

Kapitel 9

Zusammenfassung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Weiterentwicklung der BioXAS-Methodik im Hinblick auf die Analyse von XANES-Spektren. Das spezifische Ziel war es, mittels der Methode der Röntgenspektroskopie neue Einsichten in die Struktur und die Strukturänderungen des PSII-Mangankomplexes im S-Zyklus zu gewinnen. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Analyse der Absorptionskanten, wodurch Aussagen über die Struktur und die Oxidationszustände sowie deren Änderungen in den Übergängen im katalytischen Zyklus abgeleitet werden konnten. Es wurden folgende zentrale Ergebnisse erzielt:

1. Im Verlauf mehrerer Messzeiten wurde bei Raumtemperatur ein kompletter Datensatz von EXAFS-Spektren für alle S-Zustände (S_0 bis S_3) aufgenommen. Die für die primäre Datenauswertung erforderliche Software wurde implementiert.
2. Durch Vergleich mit Daten aus Tieftemperaturmessungen konnte nachgewiesen werden, dass die wesentlichen strukturellen und elektronischen Merkmale der S-Zustände bei Raum- und Tieftemperatur identisch sind (in Zusammenarbeit mit Claudia Müller und Michael Haumann). Es finden sich keine Anzeichen für relevante Unterschiede in Struktur, Protonierungszustand oder Ladungslokalisation.
3. Auch die Raumtemperaturdaten weisen auf eine Mangan-zentrierte Oxidation in jedem Übergang vom S_0 zum S_3 hin. In den Übergängen $S_0 \rightarrow S_1$ und $S_2 \rightarrow S_3$ treten größere strukturelle Änderungen auf, die als Änderungen der Mangan-Verbrückung identifiziert werden können.
4. Durch die Messungen bei Raumtemperatur wurde die Grundlage für zeitaufgelöste XAS-Messungen gelegt. Dieser neuartige Ansatz ist besonders in Verbindung mit der XANES-Analyse vielversprechend. Zeitaufgelöste Messungen wurden bereits durchgeführt, sind aber nicht in dieser Arbeit diskutiert.
5. In einer weiteren Röntgenabsorptionsstudie wurden zwei binukleare Mangankomplexe in jeweils drei verschiedenen Oxidationszuständen untersucht. Dabei wurden oxidationszustandsinduzierte strukturelle Änderungen identifiziert, die als Modelle für die S-Zustandsübergänge des nativen Mangankomplexes dienen können. Die erste Oxidation geht in beiden Komplexen ohne eine Änderung der Brückenstruktur vor sich und führt zu einer Erhöhung des Redoxpotentials. Durch die Ausbildung einer zusätzlichen μ -oxo-Brücke (oder μ -OH) wird bewirkt, dass das Redoxpotential für die zweite Ein-Elektronen-Oxidation konstant bleibt. Der Oxidationszustand, der der Bildung einer neuen Brückenstruktur vorausging, war abhängig vom O/N-Verhältnis des Mangan-Ligandensatzes.

6. Als Weiterentwicklung der empirischen Methoden zur Analyse der Röntgenabsorptionskanten wurde die Eignung von *ab-initio* XANES-Simulationen zur Analyse von Oxidationszustands- und Strukturänderungen getestet. Durch vergleichende MO-Simulationen konnte eine Interpretation spektraler Merkmale mit Relevanz für den Mangankomplex gegeben werden.
7. Anhand von Simulationen auf der Basis bekannter Strukturen wurde gezeigt, dass der absolute XANES-Verlauf sowie Änderungen durch Oxidationszustandsübergänge durch *ab-initio* Berechnungen quantitativ reproduziert werden können.
8. Ein Programm zur Anpassung der Simulationen an experimentelle Spektren unter Variation ausgewählter struktureller Parameter (XANES-Fit) wurde implementiert und dessen Funktion an Beispielen validiert.
9. Unter Anwendung der XANES-Fit-Methode auf Modelle des PSII-Mangankomplexes konnte gezeigt werden, dass die Beschreibung der Kantenstruktur von PSII-Daten mit einem EXAFS-kompatiblen Modell prinzipiell möglich ist.
10. Aufbauend auf den so gelegten Fundamenten wurden die XANES-Änderungen im S-Zyklus des Mangankomplexes untersucht. Der Fokus lag hier auf dem $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang, der sowohl durch systematische Parameterstudien als auch anhand von Fits der Differenzspektren diskutiert wurde. Es wurde gezeigt, dass die Kantenänderung im $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang charakteristisch für den Übergang von fünffach koordiniertem Mn^{III} zu sechsfach koordiniertem Mn^{IV} ist. Der $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang kann durch eine relativ symmetrische Verkürzung von sechsfach koordiniertem Mn^{III} zu sechsfach koordiniertem Mn^{IV} beschrieben werden und der $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang ist mit einem $Mn^{II} \rightarrow Mn^{III}$ -Übergang kompatibel, wobei ein $Mn^{III} \rightarrow Mn^{IV}$ -Übergang aber nicht ausgeschlossen werden kann.
11. Untersuchungen zum umstrittenen Oxy-Radikal-Mechanismus der Sauerstoffentwicklung zeigten, dass die in einer entsprechenden DFT-Studie diskutierten Strukturänderungen nicht zu den beobachteten XANES-Änderungen führen, sondern vielmehr im Gegensatz zu den röntgenspektroskopischen Ergebnissen stehen.
12. Zur Bearbeitung der Frage der Polarisationsabhängigkeit von Kantenspektren des Mangankomplexes wurde eine Theorie zur Beschreibung der Polarisationsabhängigkeit der Röntgenabsorption partiell vektoriell orientierter Proben entwickelt. Diese stellt eine Verallgemeinerung der existierenden Theorie für Einfachstreuung dar und ermöglicht die Beschreibung des XANES-Dichroismus durch Ergebnisse von FMS-Berechnungen.
13. Im Sinne eines "Proof of principle" wurde die Theorie des XANES-Linear-Dichroismus auf Modelle des Mangankomplexes angewendet. Es wurde gezeigt, dass bestimmte strukturelle Merkmale der ersten Koordinationsschale spezifische polarisationsabhängige XANES-Signaturen hervorrufen. Im Rückschluss eröffnet dies die Möglichkeit, aus Dichroismus-Kantenspektren auf die Orientierung der μ -oxo-Brücken zu schließen.
14. Als Anwendung der Theorie des XANES-Dichroismus für partiell vektoriell orientierte Proben wurde die Orientierung der μ -oxo-Ebenen im S_1 -Zustand bearbeitet.

Es wurde ein mittlerer Winkel zwischen der μ -oxo-Ebene und der Membrannormalen ($\beta_{\mu O}$) von etwa 40° bestimmt. Die Werte für die einzelnen μ -oxo-Brücken sind stark vom spezifischen Aufbau des Modellkomplexes abhängig. Winkel von weniger als 30° oder mehr als 60° sind jedoch unwahrscheinlich.

Im Rahmen der Promotion sind die folgenden Publikationen erschienen, eingereicht oder in Vorbereitung:

Fachartikel

PSII

- P. Liebisch, C. Müller, M. Grabolle, M. Haumann und H. Dau (2005). Simulation of XANES spectra for protein-bound metal centers: Analysis of linear dichroism data. *Physica Scripta*: in Druck.
- P. Liebisch und H. Dau (2005). The linear dichroism in the X-ray absorption near-edge spectra of imperfectly, unidirectionally oriented samples - Theoretical approach and application to the protein-bound manganese complex of photosystem II". Manuskript in Vorbereitung.
- P. Liebisch, und H. Dau (2005). The catalytic cycle of photosystem II studied by simulation of X-ray absorption near edge spectra - Manganese oxidation versus ligand radical formation. Manuskript in Vorbereitung.
- M. Haumann, P. Liebisch, C. Müller, M. Barra und H. Dau (2005). Intermediate formation in photosynthetic water oxidation followed by a time-resolved X-ray absorption experiment. Manuskript in Vorbereitung.
- M. Haumann, C. Müller, P. Liebisch, M. Grabolle, L. Iuzzolino, J. Dittmer, T. Neisius, W. Meyer-Klaucke und H. Dau (2004). Structural and oxidation state changes of the photosystem II manganese complex in four transitions of the water oxidation cycle ($S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$, $S_{3,4} \Rightarrow S_0$) characterized by X-ray absorption spectroscopy at 20 K as well as at room temperature. *Biochemistry*: in Druck.
- H. Dau, P. Liebisch und M. Haumann (2003). X-ray absorption spectroscopy to analyze nuclear geometry and electronic structure of biological metal centers - Potential and questions examined with special focus on the tetra-nuclear manganese complex of oxygenic photosynthesis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376(5): 562-583.
- H. Dau, P. Liebisch und M. Haumann (2005). The manganese complex of oxygenic photosynthesis: Conversion of five-coordinated Mn^{III} to six-coordinated Mn^{IV} in the S_2 - S_3 -transition is implied by XANES simulations. *Physica Scripta*: in Druck.
- H. Dau, P. Liebisch und M. Haumann (2004). The structure of the manganese complex of photosystem II in its dark-stable S_1 -state - EXAFS results in relation to recent crystallographic data. *Physical Chemistry Chemical Physics* 6: 4781 - 4792.
- H. Dau, P. Liebisch und M. Haumann (2004). Structural and oxidation state changes of the Mn_4Ca complex of photosystem II in its S-state cycle - X-ray absorption results and possible mechanistic implications. 13th International Congress on Photosynthesis, Montreal, Canada, Allen Press.
- A. Magnuson, P. Liebisch, M. Haumann, J. Höglblom, M. F. Anderlund, R. Lomoth, W. Meyer-Klaucke und H. Dau (2005). Bridging-mode changes in response to manganese oxidation in two binuclear manganese complexes - implications for photosynthetic water-oxidation. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*: eingereicht.

- M. Haumann, P. Pospisil, M. Grabolle, C. Müller, P. Liebisch, V. A. Sole, T. Neisius, J. Dittmer, L. Iuzzolino und H. Dau (2002). First steps towards time-resolved BioXAS at room temperature: State transitions of the manganese complex of oxygenic photosynthesis. *Journal of Synchrotron Radiation* 9: 304-308.
- Müller, C., P. Liebisch, M. Barra, H. Dau und M. Haumann (2004). The location of calcium in the manganese complex of oxygenic photosynthesis studied by X-ray absorption spectroscopy at the Ca K-edge. *Physica Scripta*: in Druck.

Hydrogenasen

- M. Haumann, A. Porthun, T. Buhrke, P. Liebisch, W. Meyer-Klaucke, B. Friedrich and H. Dau (2003). Hydrogen-induced structural changes at the nickel site of the regulatory NiFe hydrogenase from *Ralstonia eutropha* detected by X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry* 42(37): 11004-11015.
- T. Burgdorf, S. Löscher, P. Liebisch, E. V. d. Linden, M. Galander, F. Lenzian, W. Meyer-Klaucke, S. P. J. Albracht, B. Friedrich, H. Dau and M. Haumann (2005). Structural and oxidation-state changes at its non-standard Ni-Fe site during activation of the NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* detected by X-ray absorption-, EPR-, and FTIR-spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*: angenommen

Hämocyanin

- P. Liebisch, H. Hartmann, C. Müller, D. Hönig, K.-H. Decker und H. Dau (2005). The influence of pH on the oxygen-binding binuclear copper site of hemocyanin in *Eurypelma californicum* and *Palinurus elephas*. Manuskript in Vorbereitung.

Biogene Manganablagerungen

- A. Schöler, P. Liebisch, C. Müller, C. Plieth. und H. Dau (2005). Volcano-shaped manganese deposits at the cell wall of green alga *Chara corallina* - Elemental mapping and comparative structural analysis by spatially resolved X-ray microfocus experiments. Manuskript in Vorbereitung.

Vanadium-haltige Bromoperoxidase

- U. Christmann, H. Dau, M. Haumann, E. Kiss, P. Liebisch, D. Rehder, G. Santoni and C. Schulzke (2004). Substrate binding to vanadate-dependent bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*: A vanadium K-edge XAS approach. *Dalton Transactions*(16): 2534-2540.

Beiträge zu Jahresberichten

- P. Liebisch, A. Schöler, C. Müller, M. Haumann und H. Dau (2004). Comparative study of biogenic and synthetic manganese oxides by X-ray absorption spectroscopy. BESSY -Annual Reports.
- P. Liebisch, C. Müller, C. Plieth, A. Erko und H. Dau (2003). Microfocus XAS measurements on volcano-shaped manganese deposits at the cell-wall of the green alga *Chara corallina*. BESSY - Annual Report.
- P. Liebisch, M. Barra, M. Grabolle, C. Müller, A. Erko und H. Dau (2003). On the evolutionary origin of the manganese complex of oxygenic photosynthesis: possible formation of a bicarbonate precursor complex. BESSY - Annual Report
- H. Dau, M. Haumann, M. Grabolle, P. Liebisch und C. Müller (2002). X-ray absorption spectroscopy on biological samples (BioXAS): The manganese complex of photosystem II. BESSY -Annual Reports.
- P. Liebisch, H. Hartmann, D. Hönig, C.Müller, K.-H. Decker und H. Dau (2004). Hemocyanin - Cooperativity in relation to the structure of the binuclear copper-site. HASYLAB/EMBL - Annual Report.
- M. Haumann, A. Porthun, T. Buhrke, P. Liebisch, T. Burgdorf, W. Meyer-Klaucke, B. Friedrich und H. Dau (2002/2003). The Ni-Fe centers of oxygen-insensitive hydrogenases from *Ralstonia eutropha* studied by Ni-XAS. HASYLAB/EMBL - Annual Report.
- A. Magnuson, P. Liebisch, M. Haumann, S. Styring, W. Meyer-Klaucke und H. Dau (2002). Comparison of structural changes at the native manganese complex of photosystem II with manganese model compounds by means of XAS. HASYLAB/EMBL - Annual Report.
- M. Haumann, A. Porthun, P. Liebisch, C. Müller, T. Burgdorf, W. Meyer-Klaucke, B. Friedrich und H. Dau (2001). Hydrogen-sensing Ni-Fe site of regulatory hydrogenase. HASYLAB/EMBL - Annual Report.
- H. Dau, M. Haumann, M. Barra, P. Liebisch und C. Müller (2003). The manganese complex of photosynthetic water oxidation in all S-states at 10 K - Polarization dependent XAS, ESRF - Annual Report
- H. Dau, M. Haumann, M. Barra, P. Liebisch und C. Müller (2003). Structural changes of the tetra-manganese complex of oxygenic photosynthesis during the oxygen-evolving transition induced by Laser-flashes and studied by timeresolved BioXAS, ESRF - Annual Report.
- H. Dau, M. Haumann, M. Barra, P. Liebisch und C. Müller (2003). The calcium binding site at the manganese complex of oxygenic photosynthesis: Investigations by calcium XAS on native and biochemically treated photosystem II, ESRF - Annual Report.
- H. Dau, M. Haumann, M. Grabolle, P. Liebisch und C. Müller (2002). Structural changes of the photosynthetic tetra-manganese complex induced by Laser flashes and monitored by timeresolved BioXAS at room temperature, ESRF - Annual Report.

- H. Dau, D. Rehder, M. Haumann, C. Schulzke, M. Grabolle, P. Liebisch und C. Müller (2002). Bromide-binding to the active-site of vanadate-dependent peroxidases, ESRF - Annual Report.
- H. Dau, M. Haumann, M. Grabolle, P. Liebisch und C. Müller (2002). The manganese complex of photosynthetic water oxidation studied by calcium EXAFS, ESRF - Annual Reports.

Ausgewählte Konferenzbeiträge

- P. Liebisch und H. Dau. Simulation of XANES spectra for protein-bound metal centers: Analysis of linear dichroism data. XAFS12, 22. - 27. Juni 2003, Malmö, Schweden, (Vortrag)
- P. Liebisch, M. Grabolle, M. Haumann, C. Müller und H. Dau. XANES of protein-bound metal centers: Oxidation state changes of the photosynthetic manganese complex and other systems. European Conference on Bioinorganic Chemistry (EURO-BIC), 30. Juli - 6. August 2002, Lund, Schweden, (Poster)
- P. Liebisch, , C. Müller, M. Haumann und H. Dau. X-ray Absorption Spectroscopy on Metallo-Enzymes (BioXAS); BESSY user workshop, 14. April 2002, Berlin, (Vortrag)
- P. Liebisch, M. Grabolle, M. Haumann, C. Müller und H. Dau. XANES-Simulationen für protein-gebundene Metallzentren: Der PSII-Mangankomplex und andere Systeme. 8. - 11. September 2002, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Dresden, (Poster)