

3. Modifikation des PSII-Mangankomplexes durch Röntgenstrahlung

3.1 Photoreduktion und Röntgenabsorptionsspektroskopie

Wesentliche Informationen zur Struktur des PSII-Mangankomplexes sind durch Röntgenabsorptionmessungen (für eine Übersicht siehe [Dau *et al.* 2001, Robblee *et al.* 2001]) und in letzter Zeit durch Proteinkristallografie [Zouni *et al.* 2001, Kamiya und Shen 2003, Ferreira *et al.* 2004] gewonnen worden. Diese kristallografischen Ergebnisse stellen einen lange erwarteten Durchbruch dar. Hinsichtlich des Mangankomplexes stellt sich die Frage, in welchem Ausmaß die erhaltenen strukturellen Informationen durch Modifikationen beeinflusst sind, die durch die zahlreichen Radikale verursacht werden, die unvermeidlicherweise bei Röntgenbestrahlung entstehen. In diesem Kapitel wird der Einfluss von Röntgenstrahlung auf den Oxidationszustand und die Struktur des Mangankomplexes mit Hilfe der Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) untersucht.

Wechselwirkung zwischen Röntgenstrahlung und Proteinen

Der hauptsächliche Effekt der Röntgenstrahlung ist die Wechselwirkung der Atome mit dem Röntgenphoton, die zur Emission eines Elektrons führt. Diese Wechselwirkung besteht aus der Absorption eines Photons (Photoeffekt) oder der inelastischen Streuung (Compton-Effekt), wobei die Absorption unterhalb 10 keV dominiert, der Compton-Effekt oberhalb 10 keV an Bedeutung gewinnt. Ein weiterer Effekt beim Auftreffen von Röntgenstrahlen auf Materie ist die Paarerzeugung, die aber erst ab einer Photonenenergie von 1 MeV einsetzt. Die Mehrzahl der Absorptions- oder Streuprozesse in biologischem Material findet an Kohlenstoff-, Sauerstoff-, oder Stickstoffatomen der Proteine, Lipide oder des Substratwassers statt. Absorption (oder Streuung) durch proteingebundene Metalle spielt aufgrund ihrer geringen Konzentration keine Rolle. Das primär emittierte Elektron hat typischerweise eine kinetische Energie von einigen keV und verursacht eine Vielzahl sekundärer Ionisationen. Die Absorption eines einzigen 6,7 keV-Photons kann zur Erzeugung von etwa 250 Radikalpaaren führen. Diese große Zahl potentiell hochreaktiver Radikalpaare ist die Ursache der Strahlenschädigung in Proteinen. Selbst bei tiefer Temperatur sind diese primären Radikale mobil, wobei es nach einer Reihe von Reaktionen schließlich zur Bildung von eingefangenen tieftemperaturstabilen Radikalzentren kommt. EPR-Untersuchungen führen zu folgendem Bild [Jones *et al.* 1987]: *backbone-amino*-Radikale bilden die Mehrzahl der stabilen Elektronenloch-Zentren, wobei das Elektronenloch durch Abgabe des Stickstoff-Protons stabilisiert wird. Die emittierten Elektronen besitzen demgegenüber große Mobilität und werden von elektrophilen Zentren, wie zum Beispiel Disulfidbrücken oder Metallen in hohen Oxidationszuständen, eingefangen.

Röntgenabsorptionsspektroskopie

Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS, X-ray Absorption Spectroscopy) ist gut geeignet, um den Einfluss ionisierender Strahlung auf den Oxidationszustand und die lokale Struktur proteingebundener Metallzentren zu untersuchen. Das Absorptionsspektrum lässt sich dabei

in zwei Bereiche unterteilen: den Kantenbereich (XANES, X-ray Absorption Near Edge Structure) der Informationen über den Oxidationszustand und die elektronische Konfiguration des absorbierenden Atoms enthält, und die Oszillationen oberhalb der Absorptionskante (EXAFS, Extended X-ray Absorption Fine Structure), die Aussagen über die lokale Umgebung des Absorbers liefern. Die Energie der Mangan-K-Kante ist mit dem Oxidationszustand des Mangans korreliert [Dau *et al.* 2003] und kann benutzt werden, um den Reduktionsprozess zu verfolgen, der durch die Röntgenstrahlung verursacht wird. Die Oszillationen des EXAFS-Bereiches werden einem Photoelektron-Rückstreuphänomen zugeschrieben [Teo 1986, Koningsberger 1988]. Die Endzustands-Wellenfunktion des nach Röntgenabsorption emittierten Photoelektrons wird als Überlagerung der ausgehenden Elektronenwelle mit an benachbarten Atomen zurückgestreuten Anteilen der Elektronenwelle aufgefasst. Das führt zu einer Abhängigkeit des Absorptionskoeffizienten von der Struktur der ersten Koordinationsschalen des absorbierenden Atoms. Die Analyse der EXAFS Spektren erlaubt die Bestimmung von Absorber-Rückstreuer-Distanzen mit einer Genauigkeit von 0,02 Å, wobei Rückstreuer bis zu einer Entfernung von 4-5 Å detektierbar sind. Die EXAFS-Oszillationen aufgrund schwerer Rückstreuer (Mn, Ca) unterscheiden sich von denen leichter Atome (O, C, N) und sind wesentlich stärker, weswegen schwere Rückstreuer bei Distanzen unterhalb 4 Å im allgemeinen sichtbar sind.

Auf eine genaue Beschreibung von XANES, EXAFS soll hier verzichtet werden. Ausführliche Darstellungen finden sich in [Teo 1986, Koningsberger 1988] (EXAFS) bzw. [Stöhr 1992] (XANES).

3.2 Messung und Datenauswertung

XAS an der low-flux-Beamline

Messungen an der Mangan-K-Kante bei 18 K wurden an der *bending-magnet*-Beamline D2 am HASYLAB (EMBL, DESY, Hamburg) mit einem 13-Elemente Germanium-Detektor (Canberra) durchgeführt. Die Messungen erfolgten im Fluoreszenzmodus. Die Wellenlängenselektion der Anregungsstrahlung erfolgte mit einem Si111-Kristall-Monochromator. Die Proben wurden in einem Helium-Kryostaten platziert, unter einer Atmosphäre von 200 mbar Helium. Der von der Röntgenstrahlung ausgeleuchtete Bereich auf der Probe betrug $4 \times 1 \text{ mm}^2$. Die Erfassung eines Spektrums (6400-7100 eV) dauerte etwa 20 min. Eine detaillierte Beschreibung des Messplatzes findet sich in [Iuzzolino *et al.* 1998].

XAS an der high-flux-Beamline

Messungen bei Raum- und Tieftemperaturen wurden an der Undulator-Beamline ID26 des ESRF in Grenoble (Frankreich) durchgeführt. Die Messungen erfolgten im Fluoreszenzmodus mit einer PIN-Photodiode ($3,8 \text{ cm}^2$, Eurisys Measures). Anregungsstrahlung und Raumlicht wurde durch eine $10 \text{ }\mu\text{m}$ Chrom- und eine $10 \text{ }\mu\text{m}$ Aluminiumfolie unterdrückt. Die Messungen bei Tieftemperaturen erfolgten in einem He-Kryostaten unter 200 mbar Heliumatmosphäre. Für die Raumtemperaturexperimente wurden die Proben außerhalb des Kryostaten direkt in Luft platziert ($18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Die schnelle Aufnahme von XAS-Spektren (6500-7100 eV) erfolgte unter simultanem Verfahren des Si220-Monochromators und Variation des Undulator-Spaltes (rapid-scan-modus, beschrieben in [Meinke *et al.* 2000, Haumann *et al.* 2002a]). Der bestrahlte Bereich auf der Probe betrug $1 \times 1 \text{ mm}^2$.

An beiden Messplätzen betrug der Winkel zwischen dem elektrischen Feldvektor des Röntgenstrahls und der Probennormalen 55° (magic-angle, [Dittmer und Dau 1998]). Die Energiekalibrierung erfolgte durch simultane Messung der Absorption des schmalen Vorkanten-Maximums (6543,3 eV) einer KMnO_4 -Pulver-Probe, die am Ende des Strahlenganges vor einer Ionisationskammer platziert wurden. Die Energieachse jeder einzelnen Messung wurde durch Simulation des KMnO_4 -Vorkanten-Maximums mit einer Gaußfunktion durchgeführt. Die so erreichte Genauigkeit ist besser als $\pm 0,1$ eV [Iuzzolino *et al.* 1998, Meinke *et al.* 2000].

Datenauswertung

Die Normalisierung der XAS-Spektren und Extraktion der EXAFS-Oszillationen erfolgte wie in [Dittmer 1999, Meinke *et al.* 2000] beschrieben. Die Energieachse der EXAFS-Oszillationen wurde in eine Wellenzahlachse mit äquidistanten Datenpunktabstand unter Verwendung eines Energienullpunktes von 6540 eV transformiert [Teo 1986], wobei die Zahl der Datenpunkte durch Mittelung auf etwa 200 reduziert wurde. Die EXAFS-Spektren wurden k^3 -gewichtet, um die Dämpfung der Oszillationen mit größer werdendem Wellenvektor zu kompensieren. Für die Fouriertransformationen wurde ein fraktionales Kosinus-Fenster über 10 % des k -Bereiches links und rechts verwendet. Die Bestimmung der Kantenpositionen erfolgte nach der in [Dau *et al.* 2003] beschriebenen Integralmethode.

Simulation des EXAFS-Oszillationen

Simuliert wurden die EXAFS-Spektren mit der in der Arbeitsgruppe entwickelten Software SimX, die in [Dittmer 1999] beschrieben ist. 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. Der Amplitudenreduktionsfaktor (S_0^2) betrug 0,85, die Nullpunktenergie der Simulationen 6547 eV. Die Qualität der Simulation wurde durch eine aus den Fourier-gefilterten Spektren berechneten Fehlersumme (R_f) erfasst (siehe [Dittmer 1999, Meinke *et al.* 2000]).

3.3 Ergebnisse

Röntgeninduzierte Photoreduktion bei 10-20 K

Aufeinanderfolgende XAS-Spektren wurden aufgenommen, ohne den Bestrahlungsbereich auf der Probe zu ändern. Die so erhaltenen Serien von Spektren reflektieren die strahlungsinduzierten Veränderungen des Mangankomplexes. Zur Untersuchung der ersten, schnellen Schritte der Photoreduktion erfolgten die Messungen an einer *bending-magnet*-Beamline (D2, Hasylab, DESY, Hamburg) mit relativ geringem Photonenfluss. Die späteren, langsameren Schritte des Reduktionsprozesses würden an einer typischen *bending-magnet*-Beamline in einem Zeitbereich von einigen Wochen vor sich gehen. Die Untersuchung dieser langsamen Photoreduktion wurde deswegen an einer Undulator-Beamline (ID26, ESRF, Grenoble) durchgeführt, die einen um zwei bis drei Größenordnungen höheren Photonenfluss bietet. Aufgrund der hohen Intensität sind die langsamen Schritte der Photoreduktion beschleunigt und werden so experimentell zugänglich. Es wurden Spektren im S_1 -Zustand (an beiden Beamlines) und im höher oxidierten S_2 -Zustand (*bending-magnet*-Beamline) aufgenommen.

Im Falle des Mangans korreliert die Position der K-Kante auf der Energieachse mit dem Oxidationszustand des absorbierenden Mangans. Eine Reduktion führt zu einer Kantenverschiebung zu geringeren Energien [Dau *et al.* 2003]. Dadurch können Aussagen über röntgeninduzierte Änderungen des Oxidationszustandes des Mangankomplexes durch eine Analyse der K-Kantenposition gewonnen werden. In Abbildung 3.1 sind die Kantenspektren des Mangankomplexes im S_1 - und S_2 -Zustand, ohne dass eine vorherige Röntgenstrahlexposition stattgefunden hat, zu sehen. Die Oxidationszustands-Zusammensetzung des Mangankomplexes im S_1 - und S_2 -Zustand ist höchstwahrscheinlich $Mn(III)_2Mn(IV)_2$ bzw. $Mn(III)_1Mn(IV)_3$ [Yachandra *et al.* 1993, Dau *et al.* 2001, Dau *et al.* 2003]. Der $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang ist entsprechend mit einer Ein-Elektronen-Oxidation verbunden. Diese Ein-Elektronen-Oxidation ist mit einer Kantenverschiebung von 0,5-0,9 eV zu höheren Energien verbunden (Abbildung 3.2). Unter Verwendung der sogenannten Integralmethode zur Kantenpositionsbestimmung [Dau *et al.* 2003] erhält man eine Verschiebung um etwa 0,7 eV für den $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang [Iuzzolino *et al.* 1998, Dau *et al.* 2001, Dau *et al.* 2003].

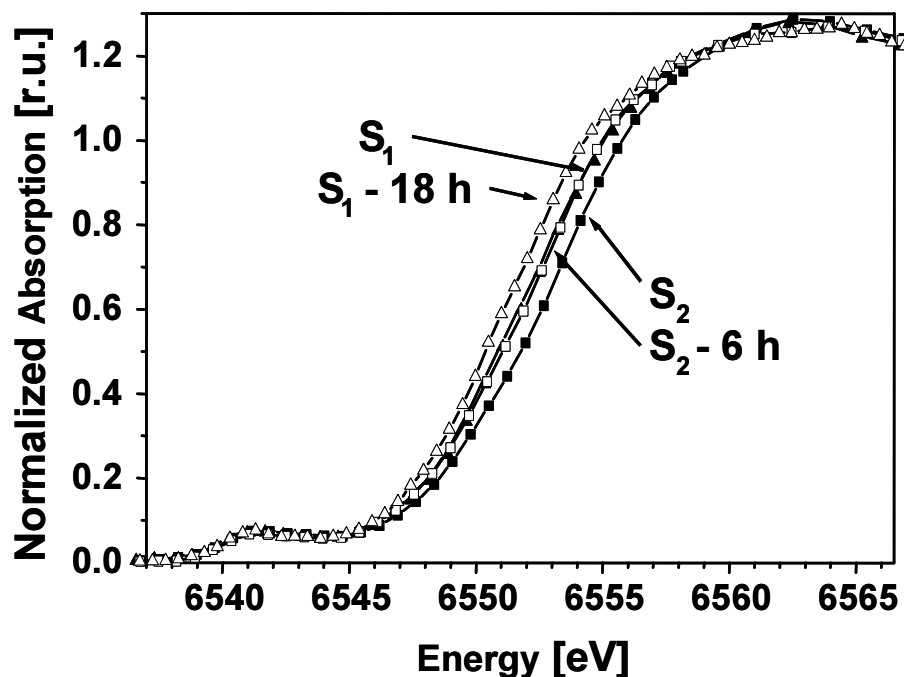


Abbildung 3.1: XANES-Spektren des nativen S_1 - und S_2 -Zustandes, sowie der S_1 -Probe nach 40 Stunden und der S_2 -Probe nach 6 Stunden Bestrahlung an der *low-flux*-Beamline.

Für Proben im höheroxidierten S_2 -Zustand führen 6 Stunden Bestrahlung an der *low-flux*-Beamline zu einer Kantenverschiebung zu niedrigeren Energien, die zu einem Kantenspektrum führt, das hinsichtlich Position und Form weitgehend dem S_1 -Spektrum entspricht (Abbildung 3.1). Der Zeitverlauf der Kantenverschiebung im S_2 -Zustand wurde im Zeitbereich von 7 Stunden durch eine Folge kontinuierlich wiederholter XAS-Scans verfolgt. Die Kantenposition in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer ist in Abbildung 3.2 zu sehen.

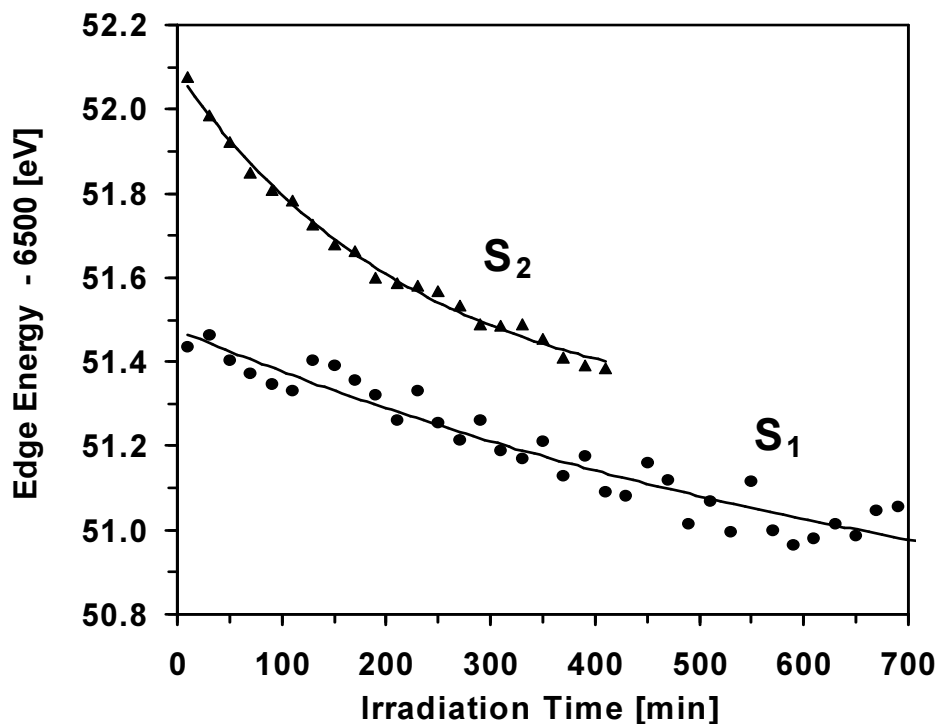


Abbildung 3.2: Zeitabhängigkeit der Kantenposition ausgehend vom S_2 - bzw. S_1 -Zustand an der *low-flux*-Beamline. (Die Linien sind einfach exponentielle Simulationen des Kantenpositionsverlaufes mit $\tau = 842$ min, $A = 0,88$ eV (S_1) und $\tau = 229$ min, $A = 0,82$ eV (S_2).)

Man erkennt, dass für Proben, die sich anfänglich im S_2 -Zustand befanden, etwa 6 Stunden Bestrahlung an der *low-flux*-Beamline ausreichen, um den Mangankomplex um ein Redoxäquivalent zu reduzieren, was zu einem Zustand führt, der hinsichtlich des Kantenspektrums dem nativen S_1 -Zustand entspricht. Demgegenüber sind für Proben, die sich anfänglich im S_1 -Zustand befanden, 12 Stunden Bestrahlung notwendig, um eine Kantenverschiebung zu geringeren Energien um 0,7 eV zu erreichen, was zu einem Zustand führt, der dem nativen S_0 -Zustand entspricht. Die Rate der röntgeninduzierten Photoreduktion ist also im höheroxidierten S_2 -Zustand gegenüber dem S_1 -Zustand mindestens verdoppelt. Die anfängliche Reduktionsrate im S_2 -Zustand ist gegenüber dem S_1 -Zustand signifikant erhöht (Kantenverschiebung um ~ 170 meV/h im S_2 , um ~ 60 meV/h im S_1). Die Rate der Photoreduktion scheint stark vom Oxidationszustand des Metallzentrums abzuhängen.

Um den Effekt höherer Energiedosen und somit die späteren Schritte der Photoreduktion zu untersuchen, wurden Spektren des Mangankomplexes im initialen S_1 -Zustand untersucht, die an einer *high-flux*-Beamline (ID 26, ESRF, Grenoble) aufgenommen wurden. Die Rate der Photoreduktion ist hier um mindestens zwei Größenordnungen höher, was dem höheren Photonenfluss entspricht. Der Zeitverlauf der Kantenposition ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Man erkennt einen zweiphasigen Verlauf der Reduktion. Eine zweifachexponentielle Simulation liefert für die schnelle Phase eine Zeitkonstante von 1,1 min und eine Amplitude von 0,7 eV (Abbildung 3.3). Der Vergleich der anfänglichen Reduktionsraten von *high-flux*- und *low-flux*-Beamline ergibt eine Beschleunigung der Reduktion um einen Faktor von 360 infolge des höheren Photonenflusses. Die zweite Reduktionsphase an der *high-flux*-Beamline ist signifikant langsamer (110 min, Amplitude 4 eV), und wäre an der *low-flux*-Beamline mit

vertretbarem Zeitaufwand nicht zugänglich (geschätzte Zeitkonstante: 2 Monate). Der in Abbildung 3.3 (A) dargestellte Zeitverlauf erforderte die Auswertung von 200 Spektren, die durch eine Serie schneller Energie-Scans erhalten wurden. Ein alternativer Ansatz führt zu dem in Abbildung 3.3 (C) dargestellten Zeitverlauf. Hier wurde die Intensität der Röntgenfluoreszenz als Funktion der Zeit für eine feste Anregungsenergie von 6549,5 eV aufgezeichnet (Zeitscan-Ansatz [Haumann *et al.* 2002a, Haumann *et al.* 2002b]). Bei dieser Energie steigt die Röntgenabsorption, und damit die detektierte Fluoreszenz, mit zunehmender Reduktion des Mangankomplexes an (Abbildung 3.3 (A)). Der Vergleich der Abbildungen 3.3 (B) und 3.3 (C) zeigt, dass die Zeitverläufe von Kantenposition und Fluoreszenzintensität bei 6549,5 eV spiegelbildlich sind. Offensichtlich kann der Zeitscan-Ansatz genutzt werden, um auf experimentell effiziente Weise den Verlauf der Photoreduktion zu verfolgen.

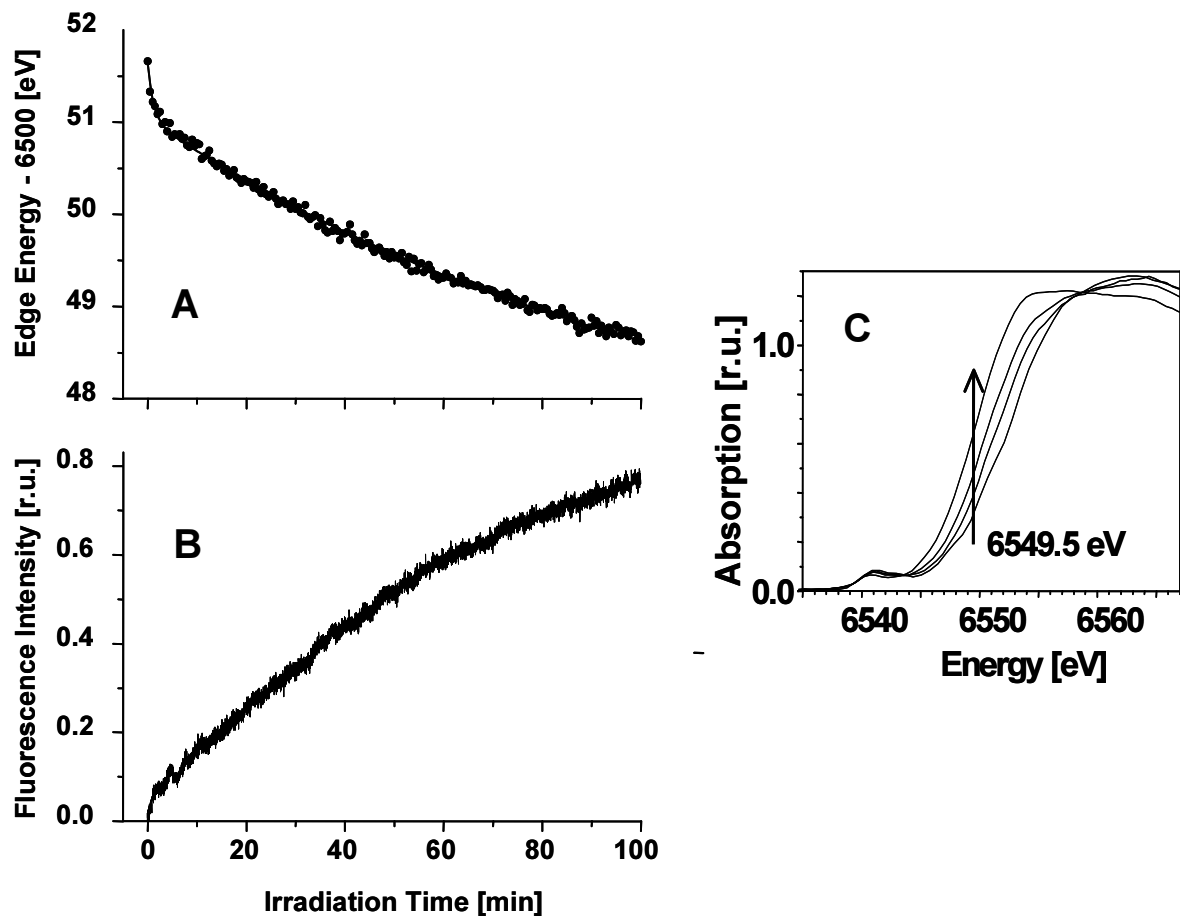


Abbildung 3.3: Kantenposition und Fluoreszenzintensität bei 20 K. A: Energie der Mangan-K-Kante bestimmt nach der Integralmethode, B: detektierte Röntgenfluoreszenz für Anregung bei einer Energie von 6549,5 eV (Zeitscan-Methode, siehe Text), beide Zeitverläufe gemessen an der *high-flux*-Beamline, ausgehend vom S_1 -Zustand. C: Kantenspektren für zunehmende Bestrahlungsdauer. Die Anregungsenergie zur Aufnahme der Zeitscans (6549,5 eV) ist durch den Pfeil markiert.

Der ausgeprägte zweiphasige Verlauf der Kantenverschiebung zu niedrigeren Energien deutet darauf hin, dass die erste Phase des Reduktionsprozesses zur Bildung eines diskreten Intermediatzustandes führt. Die Größe der Kantenverschiebung (0,7 eV) deutet an, dass dieser Intermediatzustand durch eine Ein-Elektronen-Reduktion des ursprünglichen S_1 -Zustandes des Mangankomplexes erzeugt wird. Im S-Zustands-Zyklus des PSII-Komplexes, führt die

lichtinduzierte Ein-Elektronen-Oxidation des S_0 -Zustandes zur Bildung des S_1 -Zustandes. Eine Ein-Elektronen-Reduktion des S_1 -Zustandes führt entsprechend zu einem Oxidationszustand, der formell dem nativen S_0 -Zustand äquivalent ist (Abbildung 3.1). Im folgenden werden die diskreten Intermediatzustände, die durch Photoreduktion erreicht werden, mit S_1^* bzw. S_0^* bezeichnet. Es soll noch einmal betont werden, dass nicht alleine die Kantenpositionen, sondern auch die Ähnlichkeiten in der Form der Kantenspektren eine enge Beziehung zwischen den nativen (S_1 , S_0) und den durch Photoreduktion erreichten Zuständen des Mangankomplexes nahelegt (S_1^* , S_0^*).

Temperaturabhängigkeit der Photoreduktion

Abbildung 3.4 zeigt die Ergebnisse der Experimente zur röntgeninduzierten Photoreduktion bei Raumtemperatur (Abb. 3.4 (A), Kantenposition in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer, Abb. 3.4 (B) Zeitscan bei fester Anregungsenergie).

Die Zeitverläufe zeigen auch bei Raumtemperatur kein einfaches monoexponentielles Verhalten. Im Gegensatz zur schnellen Reduktionsphase bei Tieftemperaturen ist bei Raumtemperatur eine initiale Verzögerungsphase zu erkennen (Abb. 3.4, [Meinke *et al.* 2000, Haumann *et al.* 2002a, Haumann *et al.* 2002b]). Bei Raumtemperatur ist die Anfangsrate der Photoreduktion nahe Null, während sie bei tiefen Temperaturen besonders hoch ist.

Im folgenden werden nicht die Anfangsphasen des Reduktionsverlaufes betrachtet, sondern ausschließlich die langsamen Phasen, die den größten Teil der strahlungsinduzierten Kantenverschiebung ausmachen. Im Vergleich mit den 10-20 K-Daten ist die langsame Phase der Photoreduktion bei Raumtemperatur um zwei Größenordnungen beschleunigt, was auf eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der Ratenkonstante der langsamen Phase (k_{slow}) hinweist. Wie aus dem Vergleich von Abbildung 3.4 (A) (Kantenposition) mit Abbildung 3.4 (B) (Fluoreszenzintensität) ersichtlich wird, ist der oben beschriebene Zeitscan-Ansatz auch bei Raumtemperaturmessungen geeignet um die Photoreduktion des Mangankomplexes zu verfolgen. Um die Temperaturabhängigkeit der Hauptkomponente (langsame Phase, k_{slow}) des Reduktionsprozesses zu untersuchen, wurden Zeitscans bei 13 verschiedenen Temperaturen im Bereich von 10 bis 300 K aufgenommen. Diese Fluoreszenz-Transienten, die für einige Temperaturen in Abbildung 3.5 (A, Inset) dargestellt sind, wurden mit einer einfach exponentiellen Funktion gemäß

$$F(t) = F_0 + A(1 - e^{-kt}) \quad (3.1)$$

simuliert. Die so ermittelten Ratenkonstanten sind in Abbildung 3.5 (A) dargestellt. Die Temperaturabhängigkeit zeigt eine ausgeprägte Zweiphasigkeit mit einer Übergangstemperatur bei etwa 200 K.

Eine Beschreibung der Temperaturabhängigkeit mit nur einer Aktivierungsenergie ist nicht möglich, wie aus der Arrhenius-Darstellung in Abbildung 3.5 (B) ersichtlich wird. Die Beschreibung des Temperaturverhaltens der Ratenkonstanten mit zwei Aktivierungsenergien führt auf einen Wert von 45 meV (4,4 kJ/mol) für den Temperaturbereich von 200 bis 300 K und von nur 0,2 meV (0,02 kJ/mol) für Temperaturen zwischen 10 und 50 K.

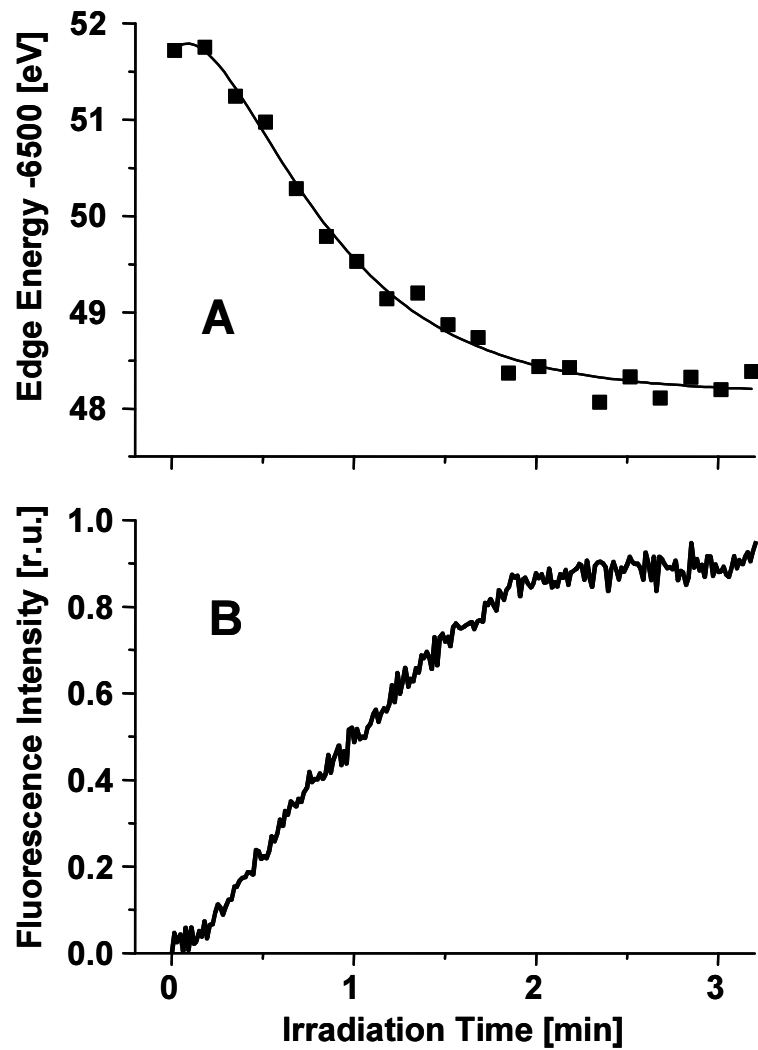


Abbildung 3.4: Kantenposition und Fluoreszenzintensität bei Raumtemperatur. A: Energie der Mangan-K-Kante bestimmt nach der Integralmethode, B: detektierte Röntgenfluoreszenz für feste Anregungsenergie (Zeitscan-Methode, siehe Text), beide Zeitverläufe gemessen an der *low-flux*-Beamline, ausgehend vom S_1 -Zustand.

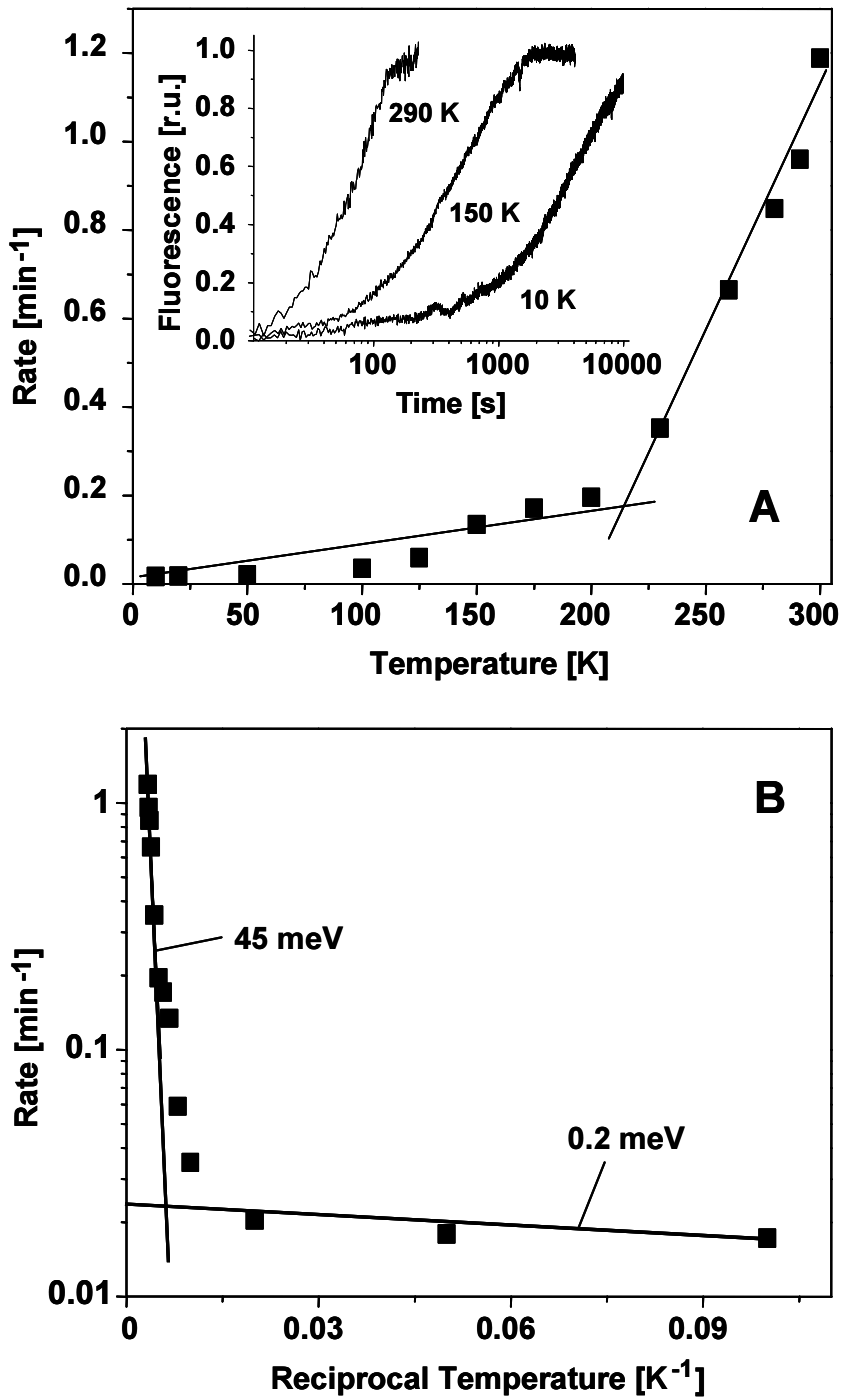


Abbildung 3.5: Photoreduktion des Mangankomplexes in Abhängigkeit von der Temperatur. Dargestellt sind die Ratenkonstanten, ermittelt durch eine einfach-exponentielle Simulation der Zeitscans (Zeitscans für drei Temperaturen zeigt das Inset). B: Arrhenius-Darstellung der Ratenkonstanten und Beschreibung durch Aktivierungsenergien von 0,2 meV und 45 meV für den Temperaturbereich von 10-50 K bzw. 200-300 K (Linien).

Relation zwischen Photonenfluss und Reduktionsrate

Die Beziehung zwischen der Ratenkonstanten der röntgeninduzierten Photoreduktion und der Intensität der Röntgenstrahlung wurde mit der Zeitscan-Methode (siehe oben) für PSII-Proben im initialen S_1 -Zustand untersucht. Der Vergleich der Zeitscans mit nicht abgeschwächtem Röntgenstrahl und mit um 90 % reduzierter Intensität in Abbildung 3.6 (beide Messungen bei 20 K) zeigt einen identischen Verlauf, aber eine Verlangsamung der Reduktion um den Faktor 10, was auf einen linearen Zusammenhang zwischen Reduktionsrate und Photonenfluss hindeutet.

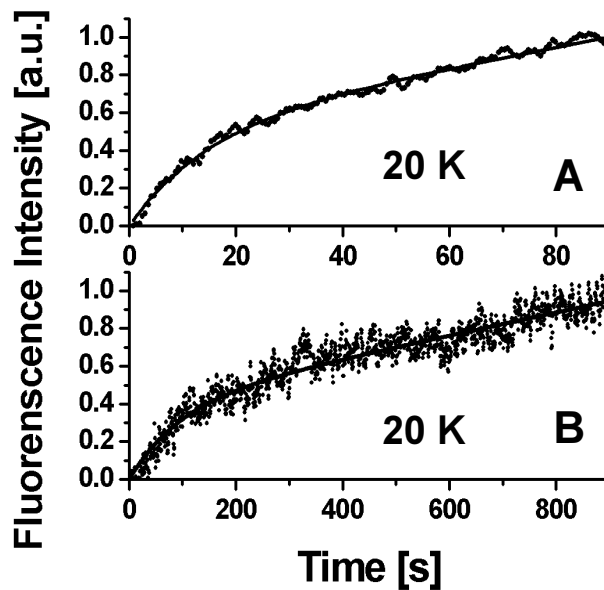


Abbildung 3.6: Photoreduktion für verschiedene Röntgenintensitäten. Gezeigt sind die Fluoreszenzintensität bei fester Anregungsenergie (Zeitscan-Methode) bei 20 K für 100 % Photonenfluss (A) und nach Abschwächung auf 10 % Photonenfluss (B). Die Linien sind Simulationen mit dem im Text beschriebenen Ansatz.

Um diese Vermutung zu bestätigen wurden, wurden mehrere Zeitscans bei verschiedenen Photonenflüssen aufgenommen und mit einem Ansatz simuliert, der den biphasigen Reduktionsverlauf bei tiefen Temperaturen berücksichtigt:

$$F(t) = F_0 + A_{fast} (1 - e^{-k_{fast}t}) + r_{slow}t \quad (3.2)$$

Wie aus Abbildung 3.6 ersichtlich, ist für die Beschreibung der langsamen Reduktionsphase aufgrund des eingeschränkten Zeitbereiches ein linearer Ansatz ausreichend ($r_{slow}t$).

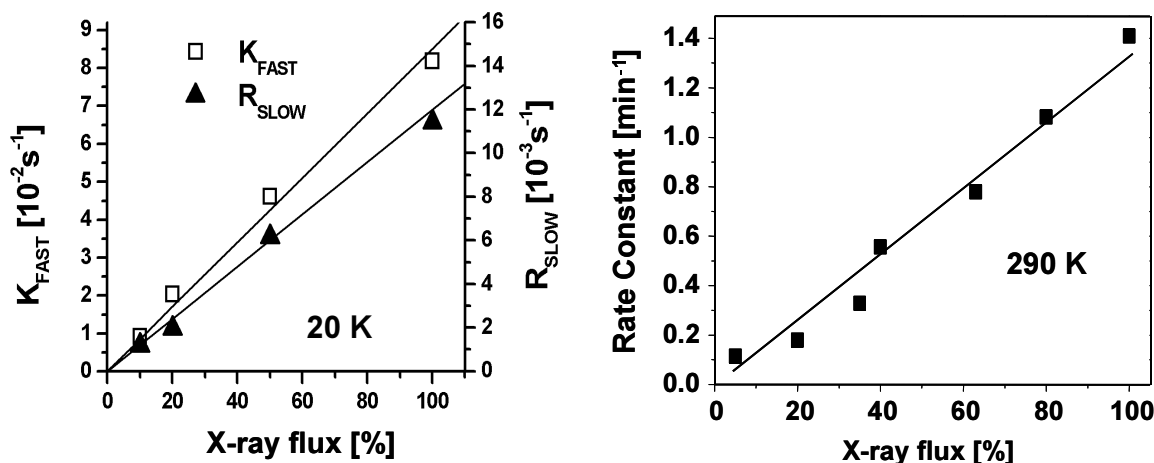


Abbildung 3.7: Rate der Photoreduktion in Abhängigkeit vom Photonenfluss bei 20 K (links) und 290 K (rechts).

In Abbildung 3.7 ist neben der Ratenkonstanten k_{fast} der Parameter $R_{\text{slow}} = r_{\text{slow}}/A_{\text{fast}}$ in Abhängigkeit von der relativen Röntgenstrahlintensität dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Raten beider Reduktionsphasen direkt proportional zur Intensität der Röntgenstrahlung sind.

Wie oben gezeigt, zeigt der Photoreduktionsprozess bei Raumtemperatur eine Verzögerungsphase, gefolgt von einem monoexponentiellen Verlauf bis zum Endzustand, in dem das Mangan weitestgehend zu Mn(II) reduziert ist. (Dieser Endzustand wird im folgenden als Mn(II)-Zustand bezeichnet.) Auch bei Raumtemperatur ist die Ratenkonstante der langsamen Reduktionsphase (k_{slow}) proportional zum Photonenfluss, wie aus Abbildung 3.7 ersichtlich wird. Die Dauer der Verzögerungsphase nimmt ebenfalls linear mit dem Photonenfluss ab (nicht dargestellt). Für beide Temperaturen ist also kein Dosis-Raten-Effekt zu beobachten, woraus geschlossen werden kann, dass das Ausmaß der röntgeninduzierten Photoreduktion (bei ansonsten unveränderten Versuchsbedingungen) nur von der integrierten Zahl der absorbierten Röntgenphotonen abhängt.

Röntgeninduzierte Strukturveränderungen

Um die durch Röntgenstrahlung induzierten strukturellen Änderungen des Mangankomplexes zu untersuchen, wurde der EXAFS-Bereich der Spektren untersucht, die durch sukzessive Messungen auf demselben Bereich der Probe gewonnen wurden. Die k^3 -gewichteten EXAFS-Oszillationen und die entsprechenden Fouriertransformierten sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

Die Oszillationen haben ihren Ursprung in der Rückstreuung des vom absorbierenden Atom emittierten Photoelektrons an den Nachbaratomen. Die EXAFS-Oszillationen reflektieren daher die Anzahl und den Abstand der Manganliganden. Im Fouriertransformations-Spektrum des nativen Mangankomplexes im S_1 -Zustand sind zwei Hauptmaxima bei reduzierten Distanzen von 1,35 und 2,2 Å zu erkennen, die zu rückstreuenden Atomen im Abstand von 1,85 und 2,7 Å gehören. Das erste Maximum (Maximum I in Abb. 3.8 (B)) stammt von Sauerstoff- und Stickstoffatomen der ersten Koordinationsschale, das zweite Maximum (Maximum III in Abb. 3.8 (B)) ist dominiert von rückstreuenden Mn-Atomen des Mangankomplexes bei Abständen von 2,7 Å vom absorbierenden Mangan. Da Distanzen nahe 2,7 Å typisch sind für di- μ -oxo-verbrückte Paare von Manganionen, wird das 2,7 Å-

Maximum solchen Manganpaaren zugeordnet [Yachandra *et al.* 1993, Robblee *et al.* 2001]. Schon 1,6 min Röntgenbestrahlung führt zu einer signifikanten Reduktion des Fouriersignals bei 2,2 Å, was auf eine Abnahme der Zahl der Rückstreuer bei 2,7 Å hindeutet. 5,5 min Bestrahlung führen zu einer Abnahme des Maximums bei 2,2 Å um etwa 50 %. Bei länger andauernder Bestrahlung kommt es zu einem vollständigen Verschwinden des Fourier-Maximums bei 2,2 Å und einem Auftauchen eines neuen Rückstreu-Signals bei knapp 2 Å. Dieses Maximum deutet auf Mangan-Rückstreuer-Distanzen von 2,2 Å innerhalb der ersten Koordinationsschale hin, typisch für die Mn-O-Bindungslänge in Mn(II)-Komplexen.

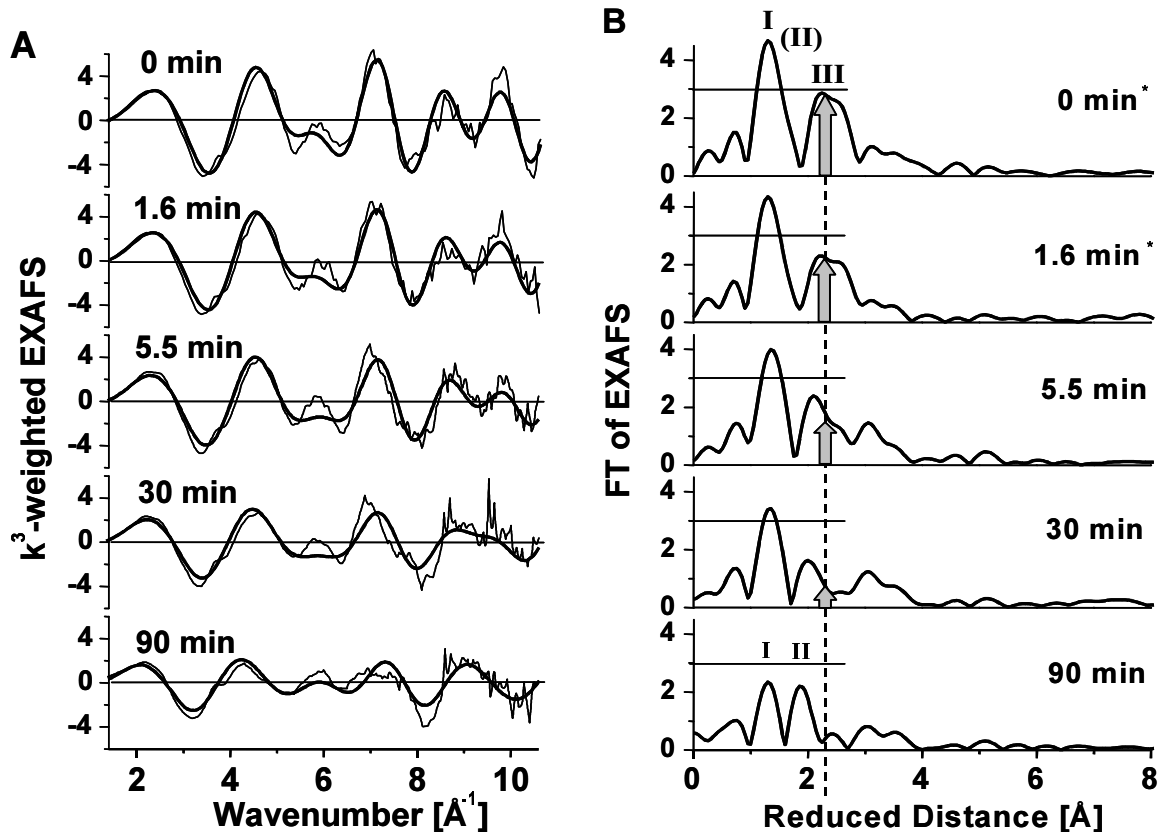


Abbildung 3.8: Tieftemperatur-Spektren für verschiedene Bestrahlungszeiten. A: k^3 -gewichtete EXAFS-Oszillationen, B: Fouriertransformierte. Die dicken Linien in A sind Simulationen mit dem im Text beschriebenen 3-Koordinationsschalen-Ansatz; Abweichungen zwischen den experimentellen Spektren und den Simulationen, vor allem bei einem Wellenzahlvektor von 5-6 \AA^{-1} , resultieren aus dem einfachen Simulationsansatz (Vernachlässigung von Rückstreuern bei Distanzen $> 3 \text{\AA}$).

Fouriertransformationsspektren sind oft hilfreich, da man Hinweise auf strukturelle Änderungen durch bloße Inspektion der Fourier-Amplituden erhalten kann. Allerdings wird nur ein Teil des Informationsgehaltes der EXAFS-Spektren visualisiert (die Phasenlagen der Oszillationskomponenten sind nicht enthalten), die reine visuelle Analyse kann daher irreführend sein. Um quantitative Strukturinformationen zu erhalten, wurden die k^3 -gewichteten EXAFS-Oszillationen simuliert. Um der Komplexität der EXAFS-Spektren gerecht zu werden, wäre ein 6-Schalen-Ansatz wünschenswert, der rückstreuendes Mangan bei $\sim 2,7$ und $\sim 3,15 \text{\AA}$, Kalzium bei $\sim 3,35 \text{\AA}$ und leichte Atome (C,O,N) bei $\sim 1,85$, $\sim 2,2$ und $3,6 \text{\AA}$ umfasst [Pospisil *et al.* 2003, Dau und Haumann 2003, Dau *et al.* 2003]. Eine

Auflösung der drei Rückstreuschalen zwischen 3,0 und 3,6 Å ist möglich, wenn der lineare Dichroismus partiell orientierter PSII-Proben ausgenutzt wird [Dittmer und Dau 1998, Dittmer 1999, Dau und Haumann 2003]. In [Pospisil *et al.* 2003] konnten diese drei Distanzen, für eine Zeitserie von Spektren durch einem Simultansimulations-Ansatz unter Ausnutzung eines einfachen kinetischen Modells, aufgelöst werden. In dem hier vorliegenden Fall erwiesen sich aussagekräftige Simulationen mit einem 6-Schalen-Ansatz allerdings als problematisch. Aus diesem Grund wurde auf die Einbeziehung von Distanzen oberhalb 3 Å in die Simulationen verzichtet. Wie in [Pospisil *et al.* 2003, Dau *et al.* 2003] gezeigt wird, kann die Vernachlässigung der Rückstreuer oberhalb 3 Å zu einer scheinbaren Zunahme der Koordinationszahl bei 2,7 Å führen (von ~1,0 auf ~1,25). Ansonsten bleiben die Simulationsergebnisse für Distanzen unterhalb 3 Å im wesentlichen unbeeinflusst. Die Simulationen auf der Basis eines 3-Schalen Ansatzes, der zwei kurze Mn-O/N Distanzen und eine Mn-Mn-Distanz umfasst, sind in Abbildung 3.8 (A) dargestellt (glatte Linien). Die korrespondierenden Simulationsparameter als Funktion der Bestrahlungsdauer zeigt Abbildung 3.9.

Für den PSII-Mangankomplex kann von einer breiten Verteilung der Distanzen zwischen dem absorbierenden Mangan-Ion und den Rückstreuern der ersten Koordinationsschale (O/N) ausgegangen werden (Mn-O/N-Abstände von 1,7 bis 2,3 Å). Die entsprechende Verteilungsfunktion wurde durch die Summe zweier Gaußverteilungen modelliert, was auf zwei Mn-O-Distanzen (R_I und R_{II}) und zwei Debye-Waller-Parametern (σ_I und σ_{II}), welche die Breite der Gaußverteilungen beschreiben, führte. Die Zahl der freien Parameter wurde durch eine Kombination von Einschränkungen (siehe Legende Abb. 3.8) und durch einen Simultan-Simulationsansatz zur Simulierung der in Abbildung 3.8 dargestellten Spektren reduziert (siehe [Pospisil *et al.* 2003]).

In Abbildung 3.9 zeigen die Koordinationszahlen N_{II} des längeren Mn-O/N-Vektors ($R_{II} = 2,7$ Å) und N_{III} des Mn-Mn-Vektors ($R_{III} = 2,7$ Å) sowie die Länge des kürzeren Mn-O/N-Vektors eine klar zweiphasige Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer. Eine schnelle Phase, die nach etwa 5 min abgeschlossen ist, gefolgt von einer wesentlich langsameren Phase. Dieses Verhalten der EXAFS-Simulationsparameter reflektiert strukturelle Änderungen, die mit der progressiven Photoreduktion einhergehen.

Ebenfalls in Abbildung 3.9 dargestellt ist der mittlere Mn-O/N-Abstand der beiden kurzen Rückstreuvektoren, der auf Basis der erhaltenen Distanzverteilung ermittelt wurde. Man erkennt eine zweiphasige Zunahme des Mn-Ligand-Abstandes mit einer schnellen Phase von etwa 5 min mit einer Amplitude von ~0,04 Å, gefolgt von einer wesentlich langsameren Komponente, die innerhalb des untersuchten Zeitbereiches von 90 min nicht abgeschlossen wird. Eine Vergrößerung des Mn-Ligand-Abstandes in der ersten Koordinationsschale infolge der Reduktion des Mangans ist zu erwarten. Typische Bindungslängen für sechsfach sauerstoffkoordiniertes Mangan sind 2,2 Å für Mn(II), 2,02 Å für Mn(III) und 1,90 Å für Mn(IV) [Brese und O'Keeffe 1991, Brown 1992, O'Keeffe und Brese 1991, Urusov 1995]. (Die mittlere Bindungslänge des $Mn(III)_2Mn(IV)_2$ -Komplexes im S_1 -Zustand ist kürzer als die 1,96 Å, die sich aus den oben genannten Abständen ergibt, was mit dem Vorkommen mehrerer kürzerer di- μ -oxo-Bindungen und vielleicht mit dem Vorliegen von 5fach koordiniertem Mn(III) zu erklären ist.) Die anfängliche Zunahme der mittleren Mn-O/N-Bindungslänge um 0,04 Å infolge der Röntgenbestrahlung könnte ein Indiz für die Verlängerung der Bindungen nur eines Mangans um 0,15 Å sein. Das würde bedeuten, dass 5 min Bestrahlungsdauer zu einer Ein-Elektronen-Reduktion des sich ursprünglich im S_1 -Zustand befindenden Mangankomplexes führt. Dieses Resultat ist kompatibel mit den Ergebnissen der Kantenpositionsanalyse. Die schnelle Reduktionsphase führt anscheinend zur Bildung des S_0^* -Zustandes.

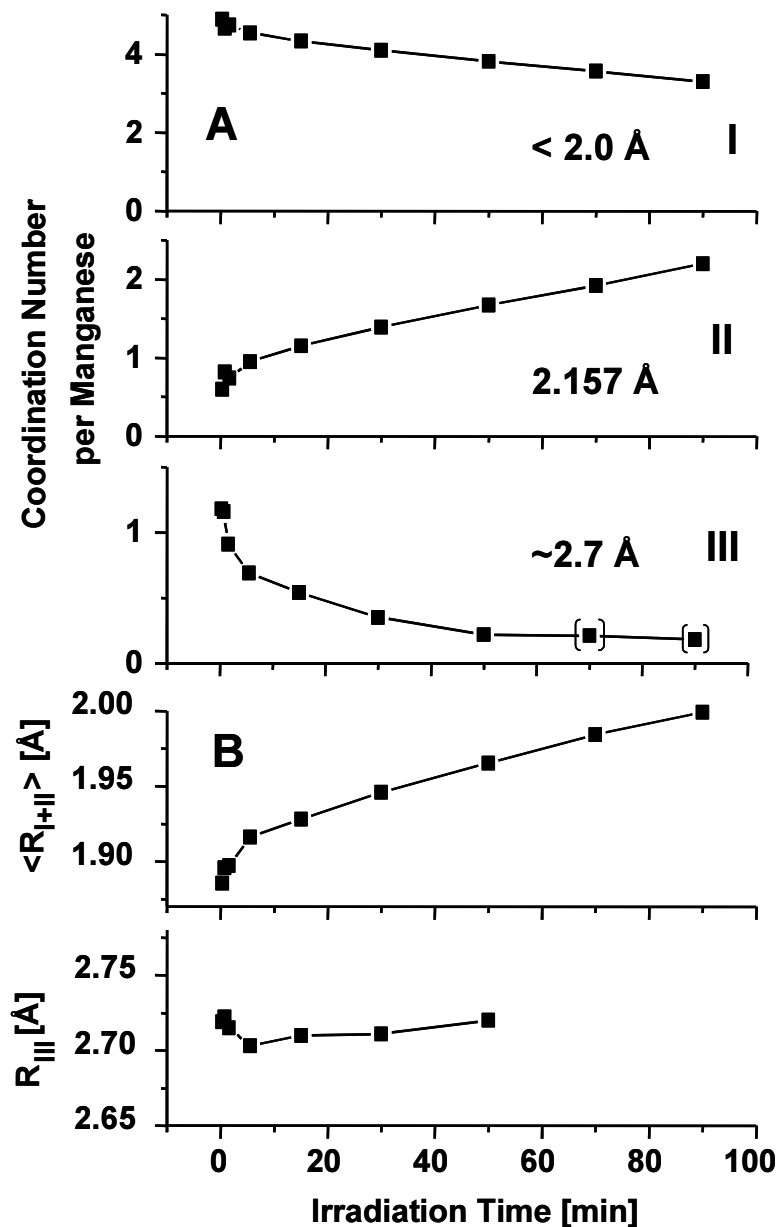


Abbildung 3.9: Simulationsergebnisse der EXAFS-Spektren für verschiedene Bestrahlungszeiten bei 20 K mit einem 3-Schalen Ansatz. A: Zahl der Rückstreuer der drei Koordinationsschalen bei $< 2,0 \text{ \AA}$ (I), $\sim 2,16 \text{ \AA}$ (II) und $\sim 2,7 \text{ \AA}$ (III). B: Mittlere Absorber-Rückstreuer-Distanz für die Schalen I und II (oben) und Distanz zum Rückstreuer in Schale III (Mangan bei ca. $2,7 \text{ \AA}$); für Bestrahlungszeiten > 50 min war eine verlässliche Distanzbestimmung aufgrund der geringen Rückstreumplitude nicht möglich (Datenpunkte in Klammern in A III).

Die Simulation der $2,7 \text{ \AA}$ -Distanz erfolgte unter Verwendung eines gemeinsamen Debye-Waller-Parameters (σ_{III}) für alle 10 EXAFS-Spektren. Ein alternativer Ansatz mit variablen σ -Werten zeigte keine signifikante Zeitabhängigkeit dieses Parameters. Insbesondere zeigte sich keinerlei Zunahme des Debye-Waller-Parameters innerhalb der schnellen Reduktionsphase. Wie in Abbildung 3.9 gezeigt, ändert sich auch die Mn-Mn-Distanz nur unwesentlich. Im Gegensatz dazu hat sich die scheinbare Koordinationszahl (N_{III} , $\sim 2,7 \text{ \AA}$)

nach 5,5 min Bestrahlung um rund 50 % verringert (von 1,2 auf 0,65). Unter Annahme zweier Mn-Mn-Vektoren von 2,7 Å im nativen S₁-Zustand des Mangankomplexes (entsprechend zweier Paare di-μ-oxo-verbrückter Mn-Ionen) lässt sich diese 50 %ige Abnahme der Koordinationszahl mit dem Verlust oder der Modifikation einer der di-μ-oxo-Brücken nach ~5 min Bestrahlung erklären. Die Auflösung der zweiten di-μ-oxo-Brücke vollzieht sich wesentlich langsamer.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass selbst bei Temperaturen von 10 K die Röntgenbestrahlung des Mangankomplexes eine Reduktion der Mangan-Ionen auslöst, die mit erheblichen strukturellen Änderungen verbunden ist. Diese Veränderungen beinhalten nicht nur eine Vergrößerung der Mn-Ligand-Bindungslängen infolge der Manganreduktion, sondern ebenso chemische Veränderungen (Auflösung und Bildung von Bindungen), die zur Modifikation oder dem Verlust von di-μ-oxo-Brücken führen.

3.4 Diskussion

Röntgeninduzierte Photoreduktion – Oxidationszustand

Die initiale Phase der Photoreduktion des PSII-Mangankomplexes im S₂-Zustand ist gegenüber dem S₁-Zustand wesentlich beschleunigt (Abbildung 3.2). Selbst im S₁-Zustand ist die Reduktionsrate wesentlich höher als in anderen Metallo-Proteinen. Bei tiefen Temperaturen bewirkt die Bestrahlung von S₁-Proben eine schnelle Ein-Elektronen-Reduktion zum S₀*-Zustand, die weitere Photoreduktion ist um einen Faktor von 100 verlangsamt (Abbildung 3.3 (B)) und führt letztlich zu einem Oxidationszustand nahe dem Mn(II)-Niveau.

Das (geschätzte) Redoxpotential des Mangankomplexes ist ungewöhnlich hoch (~ +1 V, [Vass und Styring 1991]). Es kann davon ausgegangen werden, dass der Übergang vom S₁ zum S₂-Zustand mit einer Zunahme, der Übergang vom S₁ zum S₀*-Zustand mit einer Abnahme des Redoxpotentials verbunden ist. Das Redoxpotential des schließlich erreichten Mn(II)-Zustandes ist wahrscheinlich relativ gering (< 0 V). Diese Beobachtungen legen eine Abhängigkeit der Empfindlichkeit gegenüber röntgeninduzierter Photoreduktion vom Redoxpotential nahe. Diese Vermutung wird durch neuere Untersuchungen zur röntgeninduzierten Veränderung in Proteinkristallen gestützt, die die Existenz von Zentren besonders großer Empfindlichkeit zeigen. Die untersuchten Proteine, die keine katalytischen Metallzentren enthielten, wurden bei 100 K bestrahlt, und die Strukturänderungen auf Basis der Änderungen im Beugungsmuster analysiert [Weik *et al.* 2000, Burmeister 2000, Leiros *et al.* 2001]. Typischerweise kommt es zuerst zum Aufbrechen von Disulfid-Brücken, gefolgt von Änderungen an Carboxylgruppen (Asparaginsäure, Glutaminsäure). Innerhalb eines Proteins können individuelle Tyrosine besonders sensitiv oder insensitive sein [Burmeister 2000]. In [Weik *et al.* 2000] wird die besonders große Strahlungsempfindlichkeit eines speziellen Histidins, welches Teil einer sogenannten katalytischen Triade ist, gezeigt. Redox-inerte Aminosäurereste sind kaum von der Strahlungseinwirkung betroffen, während potenziell redox-aktive und besonders elektrophile Zentren (z.B. Disulfidbrücken) reduziert werden.

Schon vor den oben erwähnten kristallografischen Untersuchungen gab es Experimente zur Strahlenschädigung durch Gamma- oder Partikelstrahlung in biologischen Makromolekülen. Eine Übersicht über diese frühen Untersuchungen findet sich in [Sonntag 1987]. Durch EPR-Spektroskopie wurde festgestellt, dass Elektronen durch elektrophile Zentren (reduzierbare Metallzentren, Disulfidbrücken) eingefangen werden [Jones *et al.* 1987]. Man kann

schlussfolgern, dass die außergewöhnlich große Empfindlichkeit des Mangankomplexes und die S-Zustandsabhängigkeit der Photoreduktion auf eine Abhängigkeit vom Redoxpotential zurückzuführen sind: je größer das Redoxpotential ist, umso größer ist die Rate der Photoreduktion.

Die Kenntnis der quantitativen Beziehung zwischen dem Redoxzustand und der Rate der Photoreduktion könnte zu einer spektroskopischen Methode zur Untersuchung redoxaktiver Kofaktoren führen, die aufgrund ihrer Lokalisierung im Innern des Proteins einer direkten Untersuchung nicht zugänglich sind (Redoxtitration). Nach Kalibrierungsexperimenten könnte die Rate der Photoreduktion eine Abschätzung des Redoxpotentials liefern.

Temperaturabhängigkeit und Proteindynamik

In Abschnitt 3.3 wurde die Temperaturabhängigkeit der Ratenkonstante der Photoreduktion zum Mn(II)-Zustand ermittelt (langsame Phase, k_{slow}). Diese Ratenkonstante nimmt von $\sim 0,01 \text{ min}^{-1}$ bei 10 K bis $\sim 1 \text{ min}^{-1}$ bei 300 K zu. Interessanterweise ist der Temperaturverlauf zweiphasig mit einer Übergangstemperatur bei etwa 200 K. Oberhalb 200 K ist der Anstieg von $k_{\text{slow}}(T)$ mehr als verzehnfacht (Abbildung 3.5 (A)). (Ein zweiter, kleinerer Anstieg von k_{slow} um einen Faktor 4-5 findet sich zwischen 100 und 150 K, soll hier aber nicht weiter diskutiert werden.)

Temperaturabhängigkeiten, ähnlich der hier beobachteten, wurden in Untersuchungen zur Proteindynamik öfter gefunden. Die Temperaturabhängigkeit der mittleren quadratischen Abweichung (Debye-Waller-Parameter $\sigma^2 = \langle \Delta x^2 \rangle$) von proteingebundenem Eisen [Parak *et al.* 1982, Keppler *et al.* 2000], von Wasserstoffatomen [Doster *et al.* 1989, Ferrand *et al.* 1993], von Methyl-Seitenketten [Lee und Wand 2001], von spezifischen Proteinatomen und assoziierten Wassermolekülen [Teeter *et al.* 2001] und des Elektronentransfers zwischen den Plastochinonen Q_A und Q_B des Photosystems II [Garbers *et al.* 1998] ist untersucht worden. In allen Experimenten wurde eine Übergangstemperatur bei etwa 200 K gefunden. Die relative Größe des Anstiegs zwischen 10 und 200 K und zwischen 200 und 290 K sind ähnlich für den in Untersuchungen zur Proteindynamik gefunden Debye-Waller-Parameter und der Ratenkonstanten k_{slow} der Photoreduktion. Die starke Zunahme in der mittleren quadratischen Abweichung ab 200 K wird durch das Einsetzen anharmonischer, proteinspezifischer Fluktuationen erklärt (sogenannter Protein-Glass-Übergang).

[Weik *et al.* 2001] erklären das unterschiedliche Ausmaß strahlungsinduzierter Modifikationen in Proteinen bei 100 und 150 K mit dem Einfluss einer proteinspezifischen Dynamik und schlägt vor, spezifische Strahlenschädigung zur Untersuchung der Proteindynamik einzusetzen. Aus dem Studium der strahlungsinduzierten Veränderungen des Einheitszellvolumens leiten [Ravelli *et al.* 2002] ab, dass Radikale, die bei 160 K unmobilität sind, bei 180 K signifikante Beweglichkeit erlangen.

Die in dieser Arbeit gefundene Temperaturabhängigkeit der Photoreduktion legt nahe, dass proteinspezifische Bewegungen einen Einfluss auf die Strahlungschemie besitzen, wahrscheinlich durch Beeinflussung der Elektronentransferschritte, die zur Reduktion des Metallkomplexes führen. Dieses Ergebnis ist erwähnenswert, da eine ähnlich klare Korrelation zwischen der Rate eines physiko-chemischen Prozesses (Reduktion des Metallzentrums) und der gut untersuchten Temperaturabhängigkeit der Proteindynamik bisher nicht berichtet wurde.

Zusammenhang zwischen Photoreduktion und Photonenfluss

Wie in Abbildung 3.7 zu sehen, ist die Rate der Photoreduktion proportional zum Photonenfluss, was heißt, dass die akkumulierte Strahlendosis (integrierte Zahl der absorbierten Photonen) das Ausmaß der Photoreduktion bestimmt, und nicht die Dosis-Rate, d. h. die benötigte Zeit dabei keine Rolle spielt.

Die Beziehung zwischen Dosis, Dosis-Rate (oder Photonenfluss) und strahlungsinduzierten Veränderungen ist vielfach untersucht worden (meistens bei 100 K). [Sliz *et al.* 2003] finden eine lineare Beziehung zwischen Strahlenschädigung in Proteinkristallen und Photonenfluss. Aber auch Abweichungen von dieser Linearität werden berichtet [Teng und Moffat 2000]. Ein Problem dabei ist, eine geeignete Definition für die Stärke der Strahlenschädigung zu finden. Insgesamt geben die kristallografischen Untersuchungen gute Indizien für eine Proportionalität zwischen der Rate der Strahlenschädigung und der Röntgenstrahlintensität (bzw. dem Photonenfluss).

Diese Proportionalität bedeutet auch, dass es nicht möglich ist, die Strahlenschädigung durch eine Verkürzung der Bestrahlungsdauer durch den Einsatz besonders hoher Photonenflüsse zu reduzieren.

Mechanismen der Photoreduktion

Die röntgenstrahlinduzierte Photoreduktion ist nur unzureichend verstanden, aber einige Aspekte können auf der Basis von Abschätzungen und den verfügbaren experimentellen Ergebnissen diskutiert werden.

In den verwendeten PSII-Proben (partiell getrocknete Membranpartikel) kommen etwa 10^5 leichte Atome (C, O, N, Wasserstoff wird wegen seines geringen Absorptionsquerschnittes vernachlässigt) auf einen Mangankomplex (4 Mangan-Atome). Bei Energien oberhalb der Mangan-K-Kante (~ 6700 eV) ist der Absorptionsquerschnitt der leichten Atome $\mu_{C,O,N}$ in etwa 40 mal kleiner als der Absorptionsquerschnitt von Mangan μ_{Mn} . Das bedeutet, dass weniger als 0,2 % der absorbierten Photonen vom Mangan absorbiert werden. Selbst an der Probenoberfläche werden innerhalb einer Bestrahlungsdauer von einer Stunde bei einem Photonenfluss von 10^{12} Photonen/mm²s nur 1,5 % der Mn-Atome getroffen. Das heißt, dass die Absorption von Röntgenphotonen durch Mangan als relevanter Faktor für strahleninduzierte Veränderungen vernachlässigt werden kann.

Unterhalb 10 keV ist Compton-Streuung vernachlässigbar und das relevante primäre Ereignis ist Photoionisation, hauptsächlich werden innere Elektronen von C, O, und N freigesetzt. Bei einer Photonenenergie von 6700 eV besitzt das emittierte Photoelektron eine kinetische Energie von etwa 6200 eV und löst eine Kaskade sekundärer Ionisationen aus, die zur Bildung von Kationenradikalen, Anionenradikalen und angeregten Zuständen führt. Wenn man annimmt, dass 25 eV pro Ionisation benötigt werden, führt die Absorption eines Röntgenquantens zur Bildung von ungefähr 250 Radikalpaaren. Die massive Radikalpaarbildung in bestrahlten PSII-Proben wurde durch EPR-Spektroskopie nachgewiesen [Dau *et al.* 1997].

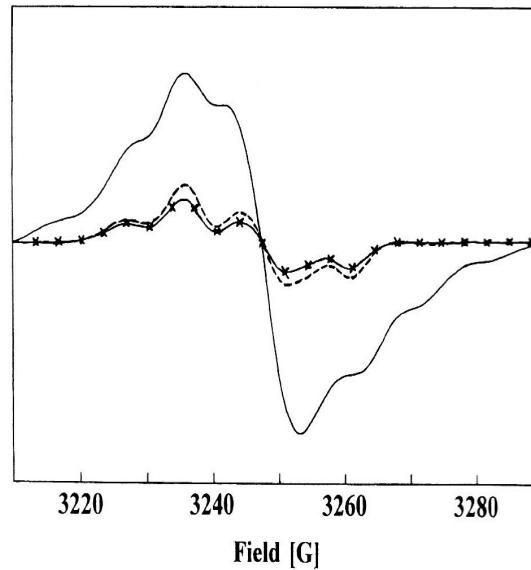


Abbildung 3.10: Erste Ableitung der X-Band-Spektren von PSII-Membranpartikeln, gemessen vor Röntgenbestrahlung (Kreuze), nach Röntgenbestrahlung (durchgezogene Linie) und nach Röntgenbestrahlung und anschließender 5-minütiger Lagerung bei Raumtemperatur. Die Spektren wurden bei 20 K aufgenommen (Mikrowellenleistung 2 μ W). (Entnommen aus [Dau *et al.* 1997])

Das EPR-Spektrum in Abbildung 3.10 zeigt, dass ein großer Teil der gebildeten Radikale bei 100 K stabil ist. Als intrinsischer Standard zur Quantifizierung der erzeugten Radikale wurde das stabile EPR-Signal des redoxaktiven Tyrosin-D (das sogenannte Tyr_D^\bullet -Signal (oder Signal II), [Andersson und Styring 1991, Barry und Babcock 1987]) des Photosystems II verwendet, das vor der Bestrahlung in 70-80 % der PSII-Zentren vorlag. Die Probe (oder ein Teil der Probe) wurde für 12 Stunden bei 18 K einer Röntgenstrahlung von 6400-7200 eV ausgesetzt. Die totale Rate der absorbierten Röntgenquanten betrug dabei etwa 2×10^9 pro s, was zu einer integrierten Dosis von $\sim 10^{14}$ Photonen führte. Die doppelte Integration des Tyr_D^\bullet -Signals und des Signals der strahlungsinduzierten Radikale zeigt, dass etwa 10 EPR-detektierbare stabile Radikale pro Tyr_D^\bullet erzeugt wurden. Die Zahl der EPR-detektierbaren Tyr_D^\bullet betrug etwa 10^{15} [Dau *et al.* 1997]. Das heißt, es wurden etwa 100 Radikale pro absorbiertem Röntgenphoton erzeugt, die durch EPR nachweisbar waren. Die Radikale wurden bei 18 K erzeugt und die EPR-Messungen erfolgten, nachdem die Proben 1-2 Wochen bei 77 K gelagert wurden. Wenn die Proben 5 min Raumtemperatur ausgesetzt wurden, kam es zu einem fast vollständigen Verschwinden des EPR-Signals der strahlungserzeugten Radikale, was darauf schließen lässt, dass bei Raumtemperatur die große Mehrzahl der Radikale durch Rekombination oder chemische Prozesse, die zu nichtdetektierbaren Spezies führt (z.B. H_2), verschwinden. Jedes absorbierte Röntgenphoton führt zur Erzeugung mehrerer hundert Radikalen, von denen unterhalb 100 K etwa 100 stabil sind, während bei Raumtemperatur die Mehrzahl der Radikale verschwindet.

Wie führen die Erzeugung von Photoelektronen an leichten Atomen und die sich anschließende Radikalerzeugung zur Reduktion des Metallzentrums? Die Temperaturabhängigkeit lässt darauf schließen, dass die Photoreduktion thermisch aktiviert und eng mit der Beweglichkeit der Proteinmatrix verknüpft ist. Eine relativ langsame und thermisch aktivierte Radikalmigration oder -chemie könnte die beobachtete Temperaturabhängigkeit erklären. Allerdings hängt das Ausmaß der Photoreduktion

hauptsächlich von der akkumulierten Strahlendosis ab, und nicht von der Zeit, die nach dem Absorptionsereignis vergangen ist. Radikalmigration oder chemische Prozesse, die auf einer Sekunden- oder Minutenskala vor sich gehen, scheinen die Reduktionsrate nicht zu beeinflussen. Ein thermisch aktivierter Reduktionsprozess, der mit einer schnellen Relaxation konkurriert, könnte beides, Temperatur- und Photonenflussabhängigkeit, erklären. Eine Hypothese hinsichtlich der stattfindenden Prozesse wird im folgenden erläutert.

Schritt 1 – Absorption und Emission eines Photoelektrons. Die Absorption eines Röntgenphotons durch eines der leichten Atome (vorwiegend C, O, N) führt zur Emission eines Photoelektrons mit hoher kinetischer Energie.

Schritt 2 – Excitationskaskade. Dieses hochenergetische Elektron löst eine Kaskade von Ionisationen und Anregungen aus, bei der einige hundert Kationen- (G_1^+) und Anionenradikale (G_1^-) sowie angeregte Zustände neutraler Gruppen (G_1^*) entstehen. Auch die gebildeten Radikale können in angeregter Form vorliegen (G_1^{+*} , G_1^{-*}). Durch schnelle Rekombinationsprozesse wird die Zahl der angeregten Radikale reduziert, was zu einer Erhöhung der Konzentration angeregter Zustände (G_1^*) führt.

Schritt 3 – Elektronentransfer in Konkurrenz zum Zerfall angeregter Zustände. Der Zerfall angeregter Zustände umfasst strahlungslose thermische Deaktivierung, strahlenden Zerfall (Lumineszenz) oder die Initiierung von Elektronentransfer-Prozessen. Elektronentransfer ist von der thermischen Bewegung der Proteinmatrix und damit von der Temperatur abhängig (Marcus-Theorie). Elektronentransfer findet auch zwischen den initial gebildeten Radikalen statt (G_1^+ , G_1^-) und trägt somit zu einer Radikalrekombination bei. Aber auch Gruppen, die nicht in die primären Reaktionen involviert waren (G_2) können als Donoren und Akzeptoren dienen, was zur Bildung von G_2^+ und G_2^- führt.

Schritt 4 – Nachfolgende Radikalchemie bei höheren Temperaturen. Bei tiefen Temperaturen ist ein großer Teil der gebildeten Radikale stabil, während bei höheren Temperaturen eine Radikalchemie einsetzt, die das Verschwinden des größten Teils der Radikale zur Folge hat. Diese Radikalreaktionen finden bei Raumtemperatur größtenteils im μ s- und ms-Bereich statt, so dass die Rate der Produktbildung linear von der Röntgenstrahlintensität abhängt. Nur für ungewöhnlich langsame Prozesse ist ein nichtlineares Verhalten zu erwarten.

Photoreduktion zum S_0^* -Zustand

Die Bestrahlung von Metalloproteinen ist benutzt worden, um das Metallzentrum zu reduzieren und vermutete Intermediatzustände des katalytischen Zyklus zugänglich zu machen [Berglund *et al.* 2002]. In diesen Studien wird davon ausgegangen, dass durch kontrollierte Bestrahlung verschiedene Zustände des Metallzentrums erreicht werden können, bevor eine signifikante Modifikation anderer Teile des Proteins einsetzt. Die in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen weisen darauf hin, dass diese Herangehensweise vermutlich auch auf den PSII-Mangankomplex anwendbar ist.

Ausgehend vom S_1 -Zustand führt eine Ein-Elektronen-Reduktion schnell zu Bildung des S_0^* -Zustandes. Das zeigt sich nicht nur in der ausgeprägten biphasigen Verschiebung der Mangan-K-Kante (Verhältnis k_{fast} zu k_{slow} von 100, Abb. 3.7). Auch die Analyse der EXAFS-Spektren zeigt, dass mit der schnellen Reduktionsphase spezifische Strukturänderungen verbunden sind (Abbildung 3.9). Diese Änderungen beinhalten die Verlängerung des mittleren Abstandes zwischen dem Mangan und den Atomen der ersten Koordinationsschale, wie bei einer Mn-Reduktion zu erwarten ist. Bemerkenswerter ist, dass die Amplitude der 2,7 Å-EXAFS-Oszillation um 50 % reduziert wird, was auf die Modifizierung einer der di- μ -oxo-Brücken des Mangankomplexes hindeutet. Dieses beobachtete Verschwinden einer di- μ -oxo-

Brücke könnte durch die Protonierung eines der verbrückenden Sauerstoffatome erklärt werden. In diesem Fall wäre eine Mn-Mn-Distanz von 2,85 Å für den Mn-(μ -O)(μ -OH)-Mn-Dimer und eine Distanz von 2,70 Å für den Mn-(μ -O)₂-Mn-Dimer zu erwarten [Baldwin *et al.* 1994]. In der EXAFS-Analyse wäre diese Struktur durch eine mittlere Distanz von ~2,77 Å und einen vergrößerten Debye-Waller-Parameter charakterisiert. Nichts von beidem wird beobachtet, was die Formierung einer μ -hydroxo-Brücke unwahrscheinlich macht. Im Gegensatz dazu ist der komplette Verlust eines verbrückenden Sauerstoffs, z.B. durch Umwandlung eines verbrückenden Sauerstoffatoms in ein terminales, mit den EXAFS-Daten kompatibel. In diesem Fall würde man eine Distanzverlängerung auf über 3 Å erwarten, ein Abstand, der in dem verwendeten Simulationsansatz nicht berücksichtigt wird (siehe oben und [Dau *et al.* 2003]). Am wahrscheinlichsten ist demnach die Umwandlung einer di- μ -oxo-Brücke in eine mono- μ -oxo-Brücke beim Übergang vom S₁- zum S₀*-Zustand.

Die EXAFS-Resultate für den durch Photoreduktion erzeugten S₀*-Zustand können mit denen des nativen S₀-Zustand verglichen werden, der durch Anwendung von drei kurzen, sättigenden Lichtblitzen, ausgehend vom dunkelstabilen S₁-Zustand populierte wird. Auch für den nativen S₀-Zustand wird eine Abnahme des zum 2,7 Å-Vektors gehörenden Fouriersignals beobachtet. Die EXAFS-Simulation zeigt, dass dieses Verschwinden mit dem Auftauchen einer Mn-Mn-Distanz von 2,8-2,9 Å gekoppelt ist [Dau *et al.* 2001, Dau und Haumann 2004]. Beide Zustände S₀ und S₀* sind also, verglichen mit dem S₁-Zustand, durch den Verlust eines 2,7 Å-Vektors charakterisiert, der zwei Mn-Ionen verbindet. Der durch Blitzanwendung populierte S₀-Zustand enthält bei Raumtemperatur möglicherweise eine einfach protonierte di- μ -oxo-Brücke, die zu einer Mn-Mn-Distanz von ~2,8 Å führt, welche beim Übergang vom S₀ zum S₁ deprotoniert wird, was zu einer Reduzierung der Mn-Mn-Distanz auf 2,7 Å führt. Im Fall des S₀*-Zustandes ist es aber wahrscheinlicher, dass die di- μ -oxo-Brücke des S₀- in eine mono- μ -oxo-Brücke im S₀*-Zustand umgewandelt wird. Ursache für diese Differenz zwischen S₀ und S₀* kann die unterschiedliche Temperatur sein. Bei Raumtemperatur scheint der S₀ → S₁-Übergang elektroneutral zu sein, vermutlich durch die neutralisierende Bewegung einer positiven Ladung weg vom Mangankomplex, wahrscheinlich in Form eines Deprotonierungsprozesses. Bei tiefen Temperaturen sind Protonenbewegungen über weite Distanzen unwahrscheinlich, und die unprotonierte di- μ -oxo-Brücke des S₁-Zustandes wird auf andere Weise modifiziert. Beide Zustände S₀ und S₀* unterscheiden sich vom S₁ durch die Art der Mn-Mn-Verbrückung, was darauf hindeutet, dass für den S₀ → S₁-Redoxübergang eine Änderung der Verbrückung zwingend ist.

Artefakte in XAS an biologischen Proben und Proteinkristallografie

Ein bedeutender Unterschied in der Photoreduktion zwischen Raum- und Tieftemperatur zeigt sich in der initialen Phase des Prozesses. Diese Phase ist bei 10-20 K gegenüber der sich anschließenden langsamen Phase um einen Faktor von 100 beschleunigt. Bei Raumtemperatur dagegen findet man eine initiale Verzögerungsphase, deren Ursprung nicht bekannt ist. Hinsichtlich des Ziels in XAS-Experimenten am nativen Mangankomplex Daten zu erfassen, die nicht wesentlich durch die Photoreduktion verfälscht werden, sollte während der Messung in maximal 10-30 % der Photosysteme eine Ein-Elektronen-Reduktion stattfinden (10 % Kantenbereich, 30 % am Ende der EXAFS-Region). Daraus resultiert für Messungen an der *high-flux*-Beamline für die Aufnahme eines kompletten Absorptionsspektrums ein Zeitfenster von etwa 10 s bei Raumtemperatur (Abbildung 3.4) und etwa 20 s bei Temperaturen von 10-20 K (Abbildung 3.3). Für den S₂-Zustand reduziert sich das Zeitfenster für beide Temperaturen um einen Faktor von 2-3. Eine signifikante Verzögerung der initialen Photoreduktion durch Messungen bei Tieftemperaturen kann, entgegen der intuitiven

Erwartung, nicht erreicht werden, was ein wichtiges Ergebnis hinsichtlich der Wahl geeigneter Messstrategien darstellt.

Zur Illustration der Probleme die sich bei XAS-Experimenten infolge der Strahlenschädigung ergeben können, wird eine fiktive Beamline mit einem Photonenfluss von 10^{10} - 10^{11} $\text{s}^{-1}\text{mm}^{-1}$ betrachtet. Ein oft verwendetes Kriterium zur Beurteilung der Strahlenschädigung ist der Vergleich der XANES-Spektren, die durch aufeinander folgende Messungen auf der selben Stelle der Probe gewonnen werden. Konventionelle XAS-Datenerfassungsprotokolle beinhalten Bestrahlungszeiten von 15-60 min pro Spektrum. Typischerweise wird der Vorkantenbereich zuerst erfasst (Messung von niedrigen zu hohen Energien). Das bedeutet, dass eine schnelle $S_1 \rightarrow S_0^*$ -Phase in der Photoreduktion stattgefunden haben kann, bevor der Kantenbereich erfasst wird, so dass diese Phase nicht detektiert wird. Kontrollexperimente, die eine Abschwächung des Röntgenstrahls beinhalten, sind notwendig, um solche strahlungsbedingten Artefakte zu minimieren.

Die hier gemachten Untersuchungen beziehen sich auf einen speziellen Typ von Photosystem-Präparationen: weitgehend dehydrierte Mehrfachschichten (*multilayers*) PSII-angereicherter Membranpartikel (BBY, [Berthold *et al.* 1981]). Wie oben erwähnt, ist die initiale Phase der Photoreduktion in anderen Metalloproteinen um mindestens eine Größenordnung langsamer. Obwohl es dafür keine Hinweise gibt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Typen von PSII-Präparationen ein anderes Photoreduktionsverhalten zeigen. Zum Beispiel könnte ein höherer Wasseranteil oder ein geringerer Anteil an Lipiden (PSII-Kernkomplexe, PSII-Kristalle) die Reduktionsrate beeinflussen. Ebenso ist es möglich, dass die Verwendung von Glycin-Betain, welches proteinstabilisierend wirkt und als Kryo-Protector dient, die Photoreduktion beeinflusst. Es ist also offen, inwieweit die hier gewonnenen Erkenntnisse auf andere Typen von PSII-Proben oder andere Metalloproteine übertragbar sind. Für jedes spezifische Röntgenexperiment sind Kontrollversuche angebracht, um unvorhergesehene Effekte infolge der Strahlenschädigung zu vermeiden.