

Kapitel 4

XAS-Untersuchungen an der Mangan-K-Kante bei Raumtemperatur

In der Vergangenheit wurden XAS-Messungen am Mn_4Ca -Komplex des PSII nahezu ausschließlich bei tiefen Temperaturen (~ 20 K) durchgeführt. In gefrorenen Proteinproben können, im Vergleich zu den Bedingungen bei Raumtemperatur, jedoch Parameter entweder undefiniert (z.B. pH-Wert) oder verändert (z.B. Ionen- und Redox-Gleichgewichte) sein [Cador et al., 2003; Rakhimov et al., 2003]. Außerdem ist im PSII bei Temperaturen < 200 K der Elektronentransfer zwischen Mangan und Y_Z unterbrochen und es findet keine Wasseroxidation statt.

Eine viel versprechende Methode, um die Reaktionen am Mn_4Ca -Komplex im Kokzyklus unter nativen Bedingungen zu untersuchen, ist XAS an PSII-Proben bei Raumtemperatur. Unter diesen Bedingungen ist das Photosystem II katalytisch aktiv und die mit den Oxidationszustandsänderungen einhergehenden strukturellen Änderungen am Metallzentrum können untersucht werden. Jedoch ist die Rate der Strahlenschädigung (Photoreduktion) stark erhöht. Daher stellte sich zu Beginn dieser Arbeit die Frage, ob sinnvolle XAS-Messungen bei RT möglich sind. Besonders wichtig war es daher, die Photoreduktion des Mn_4Ca -Komplexes während der Röntgenbestrahlung auf ein vertretbares Maß zu reduzieren. Außerdem musste die Technik den Anforderungen für schnelle Scans mit hoher Abtastrate angepasst werden.

Die in dieser Arbeit geschilderten Entwicklungen und Experimente trugen dazu bei, dass XAS-Experimente bei Raumtemperatur an der Mangan-K-Kante mit PSII-Proben erfolgreich durchgeführt werden konnten. Es wurden u.a. zum ersten Mal XANES- und EXAFS-Spektren in allen S-Zuständen des katalytischen Zyklus bei RT gemessen. Damit konnten die Oxidationszustände in den einzelnen S-Zuständen sowie die Strukturänderungen während des Kokzyklus untersucht werden. Außerdem wurde der Vergleich zwischen Daten aus XAS-Messungen bei tiefen Temperaturen und solchen bei RT möglich.

Weiterhin wurden Methoden für zeitaufgelöste XAS-Messungen im Rahmen dieser Arbeit mitentwickelt, um die Kinetik der einzelnen Schritte im katalytischen Zyklus des Mn_4Ca -Komplexes zu untersuchen. In bisherigen XAS-Messungen wurden nur Zwischenzustände bei der Alkoholdehydrogenase mit einer Zeitauflösung von 3 ms unter Verwendung der *Freeze-quench*-Technik gemessen [Kleinfeld et al., 2003; Penner-Hahn, 2003]. In diesem Kapitel werden die ersten XAS-Messungen bei Raumtemperatur an PSII-Proben in den unterschiedlichen S-Zuständen dargestellt, die auf früheren Unter-

suchungen aufbauen [Meinke et al., 2000]. Durch die in diesem Kapitel beschriebenen experimentellen Entwicklungen zum Probenwechsel und zur Messung wurde es erstmals möglich, zeitaufgelöst die einzelnen Übergänge im katalytischen Zyklus direkt zu verfolgen, Ratenkonstanten zu bestimmen und Zwischenzustände zu erkennen.

Aus den Entwicklungen dieser Arbeit folgten eine Reihe von Veröffentlichungen, an denen weitere Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holger Dau mitgewirkt haben: (I) Haumann, M., Pospisil, P., Grabolle, M., Müller, C., Liebisch, P., Sole, V. A., Neisius, T., Dittmer, J., Iuzzolino, L. und Dau, H. (2002) *J. Synchrotron Rad.* 9 (5), 304-308. (II) Haumann, M., Müller, C., Liebisch, P., Neisius, T., and Dau, H. (2005) *J. Synchrotron Rad.* 12 (1), 35-44. (III) Haumann, M., Müller, C., Liebisch, P., Iuzzolino, L., Dittmer, J., Grabolle, M., Neisius, T., Meyer-Klaucke, W. und Dau, H. (2005) *Biochemistry* 44 (6), 1894-1908. (IV) Haumann, M., Liebisch, P., Müller, C., Barra, M. und Dau, H. (2005) *Science* 310 (5750), 1019-1021. Diese Literatur wird im folgenden Kapitel nicht zitiert. Mein Anteil an den Veröffentlichungen besteht besonders in der Weiterentwicklung der Probenpräparation und der technischen Entwicklung zum automatischen Probenwechsel, durch die zeitaufgelöste XAS-Untersuchungen erst möglich wurden. Zudem habe ich die Messungen am Synchrotron mit durchgeführt und war an der Datenaufbereitung und -analyse beteiligt. In den nachfolgenden Abschnitten dieses Kapitels sind die zentralen Ergebnisse dieser Untersuchungen komprimiert dargestellt. Die Darstellung in voller Länge würde den Rahmen dieser Doktorarbeit überschreiten.

4.1 Experimenteller Aufbau

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein experimenteller Aufbau für XAS-Messungen an der Mangan-K-Kante bei Raumtemperatur erstellt. Das Prinzip der Messung besteht darin, die dunkeladaptierten PSII-Proben im Röntgenstrahl mit sättigenden ns-Laserpulsen durch den katalytischen S-Zyklus zu schalten und dabei die Änderung der Röntgenabsorption zeitaufgelöst zu verfolgen.

Um eine genügend große Anzahl von Proben in der limitierten Messzeit untersuchen zu können, wurde ein automatisierter Probenwechsler entwickelt (Abb. 4.1). Ein computergesteuerter Lineartisch (ATS02015-M-02B-CN, Aerotech Inc., USA) wurde dazu mit einem neu konstruierten Probenträgeraufbau verbunden. Dieser Wechsler konnte mit zwei verschiedenen Einsätzen für beide Arten von XAS-Probenträgern (Abb. 2.1, S. 24 und Abb. 3.8, S. 47) versehen werden. Die einzelnen PSII-Proben konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 4 \mu\text{m}$ im Röntgenstrahl positioniert und die Probenposition konnte innerhalb von ~ 1 Sekunde verändert werden. Der Wechsel zwischen zwei Proben dauerte nur ~ 3 Sekunden und erlaubte XAS-Messungen von 20 PSII-Proben innerhalb von ~ 5 Minuten. Der gesamte Aufbau wurde senkrecht auf einem Sockel montiert und konnte variabel zum Synchrotronstrahl ausgerichtet werden.

Abbildung 4.2 zeigt den gesamten experimentellen Aufbau für die XAS-Messungen an der Mn-K-Kante bei Raumtemperatur. Eine schematische Darstellung des Messaufbaus zeigt Abb. 4.3. Über eine Optik aus Linsen und Spiegel wurde ein Laserstrahl (frequenzverdoppelter, gütegeschalteter Nd:YAG Laser, Continuum Minilite, FWHM 5 ns, 532 nm, ~ 150 mJ pro Puls, 400 ms Abstand zwischen den Pulsen) aufgeweitet und gleichzeitig auf beide Seiten der Probe fokussiert (Laser-Spot $\sim 7 \text{ mm}^2$). Somit konnten in den PSII-Proben die unterschiedlichen S-Zustände durch Laser-Belichtung maximiert werden. Gleichzeitig wurde der Röntgenstrahl außerhalb des eigentlichen Messintervalls über einen schnellen, außerhalb des Strahlrohrs befindlichen Verschluss

geblockt, um die Strahlenbelastung der Proben zu minimieren. Der gesamte Aufbau (Laser, Probenwechsler, Verschluss, Datenaufzeichnung) wurde über eine Steuerelektronik synchronisiert. Die Proben befanden sich an Luft in dem temperierten Experimentierraum bei $18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

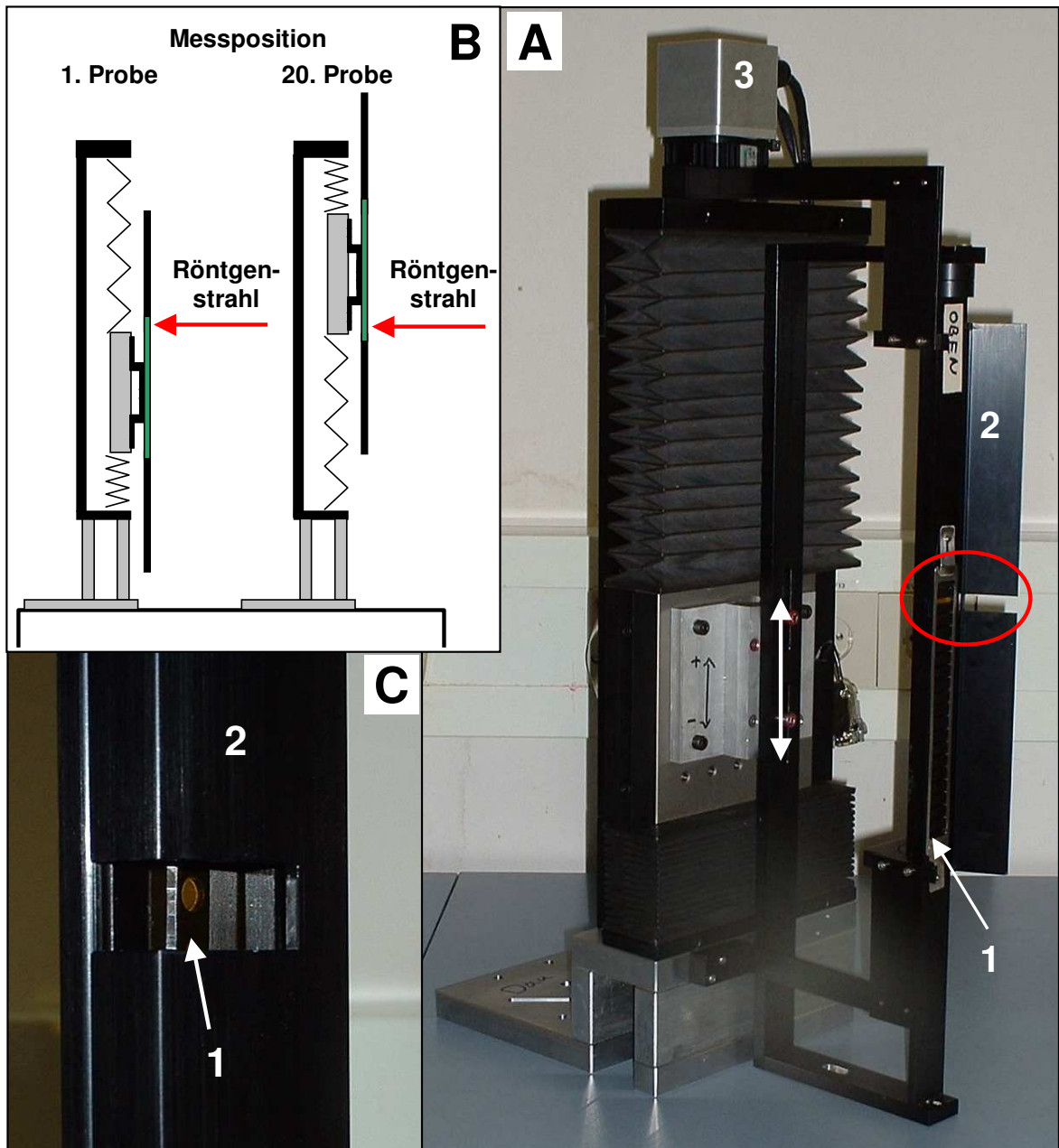


Abbildung 4.1: Probenwechsler für XAS-Messungen bei Raumtemperatur. (A) Abbildung des kompletten Probenwechslers mit offener Blende (2) um die Befestigung eines XAS-Probenträgers (1) zu zeigen. Der neu konstruierte Aufbau war mit dem Lineartisch (3) verbunden. Der Durchlass für die Röntgenstrahlung durch die Blende ist rot markiert. Alle Teile des Wechslers waren zur Minimierung von Streuung des Laserlichts schwarz eloxiert. (B) Skizze des Aufbaus mit Ausrichtung zum Synchrotronstrahl (roter Pfeil). Der XAS-Probenträger war so auf der Verfahreinrichtung montiert, dass alle 20 Proben eines Probenträgers belichtet werden konnten. Der gesamte Fahrweg betrug 15 cm, die Proben konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 4 \text{ }\mu\text{m}$ im Synchrotronstrahl positioniert werden. (C) Detailaufnahme eines XAS-Probenträgers (1) bei geschlossener Blende (2). Diese Blende ermöglichte die Bestrahlung einer einzelnen Probe bei gleichzeitiger Abschirmung aller anderen Proben gegen Röntgenstrahlung und Laserlicht.

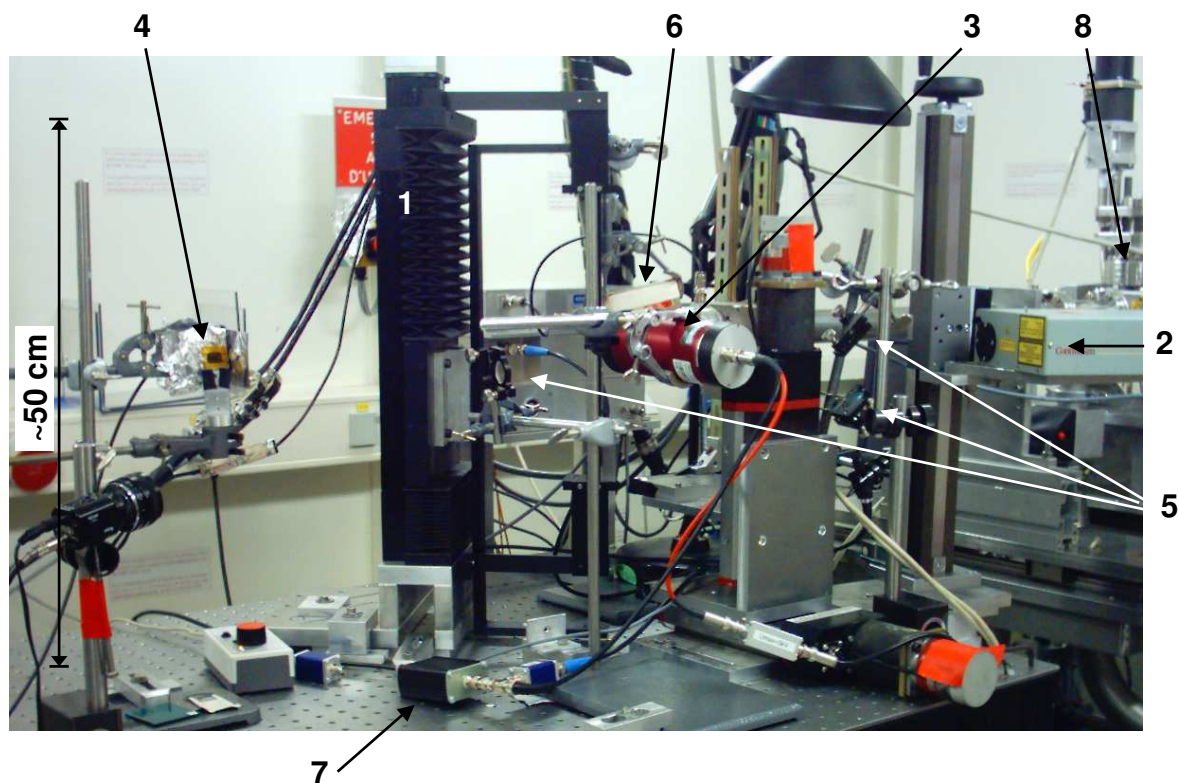


Abbildung 4.2: Experimenteller Gesamtaufbau für *Sampling*-XAS an der Mangan-K-Kante bei Raumtemperatur an der ID26 (ESRF, Grenoble, Frankreich). (1) Automatischer Probenwechsler (Details siehe Abb. 4.1), (2) gepulster Nd-YAG Laser zum Einstellen der S-Zustände, (3) großflächiger Szintillationsdetektor, (4) Referenzprobe KMnO_4 , (5) Linsen und Spiegel zur Auftrennung und Fokussierung des Laserstrahls, damit die Probe gleichstark von beiden Seiten belichtet werden konnte, (6) schneller Strahlverschluss zur Vermeidung von Strahlenschäden, (7) Vorverstärker, (8) Blenden zum Fokussieren der Röntgenstrahls. Ein Schema des Aufbaus ist in Abb. 4.3 dargestellt. Im Aufbau für *Flash-and-rapid-scan*-XAS variierte nur der Detektor und die zugehörige Elektronik.

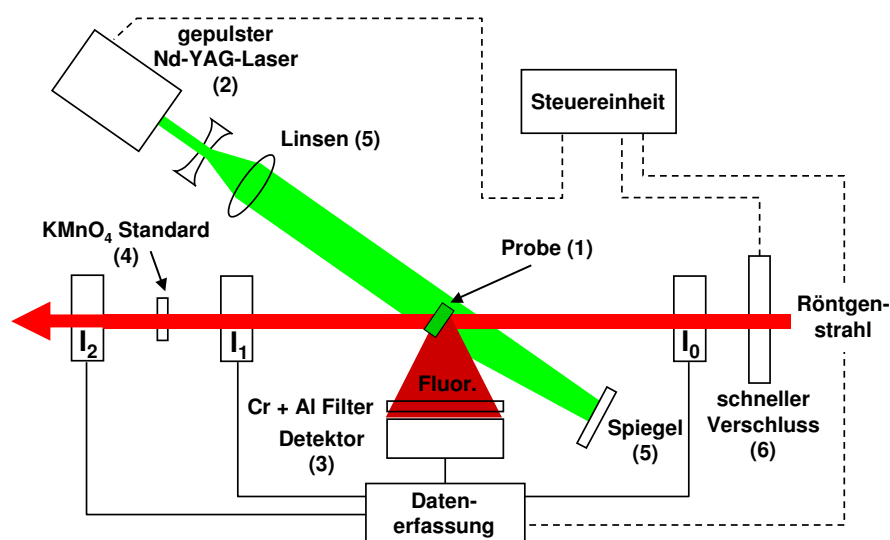


Abbildung 4.3: Schema zum Aufbau in Abb. 4.2. Es sind die Signal- und Datenverbindungen der einzelnen Komponenten untereinander eingezeichnet. Der Strahlverschluss, der Laser und die Datenaufzeichnung wurden über eine Steuereinheit miteinander synchronisiert geschaltet. Numerierung wie in Abb. 4.2.

Die XAS-Messungen bei Raumtemperatur an der Mangan-K-Kante von PSII-Membranfragmenten wurden während dreier einwöchiger Messtermine am Strahlrohr ID26 des ESRF in Grenoble (Frankreich) durchgeführt. Die ID26 ist ein Undulator-Messplatz mit der Option einer schnellen synchronen Bewegung von Monochromator und Undulator-Spalt [Sole et al., 1999]. Der Si(220)-Kristall-Monochromator war zur Unterdrückung von Reflexionen höherer Ordnung gegenüber der maximal erreichbaren Strahlintensität auf 70 % dejustiert. Der Scan-Bereich betrug 6500-7100 eV, die Größe des Röntgenstrahl auf der Probe war $\sim 1 \text{ mm}^2$. Die Winkel zwischen dem elektrischen Feldvektor des Röntgenstrahl und der Normalen der Probenoberfläche betrug im allgemeinen 55° („magischer Winkel“, [Dittmer und Dau, 1998]).

Bei einem Teil der Messungen wurde der Röntgenstrahl um den Faktor 25 - 35 durch Aluminium- und Kapton-Filtern reduziert, um eine Strahlenschädigung während der Messungen zu vermeiden. Die notwendige Reduktion wurde durch sogenannte *Time scans* (Zeitverläufe, siehe Abschnitt 4.3) bestimmt. Die Verschiebung der Kantenposition für einen Übergang im S-Zyklus entspricht einen Wert von $\sim 0,7 \text{ eV}$. Die Röntgenintensität wurde so gewählt, dass die anhand der Verschiebung der Kantenposition detektierte Photoreduktion der Probe, über den Zeitraum einer Messung, 15 % nicht überschritt. Waren diese Filter eingesetzt, wurden Messungen an Probenhaltern, in denen sich ausschließlich mehrere Lagen Kapton befanden, durchgeführt. Damit konnte sichergestellt werden, dass weder auf den Filtern noch auf der Kaptonfolie Mangan-Kontaminationen vorhanden waren.

Es wurden zwei verschiedene Messprotokolle für die XAS-Untersuchungen bei RT am PSII verwendet, sogenannte *Sampling-* (siehe Abschnitt 4.2.2) und *Flash-and-rapid-scan-XAS* (siehe Abschnitt 4.2.3), für die der Messaufbau variiert wurde.

Bei *Sampling-XAS* erfolgten die Messungen durch Aufzeichnung der angeregten Röntgenfluoreszenz senkrecht zum Röntgenstrahl mit einem großflächigen Szintillationsdetektor ($19,6 \text{ cm}^2$ aktive Fläche, 51BMI/2E1-YAP-Neg, Scionix), der mit einem 30-fachen Vorverstärker (Eigenbau, Bandbreite 10 MHz) verbunden war. Das austretende Signal wurde weiter verstärkt (Tektronix AM502, Bandbreite 100 KHz) und mit einer Abtastrate von 1 MHz von einem Computer, der mit einer 20 MHz A/D-Karte (Adlink) ausgestattet war, aufgezeichnet.

Bei *Flash-and-rapid-scan-XAS* erfolgten die Messungen durch Aufzeichnung der angeregten Röntgenfluoreszenz senkrecht zum Röntgenstrahl mit einer großflächigen PIN-Photodiode ($3,8 \text{ cm}^2$ aktive Fläche, Eurisys Measures). Die Anregungsstreustrahlung und sichtbares Licht wurden durch eine $10 \mu\text{m}$ -Chrom- und eine $10 \mu\text{m}$ -Aluminiumfolie unterdrückt, die als Filter direkt vor die Photodiode montiert wurden. Während die Streustrahlung im Bereich der Anregungsenergie effizient unterdrückt wurde, wurde der größte Teil der K_α -Fluoreszenz transmittiert.

Nachfolgend sind die verschiedenen Methoden für XAS-Messungen bei RT im Ablauf skizziert und die daraus resultierenden Möglichkeiten zur Untersuchung des Mn_4Ca -Komplexes im PSII erläutert.

4.2 Verschiedene XAS-Techniken bei RT

4.2.1 *Freeze-quench*-Proben für den Vergleich mit XAS-Ergebnissen bei tiefen Temperaturen

Für die Einstellung der verschiedenen S-Zustände in partiell orientierten PSII-Proben wurde eine sogenannte *Freeze-quench*-Technik angewendet, die in Abschnitt 3.6 beschrieben ist. Diese Technik wurde für XAS-Messungen bei tiefen Temperaturen eingesetzt.

Vorteile dieser Methode ist die Möglichkeit der Herstellung von PSII-Proben im Labor unter konstanten Bedingungen, der Lagerung von bis zu vier Wochen in flüssigem Stickstoff und der Bestimmung der S-Zustandsverteilung durch EPR-Untersuchungen vor den XAS-Messungen. Letzteres ist bei der Auswertung der XAS-Spektren (Entfaltung, siehe Abschnitt 4.4) von besonderer Bedeutung.

Die Spektren aus Messungen an *Freeze-quench*-Proben wurden in dieser Arbeit zum Vergleich mit den Ergebnissen aus RT-XAS herangezogen.

4.2.2 *Sampling*-XAS bei RT

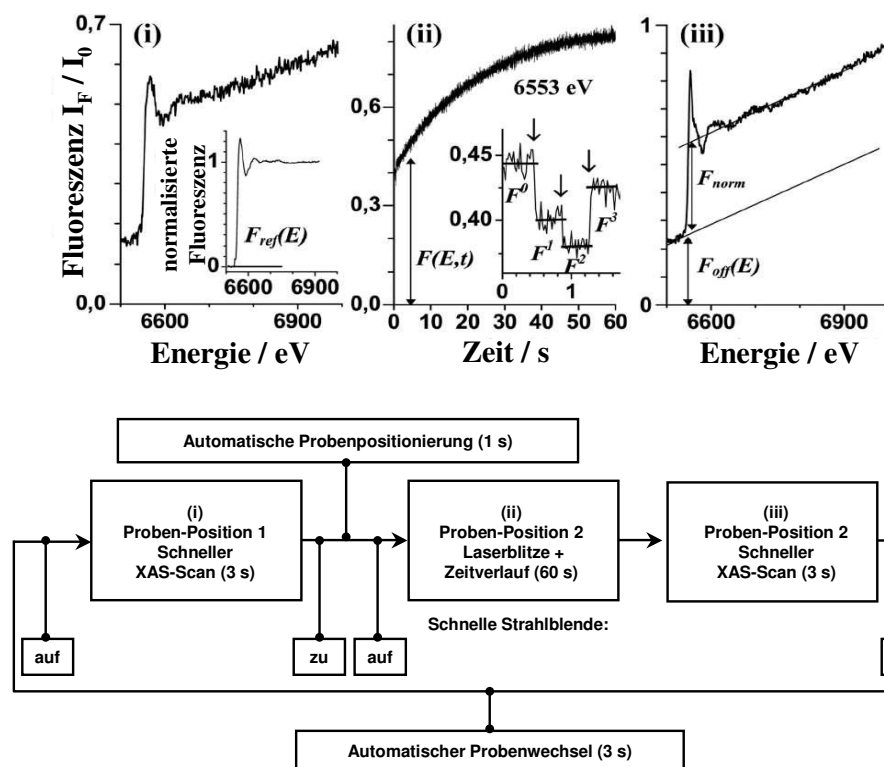


Abbildung 4.4: Beispiel-Protokoll für *Sampling*-XAS. (i) Schnelles Referenzspektrum des Mn_4Ca -Komplexes im S_1 -Zustand (keine Belichtung durch Laserblitze, Dauer eines Scans 3 s). Der Einschub zeigt das S_1 -Spektrum nach der Mittelung und Normalisierung mehrerer Scans. (ii) Zeitverlauf der Fluoreszenz bei 6553 eV (im Anstieg der Mn-K-Kante) mit einer Auflösung von 10 ms pro Punkt. Der Einschub zeigt die ersten 1,7 s des Zeitverlaufes, in denen die drei Laserblitze gegeben wurden (Pfeile). (iii) Schnelles XAS-Spektrum, gemessen nach dem Zeitverlauf. Das untere Bild zeigt schematisch den sequentiellen Ablauf des XAS-Experiments.

Sampling-XAS-Messungen beruhen auf der Aufzeichnung des Zeitverlaufes der Intensität der Röntgenfluoreszenz bei einer festen Anregungsenergie während einer Serie

sättigender Laserblitze. In Abb. 4.4 ist das Mess-Schema für diese Methode dargestellt. Um ein Referenzspektrum im S_1 -Zustand zu bekommen, wurde als erstes ein XAS-Scan an dunkeladaptierten PSII-Proben über den gesamten Energiebereich aufgezeichnet. Auf einer neuen Probenposition wurde dann ein Zeitverlauf bei einer festen Anregungsenergien durchgeführt, wobei bis zu 10 Laserblitze mit einem Abstand von 400 ms auf die Proben gegeben wurden. Für die Normalisierung wurde abschließend ein XAS-Spektrum auf der selben Probenposition über den gesamten Energiebereich an der vollständig durchreduzierten Proben (Mn_4^{II}) aufgezeichnet.

Jeder Blitz kann eine Veränderung in der Fluoreszenzintensität induzieren. Diese Veränderungen entstehen aus der Abhängigkeit vom S-Zustand des Mn_4Ca -Komplexes.

Zwischen den Laserblitzen konnte eine Photoreduktion der Probe ausgeschlossen (siehe Abschnitt 4.3) und die Fluoreszenzdaten zwischen der Laserblitzen gemittelt werden. Mehrere solcher Zeitverläufe bei jeder Anregungsenergie wurden gemittelt. Dadurch konnten die Veränderungen des Spektrums bei Änderungen des S-Zustands Punkt für Punkt verfolgt werden. Wenn diese Technik auf die Kanten-Region der Mangan-K-Kante angewendet wird, werden selbst kleinste Änderungen in den XANES-Spektren für alle vier S-Übergänge direkt sichtbar.

Für den Übergängen zwischen den einzelnen S-Zuständen konnten als absolute Neuerung die Kinetiken direkt verfolgt werden. Durch diese Technik wurde es erstmals möglich, Zwischenzustände im katalytischen Zyklus des Mn_4Ca -Komplexes zu beobachten.

4.2.3 *Flash-and-rapid-scan-XAS* bei RT

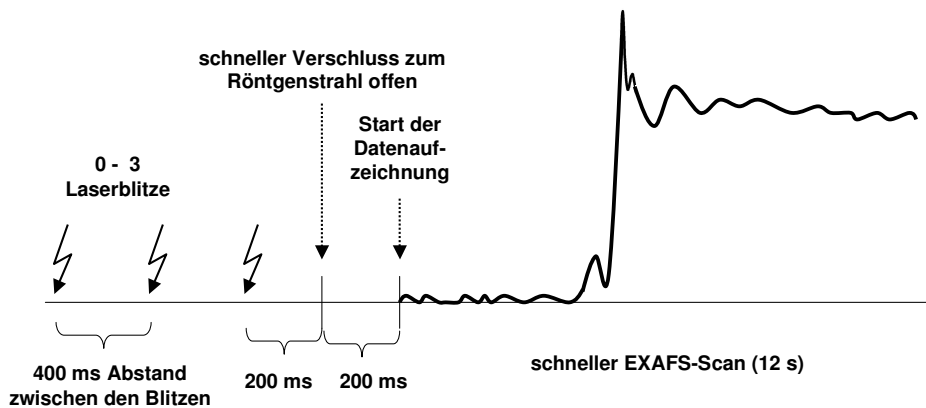


Abbildung 4.5: Schema der Messungen bei *Flash-and-rapid-scan-XAS*.

Bei *Flash-and-rapid-scan-XAS* wurden, vergleichbar mit *Freeze-quick-XAS*, komplette Spektren in den verschiedenen S-Zuständen aufgenommen. Dazu wurden direkt vor dem jeweiligen Scan 0-3 Laserblitze auf die Proben gegeben. Die Bedingungen für die Pulsenergie des Lasers und den Abstand zwischen den einzelnen Blitzen, um ein optimales Weiterschalten im S-Zyklus zu erreichen, wurden experimentell ermittelt. Während der Blitze wurde der Röntgenstrahl durch den schnellen Verschluss ausgeblendet. Kurz nach der Öffnung des Verschlusses wurde die Datenaufzeichnung gestartet. Die maximal mögliche Dauer von 12 Sekunden für einen Scan wurde zuvor durch Untersuchungen zur Photoreduktion ermittelt (siehe Abschnitt 4.3). Auf Grund der schnellen Datenaufzeichnung und der damit verbundenen geringen Aufnahmezeit pro Datenpunkt mussten viele Spektren für die Auswertung gemittelt werden.

Auch diese Spektren können mit denen der *Freeze-quench*-Proben verglichen werden und geben so Auskünfte über Unterschiede bei RT- und Tieftemperatur-XAS-Messungen.

4.3 Charakterisierung der Strahlenschädigung (Photoreduktion)

Die Wechselwirkung von Röntgenstrahlung mit Materie beinhaltet bei Energien unterhalb von 1 MeV zwei Prozesse: Photoeffekt und inelastischer Streuung (Compton-Effekt), wobei der Photoeffekt unterhalb von 10 keV dominiert, der Compton-Effekt oberhalb von 10 keV an Bedeutung gewinnt. Die Mehrzahl der Absorptions- oder Streuprozesse in biologischem Material findet an Kohlenstoff-, Sauerstoff-, oder Stickstoffatomen der Proteine, Lipide oder des Substratwassers statt. Das emittierte Photoelektron hat typischerweise eine kinetische Energie von einigen keV und löst eine Kaskade sekundärer Ionisationen aus, die zur Bildung von Radikalen und angeregten Zuständen führt. Die Erzeugung dieser potentiell hochreaktiven Radikalpaare in großer Zahl ist die Ursache der Strahlenschädigung in Proteinen. Die Absorption eines Röntgenquantens führt zur Bildung von ungefähr 250 Radikalpaaren [Dau et al., 1997]. Selbst bei tiefer Temperatur sind diese primären Radikale mobil. Eine Hypothese hinsichtlich der stattfindenden Radikalbildung und der Rekombinationsprozesse ist in [Grabolle, 2005; Grabolle et al., 2006] ausführlich dargestellt.

Der Mechanismus der Photoreduktion durch Röntgenstrahlung im PSII ist nur unzureichend verstanden. Es wird von einer Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Photoreduktion vom Redoxpotential ausgegangen [Grabolle et al., 2006]. Diese Vermutung wird durch neuere Untersuchungen zur röntgeninduzierten Veränderung in Proteinkristallen gestützt, welche die Existenz von Zentren besonders großer Empfindlichkeit zeigen [Yano et al., 2005]. Redoxinerte Aminosäurereste sind kaum von der Strahlungseinwirkung betroffen, während potenziell redoxaktive und besonders elektrophile Zentren (z.B. Disulfidbrücken) reduziert werden [Weik et al., 2000; Burmeister, 2000].

Durch Photoreduktion werden die Mn-Atome im PSII reduziert und die Struktur des Mn_4Ca -Komplexes wird modifiziert. Dabei kommt es zum Aufbrechen der μ -O-Brücken zwischen den Mn-Atomen und zur Verlängerung der Mn-Mn-Abstände. Letztendlich wird Mn^{II} gebildet, welches nach und nach aus der Bindungsstelle im Protein in das umgebende Medium austreten kann. Für jedes spezifische Röntgenexperiment sind daher Kontrollversuche notwendig, um die Artefakte infolge der Strahlenschädigung zu vermeiden oder bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen (siehe Kommentar von Yano et al. [2005] zu der postulierten Geometrie des Mn_4Ca -Komplexes in [Ferreira et al., 2004]).

Die ermittelten Raten der röntgeninduzierten Photoreduktion des Mn_4Ca -Komplexes sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Für Untersuchungen bei RT wurden Serien von XAS-Spektren aufgenommen, ohne den Bestrahlungsbereich auf der Probe zu ändern. Die so erhaltenen Spektren reflektieren die strahlungsinduzierten Veränderungen des Mn_4Ca -Komplexes. Bei 20 K verschiebt sich die Mn-K-Kante zu niedrigeren Energien unmittelbar nach dem Einsetzen der Röntgenstrahlung.

Es wird deutlich, dass die Rate der Photoreduktion 2-3 mal höher ist bei Proben, die sich vorrangig im S_2 - und S_3 -Zustand befinden, im Vergleich zu Proben im S_0 - und S_1 -Zustand. Der Verlauf der Photoreduktion zeigt ein zweiphasiges Verhalten

| Probe | Temperatur | Anfangsrate der röntgen- induzierten Photoreduk- tion von Mn, $k_{init.}$ [eV/min] | Kanten- verschiebung während des XAS-Scans, $-\Delta E_{edge}$ [eV] | geschätzter Photonen- fluss, I_{X-ray} [Phot./ (s \times mm ²)] | relative ge- mittelte Rate der Photo- reduktion, $k_{init.}^{mean}/I_{X-ray}$ [%] |
|---|---------------------|--|--|--|--|
| D2 <i>Bending magnet</i> -Messplatz, Bestrahlungsfläche ~ 5 mm ² , Datenaufnahme 20 min | | | | | |
| 0F | 20 K | 0,0023 | 0,045 | $1,5 \times 10^{11}$ | 74 |
| 1F | | 0,0050 | 0,100 | | |
| 2F | | 0,0047 | 0,094 | | |
| 3F | | 0,0032 | 0,064 | | |
| ID26 Undulator-Messplatz, Bestrahlungsfläche ~ 1 mm ² , Datenaufnahme 12 s | | | | | |
| 0F | RT | 0,14 | 0,028 | 1×10^{13} | 93 |
| 1F | (<i>Flash-and-</i> | 0,37 | 0,074 | | |
| 2F | <i>rapid-scan-</i> | 0,48 | 0,096 | | |
| 3F | XAS) | 0,28 | 0,056 | | |
| ID26 Undulator-Messplatz, Bestrahlungsfläche ~ 1 mm ² , Datenaufnahme 400 ms | | | | | |
| 0F | RT | 4,8 | 0,032 | 3×10^{14} | 100 |
| 1F | (<i>Sampling-</i> | 13,8 | 0,092 | | |
| 2F | XAS) | 15,2 | 0,101 | | |
| 3F | | 7,2 | 0,048 | | |

Tabelle 4.1: Raten der röntgeninduzierten Photoreduktion des Mn₄Ca-Komplexes bei Raumtemperatur und bei 20 K. Die Anfangsraten ergaben sich durch lineare Simulation der Daten in Abb. 4.7 und 4.8 für PSII-Proben, die mit null, ein, zwei oder drei Laserblitze belichtet worden waren.

[Grabolle, 2005]. In der schnellen Phase kommt es zu einer Ein-Elektronenübertragung, die nachfolgende Hauptphase ist um den Faktor ~ 100 langsamer. Die Ratenkonstante der langsamen Phase zeigt eine etwa lineare Temperaturabhängigkeit mit einem deutlich Sprung bei ~ 200 K (Abb. 4.6). Damit kann die Proteindynamik als ratenlimitierend angesehen werden [Angell, 1995; Weik, 2003]. Es wird deutlich, dass besonders in XAS-Messungen bei Temperaturen über 200 K die Strahlenschädigung eine große Rolle spielt.

In *Flash-and-rapid-scan*-Experimenten an der ID26 wurden die Röntgenfluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit bei einer festen Anregungsenergie im Bereich der Mn-K-Kante (6549,5 eV) aufgenommen, um die Rate der Photoreduktion zu ermitteln (Abb. 4.7 (A)). In diesem Falle war der Photonfluss gegenüber dem Maximalfluss um den Faktor 25 - 35 durch verschiedene Filter reduziert. Die Energie 6549,5 eV befindet sich im Anstieg des Mn-K-Kanten-Spektrums und es ist ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität infolge der Kantenverschiebung zu niedrigen Energien zu beobachten

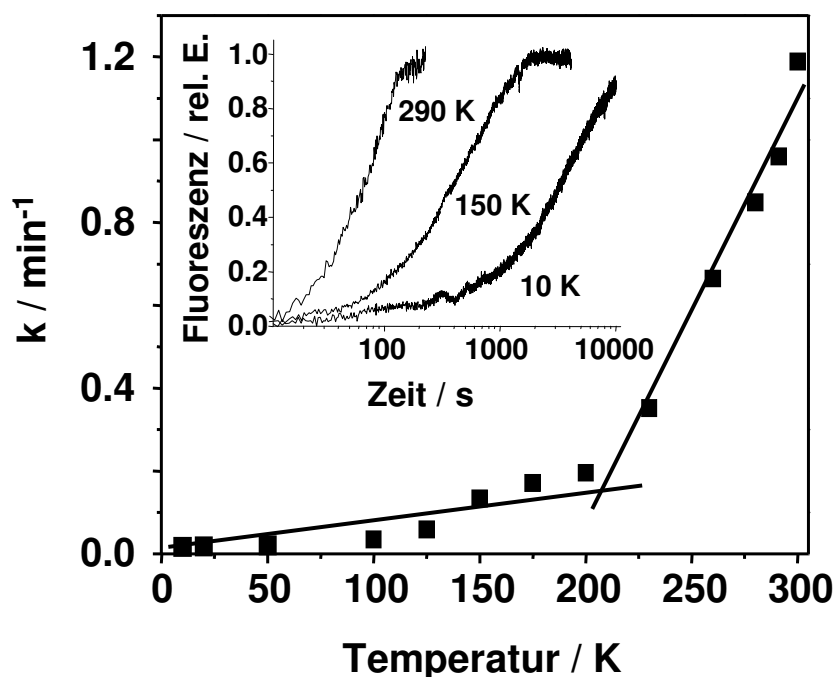


Abbildung 4.6: Photoreduktion des Mn_4Ca -Komplexes in Abhängigkeit von der Temperatur. Dargestellt sind die Ratenkonstanten, ermittelt durch einfach-exponentielle Simulation der Zeitverläufe (gemäß $F = F_0 + A(1 - e^{-k \cdot t})$). Entnommen aus [Grabolle, 2005].

(siehe Einschub in Abb. 4.7 (A)). Es ist ebenfalls ein zweiphasiges Verhalten in der Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer zu beobachten. Anstelle der schnellen Phase bei tiefen Temperaturen tritt hier eine Verzögerungsphase vor dem exponentiellen Anstieg auf [Haumann et al., 2002a]. Innerhalb dieser Verzögerungsphase findet keine Photoreduktion des Mn_4Ca -Komplexes statt. Von experimentellem Interesse war es daher, die Dauer eines Scans soweit zu verkürzen, dass entweder ein komplettes XAS-Spektrum innerhalb der Verzögerungsphase aufgenommen werden konnte oder aber die Strahlenschädigung soweit zu minimieren, dass nur ein geringer Prozentsatz von $\leq 5\%$ der Mn-Atome während der XAS-Messungen zu Mn^{II} reduziert wird.

Bei der Annahme eines Oxidationszustands von $\text{Mn}_2^{\text{III}}\text{Mn}_2^{\text{IV}}$ im S_1 -Zustand ist die vollständige Reduktion des Komplexes zu Mn_4^{II} mit der Aufnahme von sechs Elektronen verbunden. Der gesamte Anstieg der Fluoreszenz auf Grund der Photoreduktion kann nach einer Kalibrierung als Energie der K-Kante wiedergegeben werden (zweite Y-Skala in Abb. 4.7 (A)). Ausgehend von Proben in S_1 -Zustand wird eine Verzögerungsphase beobachtet, die bei dem hier vorherrschenden Photonenfluss bei ~ 40 Sekunden lag. Diese initiale Verzögerungsphase tritt bei 20 K nicht auf. Bei Proben, die durch Laserblitze belichtet worden waren (S_2 , S_3 , S_0), war eine verkürzte Verzögerungsphase zu beobachten.

Abbildung 4.7 (B) zeigt die ersten fünfzehn Sekunden der Zeitverläufe, durchgeführt an dunkeladaptierten Proben (0F) und an Proben, die mit einem (1F), zwei (2F) oder drei (3F) Laserblitzen unmittelbar vor dem Einsetzen der Strahlenbelastung belichtet worden waren. Aus den Messungen bei 20 K (Tabelle 4.1) ergab sich eine höhere Anfangsrate der röntgeninduzierten Photoreduktion bei 1F- und 2F-Proben im Vergleich zu 3F- und 0F-Proben. Das selbe Verhalten zeigte sich in RT-Messungen. Am Ende des RT-XAS-Scans von 12 Sekunden ist die maximale Verschiebung der K-Kante zu niedrigeren Energien kleiner als 0,1 eV. Im Falle des Mangans korreliert die

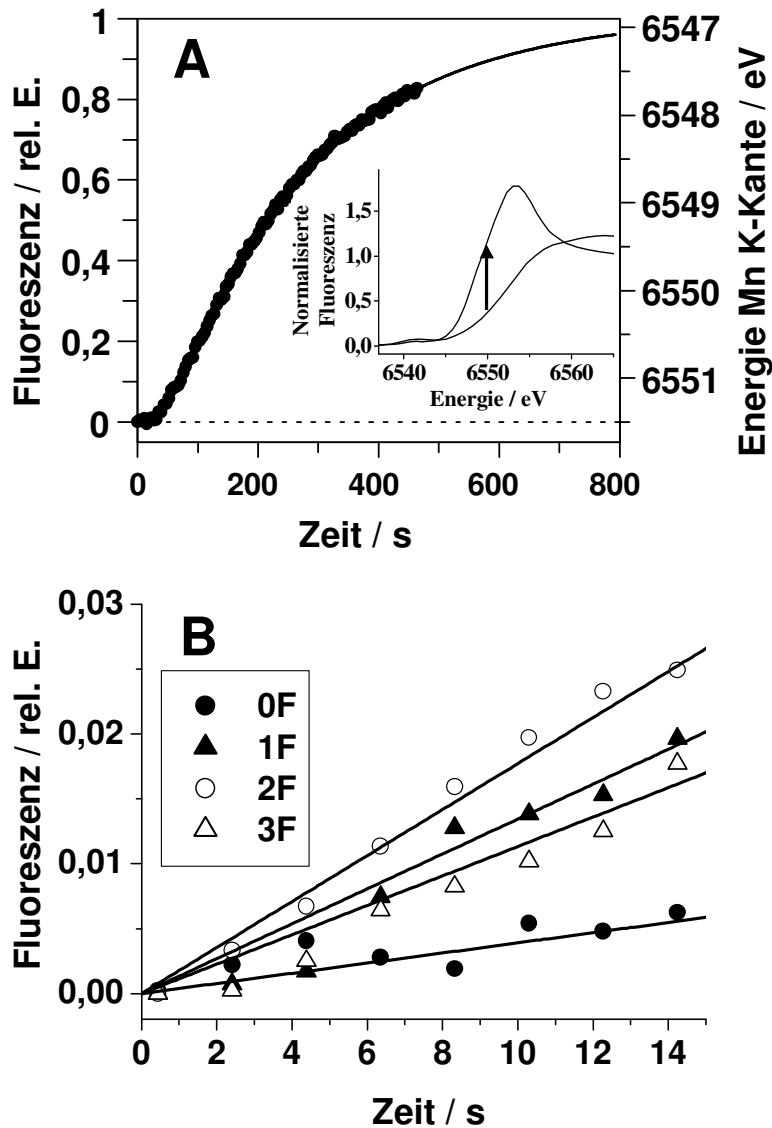


Abbildung 4.7: Photoreduktion des Mn_4Ca -Komplexes in *Flash-and-rapid-scan-XAS*-Experimenten bei RT und abgeschwächtem Röntgenstrahl. (A) Normalisierter Zeitverlauf der Röntgenfluoreszenz bei einer festen Anregungsenergie von 6549,5 eV des anfänglich im S_1 -Zustand befindlichen Mn_4Ca -Komplexes. Die dünne Linie zeigt eine mono-exponentielle Simulation ohne Berücksichtigung der Verzögerungsphase. Einschub: Spektrum der Mn-K-Kante vor dem Zeitverlauf (S_1 -Zustand mit $\text{Mn}_2^{\text{III}}\text{Mn}_2^{\text{IV}}$) und nach 15 min Strahlenbelastung (Mn^{II}). Der Pfeil markiert den Anstieg der Fluoreszenz bei der Anregungsenergie des Zeitverlaufs. (B) Die ersten 15 s der Zeitverläufe von Proben des Mn_4Ca -Komplexes im anfänglichen S_1 -Zustand (0F) und nach Belichtung mit einem (1F), zwei (2F) und drei (3F) Laserblitzen um den S_2 -, S_3 - und S_0 -Zustand einzustellen. Jeder Punkt ist aus 3-4 Zeitverläufen gemittelt. Die Linien geben lineare Simulationen mit Parametern, die in Tabelle 4.1 aufgelistet sind, wieder.

Position der K-Kante auf der Energieachse mit dem Oxidationszustand des absorbierenden Manganatoms. Eine Reduktion führt zu einer Kantenverschiebung zu geringeren Energien [Dau und Haumann, 2003]. Da eine Ein-Elektronen-Oxidation eines der vier Manganatome beim Übergang $S_1 \rightarrow S_2$ zu einer Verschiebung der K-Kante um 0,7-0,8 eV führt [Dau und Haumann, 2003], reflektiert eine Verschiebung um 0,1 eV eine Ein-Elektronen-Reduktion bei maximal 15 % der Mn_4Ca -Komplexe bzw. ≤ 4 % der vorhandenen Mn-Atome. Damit verblieben mehr als 95 % der Mn-Atome in ihrem Oxidationszustand während der gesamten Dauer einer einzelnen *Flash-and-rapid-scan*-Messung. Bei einem stark abgeschwächten Röntgenstrahl und einer Scandauer von

12 Sekunden kann damit der Einfluss der Photoreduktion auf die XAS-Spektren in den *Flash-and-rapid-scan*-Experimenten vernachlässigt werden.

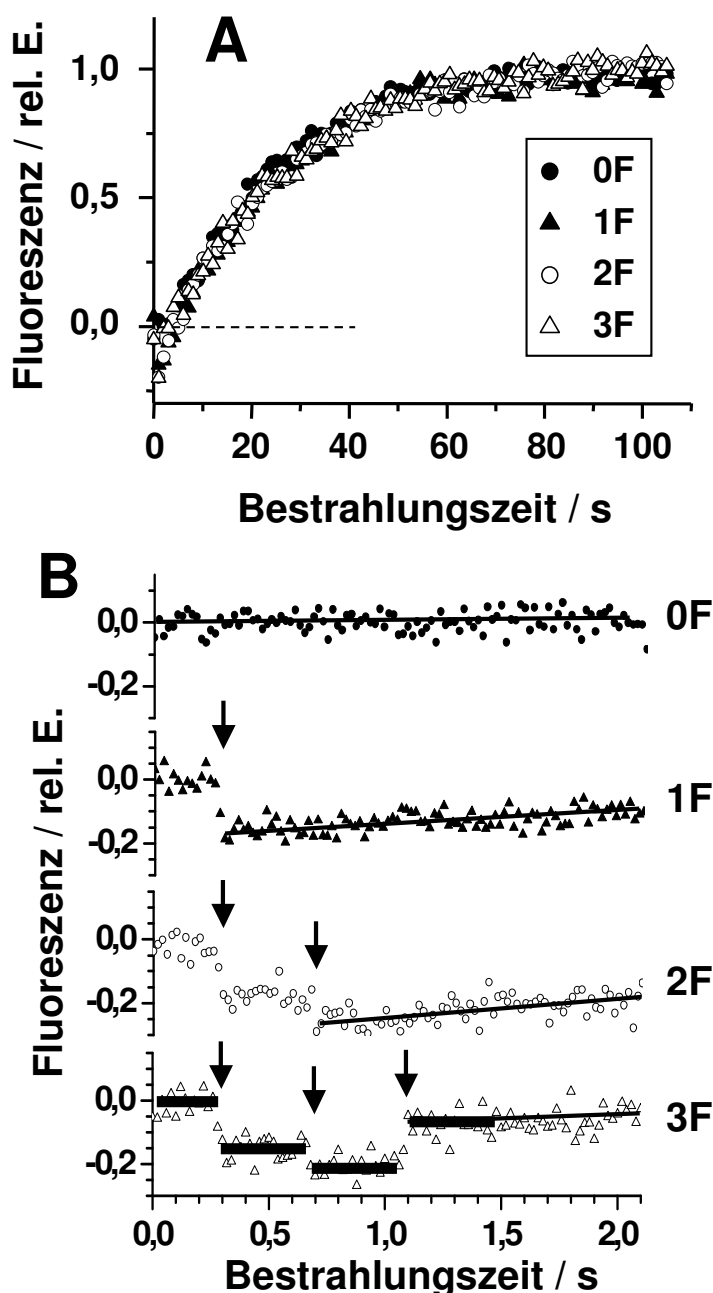


Abbildung 4.8: Photoreduktion des Mn₄Ca-Komplexes unter *Sampling*-XAS-Bedingungen bei RT und maximalen Photonenfluss. (A) Normalisierter Zeitverlauf der Röntgenfluoreszenz bei einer festen Anregungsenergie von 6553 eV. Die Zeitaufösung betrug 20 ms pro Punkt. Jeder Zeitverlauf ergibt sich aus dem Mittelwert von 3-4 Scans an unterschiedlichen Proben. (B) Die ersten zwei Sekunden der Zeitverläufe in (A). Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, bei denen die Laserblitze gegeben wurden. Durchgezogenen Linien stellen lineare Simulationen des Verlaufes dar. Die Balken in dem untersten Verlauf illustrieren den Daten-Bereich, in dem vor dem ersten Blitz (0F) und nach einem (1F), zwei (2F) und drei (3F) Blitzen zur Konstruktion der XAS-Spektren gemittelt wurde.

Bei den *Sampling*-XAS Experimenten zum zeitlichen Verhalten des Mn₄Ca-Komplexes während der Bestrahlung wurde der maximale Photonenfluss verwendet. Um die Rate der Photoreduktion unter diesen Bedingungen abschätzen zu können, wurden ebenfalls Zeitverläufe aufgezeichnet. Abb. 4.8 (A) zeigt die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit bei Proben, die mit 0, 1, 2 oder 3 Laserblitzen be-

lichtet worden waren. Nach ungefähr einer Minute waren alle vier Mn-Atome zu Mn^{II} reduziert, es kam zu keiner Änderung der Fluoreszenzintensität mit weiterer Röntgenbestrahlung. Die Photoreduktion kann nach einer Verzögerungsphase (von $\sim 2-3$ s Länge im S_1 -Zustand) durch eine mono-exponentielle Simulation beschrieben werden. Die Zeitkonstante ist nahezu unabhängig vom S-Zustand. In Abb. 4.8 (B) werden die ersten Sekunden dieser Zeitverläufe dargestellt. Die Zeitpunkte, an denen die Laserblitze gegeben wurden, sind mit Pfeilen markiert. Jeder Blitz induziert einen Sprung im Fluoreszenzniveau, welcher auf die unterschiedlichen Positionen der K-Kanten der einzelnen S-Zustände zurückzuführen ist. In den ersten zwei Sekunden nach dem letzten Blitz kann ein linearer Anstieg angenommen werden. Dabei zeigt sich auch hier, dass die anfängliche Photoreduktion des Mn_4Ca -Komplexes 2-3 mal schneller ist bei Proben, die im S_2 - und S_3 -Zustand vorliegen, verglichen mit Proben im S_0 - und S_1 -Zustand (Tabelle 4.1). Bei den *Sampling*-XAS-Experimenten wurden nur die Datenpunkte im Zeitintervall zwischen den einzelnen Blitzen (siehe Abb. 4.8 (B)) für die Konstruktion von XAS-Spektren verwendet. Innerhalb dieses Zeitbereichs war die maximale Kantenverschiebung durch die Photoreduktion nicht größer als 0,1 eV. Damit ist bei den *Sampling*-Experimenten ebenfalls der Einfluss der Photoreduktion vernachlässigbar gering.

- Es wurde vor den eigentlichen XAS-Messungen eine gründliche Untersuchung der Photoreduktion des Mn_4Ca -Komplexes bei RT auf PSII-Proben durchgeführt. Dabei konnte für *Flash-and-rapid-scan*-XAS eine Scan-Dauer von 12 s ermittelt werden, in der keine Reduktion des Mn_4Ca -Komplexes stattfindet und dadurch die strukturellen und elektronischen Informationen in dem Spektrum unverändert blieben. Bei den Untersuchungen zu *Sampling*-XAS konnte gezeigt werden, dass die Summation der Fluoreszenzintensität über 400 ms nach jedem Blitz unkritisch ist, unabhängig vom S-Zustand.

4.4 Vergleich von XAS bei RT und 20 K

Ein wichtiger Aspekt von XAS-Untersuchungen bei Raumtemperatur am Mn_4Ca -Komplex des PSII war der Vergleich mit Daten aus Untersuchungen bei tiefen Temperaturen. Durch den Vergleich von XANES- und EXAFS-Spektren in allen vier S-Zuständen sollte geklärt werden, ob unter quasi-physiologischen Bedingungen bei Raumtemperatur die selben Ergebnisse erzielt werden, wie bei 20K-Experimenten.

Abbildung 4.9 zeigt die Kantenspektren des Mn_4Ca -Komplexes im PSII bei 20 K und bei RT. (A) Bei der *Freeze-quick*-Prozedur werden PSII-Proben in verschiedenen S-Zuständen, wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, hergestellt. Die XAS-Messungen wurden bei 20 K durchgeführt. (B) Die Messungen bei RT wurden nach dem *Sampling*-Prinzip durchgeführt. Die Kanten der reinen S-Zustände wurden aus den XANES-Spektren durch eine Entfaltungsprozedur gewonnen, welche die Zustandsdurchmischung in den PSII-Proben durch unvollständiges Fortschreiten im katalytischen Zyklus berücksichtigt. Die Parameter für die Entfaltung wurden durch Simulationen der Oszillation des S_2 -*Multiline* EPR-Signals, durch Messung der prompten Fluoreszenz und der Rekombinationsfluoreszenz der Antennen-Chl des PSII bestimmt (auf die Entfaltungsprozedur und deren Auswirkung auf die Auswertung von XAS-Spektren wird in [Haumann et al., 2005b], Supporting Information, ausführlich eingegangen).

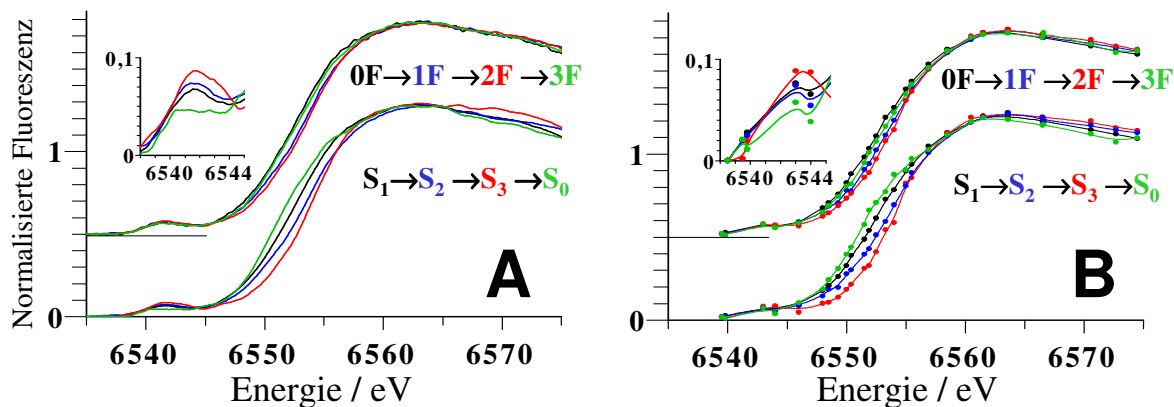


Abbildung 4.9: Kantenspektren des Mn_4Ca -Komplexes in den vier S-Zuständen. (A) Ergebnisse von *Freeze-quench*-Proben, gemessen bei 20 K nach null (0F, schwarz), einem (1F, blau), zwei (2F, rot) und drei (3F, grün) Blitzen (obere Kurvenschar) sowie Ergebnisse für die reinen S-Zustände nach der Entfaltung (untere Kurvenschar). (B) Ergebnisse wie in (A), jedoch aus Zeitverlaufsmessungen an dunkeladaptierten Proben bei Belichtung mit sättigenden Laserblitzen im Abstand von 400 ms (*Sampling-XAS*). Die Einschübe stellen jeweils einen vergrößerten Ausschnitt des Vorkanten-Maximums dar.

Für die Bestimmung der Kantenenergien wurde die Integralmethode verwendet ([Dau et al., 2003], zum Vergleich der unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der Kantenenergie siehe [Liebisch, 2005]). Die mit unterschiedlichen Methoden gemessenen Spektren weisen große Ähnlichkeit auf. Betrachtet man die Unterschiede zwischen den Spektren von verschiedenen S-Zuständen, so lässt sich eine annähernd gleich große positive Kantenverschiebung für die Übergänge $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$ und $S_0 \rightarrow S_1$ beobachten. Im Übergang $S_{3,4} \rightarrow S_0$ verschiebt sich die Kante zu niedrigeren Energien.

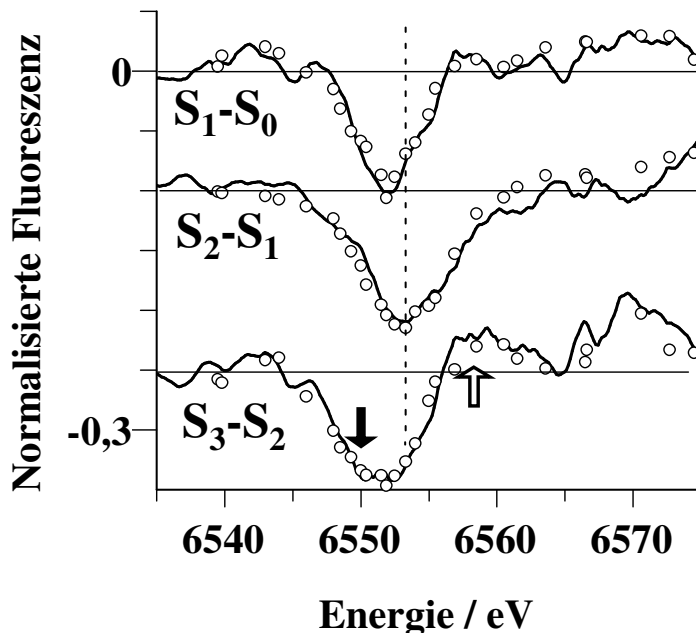


Abbildung 4.10: XANES-Differenzspektren. (—) Differenzen in den Kantenspektren aus Abb. 4.9 (A) der reinen S-Zustände bei 20 K. (○) Differenzen in den Kantenspektren aus Abb. 4.9 (B) der reinen S-Zustände bei RT. Die gestrichelte Linie läuft durch das Minimum im S_2 - S_1 -Differenzspektrum.

In Abb. 4.10 sind die XANES-Differenzspektren der reinen S-Zustände bei 20 K und bei RT dargestellt. Im Gegensatz zum $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang ist beim $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang eine Verschiebung im ansteigendem Teil der Kante zu beobachten (Minimum bei

6552 eV in Abb. 4.10, schwarzer Pfeil). Außerdem ist nur beim $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang ein signifikanter Anstieg in der Absorption bei 6558 eV detektierbar (weißer Pfeil in Abb. 4.10). Die mit der Integralmethode bestimmten Änderungen der Kantenpositionen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Es lässt sich feststellen, dass sich die in Messungen bei 20 K beobachteten Kantenverschiebungen von jeweils etwa 0,7 eV pro S-Zustandsübergang durch Messungen bei Raumtemperatur unter quasi-physiologischen Bedingungen bestätigen. Die Größe der Verschiebung ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass in jedem Übergang ein Manganatom oxidiert wird.

| | E_{Kante} / eV | $\Delta E_{Kante} / \text{eV}$ | | | |
|-------|-------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | S_1 | $S_0 \rightarrow S_1$ | $S_1 \rightarrow S_2$ | $S_2 \rightarrow S_3$ | $S_3 \rightarrow S_0$ |
| 20 K | 6551,62 | 0,58 | 0,76 | 0,71 | -2,05 |
| 295 K | 6551,79 | 0,57 | 0,77 | 0,70 | -2,06 |

Tabelle 4.2: Änderungen der Kantenenergie infolge der S-Übergänge. Die angegebenen Energien resultieren aus entfalteten Spektren für reine S-Zustände, die bei 20 K bzw. bei Raumtemperatur gemessen wurden. Die Kantenpositionsbestimmung erfolgte mit Hilfe der Integralmethode an auf eins normierten Spektren (Parameter: $\mu_1 = 0,15$; $\mu_2 = 1$; siehe [Dau et al., 2003]).

Aus den Kantenenergien kann der mittlere Oxidationszustand der Mn-Atome im PSII bestimmt werden [Dau et al., 2003]. Form und Energie der Kante hängen von der absoluten Ladung und von Parametern wie Metall-Ligand-Bindungslänge und -Geometrie ab. Der Kantenverlauf beim S_1 - und S_2 -Zustand ist annähernd gleich, es tritt nur eine Verschiebung zu höheren Energien auf. Daraus kann auf eine Oxidation ohne große strukturelle Änderungen geschlossen werden. Die spezifischen Veränderungen der K-Kante, die während des $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs beobachtet werden, können durch die Annahme eines Überganges von fünffach koordiniertem Mn^{III} zu sechsfach koordiniertem Mn^{IV} erklärt werden. Diese Annahme ist mit den EXAFS-Ergebnissen vereinbar, die im Gegensatz zu den anderen Übergängen beim $S_2 \rightarrow S_3$ keine Verkürzungen der mittleren Mangan-Ligand-Distanzen aufweisen [Dau et al., 2003; Liebisch, 2005].

Durch die *Sampling*-Methode können spektrale Änderungen direkt verfolgt werden (Abb. 4.11). Bei verschiedenen Anregungsenergien konnte die Richtung und das relative Ausmaß der Änderungen der Röntgenabsorption, die mit den individuellen S-Zustandsübergängen verbunden sind, unmittelbar beurteilt werden. Abb. 4.11 zeigt für ausgewählte Anregungsenergien die Zeitverläufe der Röntgenfluoreszenz, während die Proben mit drei Blitzen belichtet wurden. Im ansteigenden Teil der K-Kante (bei 6549 eV) induziert der erste und zweite Blitz eine ungefähr gleichgroße Abnahme der Fluoreszenzintensität, während bei 6553 eV die durch den zweiten Blitz hervorgerufene Abnahme deutlich kleiner war. Bei 6560 eV, d.h. unmittelbar vor dem Hauptmaximum der K-Kante, induziert der erste Blitz eine Absorptionzunahme, dagegen der zweite Blitz eine Abnahme. Die Positionen der drei Energien in der K-Kante sind durch Pfeile im linken unteren Bild von Abb. 4.11 markiert. Die Zeitverläufe im EXAFS-Bereich von 6635–6860 eV (rechtes unteres Bild in Abb. 4.11) weisen nur auf kleine Absorptionsänderungen beim ersten Blitz hin. Jedoch legen die jeweils deutlichen Änderungen beim zweite und dritte Blitz nahe, dass im Vergleich zum $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang die Übergänge $S_2 \rightarrow S_3$ und $S_{3,4} \rightarrow S_0$ mit signifikanten strukturellen Änderungen im Mn_4Ca -Komplex verbunden sind.

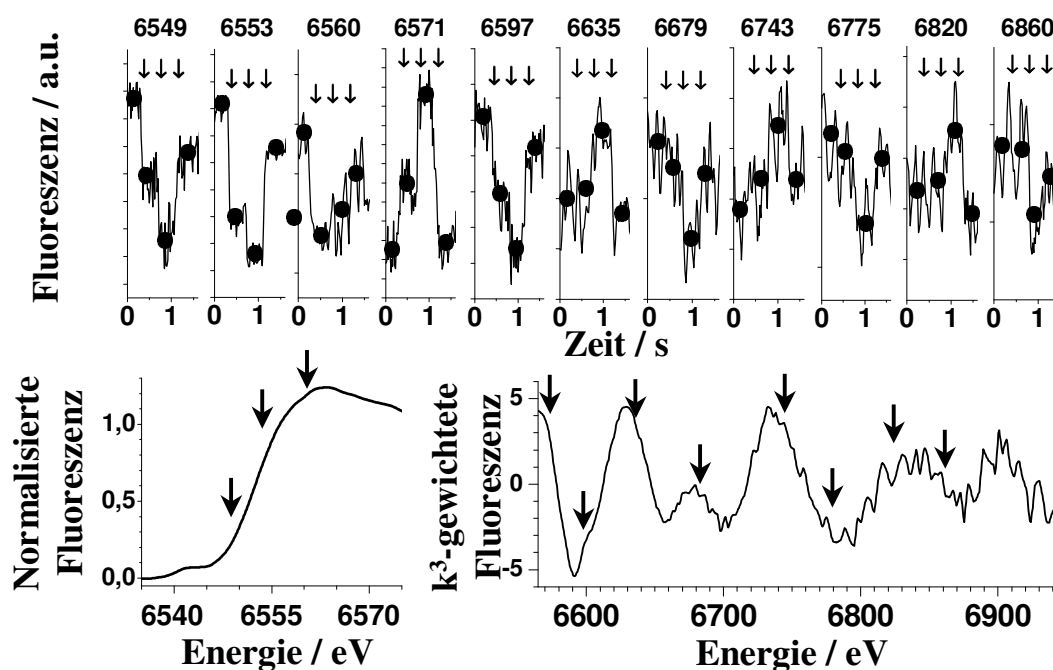


Abbildung 4.11: Durch Laserblitze hervorgerufene Änderungen der Röntgenfluoreszenz während des S-Zyklus des Mn_4Ca -Komplexes. Das obere Bild stellt die Zeitverläufe der Fluoreszenz bei ausgewählten Anregungsenergien im Bereich der K-Kante und des EXAFS-Bereich dar. Die Zeitaufösung betrug 20 ms pro Datenpunkt. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Laserblitze an. Die Punkte geben den Fluoreszenzpegel wieder, der sich aus der Mittelung der Daten zwischen den Blitzen berechnet. Das linke untere Bild zeigt ein K-Kanten-Spektrum bei Raumtemperatur an einer dunkeladaptierten Proben. Das rechte Bild stellt die k^3 -gewichteten EXAFS-Oszillationen auf einer Energieskala dar. Die Pfeile markieren die Anregungsenergien aus dem oberen Bild.

In Abb. 4.12 sind die EXAFS-Spektren und die zugehörigen Fourier-Transformierten bei 20 K und RT dargestellt: (A) Messungen bei 20 K mit *Freeze-quench*-Proben. (B) *Flash-and-rapid-scan*-Messungen. (C) Ergebnisse aus *Sampling-XAS*. In den FTs der 20 K-Spektren sind im Vergleich zu den Spektren bei RT die Maxima deutlich schmaler und höher, ansonsten sind die mit den S-Übergängen verbundenen Änderungen ähnlich. Die Amplitude der FT-Maxima ist für den S_1 - und den S_2 -Zustand (dunkeladaptierte Proben und 1F-Proben) ungefähr gleich. In 2F-Proben, in denen sich die Mehrzahl der Zentren im S_3 -Zustand befindet, nimmt die Stärke dieser Oszillationen deutlich zu und nach dem dritten Blitz (mehrheitlich S_0 , 3F) wieder ab. In dem mit II bezeichneten Maximum in den Fourier-Transformierten ist beim Übergang von S_1 nach S_2 (schwarze bzw. blaue Linie) fast keine Änderung zu beobachten, während der Übergang S_2 nach S_3 eine deutliche Zunahme und der Übergang von S_3 nach S_0 eine Abnahme des Maximums zeigt. Diese Änderungen finden sich in allen drei Datensätzen wieder.

Simulationen der EXAFS-Spektren mit einem Zwei-Schalen-Fitansatz führen zu weitgehend identischen Ergebnissen hinsichtlich der Koordinationszahlen und Distanzen für die Daten bei 20 K und RT. Der Debye-Waller-Faktor ist auf Grund verstärkt thermischer Unordnung bei RT gegenüber 20 K erhöht. Dabei ist bei dunkeladaptierten PSII-Proben und nach dem ersten und dritten Blitz die Anzahl der Mn-Mn-Vektoren mit $\sim 2,7 \text{ \AA}$ Länge nahezu eins (Tabelle 4.3). Nach zwei Blitzen ist die Anzahl ungefähr 1,5. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Annahme, dass sich während des $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ -Übergang eine weitere Mn- $(\mu\text{-O})_2$ -Mn-Brücke bildet. Das daraus abgeleitet Modell der photosynthetischen Wasserspaltung wird in Abschnitt 4.7 diskutiert.

- XAS-Ergebnisse bei RT und bei 20 K zeigen, dass nur minimale temperaturabhängige Änderungen in den Absorber-Rückstreuer-Abständen auftreten. In allen S-Zuständen kann daher eine temperaturabhängige Änderung des Protonierungsgrades der di- μ -O-Brücken oder Änderungen in den Mn-Verbrückungen ausgeschlossen werden. Dies ist in Hinblick auf die Erstellung detaillierter mechanistischer Modelle von großer Bedeutung.

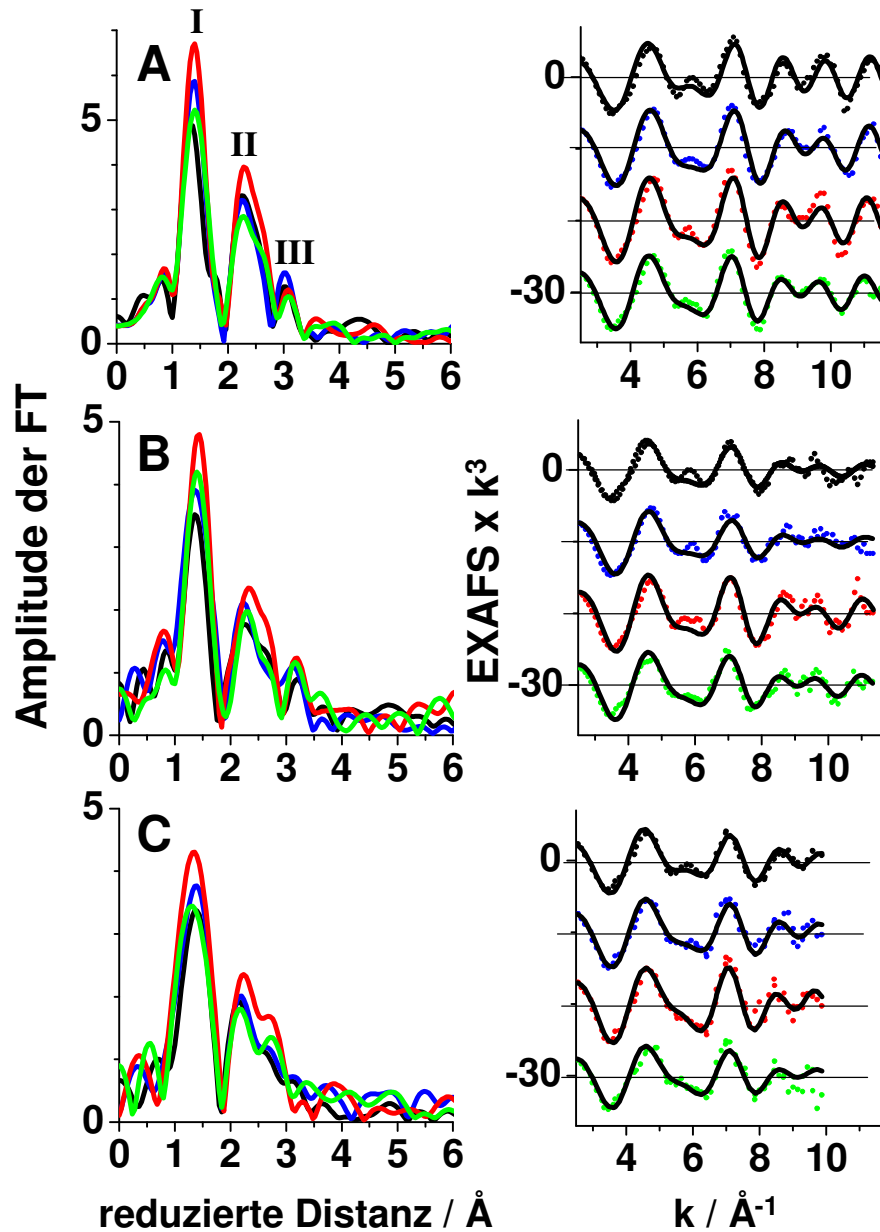


Abbildung 4.12: Fourier-transformierte und EXAFS-Oszillationen des Mn_4Ca -Komplexes nach der Belichtung mit Laserblitzen. (A) *Freeze-quench*-Messungen bei 20 K. (B) *Flash-and-rapid-scan*-Messungen bei Raumtemperatur. (C) *Sampling-XAS* bei Raumtemperatur. In der rechten Spalte werden die k^3 -gewichteten EXAFS-Oszillationen nach null (schwarze), einem (blaue), zwei (rote) und drei (grüne Punkte) Blitzen sowie Simulationen mit einem Zweischalen-Fitansatz (schwarze durchgezogene Linie) gezeigt (Parameter siehe Tabelle 4.3). Die linke Spalte zeigt die Amplituden der Fourier-transformierten der EXAFS-Daten aus der rechten Spalte (gleicher Farbcode). Die Fourier-Transformationen wurden unter Anwendung eines \cos^2 -Fensters über 10 % des k -Bereiches, und für k -Werte von 1,8 bis 11,8 \AA^{-1} (A), von 1,8 bis 11,4 \AA^{-1} (B) und von 1,8 bis 9,9 \AA^{-1} (C) durchgeführt. Fourier-Peak I: Mn-O/N bei 1,8-2 \AA ; II: Mn-Mn bei $\sim 2,7$ \AA , Mn-Mn bei $\sim 3,1$ \AA ; III: Mn-Mn/Ca bei 3,3-3,6 \AA .

| | | N_i (per Mn)/ R_i (Å)/ σ_i (Å) | | | R_F (%) |
|---|-----|---|------------------|--|-----------|
| | | Mn-O/N | Mn-Mn | | |
| 20 K | 0F | 4,55/1,858/0,112 | 1,24/2,712/0,045 | | 27,2 |
| | 1F* | 4,48/1,849/0,091 | 0,96/2,711/0,033 | | 21,7 |
| | 2F | 4,79/1,848/0,087 | 1,41/2,736/0,047 | | 20,4 |
| | 3F | 4,65/1,857/0,099 | 1,25/2,742/0,065 | | 22,3 |
| RT (<i>Flash-and-rapid-scan-XAS</i>) | 0F | 4,17/1,849/0,114 | 1,09/2,716/0,082 | | 35,2 |
| | 1F | 4,23/1,842/0,116 | 1,02/2,708/0,084 | | 36,8 |
| | 2F | 4,68/1,844/0,098 | 1,49/2,730/0,079 | | 33,6 |
| | 3F | 4,37/1,850/0,104 | 1,20/2,741/0,080 | | 28,5 |
| RT (<i>Sampling-XAS</i>) | 0F | 4,07/1,851/0,111 | 1,13/2,713/0,069 | | 23,7 |
| | 1F | 4,27/1,842/0,108 | 1,09/2,712/0,066 | | 24,3 |
| | 2F | 4,89/1,839/0,104 | 1,32/2,738/0,062 | | 20,9 |
| | 3F | 4,29/1,845/0,112 | 1,24/2,742/0,090 | | 32,8 |

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Zweischalen-Simulation der EXAFS-Oszillationen nach null, einem, zwei oder drei Blitzen. N_i : Koordinationszahl pro Mn-Atom, R_i : Distanz zwischen absorbierendem Manganatom und Rückstreuer, σ_i^2 : Debye-Waller-Faktor, R_F : gewichteter R-Faktor. Die R_F -Werte wurden aus Fourier-gefilterten Spektren über einen Bereich von 1- 3,5 Å reduzierter Distanz berechnet. Für die Simulationen der k^3 -gewichteten EXAFS-Oszillationen betrug der k -Bereich 1,8 bis 11,8 Å⁻¹ (20 K), 1,8 bis 11,4 Å⁻¹ (RT, *Flash-and-rapid-scan-XAS*) und 1,8 bis 9,9 Å⁻¹ (RT, *Sampling-XAS*). * Kontinuierlich belichtet bei 200 K, siehe Abschnitt 2.4.2.

4.5 Zeitaufgelöste XAS bei RT

Durch Messungen von Zeitverläufen der Fluoreszenzintensität während einer Sequenz von Laserblitzen konnte der Mn₄Ca-Komplex beim Durchlaufen des katalytischen Zyklus direkt beobachtet werden (Abb. 4.13). Bei einer Zeitauflösung von 10 μs konnten so die Redoxübergänge des Metallzentrums in Echtzeit verfolgt werden. In Abb. 4.13 ist deutlich eine Oszillation in der Fluoreszenzabsorption mit der Periode vier zu beobachten, die sich in gedämpfter Form nach dem fünften Blitz wiederholt. Die gesamte Lasersequenz dauerte weniger als fünf Sekunden, damit konnten Strahlenschäden entsprechend der Untersuchungen zur Photoreduktion im vorherigen Abschnitt ausgeschlossen werden. Die Änderungen in der Fluoreszenz wurde nur durch die S-Zustandspopulation des Mn₄Ca-Komplexes bedingt.

Die Veränderungen der Mn-Röntgenfluoreszenz in PSII-Proben während der Belichtung mit Laserblitzen wurden mit einer Zeitauflösung von 10 μs verfolgt (Abb. 4.14). Die bei einer Anregungsenergie von 6552 eV für den S₁ → S₂- und S₂ → S₃-Übergang beobachtete einfach-exponentielle Abnahme zeigt die Oxidation des Mn₄Ca-Komplexes durch das Y_Z⁺•-Radikal mit Zeitkonstanten $t_{1/2}$ von 70 μs und 190 μs. Für den S₀ → S₁-Übergang war $t_{1/2} \leq 30$ μs. Für S₃ → S₀ induziert der Laserblitz eine Absorptionzunahme, hervorgerufen durch die Mn-Reduktion durch die dem Substratwasser entzogenen Elektronen mit $t_{1/2} = 1,1$ ms, mit einer voraus gehenden Verzögerungsphase von ~250 μs (Abb. 4.15). Diese Verzögerungsphase deutet auf einen Zwischenzustand hin, der als S₄-Zustand interpretiert werden kann.

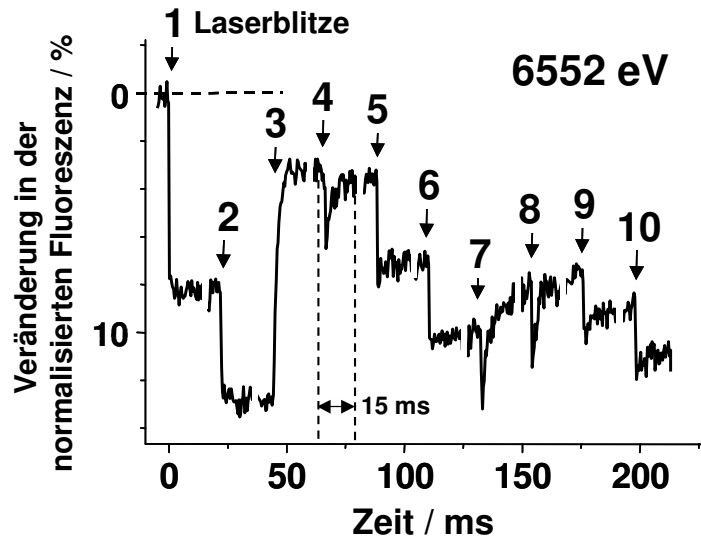


Abbildung 4.13: Änderungen der Fluoreszenz nach 1 bis 10 Laserblitzen bei einer Anregungsenergie von 6552 eV. Nur die 5 ms vor und 15 ms nach jedem Blitz (Pfeile) sind abgebildet. Die einzelnen Transienten wurden nachträglich korrigiert, da ein leichter linearer Anstieg der Fluoreszenz durch ein Nachglühen des YAP-Kristalls im Szintillationsdetektor auftrat.

Die beobachtete Verzögerungsphase könnte auch durch einen kleinen Anteil an PSII-Reaktionszentren hervorgerufen werden, die erst beim dritten Blitz den $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang vollziehen (*Misses* beim ersten und zweiten Blitz). Um dies ausschließen zu können, wurde die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit zusätzlich bei einer Anregungsenergie von 6556 eV untersucht. Bei dieser Energie wird durch den $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang keine Änderung in der Röntgenabsorption erzeugt. Abb. 4.16 zeigt, dass die Verzögerungsphase auch bei dieser Anregungsenergie beobachtet wird. Damit kann erstmals die Existenz eines Intermediates im Übergang $S_3 \rightarrow S_0$ beobachtet werden. Dieser Zwischenzustand ist der bisher hypothetische S_4 -Zustand. Es war umstritten, ob der S_4 -Zustand als diskretes chemisches Intermediat existiert oder Übergangscharakter hat. Zwei Charakteristika von XAS-Untersuchungen erleichterten die „Entdeckung“ des S_4 -Zustands. (1) Gegenüber spektroskopischen Untersuchungen der Mn-Absorption im UV-Bereich sind XAS-Messungen ausschließlich Mangan-spezifisch. (2) Die Untersuchungen am isosbestischen Punkt des $S_2 \rightarrow S_3$ -Überganges (6556 eV) vermeiden Verfälschungen der Kinetiken durch Beiträge, die aus dem unvollständigen Weiterschalten im S-Zyklus resultieren.

Zur strukturellen Natur des S_4 -Zustands können folgende Aussagen getroffen werden. Erstens kann die Bildung eines $Mn^V=O$ -Motives (doppelt gebundener Sauerstoff an einem fünffach koordiniertem Mn-Atom), wie von McEvoy et al. [2004] postuliert, ausgeschlossen werden. In Abb. 4.17 (A) ist der für die $Mn=O$ -Bildung erwartete und der tatsächlich gemessene Zeitverlauf der Fluoreszenz im Vorkantenbereich bei 6541,5 eV aufgetragen. Das typische Merkmal eines XANES-Spektrums von einem Metallzentrum mit einer $Mn=O$ -Einheit ist das große Vorkanten-Maximum mit einer Höhe von $\sim 50\%$ des Kantensprungs (* in Abb. 4.17 (B)). Bei der Bildung einer solchen Einheit an einem der vier Manganatome während des $S_3 \rightarrow S_0$ -Überganges wäre eine Verdoppelung der Höhe des Vorkanten-Maximums zu erwarten. Außerdem müsste eine signifikante Verschiebung der K-Kante zu höheren Energien und eine Änderung des Kantenverlaufes, ersichtlich aus Abb. 4.17 (B), zu beobachten sein. Keines der beiden Phänomene tritt jedoch auf. Damit kann die Bildung einer $Mn^V=O$ - oder $Mn^{IV}=O$ -Einheit im S_4 mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden.

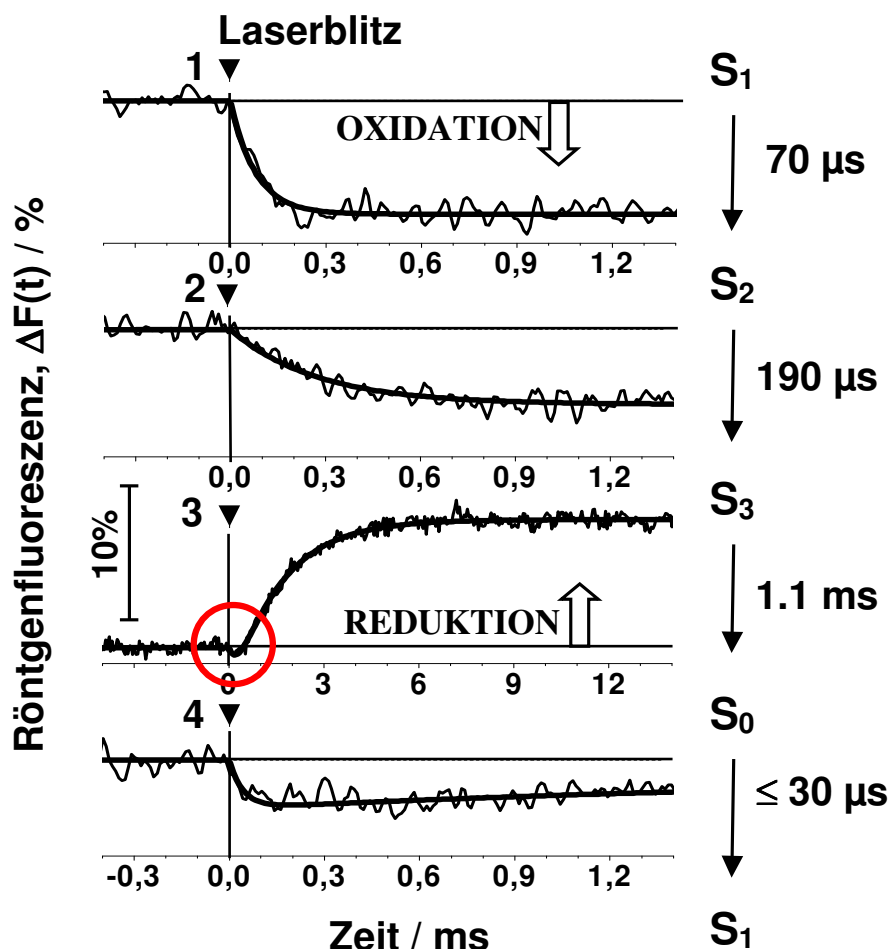


Abbildung 4.14: Kinetiken der blitzinduzierten Oxidationszustandsänderungen des Mn_4Ca -Komplexes durch zeitaufgelöste XAS-Experimente. Für 5 ms vor und 15 ms nach jedem Blitz wurden die Proben einem Röntgenstrahl der Energie 6552 eV ausgesetzt. Die Zeitauflösung betrug $10 \mu\text{s}$ pro Datenpunkt. Durchgezogene Linien: Simulationen. Daraus lassen sich folgende Zeitkonstanten ableiten [s]: 1×10^{-4} ($S_1 \rightarrow S_2$), $2,8 \times 10^{-4}$ ($S_2 \rightarrow S_3$), $1,6 \times 10^{-3}$ (Reduktion von $S_3 \rightarrow S_0$) und $\leq 5 \times 10^{-5}$ ($S_0 \rightarrow S_1$). Es wurden jeweils ~ 1000 Messungen gemittelt.

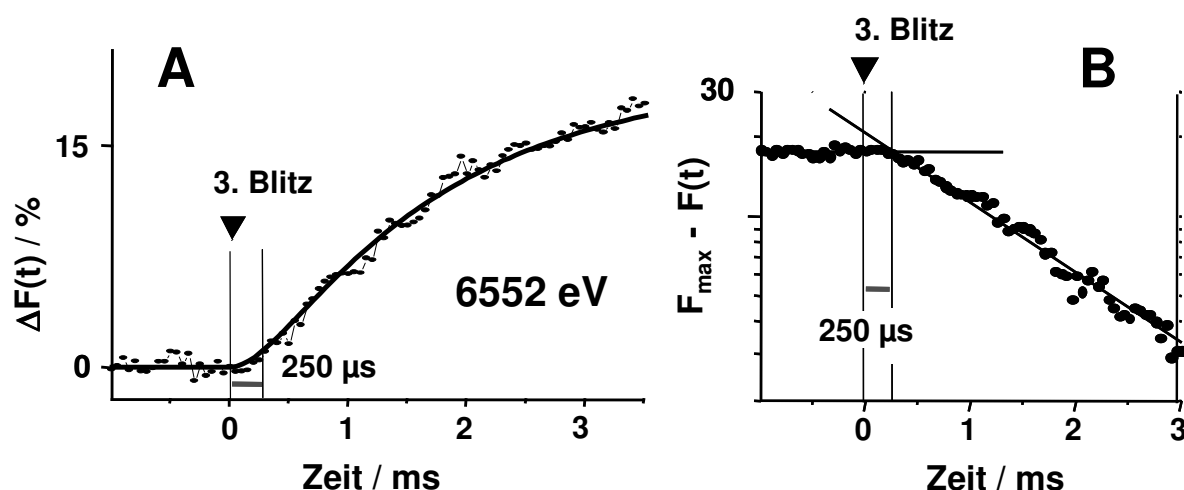


Abbildung 4.15: Verzögerungsphase im sauerstoffproduzierenden $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang (3. Blitz). (A) Änderungen der Fluoreszenz, ΔF , bei einer Anregungsenergie von 6552 eV. In (B) visualisiert die logarithmische Auftragung die Dauer der Verzögerungsphase und die einphasige Mn-Reduktion danach. Die Linie in (A) ergibt sich aus einer Simulation mit $k_1 = 3,3 \text{ ms}^{-1}$ und $k_2 = 0,62 \text{ ms}^{-1}$.

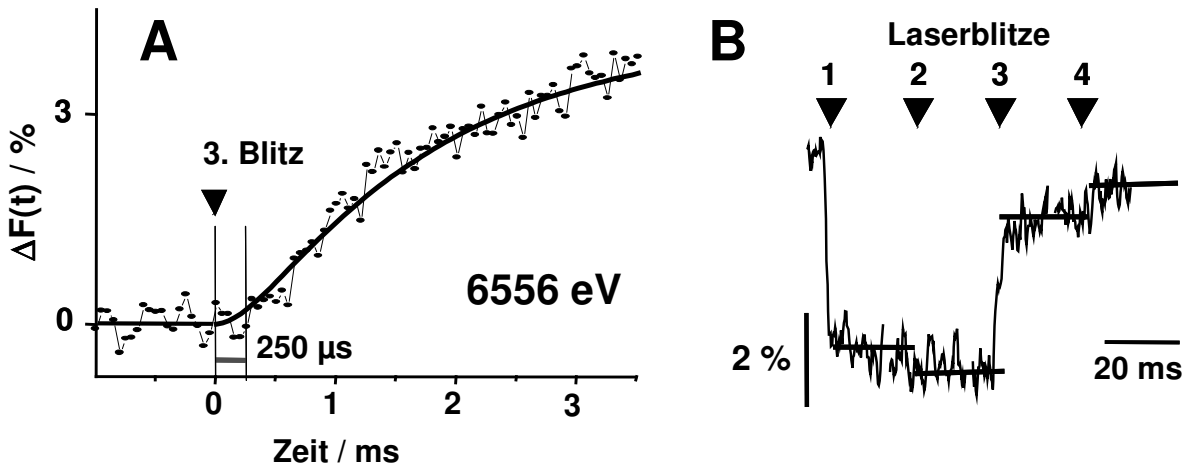


Abbildung 4.16: Verzögerungsphase im sauerstoffproduzierenden $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang (3. Blitz). (A) Änderungen der Fluoreszenz, ΔF , bei einer Anregungsenergie von 6556 eV. Bei dieser Energie ist $\Delta F = 0$ für den Übergang $S_2 \rightarrow S_3$, dargestellt in (B). Bei dieser Anregungsenergie kann eindeutig eine Verzögerungsphase von $250 \mu s$ festgestellt werden. Die Linie bei (A) ergibt sich aus einer Simulation mit $k_1 = 3,3 \text{ ms}^{-1}$ und $k_2 = 0,62 \text{ ms}^{-1}$.

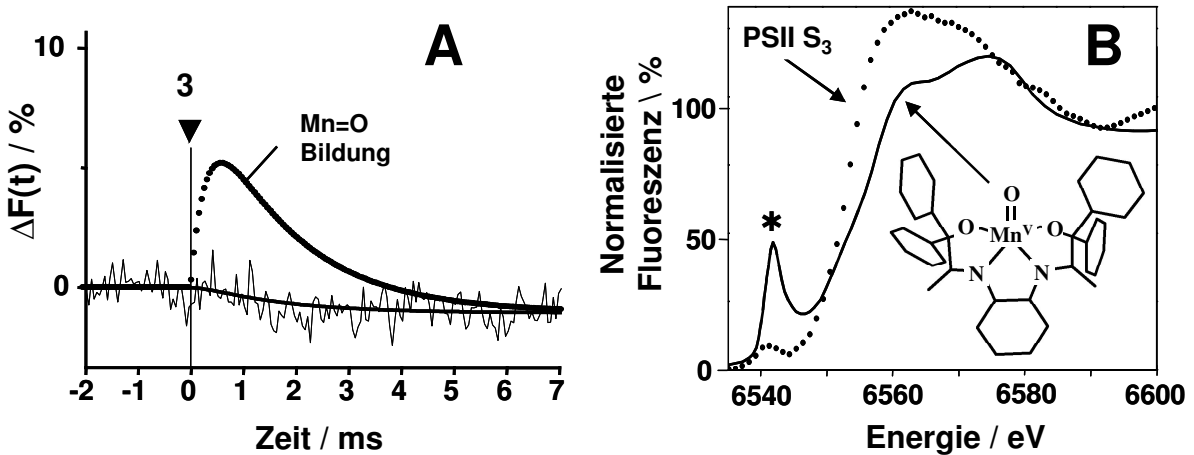


Abbildung 4.17: Spektrale Merkmale, die bei der Bildung eines $Mn=O$ -Motives zu beobachten wären. (A) Der Zeitverlauf der Fluoreszenz bei 6541,5 eV (Vorkanten-Bereich) nach dem dritten Blitz ($S_3 \rightarrow S_0$), verglichen mit der erwarteten Zeitverlauf bei einer $Mn=O$ -Bildung. (B) Vergleich zweier XANES-Spektren. Durchgezogene Linie: Spektrum einer Verbindung mit einem $Mn^{IV}=O$ -Motiv aus [Weng et al., 2004] (bei einem $Mn^{IV}=O$ -Motiv ergibt sich ein ähnlicher Kurvenverlauf [Weng et al., 2004]). Gepunktete Linie: reines S_3 -Spektrum des Mn_4Ca -Komplexes im PSII bei 20 K.

Durch Messung der Rekombinationsfluoreszenz des PSII kann gezeigt werden, dass die Gibbsche freie Energie der S_4 -Bildung pH- und temperaturabhängig ist [Grabolle, 2005]. Die Abhängigkeit von der Temperatur beweist, dass die S_4 -Bildung mit einer signifikanten Entropiezunahme verbunden ist, was auf eine Protonenabgabe ins wässrige Medium hinweist. Diese Annahmen decken sich mit Messungen zur Protonenfreisetzung [Haumann und Junge, 1994] und Elektrochromie-Untersuchungen [Rappaport et al., 1994]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Bildung des S_4 nicht mit einem Elektronentransfer vom Mn_4Ca -Komplex zum $Y_Z^{+\bullet}$ verbunden ist, wie zuvor angenommen, sondern mit der Bildung einer Base durch einen Deprotonierungsprozess. Auf der Basis von kristallographischen Daten wird Arg-357 im CP43 als mögliche Base vorgeschlagen [McEvoy und Brudvig, 2004], eine direkte Deprotonierung des Substratwassers ist ebenfalls denkbar.

4.6 Änderungen des Mn_4Ca -Komplexes im Kok-Zyklus

In Abb. 4.18 ist ein überarbeitetes Modell des katalytischen Kok-Zyklus dargestellt. Es sind nur die drei von vier Manganatomen des Mn_4Ca -Komplexes abgebildet, an denen strukturelle Veränderungen stattfinden. Die neu ermittelten Zeitkonstanten sind mit angegeben. Ob bei den einzelnen S-Zustandsübergängen Deprotonierungen und Oxidationen bzw. Reduktionen stattfinden, wird durch H^+ und e^- bzw. H_2O an den Reaktionspfeilen angezeigt.

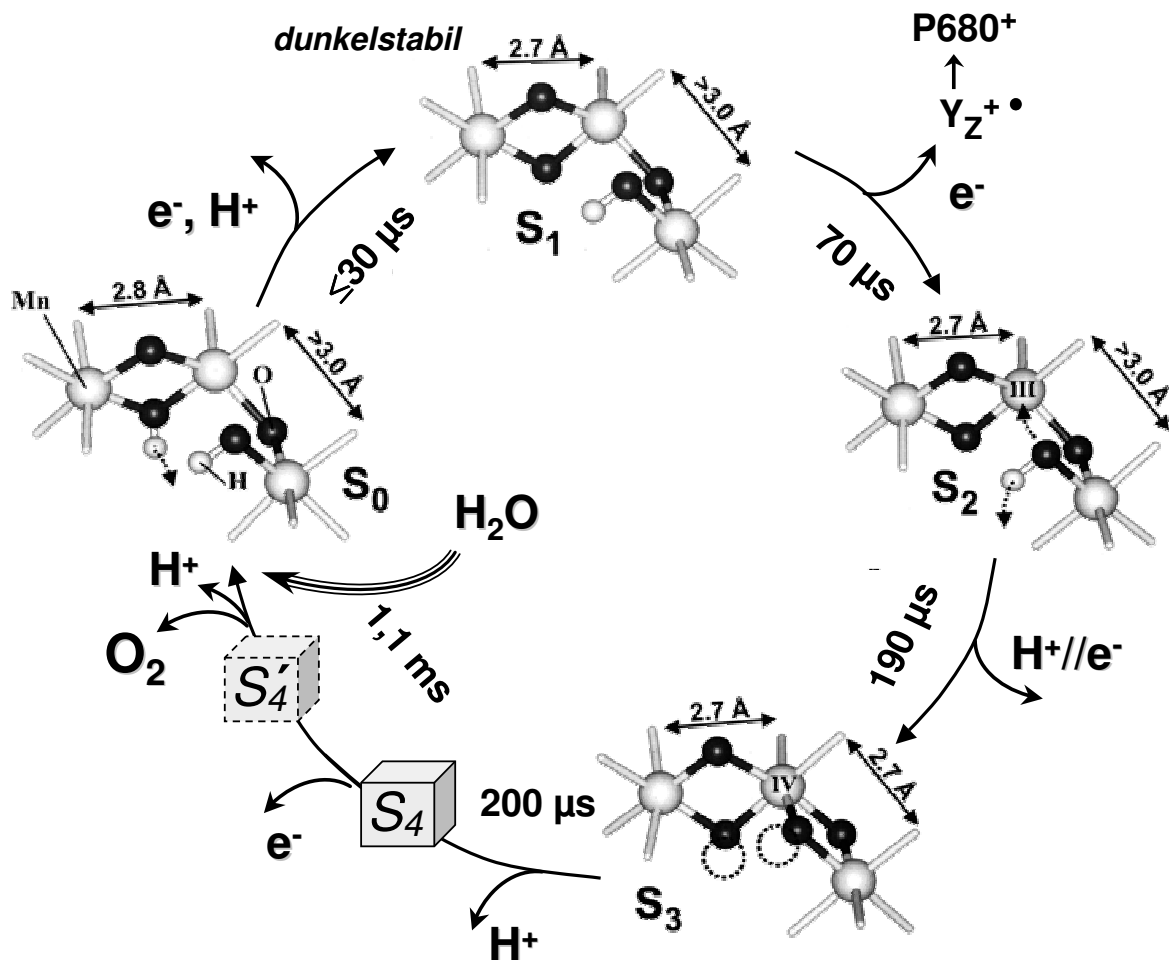


Abbildung 4.18: Schema der strukturellen Änderungen des Mn_4Ca -Komplexes innerhalb des Kok-Zyklus. Zur Vereinfachung sind nur drei der vier Mn-Atome dargestellt. Das nicht abgebildete vierte Mn-Atom ist wahrscheinlich mit einem der abgebildeten Mn-Atome über eine di- μ -O-Brücke verbunden, welche zu einem Mn-Mn-Vektor der Länge $\sim 2,7 \text{ \AA}$ in allen vier S-Zustände führt. Ein Ca^{2+} -Ion befindet sich im Abstand von $\sim 3,3 \text{ \AA}$ zu mindestens 2 Mn-Atomen (nicht eingezeichnet, siehe auch Kapitel 6.6).

Aus EXAFS-Untersuchungen an Modellsubstanzen mit bekannten Strukturen ist bekannt: (1) Mn-Mn-Distanzen von 2,65-2,75 Å finden sich nur bei Mn-Atomen, die über unprotonierte di- μ -O-Brücken verbunden sind, d.h. Mn-(μ_2 -O)₂-Mn- oder Mn-(μ_2 -O)(μ_3 -O)-Mn-Verbrückungen [Hagen et al., 1989; Dau et al., 2004]. (2) Die Protonierung eines verbrückenden Sauerstoffatoms führt zur Verlängerung einer Mn-Mn-Distanz um 0,1 Å. (3) Mono- μ -O-Brücken führen zu Abständen von 2,9-4,0 Å. (4) Änderungen um mehr als 0,05 Å lassen sich nicht durch einfache Oxidation eines Manganatoms erklären, sondern zeigen Änderungen in der Verbrückung auf.

Die EXAFS-Untersuchungen bei RT und 20 K lassen daher die folgenden Schlüsse zu. Bei den Übergängen $S_0 \rightarrow S_1$ und $S_2 \rightarrow S_3$ verändert sich die Verbrückung zwischen den Manganatomen, im $S_1 \rightarrow S_2$ ist dies nicht der Fall. Im $S_0 \rightarrow S_1$ kommt es zur Verkürzung einer der di- μ -O-Brücken durch die Deprotonierung eines verbrückenden Sauerstoffatoms. Die Zunahme der Vektoren bei Mn-Mn-Distanzen von 2,65 - 2,8 Å im $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang legen die Bildung einer dritten di- μ -O-Brücke nahe. Diese kann aus einer mono- μ -O-Brücke im S_1 und S_2 hervorgehen. Ein Mn-Mn-Vektor nahe 2,7 Å im S_3 -Zustand deutet auf eine protonierte di- μ -O-Brücke zwischen zwei Mn-Atomen hin.

4.7 Zusammenfassung

1. In allen vier S-Zuständen sind die strukturellen und elektronischen Merkmale des Mn_4Ca -Komplexes bei 20 K und bei Raumtemperatur gleich, abgesehen von einer Zunahme des Debye-Waller-Faktors bei RT. Es gibt keine Hinweise auf eine signifikante Temperaturabhängigkeit von Struktur, Protonierungsgrad oder Ladungsverteilung.
2. Mit dem $S_0 \rightarrow S_1$ - und dem $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang sind deutliche Änderungen in dem Mn-Mn-Abstand und der Mn-Koordinationszahl verbunden, welche als Veränderungen in der Mn-Mn-Verbrückung interpretiert werden. Es wird die Bildung einer dritten Mn- $(\mu_2-O)_2$ -Mn-Brücke im $S_2 \rightarrow S_3$ - und eine Deprotonierung einer μ -hydroxo-Brücke im $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang vorgeschlagen.
3. Es konnte belegt werden, dass bei jedem der drei S-Übergänge bis zum S_3 eine Ein-Elektronen-Oxidation des Mangans stattfindet.
4. Zeitaufgelöste XAS-Messungen der Röntgenfluoreszenz zeigen im $S_1 \rightarrow S_2$ und $S_2 \rightarrow S_3$ eine Oxidation der Mn_4Ca -Komplexes durch das Tyrosin-Radikal $Y_Z^{+\bullet}$ mit einer Zeitkonstante $t_{1/2}$ von 70 μs und 190 μs . Für den $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang ist $t_{1/2} \leq 30 \mu s$. Für $S_3 \rightarrow S_0$ induziert der Laserblitz eine Zunahme der Absorption auf Grund der Mn-Reduktion durch das Substratwasser ($t_{1/2} = 1,1 \text{ ms}$), der eine Verzögerungsphase von $\sim 250 \mu s$ voraus geht.
5. Die Verzögerungsphase deutet auf ein Intermediat im $S_3 \rightarrow S_0$ -Übergang hin, dessen Bildung nicht mit einer Oxidation von Mangan verbunden ist. Stattdessen wird das Intermediat durch eine Deprotonierungsreaktion gebildet. Die zeitaufgelösten XAS-Messungen erlauben damit zum ersten Mal die direkte Beobachtung der Bildung des S_4 -Zustands.

