

# Kapitel 2

## Die Struktur des Mangankomplexes im $S_1$ -Zustand

**Zusammenfassung:** Nur die Bestimmung der Struktur des PSII-Mangankomplexes mit atomarer Auflösung für die verschiedenen Zwischenzustände des S-Zyklus ermöglicht ein umfassendes Verständnis der Mechanismen der photosynthetischen Wasseroxidation. Der erste Schritt hierzu ist die Aufklärung der Struktur im  $S_1$ -Zustand, wie sie durch EXAFS-Spektroskopie und Protein-Kristallographie betrieben wird. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse beider Methoden in Bezug auf den Mangankomplex zusammengefasst und kritisch diskutiert. Es wird der Einfluss der Normierung der EXAFS-Daten auf die Bestimmung der Koordinationszahlen untersucht. Dabei kann gezeigt werden, dass die Anzahl der Mn-Mn-Vektoren mit einer Länge von etwa 2.7 Å im  $Mn_4Ca$ -Komplex mit hoher Wahrscheinlichkeit 2 beträgt. Das Vorhandensein dieser und weiterer Distanzen (Mn-Mn bei 3.1 Å und Mn-Ca bei 3.3 Å) sowie ihre Orientierung sind mit den vorliegenden Kristallstrukturen [Zouni et al., 2001; Kamiya und Shen, 2003; Ferreira et al., 2004] verträglich. Unter Berücksichtigung ausgeprägter Photoreduktion im Verlauf der kristallographischen Datenerfassung ist jedoch davon auszugehen, dass die veröffentlichten Elektronendichteverteilungen nicht dem intakten  $S_1$ -Zustand des Mangankomplexes, sondern einem deutlich veränderten reduzierten Zustand entsprechen. Eine gemeinsame Modellierung von EXAFS- und Kristallstrukturdaten wäre daher noch verfrüht. Es werden die beiden Strukturmodelle vorgestellt, die mit den 2.7-Å-Distanzen vereinbar sind und es werden Möglichkeiten ihrer Anordnung diskutiert.

### 2.1 Einleitung

Der Mangankomplex, der in einem energetisch aufwändigen und komplexen Redoxprozess Wasser unter Freisetzung von Protonen in molekularen Sauerstoff umwandelt, ist für die photosynthetische Energiegewinnung und wegen der Bildung des atmosphärischen Sauerstoffs für das Dasein aller aeroben Lebensformen von zentraler Bedeutung.

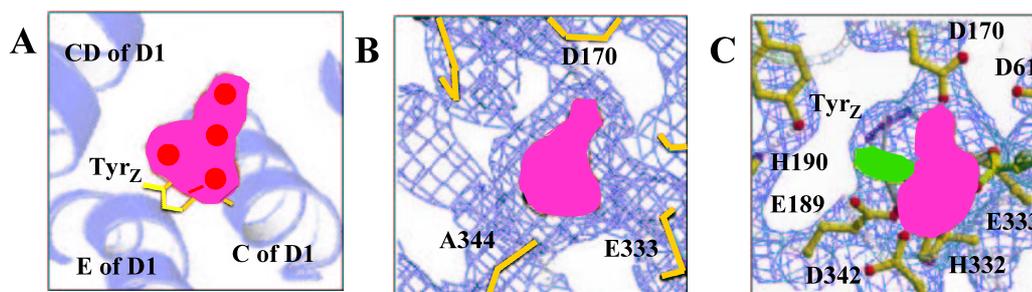
Der sogenannte S- oder Kok-Zyklus wurde 1970 von Kok et al. beschrieben [Kok et al., 1970] und besteht aus fünf Zwischenzuständen:  $S_0 \dots S_4$ . Kok et al. folgerten ihr Modell aus Messungen der Sauerstoffentwicklung von PSII-Präparationen unter sequentieller Beleuchtung mit kurzen Lichtblitzen. Sie entdeckten, dass die Sauerstoffentwicklung nur alle vier Blitze stattfand und nicht, wie man hätte annehmen können, bei jedem Blitz. Die Rate der Sauerstoffentwicklung zeigte also eine charakteristische Oszillation mit der Periode von vier Blitzen, die später auch mit verschiedenen spektroskopischen Techniken

beobachtet wurde. Die Zustände  $S_0$  bis  $S_3$  sind im Minutenbereich stabil und in Messungen separierbar, während der  $S_4$ -Zustand ein Intermediatzustand ist, der unter Bildung von Sauerstoff sofort reduziert wird. Der  $S_1$ -Zustand ist der thermisch stabilste und liegt daher in dunkeladaptierten Proben vor.

Intensive Forschung mit Methoden der Spektroskopie und Mutagenese haben eine Vielzahl an Informationen über die Wechselwirkung des Mangankomplexes mit den anderen Bestandteilen der Elektronentransportkette des PSII hervorgebracht. Untersucht wurden die Raten des Elektronentransfers zwischen dem Mangankomplex und dem  $Y_Z^{\text{ox}}$  für alle S-Zustandsübergänge [Dekker und van Gorkom, 1987; Lavergne und Junge, 1993], die Protonenfreisetzung [Lavergne und Junge, 1993; Haumann und Junge, 1996], die Bindung von Substratwasser [Hillier und Wydrzynski, 2001] und die Rolle verschiedener Aminosäuren in der Nähe des Mangankomplexes [Debus, 2001; Diner, 2001]. Für die Aufklärung des Mechanismus der Wasserspaltung ist es darüberhinaus von großer Bedeutung, die Geometrie des Komplexes (Anordnung der Kerne) und die wesentlichen Aspekte der elektronischen Struktur (Oxidationszustände) zu kennen. Dies gilt sowohl für den  $S_1$ -Zustand als auch für die intermediären Zustände der Wasseroxidation.

In den letzten Jahren gelang es, die ersten kristallographisch bestimmten Strukturen mit mittlerer Auflösung (3.8 - 3.5 Å) zu erzeugen [Zouni et al., 2001; Kamiya und Shen, 2003; Ferreira et al., 2004]. Die Form desjenigen Teils der Elektronendichte, der dem Mangankomplex zugeordnet wird, ist dabei in allen drei Strukturen ähnlich (Abb. 2.1). In den neuesten Strukturen wurden darüberhinaus Aminosäurereste modelliert, die als Liganden des Mangankomplexes dienen können. Durch Röntgenbeugung bei Energien unterhalb der Mn-K-Kante konnte in [Ferreira et al., 2004] auch bestätigt werden, dass das Kalzium-Ion in der Tat ein integraler Bestandteil des Komplexes ist, wie es zuvor durch EXAFS-Studien gezeigt worden war [Cinco et al., 2002; Müller et al., 2005]. Doch auch die Auflösung im Bereich von 3.2 Å, wie sie kürzlich von [Zouni et al., 2004] erreicht wurde, reicht nicht aus, um die einzelnen Mangan-Ionen zu lokalisieren und die Abweichungen von den angegebenen Positionen kann mehr als 1 Å betragen. Interne Strukturen, wie die Position der Brückenliganden, werden wohl noch für längere Zeit aufgelöst bleiben. Es ist an dieser Stelle wichtig darauf hinzuweisen, dass die Koordinaten der Mangan-Ionen in der Struktur von [Ferreira et al., 2004] nicht ausschließlich auf der Basis der Elektronendichten sondern unter Berücksichtigung der EXAFS-Ergebnisse [Penner-Hahn, 1998; Dau et al., 2001; Robblee et al., 2001; Sauer und Yachandra, 2004] sowie mit Hilfe von DFT-Optimierung festgelegt wurden.

Auch wenn man hoffen darf, dass die Kristallstrukturaufklärung eines Tages eine eindeutige Struktur für den dunkelstabilen  $S_1$ -Zustand liefern wird, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt vor allem die begrenzte Aussagekraft der vorhandenen Daten zu bedenken. Die Datenaufnahme für die Kristallstrukturaufklärung erfolgt an hoch intensiven Undulator-Messplätzen an Synchrotronstrahlungsquellen der dritten Generation. Aus Röntgenabsorptionsmessungen weiß man aber, dass derartige Strahlintensitäten im Bereich von Minuten oder gar Sekunden auch bei tiefen Temperaturen zur Reduktion des Metallzentrums führen [Dau et al., 2004c; Grabolle und Dau, 2005]. Dabei wird die Struktur aus vier hochoxidierten Mangan-Ionen graduell verändert, d.h. es werden  $\mu$ -oxo-Brücken gespalten und die Mangan-Mangan-Distanzen verlängert, bis schließlich freies  $\text{Mn}^{\text{II}}$  gebildet wird, das möglicherweise sogar die Bindungsstelle verlässt [Grabolle und Dau, 2005]. Es ist daher anzunehmen, dass die kristallographisch bestimmten Elektronendichten nicht den  $S_1$ -Zustand widerspiegeln, sondern einen Zustand, in dem alle Mangan-Ionen zu  $\text{Mn}^{\text{II}}$  reduziert sind (für eine Abschätzung der strahlenschädigungsrelevanten Parameter in den kristallographischen Experimenten siehe [Dau et al., 2004c]). Das hier diskutierte Auftre-



**Abbildung 2.1:** Elektronendichten des Mangankomplexes und seiner Umgebung (A) aus [Zouni et al., 2001] bei einer Auflösung von 3.8 Å; (B) aus [Kamiya und Shen, 2003] bei einer Auflösung von 3.6 Å; (C) aus [Ferreira et al., 2004] bei einer Auflösung von 3.5 Å. Die dem Mangankomplex zugeordnete Elektronendichte ist rot dargestellt ( $5\sigma$ ), die wahrscheinlich dem Kalzium entsprechende Elektronendichte in grün. Die Perspektive ist nicht einheitlich, aber zumindest in (B) und (C) ähnlich. Während die Aminosäurereste in der Umgebung des Mangankomplexes in (A) nicht zugeordnet wurden, sind in (B) und (C) mehrere potentielle Liganden angegeben, die nicht in allen Fällen übereinstimmen.

ten von Strahlenschädigung ist schon im  $S_1$ -Zustand ein ernstes Problem. In den höheren S-Zuständen vergrößert sich die Rate der Photo-Reduktion noch einmal drastisch. Diese Zustände sind also wahrscheinlich mit der Methode der Protein-Kristallographie nicht zu bestimmen.

Die Untersuchung des Mangankomplexes mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie wird seit längerem von verschiedenen Gruppen erfolgreich betrieben [Ono et al., 1992; MacLachlan et al., 1994; Penner-Hahn, 1998; Dau et al., 2001; Robblee et al., 2001]. Schon in den ersten Messungen wurden dabei Mangan-Mangan-Abstände von etwa 2.7 Å bestimmt [Kirby et al., 1981a; George et al., 1989], die bis heute ein zentrales Element aller diskutierten Strukturen darstellen. Diese Distanzen sind typisch für Strukturen, in denen höher-valente Mangan-Ionen durch di- $\mu_2$ -oxo-Brücken verbunden sind [Wieghardt, 1989; Mukhopadhyay et al., 2004]. Die Frage, ob auch andere Strukturelemente zu solchen Distanzen führen können, wird im einem der folgenden Abschnitte diskutiert. Weitere strukturelle Information kann durch polarisationsabhängige EXAFS-Messungen an partiell vektoriell orientierten Proben gewonnen werden, wie in Kap. 8 ausführlich gezeigt wird [George et al., 1989; Mukerji et al., 1994; Dau et al., 1995; Schiller et al., 1998; Dau et al., 2001]. Darüberhinaus konnten Untersuchungen der Änderungen von Struktur und Oxidationszuständen viel zum Verständnis des katalytischen Zyklus beitragen [Ono et al., 1992; MacLachlan et al., 1994; Mukerji et al., 1994; Yachandra et al., 1996; Iuzzolino et al., 1998; Penner-Hahn, 1999; Dau et al., 2001; Robblee et al., 2001; Dau et al., 2003; Pospisil et al., 2003; Haumann et al., 2005].

Die folgenden für die Aufstellung eines atomaren Modells des PSII-Mangankomplexes wesentlichen Fragen sollen hier näher besprochen werden: (1) Wie viele Mn-Mn-Vektoren von 2.7 Å Länge liegen im  $S_1$ -Zustand vor? (2) Welche strukturellen Motive kommen in Frage? Sind andere Strukturen als die di- $\mu_2$ -oxo-Brücken mit den Daten kompatibel? (3) Was kann man aus dem Vergleich der XAS-Daten mit den Ergebnissen der Protein-Kristallographie über mögliche Strukturen schließen? Wie stark ist der Einfluss der Photoreduktion auf die kristallographisch bestimmten Strukturen?

## 2.2 Anzahl der 2.7 Å-Mangan-Mangan-Vektoren im S<sub>1</sub>-Zustand

### 2.2.1 Einfluss der Normierung

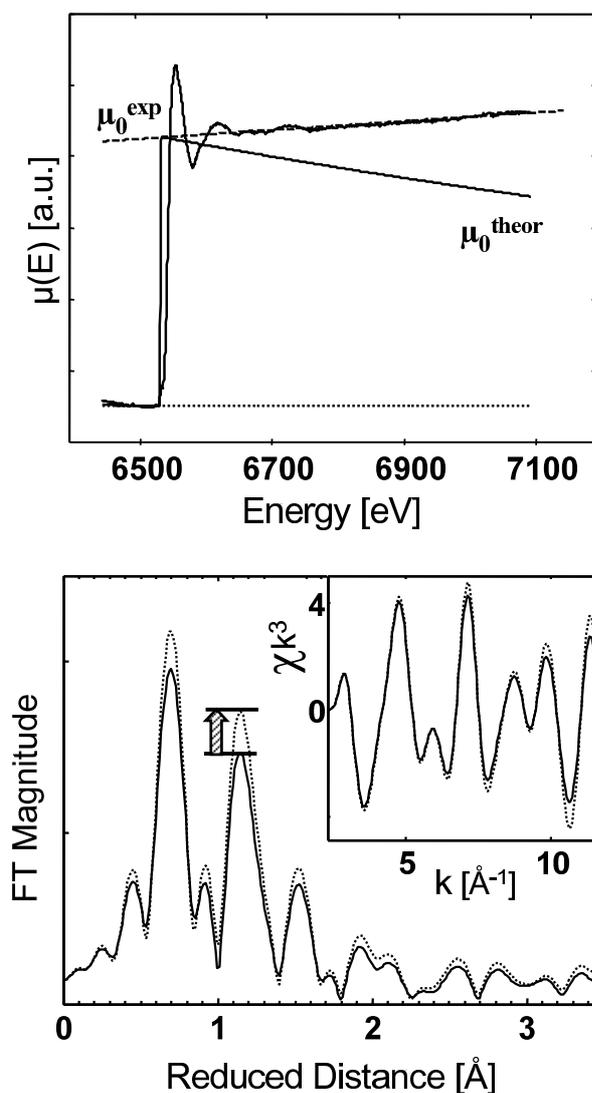
Mangan-Mangan-Abstände von etwa 2.7 Å wurden bereits aus den Daten der ersten EXAFS-Studien am PSII gefolgert [Kirby et al., 1981a; George et al., 1989; Yachandra et al., 1993]. In den meisten Studien wurde darüberhinaus die Anzahl von *zwei* Mn-Mn-Vektoren Mn<sub>4</sub>-Komplex bestimmt [Yachandra et al., 1993; DeRose et al., 1994; Yachandra et al., 1996; Schiller et al., 1998; Dau et al., 2001; Robblee et al., 2001; Haumann et al., 2005]. In einer neueren Arbeit findet sich der Vorschlag, dass die Anzahl von kurzen Mn-Mn-Distanzen im Mangan-Komplex *drei* beträgt [Robblee et al., 2002]. Auch wenn die Bestimmung von Koordinationszahlen mit EXAFS nur eine Genauigkeit von ca. 20 % erreicht, sollten diese beiden Möglichkeiten unterscheidbar sein. Für die Bestimmung der Koordinationszahlen ist unter anderem die Frage der Normierung der Daten von Bedeutung. Wie im Folgenden gezeigt wird, ist die in Kap. 1.3.4 beschriebene Bestimmung des Hintergrundes  $\mu_0$  von besonderer Bedeutung, da das genaue Ergebnis der Koordinationszahlen auch von dieser abhängt.

Aufgrund der geringen Mangankonzentration in PSII-Proben (1 Mn pro 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> O/C/N) ist in Transmissionsspektren die Mangan-Absorptionskante im Vergleich zur Untergrundabsorption verschwindend klein. In BioXAS-Experimenten allgemein und speziell in den Messungen am PSII-Mangankomplex wird daher die durch Absorption des Mangan angeregte Mn-K<sub>α</sub>-Fluoreszenz detektiert. Diese Methode wurde ursprünglich von M. Klein und seinen Mitarbeitern eingeführt [Yachandra et al., 1987]. Unabhängig von der Art der Detektion muss für die quantitative EXAFS-Analyse der Untergrund im Vorkanten-Bereich subtrahiert werden und die Normierung entsprechend  $\mu_{\text{norm}}(E) = \mu(E)/\mu_0(E)$  bzw.  $\chi(k) = \mu_{\text{norm}} - 1$  erfolgen (vgl. Kap. 1.3.4).

Für die Normierung der Spektren existieren nun zwei unterschiedliche Ansätze:

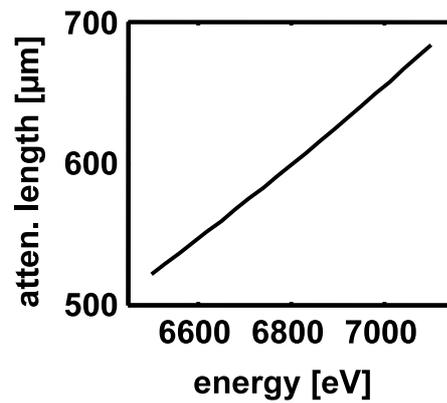
1. *Normierung auf einen theoretischen Untergrund  $\mu_0$ .* Die Höhe des Kantensprungs wird auf 1 normiert und das resultierende  $\mu_{1,0}(E)$  wird durch den theoretisch berechneten Verlauf der Absorption oberhalb der Kante, wie er beispielsweise in [McMaster et al., 1969] tabuliert ist, geteilt. Vor allem für Absorptionsdaten wird fast ausschließlich und mit Erfolg bzw. aus gutem Grund diese Methode angewendet.
2. *Normierung auf einen experimentell bestimmten Untergrund  $\mu_0$ .* Die als EXAFS bezeichneten Oszillationen sind einem Untergrund überlagert, der der Absorption des freien Atoms entspricht. Dieser kann durch die Anpassung einer glatten, langsam veränderlichen Funktion an die experimentellen Daten approximiert werden. Für die Normierung wird das Rohspektrum direkt durch den so bestimmten Untergrund geteilt. Für Fluoreszenz-detektierte Spektren ist dieser Ansatz Vorteile adäquat.

In Abb. 2.2 ist ein unbearbeitetes EXAFS-Spektrum, das an "dicken" Proben (>300 μm) aus PSII-Membran-Stapeln mit einem energieauflösenden Detektor gemessen wurde, gezeigt. Der Untergrund im Bereich vor der Kante ist klein im Vergleich zum Kantensprung und kann, da kein nennenswerter Anstieg zu verzeichnen ist, durch einen konstanten Wert erfasst werden (unterbrochene horizontale Linie in Abb. 2.2 A). Im Bereich oberhalb der Kante nimmt die Absorption mit steigender Energie leicht zu (beschrieben durch den linearen Fit  $\mu_0^{(\text{exp})}$ ), während die tabulierten Werte eine Abnahme der Absorption vorher-sagen ( $\mu_0^{(\text{theor})}$ , Punkt-Linie).



**Abbildung 2.2:** Einfluss der Normierungsprozedur für die EXAFS-Spektren auf die Fourier-Transformierten. Oben: Illustration der in Kap. 2.2.1 beschriebenen Normierungsprozeduren für ein  $S_1$ -Spektrum (gemessen bei einem Winkel von  $55^\circ$  zwischen E-Feld-Vektor und Membrannormalen).  $\mu_0^{(\text{exp})}$  wurde durch einen linearen Fit an die Daten im Bereich von 6600-7100 eV bestimmt,  $\mu_0^{(\text{theor})}$  durch einen skalierten, in [McMaster et al., 1969] tabulierten Verlauf. Unten: Die  $k^3$ -gewichteten und über den Bereich von 1-4 Å Fourier-gefilterten EXAFS-Oszillationen (eingesetzte Graphik) sowie die entsprechenden Fourier-Transformierten (20-540 eV oberhalb 6547 eV), die sich aus den verschiedenen Normierungen ergeben. Der Pfeil verdeutlicht den Unterschied in der Höhe des zweiten Fourier-Peaks, der im Wesentlichen den Mn-Mn-Abständen bei 2.7 Å zuzuordnen ist.

Den Unterschied zwischen den für den Absorptionsverlauf berechneten und dem Fluoreszenz-detektiert gemessenen Verlauf kann man wie folgt erklären: Die Fluoreszenz-anregende Röntgenstrahlung wird durch die große Zahl leichter Atome (vor allem O, C und N) im Protein und im Wasser stark absorbiert. Je höher aber die Anregungsenergie ist, desto geringer wird der Absorptionskoeffizient und desto größer wird die Eindringtiefe (Kehrwert des Absorptionskoeffizienten, Abb. 2.3). Bei niedrigeren Energien werden also weniger Absorber erreicht und angeregt. Daraus resultierend sollte die im Experiment detektierte Röntgenfluoreszenz mit zunehmender Energie ansteigen, im Gegensatz zum abfallenden



**Abbildung 2.3:** Absorptionslänge in Wasser für Röntgenstrahlen mit einer Energie im Bereich der Mn-K-Kante [Henke et al., 1993] (berechnet mit [http://www-cxro.lbl.gov/optical\\_constants/filter2.html](http://www-cxro.lbl.gov/optical_constants/filter2.html)).

$\mu_0^{(\text{theor})}$ . Dieser Effekt ist in Abb. 2.2 deutlich zu erkennen. Da dieselbe Betrachtung jedoch nicht nur für den Untergrund, sondern auch für die EXAFS-Oszillationen selbst gilt, ist es angebracht, für die Normierung den experimentell bestimmten Untergrund  $\mu_0^{(\text{exp})}$  zu verwenden.

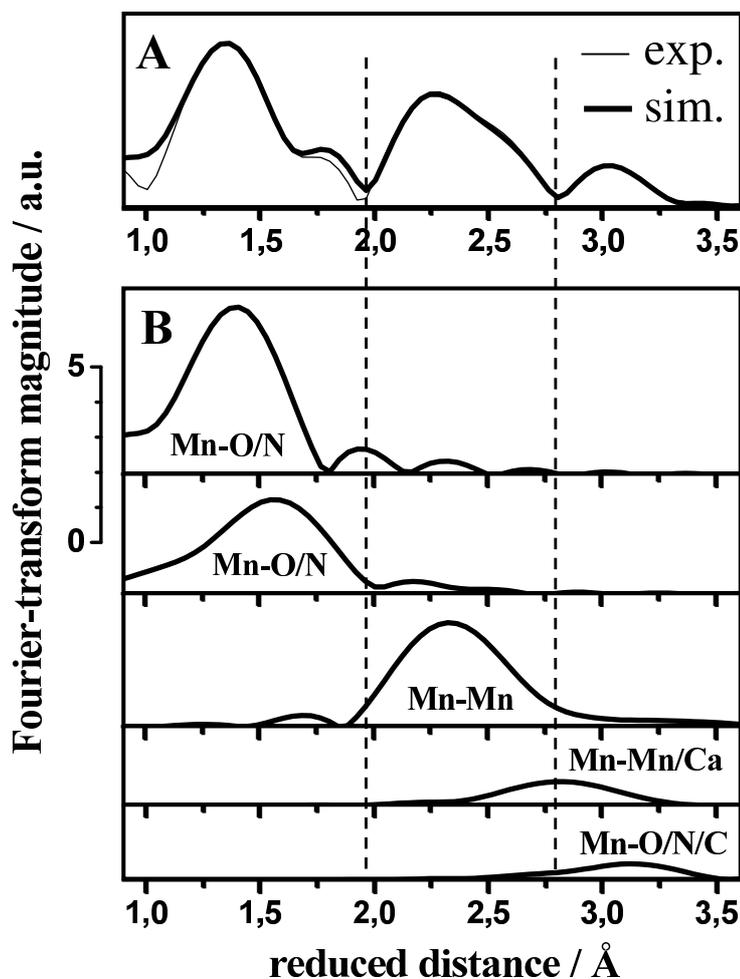
Wie in Abb. 2.2 zu erkennen ist, hängt die Größe der normierten EXAFS-Oszillationen deutlich von der verwendeten Normierungsprozedur ab. Vor allem bei hoher Energie bzw. bei hohen k-Werten ist das der Fall. Die mit dem theoretischen Verlauf normierten Oszillationen sind also vor allem bei hohen k-Werten zu groß, was in der Fourier-Transformierten zu einem Größenunterschied von 20 % im zweiten Peak führt.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die Normierung auf den theoretischen Untergrund in Fluoreszenz-detektierten Spektren zu einer systematischen Überschätzung der EXAFS-Amplitude führt. Besonders ausgeprägt ist diese Überschätzung für schwere Rückstreuer, die sich durch hohe Oszillationsamplituden bei hohen k-Werten auszeichnen.

## 2.2.2 Fourier-Isolierung

Die EXAFS-Analyse wurde in der Vergangenheit häufig unter Verwendung Fourier-isolierter Spektren betrieben. Diese Technik beinhaltet dabei normalerweise zwei Schritte: (1) Zur Reduzierung von sogenannten "Side loops", also Transformationsartefakten, wird das Spektrum mit einer Fensterfunktion multipliziert, wie beispielsweise dem in Kap. 1.3.4 erwähnten fraktionalen  $\cos^2$ -Fenster. (2) Die so behandelten Spektren werden Fourier-transformiert. Vom Real- und Imaginärteil, die sich daraus ergeben, wird meist nur der Realteil graphisch dargestellt. (3) Es werden Bereichsgrenzen  $R_{\min}$  und  $R_{\max}$  festgelegt (meist im Minimum zwischen zwei Fourier-Peaks). Real- und Imaginärteil werden analog zu (2) mit einer Fensterfunktion multipliziert, die außerhalb des Bereiches  $R_{\min}$ - $R_{\max}$  verschwindet. (4) Der so isolierte Teil des Spektrum wird zurück auf die Achse des Wellenzahlvektors (k-Raum) transformiert.

Die Auswirkung dieser Prozedur auf ein S<sub>1</sub>-Spektrum des PSII-Mangankomplexes (gemessen bei 20 K) ist in Abb. 2.4 dargestellt. Da bei der EXAFS-Analyse oft ein Ansatz gewählt wird, bei dem fünf Rückstreuerschalen berücksichtigt werden [Dau et al., 2003; Pospisil et al., 2003; Haumann et al., 2005], sind hier die Fourier-Isolationen für diese fünf Schalen gezeigt. Der zweite Peak in der Fourier-Transformierten im Bereich



**Abbildung 2.4:** Beiträge der einzelnen Rückstreuerschalen zum  $k^3$ -gewichteten  $S_1$ -EXAFS-Spektrum. (A) Fourier-Transformierte des eines PSII- $S_1$ -Tiefemperatur-Spektrums ( $k = 2 \dots 12 \text{ \AA}^{-1}$ , 10 % fraktionales  $\cos^2$ -Fenster auf beiden Seiten) sowie eine Simulation mit einem Fünf-Schalen-Fitansatz (Kap. 4.2.4, Tab. 4.2 B); (B) Beiträge der einzelnen Rückstreuerschalen. Die vertikalen Linien kennzeichnen den Bereich des zweiten FT-Peaks und die beitragenden Schalen.

von 1.9-2.6  $\text{\AA}$  reduzierter Distanz wird offensichtlich durch die Mn-Mn-Streuung bei 2.7  $\text{\AA}$  dominiert. Die Distanzen der ersten (Mn-O) und der dritten Schale (Mn-Mn/Ca) weisen jedoch ebenfalls signifikante Beiträge in diesem Bereich auf. Darüberhinaus finden sich "Side loops" des 2.7  $\text{\AA}$ -Peaks bei reduzierten Distanzen von weniger als 1.9  $\text{\AA}$  und mehr als 2.6  $\text{\AA}$ .

Durch die Technik der Fourier-Isolation werden also mögliche systematische Abweichungen durch Vernachlässigung der überlappenden Beiträge der Fourier-isolierten generiert. Auch eine systematische Beeinträchtigung der Ergebnisse durch die mehrfache Anwendung von Fensterfunktionen kann nicht vermieden werden. Die Anpassung des gesamten Spektrums durch einen entsprechend komplexen Fit-Ansatz ist aus diesen Gründen vorzuziehen.

	N <sub>i</sub> per Mn	R <sub>i</sub> /Å	σ <sub>i</sub> /Å	R <sub>f</sub> <sup>1-3.5Å</sup> (R <sub>f</sub> <sup>2-2.6Å</sup> ) in %
<b>A</b>				
Mn-O	4.01	1.845	0.097	17.5 (8.8)
Mn-Mn	1.28	2.711	0.048	
Mn-O	2.86	3.633	0.061	
Mn-O	2.75 <sup>b</sup>	1.826	0.075	11.6 (4.2)
Mn-O	2.75 <sup>b</sup>	1.977	0.120	
Mn-Mn	1.02	2.720	0.035	
Mn-Mn/Ca	1.00 <sup>b</sup>	3.186	0.105	
Mn-O	2.50 <sup>b</sup>	3.666	0.060	
<b>B</b>				
Mn-O	2.75 <sup>b</sup>	1.829	0.075	12.3 (5.7)
Mn-O	2.75 <sup>b</sup>	1.984	0.123	
Mn-Mn	1.00 <sup>b</sup>	2.718	0.032 <sup>b</sup>	
Mn-Mn	0.50 <sup>b</sup>	3.154	0.032 <sup>b</sup>	
Mn-Ca	0.50 <sup>b</sup>	3.358	0.032 <sup>b</sup>	
Mn-O	2.50 <sup>b</sup>	3.666	0.076	
<b>C</b>				
Mn-O	5.50 <sup>b</sup>	1.853/1.852	0.114/0.113	19.6/20.4
Mn-Mn	1.28/1.04	2.710/2.719	0.042/0.032	(6.0/3.6)
Mn-O	2.50 <sup>b</sup>	3.636/3.639	0.077/0.075	
<b>D</b>				
Mn-O	2.75 <sup>b</sup>	1.828	0.072	13.3 (9.1)
Mn-O	2.75 <sup>b</sup>	1.987	0.115	
Mn-Mn	1.00 <sup>b</sup>	2.700	0.032 <sup>b</sup>	
Mn-Mn	0.50 <sup>b</sup>	2.805	0.032 <sup>b</sup>	
Mn-Mn/Ca	1.00 <sup>b</sup>	3.169	0.142	
Mn-O	2.50 <sup>b</sup>	3.661	0.071	

**Tabelle 2.1:** Ergebnisse verschiedener Simulationsansätze für EXAFS-Spektren des Mangankomplexes im S<sub>1</sub>-Zustand. N<sub>i</sub> Koordinationszahl pro Mn; R<sub>i</sub> Absorber-Rückstreuer-Distanz; σ<sub>i</sub> Debye-Waller-Faktor. **(A)** Ergebnis eines Drei-Schalen- (oben) und eines Fünf-Schalen-Fitansatzes (unten); **(B)** Sechs-Schalen-Fitansatz; **(C)** Drei-Schalen-Simulation über einen Bereich von 2 bis 12 Å<sup>-1</sup> (erster Wert) und einen Bereich 2 bis 20 Å<sup>-1</sup> (zweiter Wert); Das Spektrum für diese beiden Simulationen wurde aus dem Sechs-Schalen-Fit in (B) extrapoliert, um die verbesserte Bestimmung der Koordinationszahl durch einen längeren k-Bereich zu demonstrieren. **(D)** Sechs-Schalen-Fitansatz unter Annahme von drei Mn-Mn-Vektoren bei ~2.7-2.8 Å. Der Fouriergefilterte R<sub>f</sub>-Wert wurde über einen Bereich von 1-3.5 Å reduzierter Distanz berechnet bzw. über 2-2.6 Å (in Klammern), um den Fehler im Bereich der 2.7/2.8 Å-Distanzen hervorzuheben. <sup>b</sup> im "Least-square"-Fit fixierte Parameter. Für alle Simulationen - außer (C) - betrug der k-Bereich 2 bis 12 Å<sup>-1</sup>. Es wurden k<sup>3</sup>-gewichtete Spektren verwendet.

### 2.2.3 Einfluss benachbarter Schalen im EXAFS-Fit

Die Fourier-Transformierten in Abb. 2.4 zeigen, dass die Trennung der 2.7 Å-EXAFS-Oszillationen von den Beiträgen der ersten und dritten Koordinationssphäre nicht perfekt ist. Vernachlässigung dieser Beiträge kann auch in Fits, die ohne vorherige Fourier-Isolation durchgeführt werden, die Bestimmung der Koordinationszahl beeinträchtigen.

In dieser Arbeit (Kap. 4) und anderen EXAFS-Studien am Mangankomplex des PSII [Pospisil et al., 2003; Dau et al., 2003; Haumann et al., 2005] wird ein Fünf-Schalen-Fitansatz verwendet, wie er in Tab. 4.2 B gezeigt ist. Dieser Ansatz ist einerseits einfach genug, um sicherzustellen, dass Simulationsergebnisse statistisch signifikant sind. Die Anzahl freier Fit-Parameter ( $P = 11$ ) bleibt deutlich unter der maximal möglichen ( $P_{\max} = 2\Delta R\Delta k/\pi + 1$  [Stern, 1993] ergibt mit  $\Delta k = 10 \text{ \AA}^{-1}$  und  $\Delta R = 1.84 \text{ \AA}$   $P_{\max} \sim 13$ ). Andererseits werden alle Anteile im EXAFS-Spektrum berücksichtigt. Die Details dieses Simulationsansatzes ergeben sich aus Annahmen, die im Folgenden erklärt werden.

#### Erste Koordinationssphäre

Das XANES-Spektrum des Mangankomplexes im  $S_1$ -Zustand (vgl. Kap. 4.3.1, Abb. 4.4) zeigt an, dass hauptsächlich sechsfach koordinierte Mangan-Ionen vorliegen. Die kurzen  $\mu$ -oxo-Distanzen (1.7-1.9 Å) und die längeren Distanzen zu terminalen Liganden (1.9-2.4 Å) führen zu einer besonders breiten Verteilung von Mangan-Ligand-Distanzen. Die Beschreibung der ersten Koordinationssphäre durch eine einzelne Rückstreuerschale führt daher zu einer systematischen Unterschätzung der Gesamtkoordinationszahl sowie zu relativ schlechten R-Werten (Kap. 4.3.1 sowie [Dau et al., 2003; Pospisil et al., 2003; Haumann et al., 2005]). Für die Beschreibung der radialen Verteilung der Liganden der ersten Koordinationssphäre sind also mindestens zwei Gaußfunktionen notwendig, was einer Simulation mit zwei unabhängigen Rückstreuerschalen entspricht. Da ein Teil der  $Mn^{III}$ -Ionen auch fünffach koordiniert sein kann, wird für die Gesamtkoordinationszahl ein Wert von 5.5 gewählt.

#### Zweite Koordinationssphäre (Atome, die über einen Brückenliganden verbunden sind)

Sowohl aus den kristallographisch bestimmten Strukturen [Kamiya und Shen, 2003; Ferreira et al., 2004] als auch aus zuvor erfolgten Mutagenese-Studien [Debus et al., 2000b,a; Debus, 2001; Diner, 2001] und XAS-Experimenten [Riggs-Gelasco et al., 1996; Dörner et al., 1998] folgt, dass nur eine relativ geringe Zahl von Aminosäureresten als Liganden zum Mangankomplex dienen (1-2 pro Mn-Ion). Daher ist die Anzahl leichter Rückstreuer in der zweiten Koordinationssphäre so gering, dass ihr Beitrag zu den EXAFS-Oszillationen im Bereich von 2.5-3.4 Å im Vergleich zu den starken Oszillationen aufgrund der Mn-Mn/Ca-Streuung vernachlässigt werden kann. Der zweite Fourier-Peak wird also von den starken Mn-Mn-EXAFS-Distanzen bei 2.7 Å dominiert. In den Fünf-Schalen-Ansätzen wird ein zusätzlicher Beitrag von schweren Rückstreuern bei 3.3 Å berücksichtigt. Die Position eines Kalzium-Ions in einem Abstand von 3.3 Å zu (wahrscheinlich) zwei Mangan-Ionen wurde durch EXAFS-Experimente an der Ca-K-Kante bestätigt [Cinco et al., 2002; Müller et al., 2005]. Darüberhinaus ist auch eine Mn-Mn-Streuung im Bereich von  $>3.3 \text{ \AA}$  wahrscheinlich [Pospisil et al., 2003]. Durch einen sogenannten "Joint fit" einer Zeitfolge von Spektren [Pospisil et al., 2003] oder durch Auswertung von Linear-Dichroismus-Daten von partiell orientierten Proben

[Mukerji et al., 1994; Dau et al., 1995; Dittmer, 1999; Dau et al., 2001] konnten darüberhinaus separate Mn-Ca- bzw. Mn-Mn-Distanzen aufgelöst werden. Für ein einzelnes EXAFS-Spektrum übersteigt ein solcher Fit allerdings die maximal mögliche Anzahl freier Parameter. Diese Rückstreuer werden daher im Fünf-Schalen-Fitansatz in einer gemeinsamen Schale zusammengefasst. Da wegen der ausgeprägten Distanzinhomogenität eine gleichzeitige Bestimmung von Koordinationszahl  $N$  und Debye-Waller-Parameter  $\sigma$  nicht möglich ist, wurde in diesem Ansatz eine fixierte Koordinationszahl von 1 verwendet, was einer Mn-Mn-Distanz und zwei Mn-Ca-Distanzen im Mangankomplex in diesem Distanzbereich entspricht.

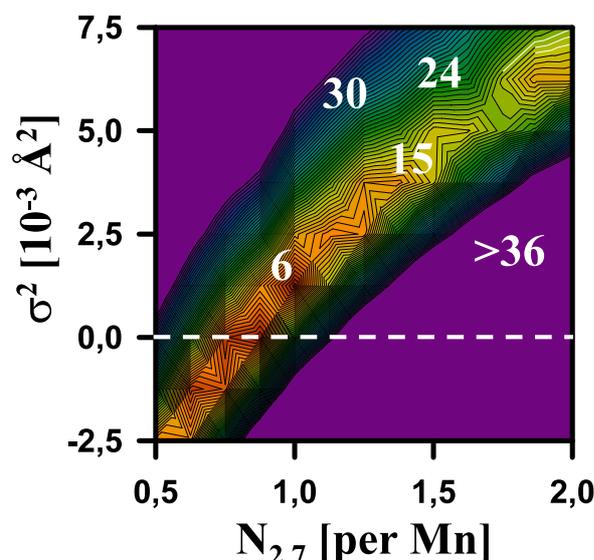
### Dritte Koordinationssphäre

Der dritte Peak in der Fourier-Transformierten enthält Beiträge der eben besprochenen Mn-Mn- und Mn-Ca-Vektoren sowie Beiträge von leichten Rückstreuern im Bereich von  $\sim 3.6$  Å [Meinke et al., 2000; Pospisil et al., 2003; Haumann et al., 2005]. In den EXAFS-Spektren von PSII, in denen nur zwei Mangan-Ionen mit einem 2.7 Å Abstand vorlagen, ist der dritte Peak nur wenig kleiner als in intakten Proben. Daraus kann man ableiten, dass leichte Rückstreuer den Hauptanteil am EXAFS in diesem Bereich ausmachen [Dörner et al., 1998; Pospisil et al., 2003]. Auch hier ist die unabhängige Bestimmung von Debye-Waller-Faktor und Koordinationszahl nicht möglich; Fits mit sehr gutem R-Faktor erhält man für Werte von  $N=2$  bis 4.

Die Möglichkeit, in EXAFS-Fits durch Überfitten bzw. Überinterpretation der Daten durch unsinnig komplexe Fit-Ansätze zu unsignifikanten Ergebnissen zu gelangen, ist bekannt und wurde viel diskutiert. Die zitierten Kriterien für die Anzahl maximal möglicher Fit-Parameter [Stern, 1993] erlauben eine Beurteilung der Ergebnisse im Hinblick auf dieses Problem. Doch auch eine zu vereinfachte Beschreibung der EXAFS-Oszillationen kann zu Fehlinterpretationen führen. Anzeichen hierfür finden sich in dem in Tab. 4.2 (A) verwendeten Zwei-Schalen-Fitansatz. Typische Merkmale dieses Problems sind: (i) Die optimale Fit-Qualität wird nur für chemisch unsinnige Koordinationszahlen erreicht. (ii) Es tritt eine ausgeprägte Abhängigkeit von der  $k$ -Gewichtung der Spektren auf. (iii) Geringe Änderungen der Länge des  $k$ -Bereichs (von weniger als  $1 \text{ \AA}^{-1}$ ) im Fit haben einen drastischen Einfluss auf die Fit-Ergebnisse. (Für eine detailliertere Diskussion hierzu siehe [Dau et al., 2003].) In Fitansätzen mit nur zwei oder drei Schalen für PSII-Spektren treten alle diese Symptome auf. Für die möglichst genaue Bestimmung der Struktur-Parameter aus einem EXAFS-Fit ist also ein hinreichend komplexer Fitansatz notwendig. Dies gilt auch für die Koordinationszahl der 2.7 Å-Distanz.

#### 2.2.4 Korrelation der Parameter $N_{2.7}$ und $\sigma_{2.7}$

Eine weitere mögliche Ursache für unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Koordinationszahl für die 2.7 Å-Distanz ist die Korrelation mit dem Debye-Waller-Faktor. In Abb. 2.5 ist in einer 2D-Kontur-Darstellung diese Abhängigkeit dargestellt. Hierzu wurden die Koordinationszahl  $N_{2.7}$  und der Debye-Waller-Parameter  $\sigma_{2.7}^2$  der 2.7-Å-Schale in kleinen Schritten variiert und für jedes  $(N_{2.7}, \sigma_{2.7}^2)$ -Paar wurde ein separater Fünf-Schalen-Fit ausgeführt, was zu einem erneut minimierten  $R_f$ -Wert führte. Der gezeigte Fouriergefilterte R-Faktor ist dabei über einen Bereich von 2-2.6 Å berechnet, d.h. er erfasst nur die Abweichungen, die aus Unterschieden der EXAFS-Spektren in diesem Bereich resultieren. (Es sei darauf hingewiesen, dass die Fehlersumme in der Fit-Prozedur ohne Fourier-Filterung berechnet wird.)



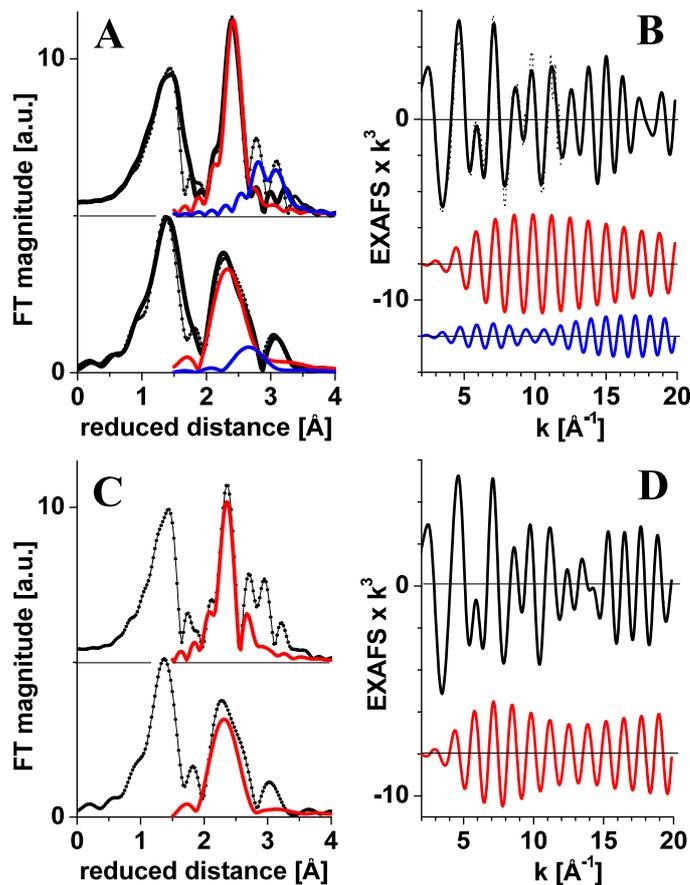
**Abbildung 2.5:** 2D-Darstellung ("Contour plot") der Fehlersumme  $R_f$  (mittlere Abweichung zwischen simuliertem und experimentellem Spektrum in %) in einem Fünf-Schalen-Fit eines PSII-S<sub>1</sub>-EXAFS-Spektrums (vgl. Tab. 4.2) in Abhängigkeit von der Koordinationszahl der 2.7 Å-Distanz  $N_{2.7}$  und dem zugehörigen Debye-Waller-Parameter  $\sigma_{2.7}^2$ . Für jedes  $N_{2.7}$ - $\sigma_{2.7}^2$ -Paar wurde der  $R_f$ -Wert unter Optimierung aller übrigen Parameter bestimmt. Im Unterschied zu den Fits in Tab. 4.2 waren die Koordinationszahlen der ersten Schale hier nicht auf einen festen Wert sondern, auf eine Summe von 5.5 fixiert. Die  $R_f$ -Werte wurden über einen Bereich von 2.0-2.6 Å (nur zweiter Peak) berechnet. Rote Bereiche bedeuten einen sehr geringen  $R_f$ -Wert (6-9 %), der über orange, gelb, grün, blau zu höchsten Werten (violett) ansteigt. Die stärkeren Kontur-Linien haben einen Abstand von 3 %.

In Abb. 2.5 ist ein absolutes und recht ausgeprägtes Minimum ( $R_f = 6\%$ ) bei einer Koordinationszahl von  $N_{2.7} = 1.0$  zu erkennen, was zwei Distanzen von 2.7 Å pro tetranuklearem Komplex entspricht. Weitere Minima befinden sich bei niedrigeren Koordinationszahlen. Die zu diesen Minima gehörigen Debye-Waller-Parameter  $\sigma_{2.7}^2$  sind jedoch entweder sehr nahe bei Null oder sogar negativ, was physikalisch unsinnig ist. Koordinationszahlen unter 1 ergeben offenbar keine sinnvollen Fitergebnisse. Bei einer Koordinationszahl von  $N_{2.7} = 1.5$ , was drei Mn-Mn-Vektoren im Mangankomplex entspräche, deutet sich zwar ein Nebenminimum an, der  $R_f$ -Wert ist mit etwa 15 % jedoch 2.5 Mal so hoch, wie am absoluten Minimum. Die Simulationen mit der Koordinationszahl  $N_{2.7} = 1.5$  ergeben also deutlich schlechtere Fits.

Im Ergebnis kann festgestellt werden, dass mit einem Fünf-Schalen-Fitansatz unter Ausschluss negativer Werte für  $\sigma^2$  das absolute Minimum der Fehlersumme bei  $N_{2.7} = 1.0$  liegt. Der entsprechende  $R_f$  ist deutlich kleiner als der zu  $N_{2.7} = 1.5$  gehörige. Aus den EXAFS-Daten kann also mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Vorhandensein von zwei Mn-Mn-Vektoren bei  $\sim 2.7$  Å ( $< \sim 2.8$  Å) geschlossen werden.

### 2.2.5 Einfluss der Länge des k-Bereichs

Durch die im vorangegangenen Abschnitt gezeigte Analyse wurde eine weitere Mn-Mn-Distanz nahe 2.7 Å ausgeschlossen. Es ist jedoch möglich, schlechtere, aber durchaus noch akzeptable Fits unter der Annahme einer Distanz bei  $\sim 2.8$  Å zu erreichen. Für



**Abbildung 2.6:** Einfluss des  $k$ -Bereiches. Die Fourier-Transformierten in (A) wurden auf der Basis der in (B) gezeigten EXAFS-Oszillationen über einen Bereich von 2-20  $\text{\AA}^{-1}$  (oben) bzw. von 2-12  $\text{\AA}^{-1}$  (unten) berechnet. Die EXAFS-Oszillationen wurden durch Extrapolation der S<sub>1</sub>-Fitergebnisse in Tab. 2.1B erzeugt. Die schwarze Linie in (A) stellt das Ergebnis eines 3-Schalen-Fits dar (Tab. 2.1C). Die rote Linie kennzeichnet den Beitrag der 2.7 Å-Distanzen, die blaue Linie repräsentiert die Summe der Beiträge der Mn-Mn-Distanz bei  $\sim 3.1$  Å und der Mn-Ca-Distanz bei  $\sim 3.3$  Å (Tab. 2.1B). (C) Fourier-Transformierte, berechnet aus den EXAFS-Oszillationen in (D) entsprechend den Parametern aus Tab. 2.1D. Die rote Linie in (C) markiert den Beitrag von Distanzen bei 2.7 Å und 2.8 Å.

einen solchen Fit steigt der  $R_f$ -Wert von 4.2 % (ohne 2.8-Å-Distanz) auf 9.1 % (mit 2.8-Å-Distanz) - trotz einer erhöhten Zahl von Fitparametern. Die Existenz einer solchen Distanz erscheint daher äußerst unwahrscheinlich, kann aber nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Durch Messungen über einen verlängerten  $k$ -Bereich könnte diese Frage möglicherweise beantwortet werden. Darüberhinaus ließen sich so auch die Beiträge der Mn-Mn/Ca-Vektoren besser auflösen. Mit Simulationen über einen erweiterten  $k$ -Bereich lässt sich dies verdeutlichen. In Abb. 2.6B (schwarze durchgezogene Linie) sind EXAFS-Oszillationen über einen Bereich von 2 bis 20  $\text{\AA}^{-1}$  dargestellt, die anhand der Parameter in Tab. 2.1B berechnet wurden. In Tab. 2.1B wurde ein Sechs-Schalen-Fitansatz zur Beschreibung des S<sub>1</sub>-Spektrums gewählt, der explizit die Mn-Mn-Distanzen bei  $\sim 3.1$  Å sowie die Mn-Ca-Distanz bei  $\sim 3.3$  Å berücksichtigt. Abbildung 2.6A zeigt die Fourier-Transformierten, die aus diesem extrapolierten Spektrum über einen Bereich bis 2-20  $\text{\AA}^{-1}$  (obere Kurve) und

2-12  $\text{\AA}^{-1}$  (untere Kurve) berechnet wurden. Neben den Beiträgen der 2.7  $\text{\AA}$ -Distanzen, die über den verlängerten k-Bereich deutlicher hervortreten, werden auch die 3.1 / 3.3  $\text{\AA}$ -Distanzen gut voneinander und von den 2.7  $\text{\AA}$ -Distanzen unterscheidbar. Um den Einfluss der Länge des k-Bereiches auf die Bestimmung der Koordinationszahl zu untersuchen, wurden die Daten in Abb. 2.6B durch einen einfachen Drei-Schalen-Fitansatz für sowohl 2-12  $\text{\AA}^{-1}$  als auch für 2-20  $\text{\AA}^{-1}$  simuliert. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.6A als unterbrochene Linien dargestellt und die Parameter sind in Tab. 2.1C aufgelistet. Die Simulation über einen Bereich von 2-12  $\text{\AA}^{-1}$  ergibt eine Koordinationszahl  $N_{2.7}$  von 1.28, während über den Bereich von 2-20  $\text{\AA}^{-1}$  ein Wert von 1.04 bestimmt wird. In solchen einfachen Fit-Ansätzen ist ein langer k-Bereich für die akkurate Bestimmung von Koordinationszahlen und Debye-Waller-Faktoren offensichtlich von Vorteil.

Die vermutete 2.8  $\text{\AA}$ -Mn-Mn-Distanz ließe sich mit Messungen über einen längeren k-Bereich ebenfalls aufklären. In Abb. 2.6D sind EXAFS-Oszillationen gezeigt, die auf der Basis des Fits für das  $S_1$ -Spektrum (Tab. 2.1D) unter Hinzunahme eines hypothetischen 2.8  $\text{\AA}$ -Vektors zu den beiden 2.7  $\text{\AA}$ -Vektoren berechnet worden sind. Die Beiträge der drei Mangan-Vektoren zum EXAFS-Spektrum sind als rote Linie dargestellt. Oberhalb von 12  $\text{\AA}^{-1}$  ist eine Schwebung zu erkennen, ein sogenanntes "Beat pattern", das auf die Interferenz von zwei nahe beieinander liegenden Schalen zurückzuführen ist. In der zugehörigen Fourier-Transformierten über den verlängerten k-Bereich (Abb. 2.6C, oben) sind die beiden Schalen noch nicht mit Sicherheit zu unterscheiden.

Die verfügbaren EXAFS-Daten, die üblicherweise bis 12  $\text{\AA}^{-1}$  reichen (aufgrund der Fe-K-Kante bei 7100 eV), sind also ausreichend, um in einem hinreichend komplexen Fit-Ansatz die mittleren Distanzen und die Koordinationszahl der 2.7  $\text{\AA}$ -Distanzen zu bestimmen. Durch einen verlängerten k-Bereich wäre eine hinreichend genaue Bestimmung der Koordinationszahl  $N_{2.7}$  jedoch schon mit einem einfachen Zwei- oder Drei-Schalen-Fitansatz möglich. Selbst aus einem bis 20  $\text{\AA}^{-1}$  im k-Bereich ( $\sim 1500$  eV über  $E_0$ ) gemessenen EXAFS-Spektren ließen sich aus der visuellen Inspektion der Fourier-Transformierten jedoch noch keine um nur 0.1  $\text{\AA}$  verschiedenen Distanzen bei 2.7 und 2.8  $\text{\AA}$  unterscheiden. In Fits über das gesamte Spektrum wäre die Auflösung allerdings verbessert. Für die Auflösung der Mn-Mn- bzw. Mn-Ca-Distanzen wäre eine solche Verlängerung des k-Bereiches von besonderem Wert.

## 2.3 Struktur motive für den Mangankomplex

### 2.3.1 Vergleich mit Ergebnissen der Protein-Kristallographie

Wie im vorigen Abschnitt diskutiert, zeigen die EXAFS Daten für den  $S_1$ -Zustand des Mangankomplexes das Vorliegen von zwei Mn-Mn-Vektoren bei etwa 2.7  $\text{\AA}$  pro  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Struktur an. Linear-Dichroismus-Daten ergeben darüberhinaus, dass der Winkel zwischen der Membrannormalen und einem dieser Mn-Mn-Vektoren ( $R_{\text{Mn-Mn}} < 2.71 \text{\AA}$ ) etwa  $60^\circ$  beträgt und für den anderen Mn-Mn-Vektor ( $R_{\text{Mn-Mn}} > 2.72 \text{\AA}$ ) größer als  $80^\circ$  ist [Dau et al., 2001, 2003; Dau und Haumann, 2003]. Für die Mn-Mn- bzw. Mn-Ca-Distanzen über 3  $\text{\AA}$  sind die Ergebnisse weniger verlässlich. Ebenfalls aus Linear-Dichroismus-Daten wurden Winkel von  $80-90^\circ$  für die längeren Mn-Mn-Vektoren und Winkel von etwa  $45^\circ$  für die Mn-Ca-Distanzen bestimmt [Haumann et al., 2001; Cinco et al., 2002; Yachandra, 2002; Pospisil et al., 2003]. Die Anzahl der Mn-Mn-Distanzen beträgt etwa 1-2 und die der Mn-Ca-Vektoren wird mit 2-3 angegeben [Cinco et al., 2002, 2004; Müller et al., 2005]. Die Mn-Mn-Vektoren sind demzufolge tendenziell alle senkrecht

zur Membrannormalen, d.h. parallel zur Membranebene orientiert. Die kompakte Elektronendichte in den Kristallstrukturen [Zouni et al., 2001; Kamiya und Shen, 2003; Ferreira et al., 2004] ist gut mit dem Vorliegen mehrerer Mn-Mn/Ca-Distanzen bei mehr als 3 Å neben den 2.7 Å-Distanzen kompatibel. Die eher flache Elektronendichte scheint auch mehrere Mn-Mn-Vektoren in der Ebene zuzulassen. Angesichts der zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Auflösung scheint jedoch eine Analyse von Winkelinformationen im Lichte der kristallographischen Ergebnisse verfrüht.

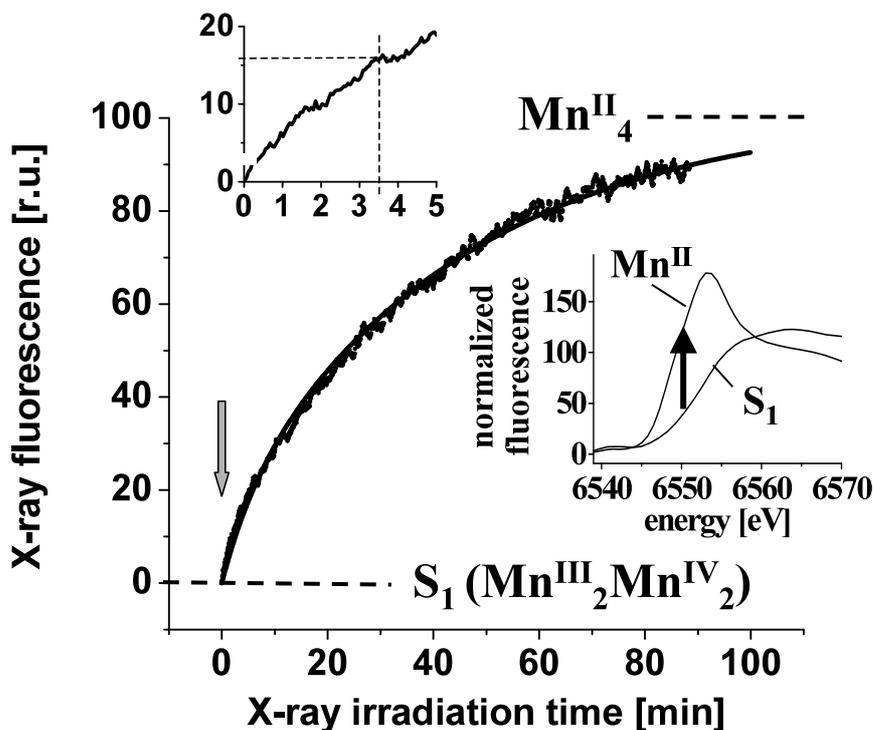
Das Kalzium-Ion wurde in [Ferreira et al., 2004] zwischen dem Mangankomplex und dem Tyr<sub>z</sub> lokalisiert, senkrecht zu einer durch die Mangan-Ionen aufgespannten Ebene. Diese Position scheint sowohl mit einer Mn-Ca-Distanz von etwa 3.3 Å [Cinco et al., 2002, 2004; Müller et al., 2005] als auch mit einem Winkel von 45° zwischen dem mittleren Mn-Ca-Vektor und der Membrannormalen wie er aus XAS-Daten [Yachandra, 2002; Pospisil et al., 2003; Cinco et al., 2004] kompatibel zu sein.

Ein detaillierterer Vergleich von EXAFS- und kristallographischen Ergebnissen scheint wie erwähnt noch nicht angebracht. Dabei stellt nicht nur die geringe Auflösung ein Problem dar. In [Dau et al., 2004c] wurde abgeschätzt, dass die Kristalle für mehr als 3 Minuten einem Photonenfluss von  $5 \times 10^{13}$  bis  $10^{15}$  Photonen  $\text{s}^{-1}\text{mm}^{-1}$  ausgesetzt waren. Wie aus Abb. 2.7 zu ersehen ist, reicht jedoch schon ein Fluss von  $\sim 10^{12}$  Photonen  $\text{s}^{-1}\text{mm}^{-1}$  über eine Zeitspanne von 3 min. aus, um eine Ein-Elektronen-Reduktion des Mangankomplexes herbeizuführen, die mit Strukturänderungen verbunden ist (Zerstörung einer  $\mu$ -oxo-Brücke, unveröffentlichte Ergebnisse). Da die Photonenflüsse in der kristallographischen Datenerfassung den Fluss in dem in Abb. 2.7 gezeigten Experiment um mehr als einen Faktor 10 übersteigen, ist die Photoreduktion dort sehr wahrscheinlich deutlich schneller als die in Abb. 2.7 dargestellte. Die Elektronendichteverteilungen der Proteinkristallographie entsprechen daher einem Mangankomplex, der mit Sicherheit in seinem Redoxzustand und wahrscheinlich auch in seiner Struktur verändert ist.

Die Photoreduktion an den verwendeten PSII-Kristallen und die damit einhergehenden Strukturänderungen wurden bisher nicht hinreichend untersucht. Es ist auch denkbar, dass diese Strukturänderungen bei der gegenwärtig erreichten Auflösung von etwa 3.5 Å noch nicht detektierbar und somit irrelevant sind. Es ist aber ebenso denkbar, dass die veröffentlichten Elektronendichten einen photoreduzierten Mn<sub>4</sub>Ca-Komplex repräsentieren, in dem das vierte Mangan aus dem Komplex entfernt und aufgrund von Unordnung an seiner veränderten Position nicht detektierbar ist. Beim gegenwärtigen Stand der Forschung ist also auf jeden Fall Vorsicht angebracht, wenn aus den kristallographischen Ergebnissen Modelle mit atomarer Auflösung abgeleitet werden sollen.

### 2.3.2 Mögliche strukturelle Motive

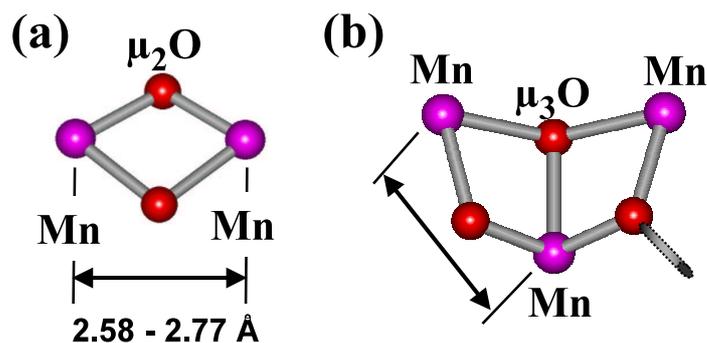
Welche strukturellen Motive können nun zu den im PSII vorhandenen Distanzen von  $\sim 2.7$  Å führen? Für Modelle, die eine di- $\mu_2$ -oxo-Brücke enthalten (Mn( $\mu_2$ -O)<sub>2</sub>Mn-Motiv), ist dies auf jeden Fall gegeben (vgl. [Wieghardt, 1989; Mukhopadhyay et al., 2004] sowie die dort angegebenen Referenzen). Recherchen in der Cambridge Structural Database (CSD, [Allen, 2002]) ergaben für diese Strukturen Mn-Mn-Distanzen zwischen 2.58 und 2.77 Å. Eine einfache Protonierung von di- $\mu_2$ -oxo-Brücken, also eine ( $\mu$ -O)( $\mu$ -OH)-Brücke, führt zu einer Verlängerung der Mn-Mn-Distanz um etwa 0.1 Å auf  $\sim 2.8$  Å. Auch wenn es recht spekulativ erscheint, kann der Mn<sub>4</sub>Ca( $\mu_3$ -O)<sub>4</sub>-Kuban-Komplex, der in [Ferreira et al., 2004] modelliert wurde, als Ausgangspunkt für weitere Überlegungen zu möglichen Brückenmotiven - speziell zur vorgeschlagenen  $\mu_3$ -O-Brücke - dienen. Die Frage ist also, ob eine Mn( $\mu_{2/3}$ -O)( $\mu_3$ -O)Mn-Verbrückung (Abb. 2.8b) zu Längen von 2.7 Å



**Abbildung 2.7:** Photoreduktion des Mangankomplexes im  $S_1$ -Zustand durch Röntgenstrahlung bei 100 K. Die Daten (Punkte) zeigen einen Zeitverlauf der Röntgenfluoreszenz bei einer konstanten Anregungsenergie in der ansteigenden Flanke der Absorptionskante (6550 eV, schwarzer Pfeil im eingefügten Bild der Kantenspektren). Der offene Pfeil kennzeichnet das Einsetzen von Photoreduktion. Die Daten wurden auf 100 % normiert. Untere eingesetzte Graphik: Die Anfangsintensität der Fluoreszenz, die dem Wert im  $S_1$ -Zustand entspricht, nimmt durch eine Verschiebung der Kante zu niedrigerer Energie solange zu, bis nach etwa 100 min. alle Mangan-Zentren als  $Mn^{II}$  vorliegen. Unter der Annahme, dass im  $S_1$ -Zustand ein  $Mn_2^{III}Mn_2^{IV}$ -Komplex vorliegt, ist hierfür eine Reduktion durch 6 Elektronen notwendig. Ein Anstieg der Fluoreszenz um  $\sim 17\%$  entspricht demzufolge der Reduktion des  $Mn_4$ -Komplexes durch ein Elektron. Unter den hier gezeigten Bedingungen ist dieser Wert nach etwa 3,5 min. erreicht (obere eingesetzte Graphik). Die glatte Linie ergibt sich aus einem biexponentiellen Fit mit Amplituden ( $A_i$ ) und Ratenkonstanten ( $k_i$ ) von  $A_1 = 15\%$ ,  $k_1 = 0.165 \text{ min}^{-1}$ ,  $A_2 = 85\%$ ,  $k_2 = 0.022 \text{ min}^{-1}$ . Während der Datenaufnahme in kristallographischen Messungen bei 100 K ist die Photoreduktion mindestens zehnmal schneller als in diesem XAS-Experiment [Dau et al., 2004c].

führen kann. Entsprechende trinukleare Modelle existieren nach dem hier vorliegenden Stand des Wissens nicht. In Abb. 2.9 ist jedoch die Struktur eines  $Mn_{10}$ -Komplexes gezeigt, der zwei  $Mn(\mu_2-O)(\mu_3-O)Mn$ -Paare mit Mn-Mn-Distanzen nahe bei  $2.7 \text{ \AA}$  enthält. Das bedeutet, dass prinzipiell  $Mn(\mu_2-O)(\mu_3-O)Mn$ -Strukturen mit Mn-Mn-Distanzen von  $\sim 2.7 \text{ \AA}$  möglich sind! Aufgrund der Mn-Mn-Distanz des  $Mn(\mu_3-O)_2Mn$ -Paares von  $2.9 \text{ \AA}$  ist diese spezielle Struktur jedoch nicht mit den EXAFS-Daten vom  $S_1$ -Zustand vereinbar. Mn-Mn-Distanzen von mehr als  $2.8 \text{ \AA}$  finden sich auch in tetranuklearen (verzerrten) Kubanstrukturen [Cinco et al., 1999].

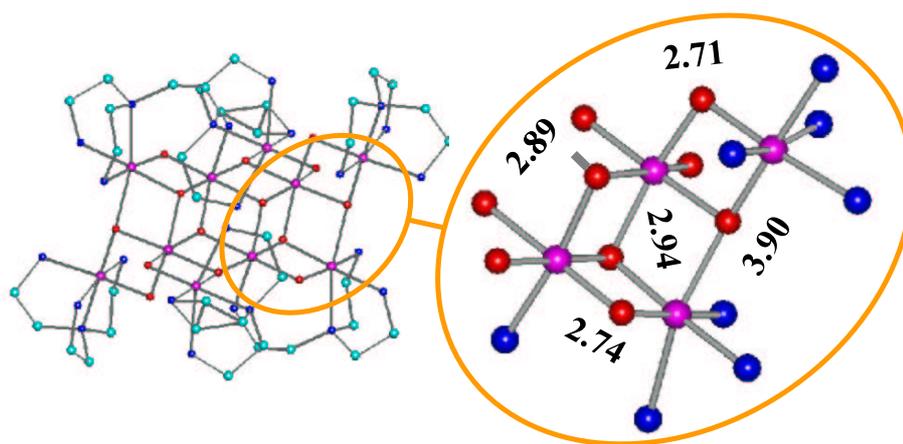
Als Resultat kann festgehalten werden, dass Mn-Mn-Distanzen von  $\sim 2.7 \text{ \AA}$ , wie sie im  $S_1$ -Zustand vorliegen, di- $\mu$ -oxo-verbrückten Mangan-Paaren zuzuordnen sind, die entweder entweder in  $Mn(\mu_2-O)_2Mn$ - oder in  $Mn(\mu_2-O)(\mu_3-O)Mn$ -Strukturen vorliegen. Andere, als die zwei hier aufgezählten Motive zur Erklärung der Mn-Mn-Distanzen müssen als un-



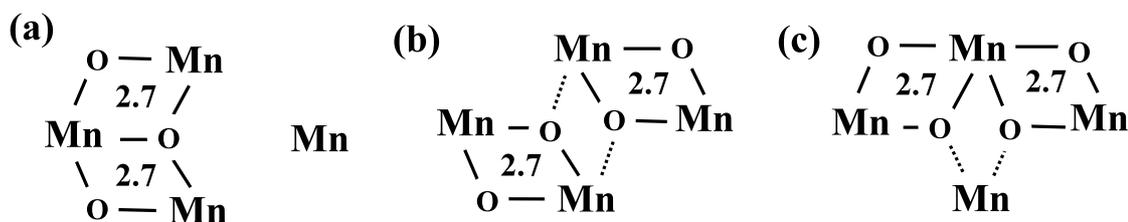
**Abbildung 2.8:** Zwei strukturelle Motive, die zu Mn-Mn-Distanzen von 2.7 Å führen können. (a)  $(\mu_2\text{-O})_2$ -Brücke; (b)  $(\mu_2\text{-O})(\mu_3\text{-O})$ -Brücke. Zur Vereinfachung sind nur die Brücken-Sauerstoffe eingezeichnet. Der in (a) eingezeichnete Bereich entspricht dem in synthetischen Modellen in der Literatur und der CSD [Allen, 2002] gefundenen.

wahrscheinlich gelten, da sich unter den synthetischen Komplexen der CSD keine Analoga finden ließen. Beide Motive sind di- $\mu$ -oxo-verbrückte Mn-Paare. Daher wird im Folgenden davon ausgegangen, dass der PSII-Mangankomplex aus zwei durch di- $\mu$ -oxo-Brücken verbundenen Paaren besteht.

In Abb. 2.10 sind drei verschiedene Anordnungen der vier Mangan-Ionen dargestellt, die in Übereinstimmung mit den EXAFS-Ergebnissen sind. Diese Strukturen können neben den für die 2.7 Å-Distanzen verantwortlichen Brücken noch weitere Brücken enthalten (mono- $\mu$ -oxo- oder Karboxylato-Brücken), die zu den längeren Mn-Mn-Distanzen führen. In allen drei Strukturen kann weiterhin das Ca-Ion so positioniert werden, dass es mit den oben diskutierten EXAFS-Ergebnissen bezüglich Distanz und Winkel zur Membrannormalen in Übereinstimmung ist. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann keine der gezeigten Strukturen als wahrscheinlicher als die anderen gelten. Alle Strukturen eröffnen jedoch



**Abbildung 2.9:** Struktur eines synthetischen  $\text{Mn}_{10}$ -Komplexes aus [Hagen et al., 1989a] (links) sowie Vergrößerung eines Ausschnittes, der auch  $(\mu_2\text{-O})(\mu_3\text{-O})$ -Brücken zwischen den Mangan-Ionen enthält (rechts). Die Distanzen sind in Å gegeben und die Farben bedeuten: violett - Mn, türkis - C, rot - O, blau - N. Protonen sind nicht dargestellt.



**Abbildung 2.10:** Drei elementare Struktur motive für die Anordnung der Mn-Ionen im PSII-Mangankomplex. (a) Dreieck-Trimer + Monomer; (b) Dimer von Dimeren; (c) gestrecktes Trimer + Monomer. Nur die Mn-Ionen und die Brücken-Sauerstoffe sind dargestellt. Die Mn-( $\mu_{2/3}$ -O)-Bindung ist als durchgezogene Linie dargestellt. Die unterbrochenen Linien deuten auf weitere koordinative Bindungen hin, die zu weiteren ( $\mu_3$ -O)-Brücken führen könnten. Das Ca-Ion befindet sich im Abstand von  $\sim 3.3 \text{ \AA}$  zu zwei Mn-Ionen, ist jedoch nicht eingezeichnet. Auch die Mn-Mn-Distanz von  $\sim 3.1 \text{ \AA}$  ist nicht dargestellt. Wie die Zahlen "2.7" andeuten sollen, beinhaltet jede Struktur aus genau zwei Mn-Mn-Distanzen von 2.7  $\text{\AA}$ . Alle drei Strukturen sind in Übereinstimmung mit den vorliegenden EXAFS-Daten.

die Möglichkeit, im  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang eine weitere  $\mu$ -oxo-Brücke zwischen den Mn-Ionen zu bilden, was in dieser Arbeit und in [Dau et al., 2001; Haumann et al., 2002b; Dau und Haumann, 2003; Haumann et al., 2005] vorgeschlagen wird.

## 2.4 Zusammenfassung

Die Aufklärung der Struktur des PSII-Mangankomplexes ist das Ziel von Protein-kristallographischen und von EXAFS-Untersuchungen. Die kritische Diskussion der Methoden der EXAFS-Datenaufbereitung und -analyse sowie der Vergleich mit Modellstrukturen und kristallographischen Ergebnissen führt zu folgenden Schlussfolgerungen:

(1) Für die Bestimmung von Koordinationszahlen ist wesentlich, dass (a) die Normierung entsprechend den Fluoreszenz-detektierten Daten vorgenommen wird, (b) die Methode der Fourier-Isolation vermieden wird, (c) ein hinreichend komplexer Fitansatz gewählt wird und (d) das Ausmaß der Photoreduktion eine Ein-Elektronen-Reduktion von ca. 10 % der Mangan-Ionen nicht überschreitet.

(2) Adäquate Fitansätze können unter Berücksichtigung aller Informationen aus Mn/Ca-EXAFS, Linear-Dichroismus-Messungen, Messungen an partiell Mangan-verarmten Proben gewonnen werden.

(3) Im  $S_1$ -Zustand ist das Vorliegen von zwei Mn-Mn-Distanzen bei 2.7  $\text{\AA}$  in bester Übereinstimmung mit den EXAFS-Daten. Das Vorhandensein einer weiteren Mn-Mn-Distanz um 2.8  $\text{\AA}$  kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, ist aber aufgrund schlechterer Fitergebnisse unwahrscheinlich.

(4) Die Elektronendichte, die in den Kristallstrukturen dem  $Mn_4Ca$ -Komplex zugeordnet wird, ist in Übereinstimmung mit mehreren Mn-Ca-Distanzen von etwa 3.3  $\text{\AA}$  Länge sowie der Orientierung der Mn-Mn-Distanzen parallel zur Membranebene, wie es auf der Basis von EXAFS-Untersuchungen postuliert wurde. Aufgrund des anzunehmenden Ausmaßes der Photoreduktion in den kristallographischen Daten ist von einer detaillierteren Diskussion jedoch abzusehen.

(5) Durch den Vergleich mit synthetischen Modellkomplexen ergeben sich zwei Brückenstrukturen, die mit den EXAFS-Ergebnissen kompatibel sind, nämlich  $Mn(\mu_2$ -

$O)_2Mn$ - sowie  $Mn(\mu_2-O)(\mu_3-O)Mn$ -Paare. In beiden Fällen handelt es sich um eine di- $\mu$ -oxo-Verbrückung.

(6) Ein wesentlicher Aspekt der Struktur des PSII-Mangankomplexes ist mit hoher Wahrscheinlichkeit das Auftreten von zwei Mn-Paaren, die über di- $\mu$ -oxo-Brücken verbunden sind. Hierbei können die drei grundlegenden Topologien unterschieden werden, die in Abb. 2.10 gezeigt sind. Vermutlich entsprechen die beiden Paare Mn-Mn-Vektoren von  $\sim 2.69 \text{ \AA}$  und  $\sim 2.73 \text{ \AA}$ , die Winkel von  $\approx 60^\circ$  ( $2.69 \text{ \AA}$ ) und  $80-90^\circ$  ( $2.73 \text{ \AA}$ ) mit der Membrannormalen bilden.