.

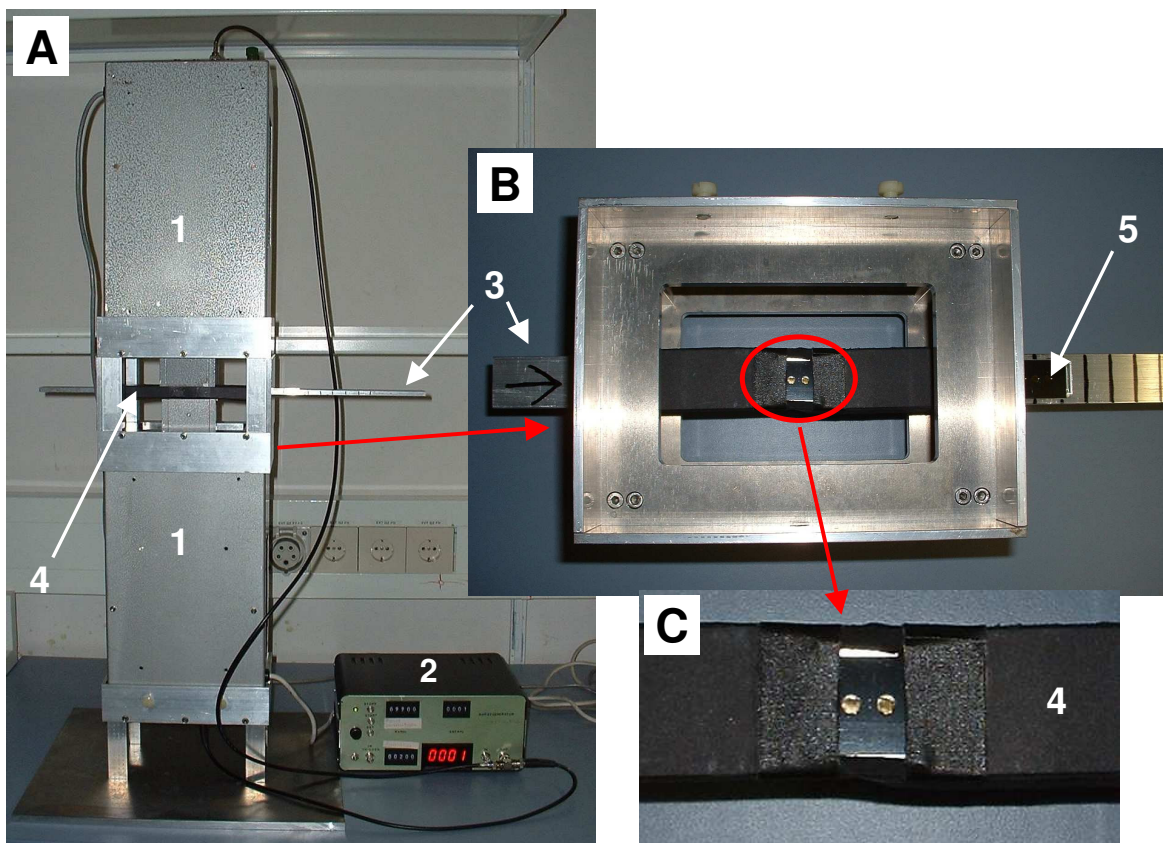


Abbildung 3.9: Apparatur zur Vorbelichtung von PSII-Proben für XAS-Messungen bei Raumtemperatur. Auf die Bedeutung der Vorbelichtung von PSII-Proben zur Maximierung des S_1 -Zustandes wurde bereits in Abschnitt 2.4.3 näher eingegangen. (A) Abbildung des gesamten Aufbaus bestehend aus zwei Xenon-Gasentladungslampen (1) (FX 134, EG&G Electron Optics, Blitzdauer 5 μ s, 410 nm < λ < 750 nm), die über eine Steuerungseinheit (2) geschaltet wurden. In der Mitte befand sich eine Transportschiene (3) für die speziellen XAS-Probenträger bei RT-Messungen (5) (siehe Abb. 3.8, S. 47). Um für gleiche Belichtungsbedingungen auf beiden Seiten zu sorgen, war vor der oberen Lampe eine Schicht aus Kaptonfolie befestigt. (B) Detailaufnahme der Transportschiene von oben; es konnten immer zwei Proben gleichzeitig und von beiden Seiten belichtet werden (rote Markierung). Die restlichen Proben wurden durch eine schwarze Blende (4), die in (C) vergrößert abgebildet ist, abgedeckt um Mehrfachbelichtung zu vermeiden.

3.7.3 *Drop-and-dry*-Vorschrift für die Massen-Herstellung von XAS-Proben für RT-Messungen

Alle Schritte wurden bei grünem, abgedunkeltem Licht und im Kühlraum bei 4 °C oder auf Eis ausgeführt und alle Medien, Geräte und Zentrifugenrotoren wurden vorgekühlt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 2-4 °C in einer Kühlzentrifuge (RC 26 Plus, Rotor SS-34, Sorvall) durchgeführt. Die Zusammensetzungen der einzelnen Puffer sind in Anhang A aufgelistet.

1. **VORREINIGUNG:** PSII-Membranfragmente entsprechend 50 mg Chlorophyll langsam auf Eis auftauen, in einem 100ml-Becherglas vereinigen, mit einem Pinsel homogenisieren und auf etwa 60 ml mit Puffer D auffüllen. Die Lösung auf zwei Zentrifugenröhrchen aufteilen, austarieren und bei 4 °C für 12 Minuten bei 50000 g zentrifugieren. Die Überstände verwerfen und die Pellets in 30 ml Puffer D mit einem Pinsel gründlich resuspendieren.
2. **EINSTELLEN DER KONZENTRATION:** Bestimmung des Volumens und der Gesamtchlorophyllmenge. Zugabe von 30mM-PPBQ-Stammlösung entsprechend 100 nmol PPBQ/(mg Chl). Den Elektronenakzeptor PPBQ zuvor in Ethanol frisch umkristallisieren (Vorschrift in Anhang C). Die Lösung mit Puffer D auf 1 mg Chl/ml verdünnen und gut mischen.
3. **AUFKONZENTRATION:** Die Lösung auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilen, austarieren und bei 4 °C für 12 Minuten bei 5900 g zentrifugieren. Die Überstände verwerfen und die Pellets sehr vorsichtig mit einem breiten Spatel homogenisieren, ohne dass Blasen entstehen. Für die Chl-Bestimmung 40 μ l Suspension in 200 μ l Puffer D vorverdünnen und davon 40 μ l in 10 ml Aceton-Wasser-Gemisch geben. Aus der ermittelten Chl-Konzentration die zu pipettierende Menge pro Probe berechnen (siehe unten). Die Lösung entweder sofort weiter verarbeiten oder für den späteren Bedarf in flüssigem Stickstoff einfrieren.
4. **BEFÜLLUNG DER XAS-PROBENTRÄGER:** PSII-Membranfragmente entsprechend 100 μ g Chlorophyll halbautomatisch mit Hilfe eines elektronischen Dosiersystems (Eppendorf EDOS 5222 mit Combitip 500 μ l, Dosiergenauigkeit $\pm 0,5 \mu$ l) auftragen.
5. Jede Probe einmal beidseitig mit Xenon-Lampen (Abb. 3.9) belichten.
6. **TROCKNUNG:** Die fertig befüllten Probenträger in einem Exsikkator mit P₂O₅ als Trocknungsmittel legen und bei 4 °C und 250 mbar Druck für 3 Stunden in Dunkelheit trocknen. Anschließend in flüssigem Stickstoff lagern.

3.8 Zusammenfassung

1. Es wurden die Präparationsvorschriften für zwei verschiedene Probentypen von PSII-Membranfragmenten in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Dau etabliert und verbessert: (1) Partiiell orientierte *Freeze-quench*-Proben, die durch Laserblitze in den verschiedenen S-Zuständen angereichert werden konnten. (2) Partiiell orientierte *Dichroismus*-Proben für winkelabhängige XAS-Messungen im S₁- und S₂-Zustand bei tiefen Temperaturen.
2. Das Protokoll für die partielle Dehydrierung der Proben unter Erhalt der vollen Sauerstoffaktivität wurde verbessert. Der Vorteil eines niedrigen Wassergehalts ist die Verringerung der Streubeiträge in Röntgenabsorptionsmessungen und eine höhere Metallkonzentration in der Probe im Vergleich zu PSII-Lösungen.
3. Zwei Sorten von partiell orientierten PSII-Membranfragment-Proben (*Freeze-quench*- und *Dichroismus*-Proben) wurden hinsichtlich der Schichtdicke, des Chlorophyllgehalts und der Sauerstoffaktivität charakterisiert. Diese Parameter

sind entscheidend für die Effektivität der Anregung des PSII mit Laserblitzen und die Qualität von XAS-Messungen.

4. Die optimale PSII- und Elektronenakzeptor-Konzentration für die maximale Population der einzelnen S-Zustände durch Laserblitze an partiell orientierten PSII-Proben wurde ermittelt. Aus der Quantifizierung der S_2 -*Multiline* EPR-Signale ergaben sich die folgenden Parameter: 100 μg Chl pro Probe und 100 nmol PPBQ/(mg Chl). Diese Untersuchungen waren sowohl für XAS-Messungen bei tiefen Temperaturen als auch bei Raumtemperatur relevant.
5. XAS-Messungen bei Raumtemperatur bedingen einen enormen Probenbedarf und möglichst schnellen Probenwechsel:
 - \Rightarrow Es wurde eine neue, speziell an RT-Messungen angepasste Vorschrift (*Drop-and-dry*-Technik) für die reproduzierbare Massen-Herstellung von PSII-Proben mit hoher Sauerstoffaktivität entwickelt. Mit dieser Vorschrift können Proben auch direkt vor Ort am Synchrotron präpariert werden.
 - \Rightarrow Entwicklung einer speziellen Prozedur für die schnelle Trocknung von bis zu 300 XAS-Proben gleichzeitig ohne nennenswerten Verlust an Sauerstoffaktivität.

