

Kapitel 5

Herstellung hoch sauerstoffaktiver PSII-Proben mit minimiertem Ca^{2+} -Gehalt ($PSII_{Ca}$ -Proben) für XAS-Messungen an der Calcium-K-Kante

In diesem Abschnitt wird die Entwicklung einer Präparationsvorschrift für die Herstellung hoch sauerstoffaktiver PSII-Membranfragment-Proben mit minimiertem Ca^{2+} -Gehalt beschrieben. Diese speziellen PSII-Proben werden im Folgenden als $PSII_{Ca}$ -Proben bezeichnet. Ziel dieser Ca^{2+} -Minimierung waren XAS-Messungen an der Calcium-K-Kante.

Bei XAS-Messungen an der Ca-K-Kante werden alle Calciumatome einer Probe gleichermaßen „gesehen“, so dass das resultierende Spektrum Anteile von spezifisch und unspezifisch gebundenen Calcium enthält. Für sinnvolle XAS-Messungen von PSII-Proben ist daher ein niedriges Ca/PSII-Verhältnis notwendig. Ideal wäre ein Verhältnis von 1 Ca/PSII, da nur ein Ca^{2+} -Ion am Mn_4Ca -Komplex gebunden ist [Ferreira et al., 2004; Biesiadka et al., 2004; Loll et al., 2005b]. Dies ist nicht möglich, da ein zweites Ca^{2+} -Ion mit höherer Affinität vermutlich am LHCII [Davis und Gross, 1975; Han und Katoh, 1993] oder am CP29 [Shen et al., 1988a,b; Jegerschöld et al., 2000] gebunden ist. Größere Mengen von unspezifischem Calcium, das in gelöster Form vorliegt, würde das XAS-Spektrum dominieren und so die Detektion des essentiellen Calciums im Mn_4Ca -Komplex unmöglich machen. Mit Proben, die jedoch nur ~ 2 Ca/PSII bzw. ~ 2 Ca/4 Mn enthalten, sollten Ca-Mn-Wechselwirkungen im EXAFS-Spektrum detektierbar sein.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ausgehend von PSII-angereicherten Membranfragmenten (siehe Abschnitt 2.1), eine reproduzierbare und schnelle Prozedur zur Herstellung von Proben mit 2 Ca/PSII zu entwickeln. Die Vorschrift sollte PSII-Proben liefern, die (1) minimalen Gehalt an Calcium aufweisen, (2) vier Manganatome pro PSII enthalten, (3) unveränderte Sauerstoffaktivität zeigen und (4) aus PSII-Proteinkomplexen bestehen, die alle drei extrinsischen Polypeptide besitzen.

Neben der Behandlung von PSII-Proben mit hohen Salzkonzentrationen [Boussac und Rutherford, 1988b; Shen und Katoh, 1991; Freeman et al., 2004] oder durch Erniedrigung des pH-Wertes [Ono und Inoue, 1988; Shen und Katoh, 1991; Semin et al., 1998] kann Chelex-100 zur Entfernung zweiwertiger Kationen in PSII-Proben eingesetzt werden. Chelex-100 ist ein Ionenaustauscherharz, das aus einem Styroldivinylbenzol-

Kopolymer mit Methyliminodiacetat-Gruppen an der Oberfläche besteht. Diese Gruppen koordinieren Metallionen über Sauerstoff- und Stickstoffbindungen, vergleichbar mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Chelex-100 unterscheidet sich von anderen Austauschharzen durch seine hohe Selektivität für Metallionen und seine sehr hohen Bindungsstärken (Struktur und Wirkungsweise von Chelex-100 siehe Anhang B). Ausgehend von bekannten Methoden zur Chelexbehandlung von PSII-Membranfragmenten [Kashino et al., 1986; Han und Katoh, 1993; Cinco et al., 2002] wurden die optimalen Werte für pH-Wert, Chelex-zu-Chl-Verhältnis, Inkubationsdauer und Pufferzusammensetzung ermittelt. Vorversuche unter Verwendung originaler Vorschriften aus der Literatur lieferten nicht die gewünschten Ergebnisse, da nur stark in der Sauerstoffaktivität verminderte PSII-Proben mit einem Ca/PSII-Verhältnis nicht besser als 4:1 erhalten wurden (Daten nicht gezeigt).

Ein Hauptproblem bei der Calcium-Verarmung von PSII-Proben waren Ca^{2+} -Kontaminationen von Chemikalien, Utensilien (Pipettenspitzen, Spatel, Pinzetten, Trichter etc.), Gefäßen und Lösungen. Daher mussten bei den Arbeiten im Labor besondere Reinigungsschritte eingeführt werden und alle Chemikalien der höchsten Reinheitsstufe entsprechen. Alle Arbeiten wurden mit Handschuhen durchgeführt. Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen hatten einen stark erhöhten experimentellen Aufwand zur Folge. Schon die Herstellung der calciumfreien Puffer für *PSII_{Ca}*-Proben bedeutete einen nicht unerheblichen präparativen Aufwand (siehe Anhang B). Die Reinigungsschritte während einer Präparation verlängerten deren Dauer und erhöhten damit die Gefahr von Aktivitätsverlusten. Erst durch Routine beim Arbeiten unter diesen besonderen Vorsichtsmaßnahmen gelang es, gute Proben herzustellen.

5.1 Entwicklung der Präparationsvorschrift zur Reduzierung des Calciumgehalts in PSII-Proben

In diesem Abschnitt wird die Entwicklung der Vorschrift zur Herstellung von *PSII_{Ca}*-Proben beschrieben. Es konnte die Entfernung unspezifischer Ca^{2+} -Ionen erreicht werden unter Erhalt von nahezu 4 Mn/PSII und beinahe unveränderter Sauerstoffaktivität. Die Bestimmung des Ca/PSII- und Mn/PSII-Gehalts erfolgte durch AAS (siehe Abschnitt 2.3), die Messungen der Sauerstoffaktivität wurde nach der in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Prozedur durchgeführt. Als Ionenaustauscher wurde Chelex-100 von Merck (p.a., Natriumform) eingesetzt.

Jedes Experiment wurde 4- bis 6-mal wiederholt, wobei zum Teil unterschiedliche Ausgangspräparationen von PSII-Membranfragmenten eingesetzt wurden. Die jeweiligen Streuungen der Messergebnisse geben die Standardabweichungen der Mittelwerte der einzelnen Versuchsreihen an. Alle Sauerstoffaktivitäten wurden mit vierfacher Wiederholung bestimmt. Für die Bestimmung des Calcium- und Mangan Gehalts wurde als Bezugsgröße 230 Chl-Moleküle pro PSII angenommen.

5.1.1 Einfluss des pH-Wertes auf das Ca-zu-Mn-Verhältnis

Die Bindungsaffinität von Ca^{2+} am Mn_4Ca -Komplex ist pH-abhängig [Ono und Inoue, 1988; Semin et al., 1998]. Es wurden daher Chelexbehandlungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bei pH-Werten kleiner als 5,5 bereits

nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten die Rate der Sauerstoffentwicklung stark verringert wurde (auf 25 % der Ausgangsaktivität). Bei pH-Werten zwischen 5,5 und 6,0 zeigten die PSII-Proben dagegen nahezu 100 % Sauerstoffaktivität. Allerdings enthielten solche Proben 5-7 Ca^{2+} pro PSII. Bei pH 6,5 wurde die maximale Rate der Sauerstoffbildung und $4,1 \pm 0,4$ Mn/PSII erhalten. Der Calciumgehalt war zudem deutlich auf $2,8 \pm 1,2$ Ca/PSII verringert. In Tabelle 5.1 sind die Ergebnisse zum Einfluss des pH-Wertes auf die Minimierung des Ca^{2+} -Gehalts zusammengefasst.

⇒ Alle nachfolgenden Versuche zur Calcium-Reduzierung wurden bei pH 6,5 durchgeführt.

CA1	Dauer der Behandlung mit Chelex-100	O_2 -Entwicklung	Mn/PSII	Ca/PSII
pH	min	$\mu\text{mol O}_2 \cdot$ $(\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$	n/n	n/n
4,5	30	285	-	-
5,0	30	280	-	-
5,5	30	1070	$4,2 \pm 0,5$	$5,2 \pm 1,7$
6,0	30	1080	-	-
6,5	30	1020	$4,2 \pm 0,3$	$2,6 \pm 1,1$
	60	1050	$3,9 \pm 0,4$	$3,0 \pm 1,3$

Tabelle 5.1: Einfluss des pH-Wertes auf den Ca- und Mn-Gehalt und die Rate der Sauerstoffbildung bei der Behandlung von PSII-Membranfragmenten mit Chelex-100 (Inkubation in Puffer CA1 bei verschiedenen pH-Werten, weitere Versuchsbedingungen siehe Abschnitt 5.2).

5.1.2 Einfluss von Glycinbetain auf die Ca^{2+} -Minimierung

Glycinbetain wirkt stabilisierend auf die Bindung der extrinsischen Polypeptide [Papa-georgiou und Murata, 1995; Lee et al., 1997] und verringert die Denaturierung durch Wärme [Mohanty et al., 1993; Allakhverdiev et al., 1996]. Glycinbetain wird daher als stabilisierende Substanz bei Präparationen von PSII-Membranfragmenten eingesetzt [Murata et al., 1992; Schiller und Dau, 2000]. Die feste Bindung der extrinsischen Polypeptide könnte jedoch die Calcium-Verarmung erschweren, da ein Zusammenhang zwischen den extrinsischen Polypeptiden und der Bindungsaffinität des Ca^{2+} -Ions am Mn_4Ca -Komplex besteht [Ghanotakis et al., 1984, 1985b]. Es wurde daher der Einfluss von Glycinbetain bei der Minimierung des Calciumgehalts in PSII-Membranfragmenten untersucht. Bei Experimenten ohne Glycinbetain im Reaktionspuffer CA2 zeigte sich, dass die Rate der Sauerstoffbildung in den PSII-Proben schon nach kurzer Inkubationszeit (15 Minuten) um die Hälfte verringert war. Mit 0,5 M Glycinbetain im Puffer wurde dagegen keine Verminderung beobachtet (Tabelle 5.2).

⇒ Alle weiteren Versuche wurden daher im Puffer CA2 mit 0,5 M Glycinbetain durchgeführt.

Dauer der Behandlung mit Chelex-100	CA1 mit Glycinbetain		CA1 ohne Glycinbetain	
	O ₂ -Entwicklung	Mn/PSII	O ₂ -Entwicklung	Mn/PSII
min	$\mu\text{mol O}_2 \cdot$ $(\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$	n/n	$\mu\text{mol O}_2 \cdot$ $(\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$	n/n
0	1100	$3,8 \pm 0,4$	880	$4,1 \pm 0,3$
15	1100	$3,6 \pm 0,3$	470	$3,8 \pm 0,5$
30	1070	$3,6 \pm 0,3$	340	$2,8 \pm 0,5$

Tabelle 5.2: Einfluss von Glycinbetain im Reaktionspuffer auf die Rate der Sauerstoffbildung bei der Behandlung von PSII-Membranfragmenten mit Chelex-100 (Inkubation in Puffer CA1 mit und ohne 0,5 M Glycinbetain bei pH 6,5, weitere Versuchsbedingungen siehe Abschnitt 5.2).

5.1.3 Anpassung des Chelex-zu-Chl-Verhältnisses

Es wurden Experimente an PSII-Membranfragmenten mit unterschiedlichen Chelex-zu-Chlorophyll-Verhältnissen durchgeführt. Nach der Behandlung mit 1 g Chelex-100/(mg Chl) wurden im Mittel ~ 6 Ca/PSII bestimmt, mit einer Konzentration von 1,5 g/(mg Chl) konnte das Verhältnis auf <3 Ca/PSII vermindert werden. Eine Erhöhung der Inkubationszeit auf 90 Minuten verbesserte das Ergebnis nicht weiter (Tabelle 5.3). Eine Erhöhung auf 3,0 g Chelex-100/(mg Chl) in Kombination mit niedrigerem pH-Wert und/oder längerer Inkubationszeit brachten keine Verbesserung bei den Ca/PSII-Werten und hatte zusätzlich eine Reduzierung der Sauerstoffaktivität zur Folge (Daten nicht gezeigt).

⇒ Alle nachfolgenden Versuche zur Calcium-Reduzierung wurden mit 1,5 g Chelex-100/(mg Chl) durchgeführt.

Chelex-Konzentration	Dauer der Behandlung mit Chelex-100	O ₂ -Entwicklung	Mn/PSII	Ca/PSII
$\text{g} \cdot (\text{mg Chl})^{-1}$	min	$\mu\text{mol O}_2 \cdot$ $(\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$	n/n	n/n
1,0	60	870	$4,1 \pm 0,3$	$5,4 \pm 1,1$
	90	800	$4,0 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,7$
1,5	60	1040	$3,7 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,8$
	90	810	$3,8 \pm 0,2$	$2,9 \pm 1,2$

Tabelle 5.3: Einfluss der Konzentration von Chelex-100 auf die Reduzierung des Calciumgehalts (Inkubation in Puffer CA1 bei zwei verschiedenen Chelex-zu-Chlorophyll-Verhältnissen, weitere Versuchsbedingungen siehe Abschnitt 5.2).

5.1.4 Ergebnis

Die minimal erreichte Calciumkonzentration unter Erhalt nahezu voller Sauerstoffaktivität betrug $2,6 \pm 0,8$ Ca/PSII. Damit wurde das angestrebte Ziel von ≤ 2 Ca/PSII scheinbar nicht erreicht. Wird jedoch eine Kontamination von ~ 30 % während der Probenherstellung für die AAS-Messungen berücksichtigt, liegt der tatsächliche Ca/PSII-Wert im Mittel unter zwei. In Abschnitt 5.3.4 und in der abschließenden Diskussion wird auf die Problematik der Kontaminationen und die daraus resultierende „Überbestimmung“ der Ca^{2+} -Gehalte näher eingegangen.

5.2 Präparationsvorschrift für $PSII_{Ca}$ -Proben

1. MASSNAHMEN ZUR VERMEIDUNG VON CALCIUM-KONTAMINATIONEN: Nur Utensilien (Becher, Flaschen, Pinzetten etc.) aus Kunststoff verwenden. Außerdem alle Gefäße und Utensilien mit Reinstwasser und 0,2 % HNO_3 (HNO_3 : Reinstwasser (w/w)) vorspülen, wenn möglich bis zum Gebrauch darin lagern. Alle eingesetzten Chemikalien (höchste Reinheitsstufe, z.B. Suprapur[®] von Merck) zusätzlich mit Chelex-100 zur Entfernung restlicher Calcium-Kontaminationen vorbehandeln (Vorschrift siehe Anhang B). Generell nur frisch hergestelltes Reinstwasser verwenden. Den Calciumgehalt von allen Lösungen (Puffer, 0,2 % HNO_3 , Reinstwasser) mit AAS-Messungen routinemäßig kontrollieren (Sollwert $< 0,1 \mu g$ Ca/l). Bei allen Versuchen jeweils frisches Chelex-100 einsetzen, sowohl bei der Herstellung von Puffern als auch bei der Probenbehandlung. Bei allen Versuchen mit Handschuhen arbeiten.
2. REDUZIERUNG DES CALCIUMGEHALTS
 - (a) ALLGEMEINE VORBEREITUNGEN: Vom eingesetzten Reinstwasser und allen verwendeten Lösungen jeweils ein Aliquot für die Kontaminationskontrollen entnehmen. Puffer, wie in Anhang B beschrieben, behandeln. Alle weiteren Arbeiten bei gedämpften Grünlicht und auf Eis durchführen. Alle Zentrifugationsschritte bei 2-4 °C in einer Kühlzentrifuge (RC 26 Plus, Rotor SS-34, Sorvall) durchführen.
 - (b) VORBEREITUNG ZUR CHELEXBEHANDLUNG: Spezielle Präparationen an PSII-Membranfragmenten einsetzen, die im letzten Reinigungsschritt mit Puffer CA1 an Stelle von Puffer D gewaschen wurden (siehe Abschnitt 2.1.1). Von diesen Membranfragmenten eine Menge entsprechend ca. 40 mg Chl langsam (1-2 Stunden) im Dunkeln auf Eis auftauen lassen. Mit Puffer CA2 verdünnen und 12 Minuten bei 50000 g zentrifugieren. Mit einem Pinsel in ca. 20 ml Puffer CA2 gründlich resuspendieren. Chlorophyllkonzentration bestimmen (siehe Abschnitt 2.2.1) und Kontrollproben für AAS- und Sauerstoffmessung entnehmen. In braune 125ml-HDPE-Weithalsflasche 60 g Chelex-100 einwiegen. Mit 60 ml Puffer CA2 auffüllen und pH-Wert auf 6,5 einstellen.
 - (c) CHELEXBEHANDLUNG: PSII-Lösung entsprechend 40 mg Chl in die HDPE-Weithalsflasche geben und mit Puffer CA2 auf insgesamt 80 ml Flüssigkeit auffüllen $\Rightarrow 1,5$ g Chelex-100/(mg Chl) und 0,5 mg Chl/(ml Puffer). Im

Dunkeln und kühl (2-4 °C) auf einem Schüttler (Multi 3D-Shaker, Kisker) für 60 Minuten schütteln.

- (d) NACHBEHANDLUNG: Fertige Lösung über, mit 0,2 % HNO_3 und Puffer CA2 gespültem, Filterpapier (Schleicher&Schuell, Gelbband, Ø70 mm) bei leichtem Wasserstrahlvakuum absaugen. Zum Aufkonzentrieren die Lösung 12 Minuten bei 50000 g zentrifugieren.

3. HERSTELLUNG PARTIELL ORIENTIERTER $PSII_{Ca}$ -MEMBRANFRAGMENT-PROBEN

- (a) Durchführung wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben.
- (b) TROCKNUNG: Proben in einen mit Orangegel befüllten Exsikkator bei 250 mbar im Dunkeln bei 4 °C eine Stunde trocknen lassen. Die partiell getrockneten $PSII_{Ca}$ -Proben in flüssigem Stickstoff lagern.

5.3 Eigenschaften von $PSII_{Ca}$ -Proben

Im Folgendem sind zusammenfassend die Ergebnisse der Charakterisierung der $PSII_{Ca}$ -Proben dargestellt, die nach der in 5.2 beschriebene Vorschrift hergestellt wurden.

5.3.1 Bestimmung der Polypeptidzusammensetzung

Bei $PSII$ -Membranfragmenten können sowohl Änderungen im pH-Wert [Shen und Inoue, 1991] als auch Prozeduren zum Entfernen von Calcium [MacLachlan et al., 1994a; Vander Meulen et al., 2002] zu einem Verlust der extrinsischen Polypeptide führen. Diese Polypeptide stabilisieren die katalytische Konformation des Mn_4Ca -Komplexes [Seidler, 1996], Es wurde daher in den $PSII_{Ca}$ -Proben die Anwesenheit der extrinsischen Polypeptide mit SDS-Gelelektrophorese überprüft. Die hier verwendete Vorschrift (siehe Abschnitt 2.2.3 und Anhang A) wurde in Hinblick auf die Trennschärfe der drei extrinsischen Polypeptide 17kDa, 23kDa und 33kDa optimiert [Barra et al., 2005].

Die in Abb. 5.1 dargestellten SDS-Gele zeigen $PSII_{Ca}$ -Proben aus vier verschiedenen Präparationen. Die Proben zeigten nach der Chelexbehandlung eine Aktivität von durchschnittlich $930 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$ (≈ 93 % der Ausgangsaktivität) und ein mittleres Verhältnis von 2,9 Ca/ $PSII$. Ein Verlust von extrinsischen Polypeptiden war nicht zu beobachten. Die in dieser Arbeit entwickelte Prozedur zur Minimierung des Calciumgehalts in $PSII$ -Membranfragmenten verändert also die Proteinzusammensetzung nicht.

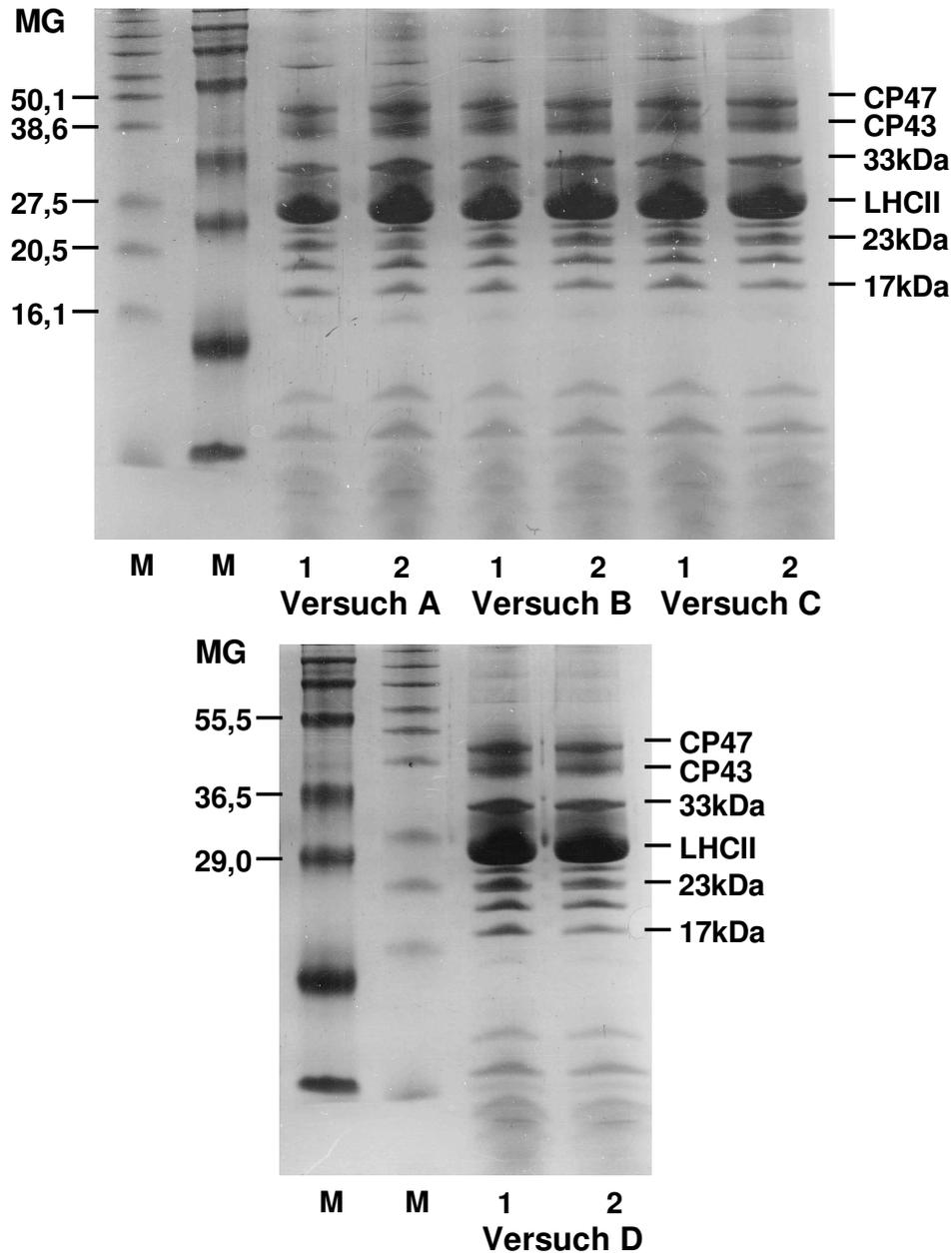


Abbildung 5.1: SDS-Gele von PSII-Membranfragmenten, die mit Chelex-100 zur Minimierung des Ca^{2+} -Gehalts behandelt wurden. (1): Proben vor der Behandlung mit Chelex-100, d.h. aufgetaute PSII-Membranfragmente nach dem Reinigungs-Zentrifugationsschritt; (2): Proben nach der Behandlung mit Chelex-100. Die Positionen der Banden beider Marker (M) sowie die der Präparationen und die korrespondierenden Molekulargewichte (MG [kDa]) sind eingezeichnet. Es wurden vier Versuche mit unterschiedlichen PSII-Ausgangspräparationen durchgeführt.

5.3.2 Aktivitätsbestimmung

Zur Quantifizierung der Aktivität der mit Chelex-100 behandelten PSII-Präparationen wurde die Sauerstoffentwicklung, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, gemessen. Es wurde eine Reihe von Tests mit zwei unterschiedlichen Puffern durchgeführt, um den Einfluss von zweiwertigen Kationen und Glycinbetain auf die Proben zu untersuchen. Die Puffer setzten sich zusammen aus (1) 1 M Glycinbetain, 25 mM MES, 15 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 („mit Ca^{2+} “) und (2) 1 M Glycinbetain, 25 mM MES, 15 mM NaCl („ohne Ca^{2+} “). Der pH-Wert wurde bei beiden Puffern auf 6,3 eingestellt. Es konnte kein Unterschied in der Rate der Sauerstoffbildung im Rahmen der Messgenauigkeit

festgestellt werden (Abb. 5.2). Daraus lässt sich schließen, dass das für die Wasserspaltung essentielle Calciumion noch in dem PSII-Proteinkomplexen enthalten war und die $PSII_{Ca}$ -Proben keinen erhöhten Bedarf an externem Calcium hatten.

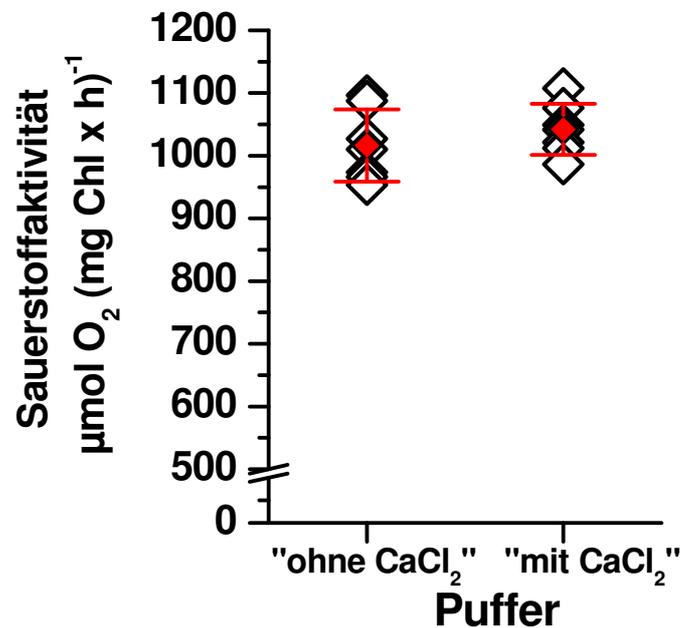


Abbildung 5.2: Sauerstoffentwicklung von $PSII_{Ca}$ -Proben in unterschiedlichen Puffern. Die Sauerstoffaktivität von 7 Präparationen wurde in Puffer mit und ohne $CaCl_2$ bestimmt. Alle anderen Bedingungen sind wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben. Mittlerer Calciumgehalt der Proben: $2,8 \pm 1,6$ Ca/(230 Chl) (Fehlerbalken: Standardabweichung).

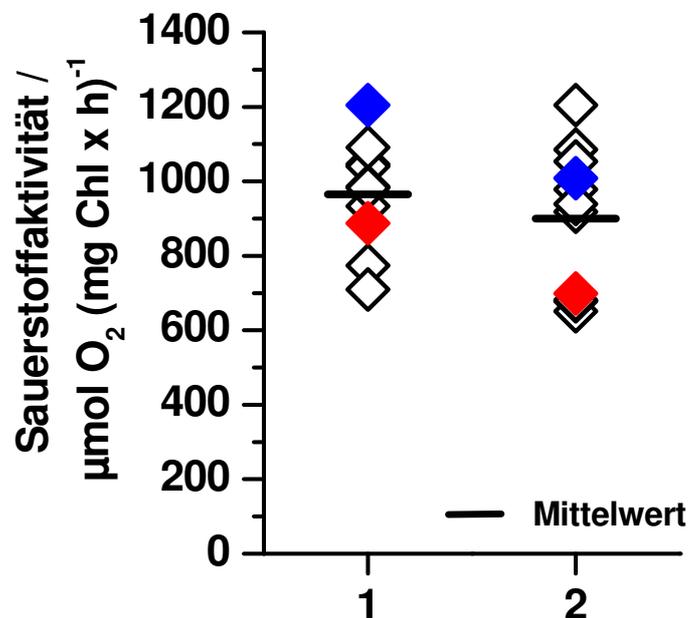


Abbildung 5.3: Sauerstoffaktivität von $PSII_{Ca}$ -Proben, hergestellt nach der Vorschrift in Abschnitt 5.2. (1) vor der Behandlung mit Chelex-100, d.h. die Messungen wurden nach dem Reinigungsschritt der aufgetauten PSII-Proben vorgenommen. (2) nach der Behandlung mit Chelex-100, d.h. als Endprobe wurde die Lösung, die anschließend auf die XAS-Probenträger aufgetragen wurde, verwendet. Balken: Mittelwert aus 12 Präparationen. Zur Veranschaulichung sind zwei Präparationen farblich markiert.

Abbildung 5.3 zeigt die Sauerstoffaktivität von 12 $PSII_{Ca}$ -Präparationen. Vor der Chelexbehandlung lag die Aktivität im Mittel bei

$965 \pm 145 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$. Nach der Behandlung wurde eine mittlere Aktivität von $900 \pm 190 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$ bestimmt. Die Streubreite der Messwerte war durch die unterschiedlichen Aktivitäten der Ausgangspräparationen bedingt. Im Mittel war die Sauerstoffaktivität nach Chelex-Behandlung nur um $\sim 10\%$ verringert. Im Vergleich dazu wird bei [Cinco et al., 2002], der einzigen weiteren Veröffentlichung über Ca-XAS-Messungen an PSII-Proben, ein Aktivitätsverlust von bis zu 15% angegeben. Zusätzlich ist in diesen Proben bereits die Ausgangsaktivität mit $300\text{-}400 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$ sehr viel geringer als in den PSII-Proben dieser Arbeit.

5.3.3 Mangangehalt

Die Anzahl der Manganatome pro PSII vor und nach der Calcium-Verarmung wurde in 23 Präparationen bestimmt (Abb. 5.4). Vor der Chelexbehandlung lag der Mangangehalt im Mittel bei $4,0 \pm 0,4 \text{ Mn}/(230 \text{ Chl})$. Nach der Behandlung mit Chelex-100 nahm das Verhältnis leicht auf $3,7 \pm 0,3 \text{ Mn}/\text{PSII}$ ab. Damit hatten höchstens 8% der Reaktionszentren ein Manganatom und damit ihre Sauerstoffaktivität verloren, in guter Übereinstimmung mit den Sauerstoffmessungen. Es zeigte sich, dass nur ein sehr geringer Anteil an freien Mn^{2+} -Ionen am Ionenaustauscher gebunden wurde und intakte Mn_4Ca -Komplexe von der Chelexbehandlung unbeeinflusst blieben.

Es wurde zusätzlich die Reproduzierbarkeit der AAS-Probenherstellung abgeschätzt. Dazu wurden bei fünf Präparationen jeweils drei AAS-Proben parallel hergestellt und gemessen. Der Mittelwert aller 15 Standardabweichungen der Mn/PSII -Werte (5×3 Proben, jeweils mit dreifacher Wiederholung gemessen) lag bei $3,3\%$. Die Reproduzierbarkeit der Mn-Bestimmung ist damit sehr gut.

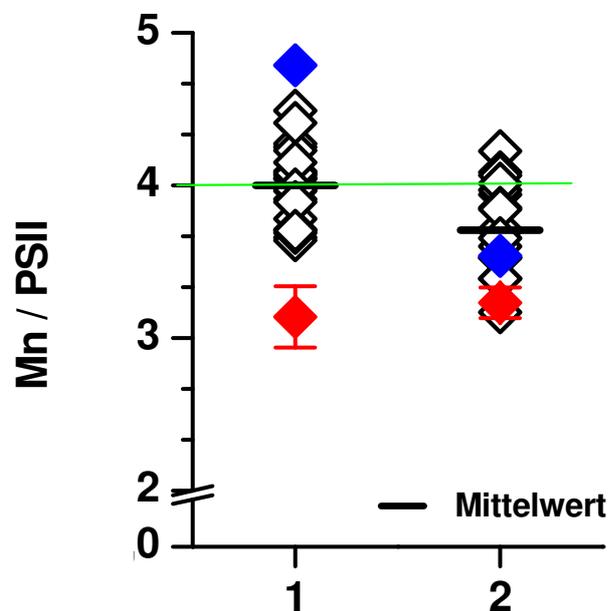


Abbildung 5.4: Mangangehalt von $PSII_{Ca}$ -Proben, hergestellt nach der Vorschrift in Abschnitt 5.2. (1) vor der Behandlung mit Chelex-100, d.h. der Startwert wurde nach dem Reinigungsschritt der aufgetauten PSII-Proben entnommen. (2) nach der Behandlung mit Chelex-100, d.h. als Endprobe wurde die Lösung, die auf die XAS-Proben-träger aufgetragen wurde, verwendet. Es wurden 230 Chlorophyll-Moleküle pro PSII-Reaktionszentrum angenommen. Der Mittelwert ergibt sich aus 23 Präparationen. Als Vergleich zur Streuung aller Präparationen ist die Standardabweichung einer einzelnen Messung (rot) eingetragen. Zur Veranschaulichung sind insgesamt zwei Präparationen farblich markiert.

5.3.4 Calciumgehalt

Das Ca/PSII-Verhältnis vor und nach der Chelex-Behandlung wurde in 18 Präparationen bestimmt (Abb. 5.5). Vor Beginn der Behandlung enthielten die PSII-Proben im Mittel 80 ± 30 Ca/PSII. Nach der Behandlung mit Chelex-100 sank die Anzahl auf $3,6 \pm 1,3$ Ca/PSII ab. Es wurde bei etwa der Hälfte der Versuche das angestrebte Verhältnis von 2 Ca/PSII erreicht. Die sehr große Streuung vor der Calcium-Verarmung lag an den unterschiedlichen Ausgangspräparationen, die Reste von Puffer mit Calcium enthalten konnten.

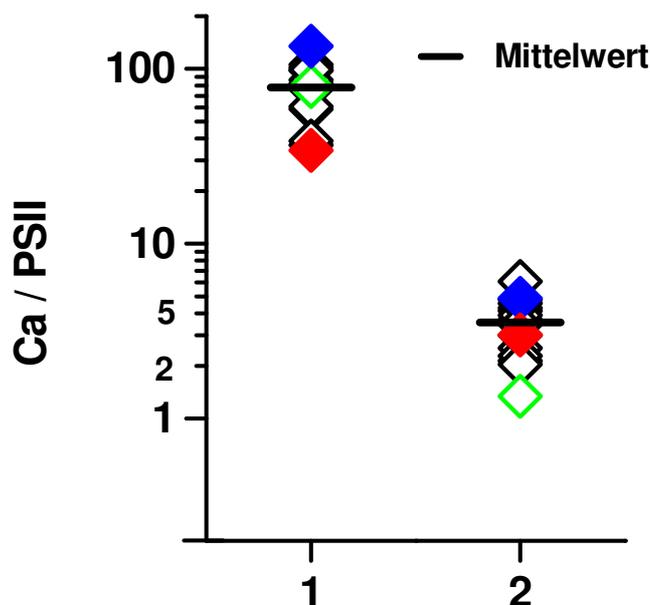


Abbildung 5.5: Calciumgehalt von $PSII_{Ca}$ -Proben, hergestellt nach der Vorschrift in Abschnitt 5.2. (1) vor der Behandlung mit Chelex-100, d.h. der Startwert wurde nach dem Reinigungsschritt der aufgetauten PSII-Proben entnommen. (2) nach der Behandlung mit Chelex-100, d.h. als Endprobe wurde die Lösung, die auf die XAS-Proben-träger aufgetragen wurde, verwendet. Es wurden 230 Chlorophyll-Moleküle pro PSII-Reaktionszentrum angenommen. Der Mittelwert ergibt sich aus 18 Versuchen. Zur Veranschaulichung sind drei Versuche farblich markiert.

An fünf Präparationen wurde die Reproduzierbarkeit der Probenherstellung getestet, indem jeweils pro Präparation drei gleiche AAS-Proben hergestellt und vermessen wurden. Der Mittelwert aller Standardabweichungen der insgesamt 15 Proben lag hierbei bei $\sim 19\%$ und war damit deutlich höher als bei der Mn-Bestimmung.

Zusätzlich wurden vier fertige $PSII_{Ca}$ -AAS-Proben bei jeweils vier verschiedenen Verdünnungen (hergestellt mit zuvor kontrolliertem Reinstwasser) gemessen (Abb. 5.6). Die Standardabweichung bei den insgesamt 16 Verdünnungen lag im Mittel bei $\sim 14\%$.

Korrektur des Calcium-Gehalts

Die obigen Ergebnisse erklären nicht die ermittelte Streuung der Ca/PSII-Werte von $\sim 30\%$ in den $PSII_{Ca}$ -Proben. Die Aufnahmekapazität des Ionenaustauschers wurde bei allen Versuchen um Größenordnungen unterschritten. Ebenso kann eine Wiederfreisetzung von Calcium während der Trennung der PSII-Lösung vom Ionenaustauscher Chelex-100 ausgeschlossen werden, da dann die Calciumwerte sehr viel höher gewesen wären.

Auf der Suche nach möglichen Kontaminationsquellen wurden an drei verschiedenen Tagen jeweils sechs AAS-Proben hergestellt, die nur $80 \mu\text{l}$ Puffer CA3 und kein

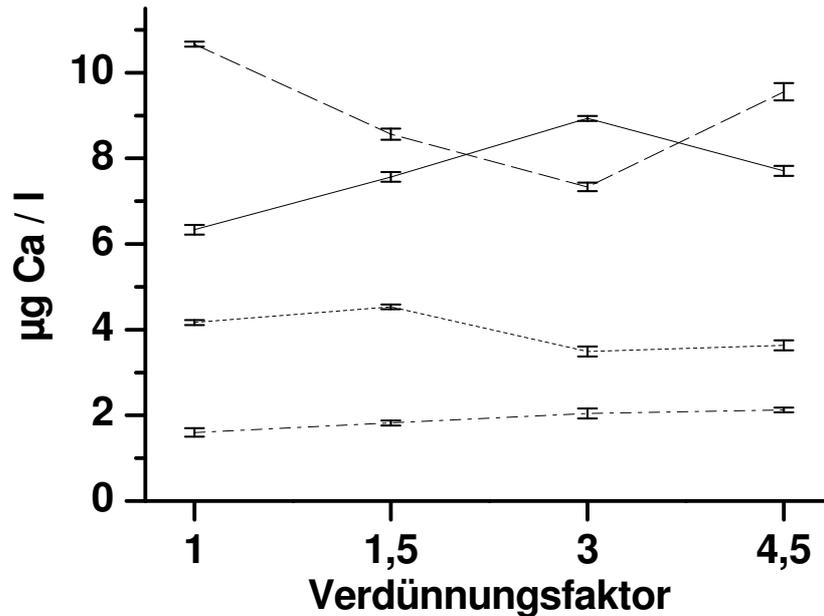


Abbildung 5.6: Verdünnungsreihen bei Ca-AAS-Messungen an $PSII_{Ca}$ -Proben. Für die Reproduzierbarkeit wurden von vier Präparationen jeweils vier verschiedene Verdünnungen angesetzt und die Calciumgehalte bestimmt (Fehlerbalken: Standardabweichung).

$PSII_{Ca}$ enthielten. Es wurde in diesen Proben eine Konzentration von $1,7 \pm 0,6 \mu\text{g Ca/l}$ bestimmt, obwohl alle zuvor getesteten Reinigungsschritte eingehalten wurden. Werden diese Sicherheitsvorkehrungen jedoch nicht beachtet, so kann die Kontamination bis auf $\geq 20 \mu\text{g Ca/l}$ ansteigen (Beispiele siehe Tabelle 5.4). Das Kontaminationsniveau lag also bei $\sim 30\%$ alleine durch die Herstellung von Proben für die AAS. Wird dieser Wert von dem oben angegebenen Verhältnis von $3,6 \text{ Ca/PSII}$ subtrahiert, so kann auf $\sim 2 \text{ Ca/PSII}$ in den XAS-Proben korrigiert werden.

$\mu\text{g Ca/l}$	Proben
7,80	Reinstwasser aus dem Vorratsbehälter + unbehandeltes Reaktionsgefäß
0,15	frisches Reinstwasser + in 0,2% HNO_3 gelagertes Reaktionsgefäß
23,13	unbehandelte Pipettenspitze, Reaktionsgefäß, Spatel, Becher
0,05	alle Utensilien mit 0,2% HNO_3 behandelt
1,51	Puffer CA1 vor Chelexbehandlung
0,04	Puffer CA1 nach Chelexbehandlung

Tabelle 5.4: Beispiele für die Wirksamkeit der Vorsichtsmaßnahmen zur Minimierung der Calcium-Kontaminationen.

5.4 Zusammenfassung

- Durch die Entwicklung einer Vorschrift zur Reduzierung des Ca^{2+} -Gehalts in PSII-Membranfragmenten konnten Proben mit $\sim 3,6 \text{ Ca/PSII}$ bei nahezu unveränderter Sauerstoffaktivität (Verringerung der Sauerstoffaktivität von $\sim 960 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$ auf $\sim 900 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$) herge-

stellt werden. Im Vergleich dazu wird in der einzigen weiteren Veröffentlichung über Ca-XAS-Messungen an PSII-Proben nur eine Aktivität von $\sim 340 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$ angegeben [Cinco et al., 2002]. Die Polypeptidzusammensetzung in diesen PSII-Proteinkomplexen blieb nachweislich unverändert.

- Die Reproduzierbarkeit der Mangangehalte und der Sauerstoffaktivitäten war sehr hoch. Die dabei beobachteten Streuungen sind vorrangig auf die unterschiedlich aktiven Ausgangspräparationen zurückzuführen. Die Calciumgehalte können nur mit einer deutlich geringeren Genauigkeit bestimmt werden.
- Calcium-Kontaminationen stellten ein großes Problem dar. Bei den eingesetzten Lösungen und Puffern konnte durch AAS-Messungen zwar eine Calcium-Kontamination ausgeschlossen werden. Die in Abschnitt 5.2 aufgelisteten Vorsichtsmaßnahmen mussten aber unbedingt beachten werden, um die Ca^{2+} -Kontaminationen zu minimieren. Trotzdem zeigten Kontrollmessungen von AAS-Proben ohne $PSII_{Ca}$ einen gleichbleibenden Kontaminationslevel von $\sim 30\%$ bezogen auf die „normalen“ Ca-AAS-Werte (Abschnitt 5.3.4. Diese Kontaminationen entstanden wahrscheinlich durch das Einwirken von hoch konzentrierter Säure ($65\% \text{HNO}_3$) auf die Probengefäße.

⇒ Das Verhältnis von $\sim 3,6$ Ca/PSII direkt aus den AAS-Messungen kann auf reale ~ 2 Ca/PSII korrigiert werden.

- Andere mögliche Prozeduren zur Herstellung von AAS-Proben aus PSII-Membranfragmenten sind mit sehr viel größeren Probenmengen und/oder mehreren Reaktionsschritten verbunden, wodurch keine Verbesserung des Kontaminationsniveaus erreicht wird. Durch die Auswahl anderer Probengefäße würden sich die Kontaminationen ebenfalls nicht verringern, da auch aus anderen Materialien als Polypropylen durch konzentrierte HNO_3 Calcium heraus gelöst wird.

⇒ Die in dieser Arbeit angeführte Vorbehandlung der Probengefäße ist die einzige Möglichkeit, die Calcium-Kontamination bei der Herstellung der AAS-Proben auf ein tolerierbares Maß zu senken.

⇒ Es bestanden während dieser Arbeit zur Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie keine Alternativen zur quantitativen Analyse des Ca^{2+} -Gehalts. Denn bei Ca-Bestimmungen durch Induktiv-gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) wurden zu große Probenmengen benötigt (≥ 5 mg Chl) und Röntgenfluoreszenzanalysen (RFA) bei der Vielzahl der Proben waren nicht möglich.

- Nicht in allen mit Chelex-100 behandelten Proben konnte das angestrebte Calcium-zu-PSII-Verhältnis von 2:1 erreicht werden. Es war daher unbedingt notwendig, dass jede $PSII_{Ca}$ -Proben vor den XAS-Experimenten mit Hilfe von AAS charakterisiert wurde.

⇒ Für die XAS-Messungen an der Calcium-K-Kante wurden nur PSII-Membranfragment-Proben mit einem Ca:PSII-Verhältnis von $\sim 2:1$ verwendet.