

Kapitel 6

XAS an der Calcium-K-Kante

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse von XAS-Messungen bei tiefen Temperaturen an hochaktiven $PSII_{Ca}$ -Proben an der Calcium-K-Kante dargestellt und diskutiert. Von besonderem Interesse sind solche Messungen an nativen PSII-Proben mit katalytisch aktivem Mn_4Ca -Komplex für die Untersuchungen der photosynthetischen Wasserspaltung. Denn die Bindungsstelle des Ca^{2+} -Ions im Mn_4Ca -Komplex, die Distanzen zu den Mn-Atomen und die Winkel der Ca-Mn-Vektoren zur Membrannormalen können nur eindeutig durch Ca-XAS untersucht werden.

Bei Messungen an der Ca-K-Kante (~ 4 keV) ergeben sich gegenüber Messungen an der Mn-K-Kante folgende Schwierigkeiten: (1) Die Röntgenabsorption der Protein-Lipid-Matrix steigt mit sinkender Röntgenenergie, daher steigt die Strahlenschädigung gegenüber Mn-XAS um einen Faktor ~ 3 an. (2) Bei diesen Röntgenenergien ist die Absorption des einfallenden Strahls durch Luft nicht mehr zu vernachlässigen (Absorption in 10 cm Luft: bis zu 65 %), so dass die Experimente unter Vakuum durchgeführt werden müssen. (3) Die Absorption an den Fenstern des Kryostaten schwächt die Intensität des Strahls zu stark, daher muss ein fensterloser Aufbau verwendet werden. (4) Gefrorene PSII-Proben, die dem Vakuum ausgesetzt sind, können lyophilisiert werden, was eine Veränderung der Metallkoordination zur Folge haben könnte [Ascone et al., 2003]. (5) Die Ca^{2+} -Konzentration in PSII-Proben beträgt nur ein Viertel bis Hälfte der Mn-Konzentration ($\leq 0,25 \mu\text{mol } Ca^{2+}/l$).

Es traten außerdem weitere experimentelle Schwierigkeiten bei den hier beschriebenen Messungen auf: (A) Es kam zur unerwünschten Bildung von Eis auf den PSII-Proben bei der Montage auf dem Kühlfinger. Das verursachte Störungen in den EXAFS-Spektren, die durch Mittelung der Daten kaum reduziert werden konnten und die Auswertung stark erschwerten. (B) Der Probenwechsel nahm auf Grund der apparativen Besonderheiten (senkrecht angebrachter Flansch mit Gummidichtung und Verbindung zur Vakuumpumpe) viel Zeit in Anspruch.

Es wurden bisher nur wenige XAS-Messungen an der Calcium-K-Kante bei Proteinen durchgeführt [Powers et al., 1978; Schulzke et al., 1978; Bianconi et al., 1980; Davoli et al., 1987; Hori et al., 1988; Hasnain, 1993], neuere Arbeiten sind nicht bekannt. Außer den Daten in dieser Arbeit wurden nur Calcium-XAS-Ergebnisse vom PSII-Komplex von Cinco et al. [2002] publiziert. Außerdem existieren einige wenige Untersuchungen an anorganischen Calciumverbindungen [Hardwick et al., 1985; Martens et al., 1985; Levi-Kalishman et al., 2000, 2002], an Calcium in wässrigen Lösungen [Jalilehvand et al., 2001; Fulton et al., 2003; D'Angelo et al., 2004] und an der Ca-L-Kante anorganischer Substanzen [de Groot et al., 1990; Naftel et al., 2001; Krüger und Natoli, 2005]. Eine klare Beschreibung der strukturellen Eigenschaften von Calcium in

biologischen und anorganischen Systemen ist nicht möglich, da starke Unregelmäßigkeiten in der Ca-Koordinationsumgebung auftreten (zu den stark abweichenden Ergebnissen der Koordinationszahlen siehe Abb. 6.1 und [Ohtaki und Radnai, 1993; Katz et al., 1996; Spangberg et al., 2000]).

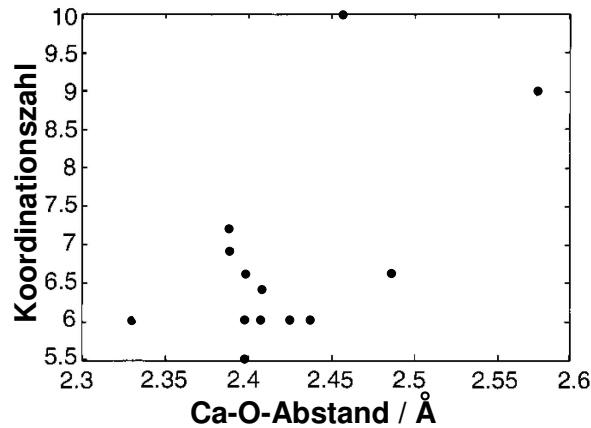


Abbildung 6.1: Koordinationszahlen von Calciumverbindungen in wässrigen Lösungen, aufgetragen gegen die Ca^{2+} -O-Distanzen. Daten aus XAS-Untersuchungen in der Literatur entnommen. Das Fehlen einer Beziehung zwischen Abstand und Koordinationszahl ist deutlich zu erkennen. Entnommen aus [Spangberg et al., 2000].

Neben den Messungen an nativen PSII-Proben könnte die Untersuchung synthetischer Mn-Ca-Komplexe zur Entschlüsselung der Struktur des nativen Systems beitragen. Systematische Studien von Modellen mit unterschiedlichen Liganden und Koordinationen von Calcium, wie sie am Mangan durchgeführt werden, gibt es bisher nicht. Außerdem waren bis vor kurzem keine heterometallischen Mn_4CaO_x -Komplexe bekannt. Von Mishra et al. [2005] wurde ein Komplex synthetisiert, der zwei kubische Mn_4Ca -Einheiten enthält (Abb. 6.2). Die angestrebte Struktur bezieht sich auf die von Ferreira et al. [2004] vorgeschlagene Geometrie für den Mn_4Ca -Komplex.

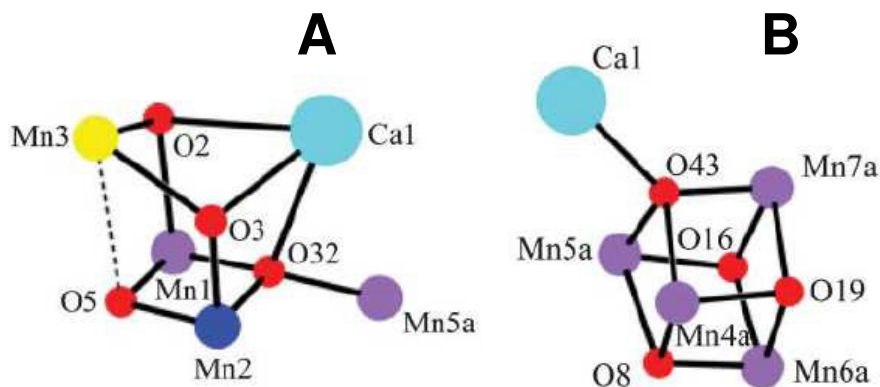


Abbildung 6.2: Zwei kubische Motive im ersten synthetischen, hoch oxidierten Mn_4Ca -Komplex (entnommen aus [Mishra et al., 2005]). (A) Eine Mn_4CaO_4 -Einheit, wie sie in [Ferreira et al., 2004] für den Mn_4Ca -Komplex im PSII postuliert wird. (B) Ein weiteres Motiv, bei dem ein Ca^{2+} -Ion mit einem Mn_4O_4 -Kubus verknüpft ist. Die gesamte Struktur enthält einen $[\text{Mn}_{13}\text{Ca}_2]^{42+}$ -Kern und ist damit zu groß für einen naturnahen „Nachbau“ des katalytischen Zentrums im PSII.

6.1 Experimenteller Aufbau

Die XAS-Messungen an der Calcium-K-Kante von PSII-Membranpartikeln wurden am Strahlrohr ID26 des ESRF in Grenoble (Frankreich) durchgeführt. Zur Detektion der angeregten Röntgenfluoreszenz senkrecht zum Röntgenstrahl wurde eine großflächige PIN-Photodiode (3,8 cm² aktive Fläche, Eurisys Measures) ohne Abdeckung verwendet. Diese spezielle Diode befand sich direkt in der Probenkammer und wurde so dicht wie möglich an die Probe herangefahren. Die Winkel zwischen dem elektrischen Feldvektor des Röntgenstrahls und der Normalen der Probenoberfläche betrug 45°.

Es wurde ein neu konstruierter Kryostat eingesetzt, in dem sich ein Helium-gekühlter, drehbarer und vertikal beweglicher Kühlfinger befand. Zum Probenwechsel musste der Kryostat vom Vakuum im Strahlrohr über einen manuellen Schieber getrennt werden. Danach wurde die Heliumzufuhr unterbrochen, der Innenraum über die Heizung am Kühlfinger auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend belüftet. Bis zu drei *PSII_{Ca}*-Proben wurden unter flüssigem Stickstoff bei gedämpftem Grünlicht auf einem Probenhalter befestigt. Die Montage des Probenhalters auf den Kühlfinger und das Schließen des Kryostaten erfolgte ebenfalls bei gedämpftem Grünlicht. Das Abdichten des Flansches mit der Gummidichtung erforderte hohe manuelle Geschicklichkeit und wurde zusätzlich durch den daran befindlichen Pumpenanschluss erschwert. Kleinste Vakuumslecks bewirkten die Bildung von Eis auf der Probe, wodurch die Spektren auf Grund der Röntgenreflexe an Eiskristallen und enthaltener Calciumionen unbrauchbar wurden. Der Kühlfinger wurde sofort nach dem Verschließen des Kryostaten bei gleichzeitiger Evakuierung auf 50 K herunter gekühlt. Die Messungen erfolgten unter Vakuum ($\sim 10^{-5}$ mbar).

Hinter einem calciumfreien Siliciumnitrit-Fenster (150 nm dick) wurde die Intensität der auf die Probe treffenden Röntgenstrahlung (I_0) detektiert. Es befand sich kein weiteres Fenster oder Filter zwischen der Probe und dem Speicherring. Der EXAFS-Scan-Bereich betrug 3900 - 4500 eV, die Größe des Röntgenstrahls auf der Probe betrug ~ 1 mm². Es wurde jeweils nur ein Scan pro Probenposition ausgeführt. Messungen der Referenzsubstanz (CaCl₂) zeigten, dass die Energieachse während der Scans mit einer Genauigkeit von $\pm 0,2$ eV stabil war.

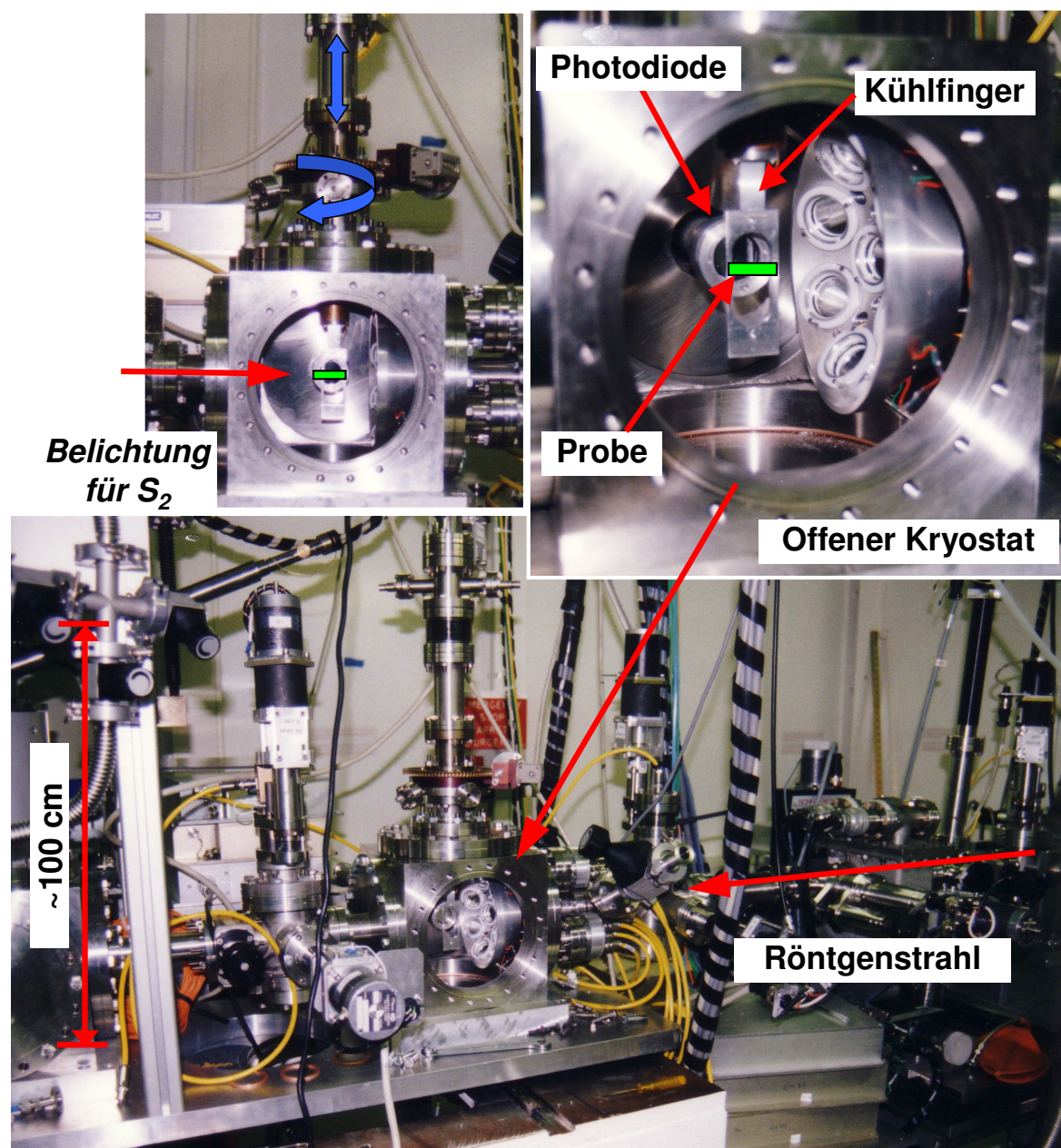


Abbildung 6.3: Experimenteller Aufbau am Strahlrohr ID26 (ESRF, Grenoble, Frankreich) für Messungen an der Calcium-K-Kante. Vergrößert dargestellt ist der geöffnete Kryostat mit dem Kühlfinger und der im rechten Winkel zum Röntgenstrahl befindlichen Photodiode. Auf dem Kühlfinger, der mit Helium gekühlt werden konnte, wurden ein Halter mit bis zu drei PSII-Proben befestigt. Ein Probenträger ist zur Verdeutlichung als hellgrüner Balken eingezeichnet. Die Proben konnten vertikal und radial um die vertikale Achse zum Röntgenstrahl ausgerichtet werden (angedeutet durch blaue Pfeile). Der Kryostat wurde durch einen Flansch, an dem eine Hochvakuumpumpe angeschlossen war, verschlossen. *Belichtung für S_2* : Richtung des Lichtstrahls auf die Probe zur Einstellung des S_2 -Zustands (siehe Abschnitt 6.5).

6.2 *PSII_{Ca}*-Proben im S₁-Zustand

Ca-XAS-Messungen wurden während zweier einwöchiger Messtermine am ESRF durchgeführt. Fünf verschiedene Präparationen partiell orientierter *PSII_{Ca}*-Proben (siehe Abschnitt 5.2) wurden untersucht. Die Proben besaßen eine mittlere Sauerstoffaktivität von $1025 \pm 100 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl} \cdot \text{h})^{-1}$, einen mittleren Mangangehalt von $3,7 \pm 0,3 \text{ Mn}/(230 \text{ Chl})$ und einen Calciumgehalt von 1,1 - 2,0 Ca/(230 Chl) (siehe dazu Seite 86). Die Zahl der PSII-Zentren im S₁-Zustand wurde durch Vorbelichtung und anschließende Dunkeladaptation maximiert (siehe Abschnitt 2.4.3).

6.3 Charakterisierung der Strahlenschädigung (Photoreduktion) bei *PSII_{Ca}*-Proben

Es konnte durch Messungen an der Mn-K-Kante gezeigt werden, dass die Photoreduktion des Mn₄Ca-Komplexes (Strahlenschädigung) bei einem Photonenfluss von $\sim 10^{13} \text{ s}^{-1} \text{ mm}^{-2}$ innerhalb von Minuten auch bei tiefen Temperaturen stattfindet [Meinke et al., 2000; Haumann et al., 2002b,a; Dau und Haumann, 2003; Grabolle et al., 2006]. Durch diesen Prozess wird Mn^{II} gebildet. Es war zu erwarten, dass bei XAS-Messungen an der Ca-K-Kante (3,9 - 4,5 keV) auf Grund des mit sinkender Energie steigenden Absorptionsquerschnitts der Protein-Matrix die Photoreduktion im Vergleich zu Messungen an der Mn-K-Kante stark beschleunigt ist. Bei diesen Röntgenenergien nimmt in der Probe die Absorption durch Atome mit niedriger Ordnungszahl zu. Außerdem werden die Photonen bereits in den ersten Schichten der Membranfragmente absorbiert.

Abbildung 6.4 zeigt Ca-XANES-Spektren in der Nähe der 0F-K-Kante von PSII-Proben, die $\sim 80 \text{ Ca}^{2+}$ pro PSII enthalten (Ca^{2+} war im Puffer enthalten), und Präparationen, bei denen der Calciumgehalt auf $\leq 2,0 \text{ Ca/PSII}$ durch Chelexbehandlung reduziert wurde (*PSII_{Ca}*-Proben). Die Probe mit $\sim 80 \text{ Ca/PSII}$ wurde zur Erstellung eines Vergleichsspektrums eingesetzt. Es zeigt Ca^{2+} -Ionen, die vollständig mit Sauerstoff koordiniert sind. Der Anteil an mit Mangan koordinierten Calciumionen ist hier zu vernachlässigen und hat daher keine Einfluss auf das Spektrum. Außerdem wurde ein korrigiertes Spektrum erstellt, um ein theoretisches Spektrum für das Ca^{2+} -Ion im Mn₄Ca-Komplex zu erhalten. Dazu wurden 33 % des Spektrums der Probe mit hohem Ca^{2+} -Gehalt vom *PSII_{Ca}*-Spektrum subtrahiert (Annahme von 1,5 Ca/PSII im *PSII_{Ca}*-Spektrum).

Es sind geringe Unterschiede im XANES-Bereich zu beobachten. Ein höheres Vorkanten-Maximum, eine um 0,3 eV reduzierte Kantenenergie und ein niedrigeres absolutes Maximum sind Indikatoren für eine niedrigere Koordinationszahl und eine niedrigere Symmetrie der Ligandenumgebung der Ca^{2+} -Ionen in *PSII_{Ca}*-Proben verglichen mit der relativ symmetrischen Koordination von Ca^{2+} in Lösung durch 7-8 Sauerstoffatome aus Wassermolekülen [Jalilehvand et al., 2001; D'Angelo et al., 2004]. Deutlich ausgeprägt ist die Veränderung in der Höhe des primären Maximums zwischen Spektren von am PSII gebundenen Calcium und hydratisiertem Calcium im Lösung. Am deutlichsten ist ein Unterschied bei 4038 eV zu erkennen (senkrecht gestrichelte Linie in Abb. 6.4). Dieser Effekt wurde für die Quantifizierung der Strahlenschädigung verwendet. Vorausgesetzt wurde, dass sowohl Mn²⁺ als auch Ca^{2+} aus dem reduzierten Komplex freigesetzt wird. Bei einer Anregungsenergie von 4038 eV wurde die Rönt-

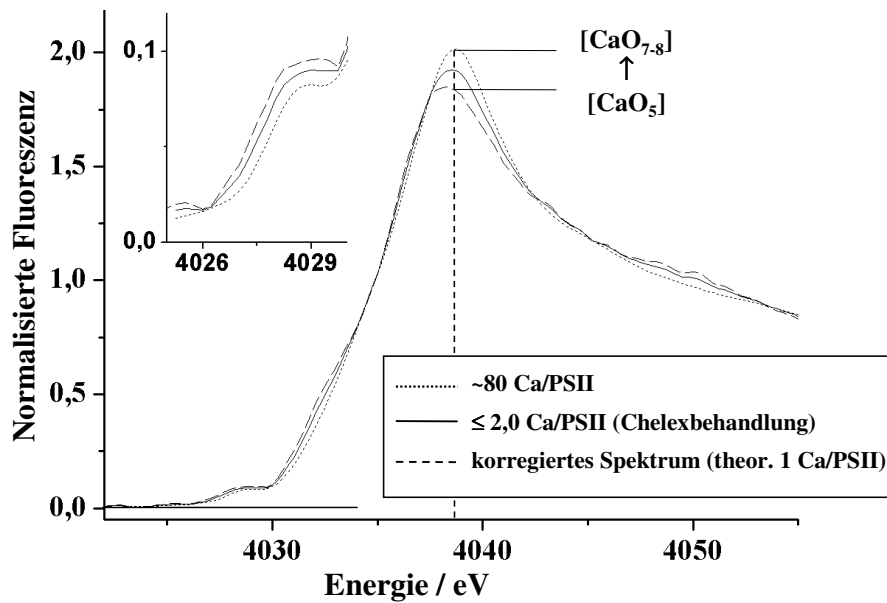


Abbildung 6.4: Ca-XANES-Spektren von PSII-Membranfragment-Proben mit unterschiedlichem Calciumgehalt. Die gepunktete Linie stellt das Spektrum von vollständig hydratisierten Ca^{2+} -Ionen (~ 80 Ca/PSII) dar. Die durchgezogene Linie zeigt das Spektrum von PSII_{Ca} -Proben, deren Calciumgehalt durch die Behandlung mit Chelex-100 drastisch auf $\leq 2,0$ Ca/PSII reduziert worden ist. Bei dem korrigierten Spektrum (gestrichelte Linie) wurde von dem PSII_{Ca} -Spektrum 33% des ~ 80 Ca/PSII-Spektrums subtrahiert (mit anschließender Normalisierung). Das so erzeugte Spektrum zeigt das eine Ca^{2+} -Ion im Mn_4Ca -Komplex. Einschub: Änderung im Bereich des Vorkanten-Maximums. Pfeil: Übergang von fünffach koordiniertem Ca^{2+} zu siebenfach koordiniertem Ca^{2+} nach Freisetzung aus dem Mn_4Ca -Komplex (bei 4038 eV).

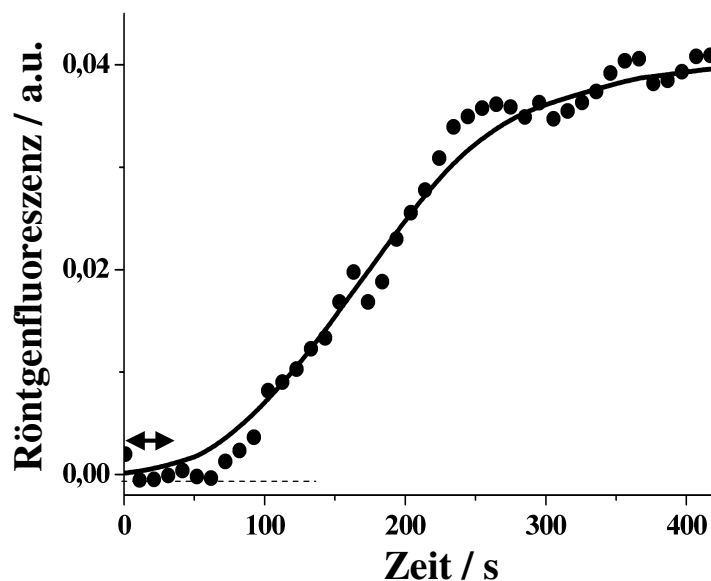


Abbildung 6.5: Zeitverlauf der Intensität der Röntgenfluoreszenz von PSII_{Ca} -Proben bei einer Anregungsenergie von 4038 eV. Es wurden fünf Scans gemittelt. Die Linie dient zur optischen Veranschaulichung des Verlaufs. Der Pfeil zeigt die Scandauer einer vollständigen XAS-Messung an (~ 30 s).

genfluoreszenz von $PSII_{Ca}$ -Proben als Funktion der Zeit aufgenommen. Dabei wurde eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet (Abb. 6.5). Dieser Effekt wurde mit der Freisetzung von spezifisch gebundenem Ca^{2+} (und Mangan) aus dem katalytischen Zentrum in das umgebene Medium erklärt. Bei 50 K war die Ca^{2+} -Freisetzung innerhalb von ~ 400 s abgeschlossen. Innerhalb der Zeitspanne für einen XAS-Scan (30 s) blieb die Fluoreszenzintensität bei 4038 eV (Pfeil in Abb. 6.5) und damit die Höhe der Ca-K-Kante jedoch unverändert. Somit verbleibt während der XAS-Scans das katalytisch essentielle Ca^{2+} -Ion offensichtlich innerhalb des Mn_4Ca -Komplexes.

6.4 EXAFS-Messungen an $PSII_{Ca}$ -Proben im S_1 -Zustand

In Abb. 6.6 sind die Fourier-Transformierten der EXAFS-Oszillationen (Einschub) von Proben mit ~ 80 Ca/PSII (A), von Proben mit $\leq 2,0$ Ca/PSII (B) und für den theoretischen Fall von 1 Ca/PSII (C) dargestellt. Die FT von (A) weist nur ein Maximum auf, die FTs von (B) und (C) dagegen zwei.

Das Spektrum der Proben mit hohem Calciumgehalt wird sehr gut durch eine Simulation mit nur einer Koordinationsschale für Ca-O-Streuung beschrieben (Abb. 6.6 (A)). Die Koordinationszahl liegt bei 7-8 und die mittlere Bindungslänge bei $\sim 2,4$ Å (Tabelle 6.1, Fit I). Dies sind Werte, die bei hydratisiertem Calcium beobachtet werden [Jalilehvand et al., 2001; D'Angelo et al., 2004]. Damit lag Ca^{2+} in diesen Proben vorrangig in vollständig hydratisierter Form vor.

Die FT der EXAFS-Oszillationen der $PSII_{Ca}$ -Proben zeigt ein vermindertes Maximum bei einer reduzierten Distanz von ~ 2 Å (Abb. 6.6 (B)). Zusätzlich wird ein zweites Maximum bei einer reduzierten Distanz von $\sim 2,7$ Å beobachtet. Ein solches Maximum könnte Ca-Mn-Distanzen anzeigen. Bei ~ 2 Ca/PSII sind mindestens die Hälfte der Ca^{2+} -Ionen nicht im Mn_4Ca -Komplex gebunden. Die Amplitude des Ca-O-Vektors im Vergleich zu der des Ca-Mn-Vektor wird damit vergrößert. In einer ersten Simulation wurden zwei Koordinationsschalen mit den Rückstreuern O und Mn angenommen. Das Resultat ist auf Grund seines hohen R_F -Wertes nicht befriedigend (Tabelle 6.1, Fit II). Das Einführen von zwei Koordinationsschalen mit Sauerstoff verbessert den Fit. Die entsprechenden Längen der Ca-O-Vektoren sind $\sim 2,26$ Å und $\sim 2,43$ Å, die Summe der Koordinationszahlen ist sechs (Tabelle 6.1, Fit III). Die kürzere Distanz stimmt mit der in den Proben mit 80 Ca/PSII überein. Damit scheint sich ein signifikanter Anteil der Ca^{2+} -Ionen in einer Koordination zu befinden, die dem von Ca^{2+} in wässriger Lösung entspricht. Die Koordinationszahl der Ca-O-Vektoren lässt vermuten, dass am Mn_4Ca -Komplex gebundenes Ca^{2+} nicht vollständig hydratisiert, sondern nur durch 5-6 Sauerstoff- oder Stickstoffatome koordiniert ist [Kretsinger und Nelson, 1976; Powers et al., 1978]. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Veränderungen, die in den XANES-Spektren beobachtet werden.

In beiden Simulationen ist die Zahl der Manganatome, die durch den Absorber Ca^{2+} „gesehen“ werden, ungefähr 1,5. Im Fall von genau zwei Ca^{2+} -Ionen pro PSII, von denen ein Ion am Mn_4Ca -Komplex gebunden und nur ein Ca-Mn-Vektor vorhanden ist, wird eine Ca-Mn-Koordinationszahl von 0,5 erwartet. Das Ca^{2+} -Ion, das weiter entfernt gebunden ist, leistet keinen Beitrag zum Ca-Mn-Vektor und das Ca^{2+} -Ion im Mn_4Ca -Komplex wird auf Grund von Mn-XAS-Ergebnissen im annähernd gleichen Abstand zu zwei Manganionen vermutet.

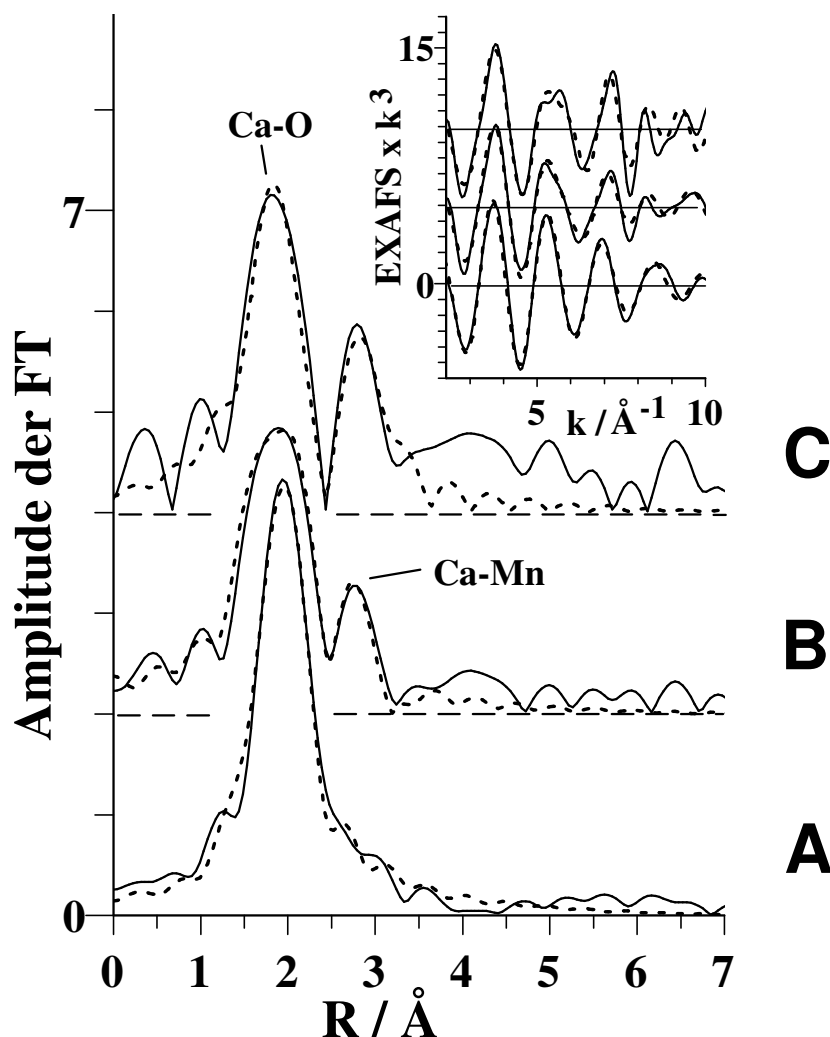


Abbildung 6.6: Fourier-Transformierte der EXAFS-Oszillationen oberhalb der Ca-K-Kante. Einschub: Rücktransformierte. (A) Spektrum einer Probe mit ~ 80 Ca/PSII (Fit I). (B) Spektrum einer mit Chelex behandelten Probe mit $\leq 2,0$ Ca/PSII (Fit IV). (C) Korrigiertes Spektrum, welches dem Ca^{2+} -Ion im Mn_4Ca -Komplex zugeschrieben wird (Fit VI in Tabelle 6.1). Durchgezogene Linien: experimentelle Daten. Gestrichelte Linien: Simulationen. Es wurden jeweils ~ 30 Scans gemittelt.

Die gefundene Koordinationszahl des Ca-Mn-Vektors von $\sim 1,5$ führt zu der Vermutung, dass die durchschnittliche Ca : Mn-Stöchiometrie in den PSII_{Ca} -Proben eher etwas geringer als der mit AAS bestimmte Wert ist. Es können eher $\sim 1,5$ Ca/PSII anstelle von $\sim 2,0$ Ca/PSII angenommen werden oder es befinden sich alternativ drei Mn-Ionen im etwa gleichen Abstand zum Ca^{2+} -Ion. Die Ergebnisse der Simulationen unter Verwendung der letzten beiden Annahmen sind in Tabelle 6.1 aufgelistet (Fit IV mit Ca : Mn = 1,5 : 4 und zwei Mn-Ca-Vektoren; Fit V mit Ca : Mn = 2 : 4 und drei Mn-Ca-Vektoren). Beide Annahmen führen zu vergleichbaren R_F -Werten. Der Abstand vom Ca^{2+} zu den benachbarten zwei Mn-Atomen beträgt bei allen Simulationen $\sim 3,3$ Å.

Das auf der Basis von Fit IV (Tabelle 6.1) korrigierte XAS-Spektrum ist in Abb. 6.6 (C) dargestellt. Die EXAFS-Oszillationen, die nun dem Ca^{2+} -Ion im Mn_4Ca -Komplex zugeschrieben werden können, lassen sich gut durch zwei Koordinationsschalen (Ca-O-Vektor mit $N = 5$ und zwei Ca-Mn-Vektoren mit $N = 2$) simulieren. Dies entspricht einem Verhältnis von 1 Ca/PSII.

| Spektrum | Fit | Schale | N _i [pro Ca] | R _i [Å] | σ _i ² [10 ⁻³ Å ²] | R _F (1-3 Å) [%] |
|---|-----|--------|----------------------------|-----------------------|---|-------------------------------|
| ~80 Ca/PSII | I | Ca-O | 7,32 | 2,42 | 12,3 | 13,7 |
| mit Chelex-100 behandelte PSII-Proben (≤2,0 Ca/PSII) | II | Ca-O | 6,43 | 2,38 | 16,1 | 17,6 |
| | | Ca-Mn | 1,49 | 3,27 | 15,0 | |
| | III | Ca-O | 2,30 | 2,26 | 1,5 | 12,7 |
| | | Ca-O | 3,37 | 2,43 | 2,5 | |
| | | Ca-Mn | 1,65 | 3,26 | 15,5 | |
| | IV | Ca-O | 3,33* | 2,27 | 6,7 | 13,7 |
| | | Ca-O | 2,33* | 2,44 | 2,5 | |
| | | Ca-Mn | 1,33* | 3,26 | 14,5 | |
| | V | Ca-O | 2,50* | 2,26 | 2,0 | 15,8 |
| | | Ca-O | 3,50* | 2,43 | 2,0 | |
| | | Ca-Mn | 1,50* | 3,26 | 16,8 | |
| Ca im Mn ₄ Ca-Komplex gebunden | VI | Ca-O | 5,00* | 2,29 | 11,2 | 14,3 |
| | | Ca-Mn | 2,00* | 3,27 | 9,3 | |

Tabelle 6.1: Ergebnisse der verschiedenen Simulationsansätze der k^3 -gewichteten Ca-EXAFS-Oszillationen. N_i: Koordinationszahl, R_i: Distanz zwischen Absorber und Rückstreuer, σ_i²: Debye-Waller-Faktor, R_F: gewichteter R-Faktor; (*) fixierte Parameter während der Simulation. Die R_F-Werte wurden aus Fourier-gefilterten Spektren über einen Bereich von 1-3 Å reduzierter Distanz berechnet. Für alle Simulationen betrug der k -Bereich 2,3 bis 10,2 Å⁻¹.

6.5 Einstellung des S₂-Zustands bei *PSII*_{Ca}-Proben

Ein erster Versuch zur Messung des S₂-Zustands an *PSII*_{Ca}-Proben wurde im Mai 2003 an der ID26 am ESRF, Grenoble unternommen. Um den S₂-Zustand einzustellen, wurden die Proben direkt im Kryostaten durch das hintere Kapton-Fenster 10 Minuten bei 200 K belichtet (siehe Abb. 6.3). Während der letzten Minute der Belichtung wurden die Proben auf 100 K herunter gekühlt. Nach den XAS-Messungen wurden die Proben ohne aufzutauen sofort in flüssigem Stickstoff gelagert. Der Innenraum des Kryostaten wurde dabei nicht wie bei einem „normalen“ Probenwechsel bis auf RT erwärmt, sondern bereits bei tiefen Temperaturen belüftet. Anschließend wurden EPR-Messungen zum Nachweis des S₂-Zustands durch das *Multiline*-Signal an der TU Berlin durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4).

Es wird postuliert, dass sich der Oxidationszustand und die Koordinationsumgebung vom Ca²⁺-Ion beim S₁ → S₂-Übergang nicht verändert [Debus, 1992; McEvoy und Brudvig, 2004]. Es kann daher eine unveränderte Position der Ca-K-Kante im S₂-XAS-Spektrum angenommen werden.

Der Vergleich der K-Kanten beim S₁- und S₂-Zustand in XANES-Spektren von *PSII*_{Ca}-Proben ergab keine detektierbaren Veränderungen (Abb. 6.7). Die Versuchsbedingungen am ESRF in Grenoble waren so gewählt, dass der S₂-Zustand in den *PSII*_{Ca}-Proben mit großer Wahrscheinlichkeit eingestellt worden ist. Nicht auszuschlie-

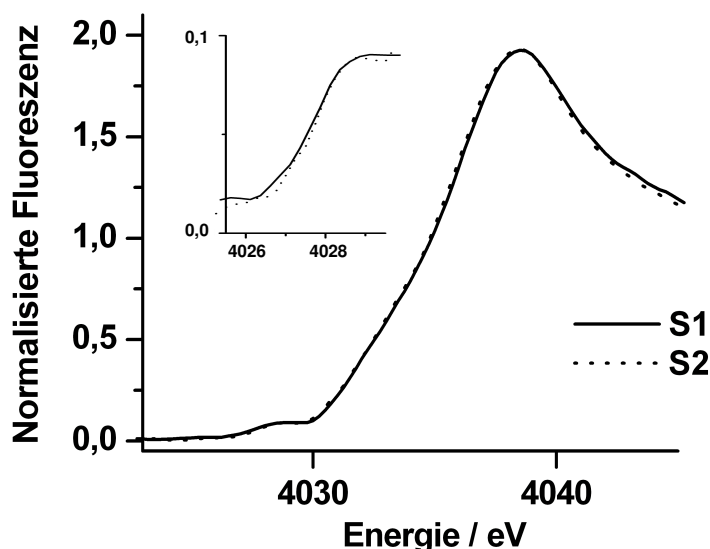


Abbildung 6.7: Ca-XANES-Spektren von $PSII_{Ca}$ -Proben im S_1 - und S_2 -Zustand. Durchgezogene Linie: Proben im S_1 -Zustand. Gestrichelte Linie: Proben, bei denen voraussichtlich der S_2 -Zustand maximiert wurde. Einschub: Vergrößerte Darstellung des Vorkanten-Maximums.

ßen war jedoch eine Photoreduktion vom S_2 -Zustand zum S_1 -Zustand während der XAS-Messungen. Eine Relaxation vom S_2 -Zustand in den S_1 -Zustand vor den EPR-Messungen konnte jedoch durch Lagerung der Proben in flüssigem Stickstoff nahezu ausgeschlossen werden. Da ein direkter Nachweis von PSII-Zentren im S_2 nicht möglich war, kann nicht eindeutig belegt werden, dass bei diesem Versuch in den $PSII_{Ca}$ -Proben der S_2 -Zustand eingestellt worden war. Eine Wiederholung des Versuches war auf Grund der begrenzten Messzeit am Synchrotron nicht möglich.

Ein weiterführendes Experiment wäre die Herstellung von $PSII_{Ca}$ -Proben in höheren S-Zuständen durch die sogenannte *Freeze-quick*-Technik. Es wurden bis jetzt keine Ca- oder Sr-XAS-Daten über PSII-Proben in höheren S-Zuständen veröffentlicht. Von besonderem Interesse wäre der S_3 -Zustand, da Änderungen des 3,4Å-Ca-Mn-Abstandes zu erwarten sind [MacLachlan et al., 1994b; Yachandra, 2002]. Anhand von Änderungen der Ca-Koordination oder der Länge der Ca-O-Vektoren im EXAFS-Spektrum könnte die Beteiligung des Ca^{2+} -Ions an der Bindung von Substratwasser näher untersucht werden (postuliert in [Siegbahn, 2000; Vrettos et al., 2001a; Hendry und Wydrzynski, 2003]). Außerdem könnte die Bildung einer neuen $(\mu_2-O)_2-Mn_2$ -Einheit beim $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang den Ca-Mn-Vektor beeinflussen (Modell des Mn_4Ca -Komplexes in [Dau et al., 2001, 2004]).

6.6 Modell der Calcium-Bindung im katalytischen Zentrum des Photosystems II

Durch XAS-Untersuchungen an der Mn-K-Kante wird in [Sauer et al., 1992; DeRose et al., 1994; Dau et al., 2001; Dau und Haumann, 2003] ein Abstand von 3,3-3,5 Å zwischen Ca^{2+} und mindestens einem Manganatom postuliert. Weitere strukturelle Untersuchungen zum Mn_4Ca -Komplex des PSII wurden durch XAS-Messungen an der Mn-K-Kante an PSII-Proben, bei denen Ca^{2+} vollständig entfernt wurde, durchgeführt; dies führte jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen [Ono et al., 1993, 1994; Latimer

et al., 1998]. Zudem zeigen solche Präparationen keine Sauerstoffaktivität [Boussac et al., 1985a,b]. Außerdem ist eine Modifikation des Mn_4Ca -Komplexes anzunehmen, da Ca^{2+} die katalytisch aktive Konformation [Chen et al., 1995] und die Proteinumgebung [Vander Meulen et al., 2002] des Mn_4Ca -Komplexes beeinflusst. Es wird allgemein angenommen, dass Ca^{2+} an sauerstoffhaltenden Gruppen wie Carboxylate, Carbonyle, Wasser und Hydroxyl-Sauerstoff bindet [Kim et al., 2004; Cinco et al., 2004].

Da XAS-Messungen an der Ca-K-Kante experimentell sehr aufwendig sind, gibt es eine Reihe von Untersuchungen, bei denen Ca^{2+} durch andere, leichter zu detektierende Elemente ausgetauscht wurde [Ghanotakis et al., 1985b; Lockett et al., 1989; Booth et al., 1996; Riggs-Gelasco et al., 1996; Ono, 2000; Ono et al., 2001]. Nur mit Sr^{2+} ist eine Reaktivierung und damit die Wiederherstellung der katalytisch aktiven Konformation möglich [Boussac und Rutherford, 1988b; Ono und Inoue, 1989b]. In diesen Experimenten wurden zum Teil deutlich längere Mn-Element-Abstände gemessen, z.B. 4,49 Å an La^{3+} -substituierten PSII-Proben [Chen und Tao, 2001].

An Sr^{2+} -substituierten PSII-Proben wurden sowohl Messungen an der Mn- als auch an der Sr-K-Kante durchgeführt. Ein Abstand von 3,3-3,5 Å zwischen Sr^{2+} und mindestens einem Manganatom konnte durch Mn-EXAFS-Messungen bestimmt werden [Yachandra et al., 1993; Latimer et al., 1995]. Von Riggs-Gelasco et al. [1996] wurde ein Beitrag von Ca-Mn-Vektoren zu den XAS-Spektren angezweifelt, da keine Unterschiede in den EXAFS-Spektren von nativen und Sr^{2+} -substituierten PSII-Proben beobachtet wurden. Aus den Kristallstrukturen konnte mittlerweile jedoch eindeutig ein Ca^{2+} -Ion in unmittelbarer Nähe der Manganatome nachgewiesen werden [Ferreira et al., 2004; Biesiadka et al., 2004; Loll et al., 2005b]. Sr-EXAFS-Messungen an Sr^{2+} -substituierten Proben bestätigten, dass Sr-Mn-Abstände (und damit Ca-Mn-Abstände) von $\sim 3,4$ Å vorliegen [Booth et al., 1996; Cinco et al., 1998]. Bei Cinco et al. [1999] wurden zwei Sr-Mn-Vektoren postuliert. Die auf Grund des relativ kurze Abstandes aufgestellte Vermutung, dass es sich hierbei um eine Sr(Ca)-O-Mn-Verbrückung handelt, wird durch FTIR-Untersuchungen an nativen und Ca^{2+} -freien Proben unterstützt [Noguchi et al., 1995a,b].

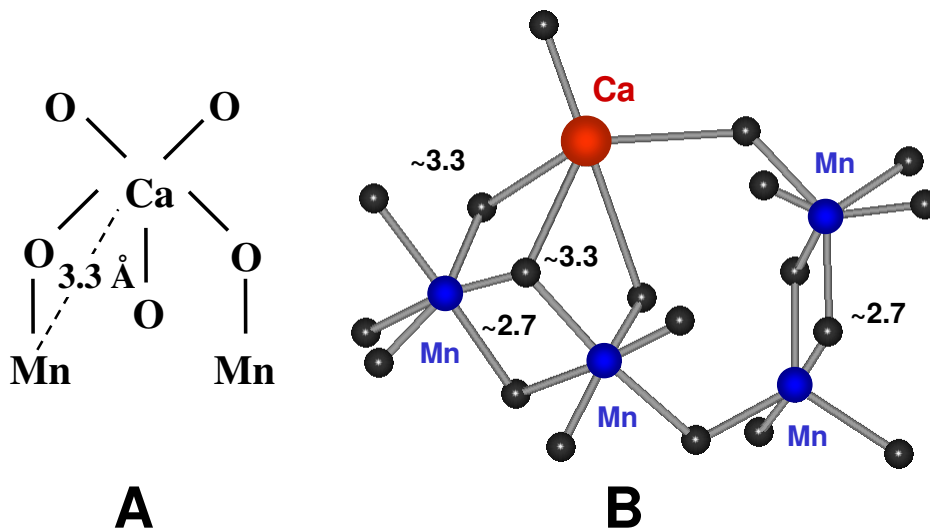


Abbildung 6.8: Modell für die Bindung von Ca^{2+} im Mn_4Ca -Komplex des PSII. (A) Mögliche Koordination von Calcium auf der Basis von in dieser Arbeit bestimmten Ca-XAS-Daten. (B) Hypothetisches dreidimensionales Modell des Mn_4Ca -Komplexes im S_1 -Zustand. Schwarze Kugeln: Sauerstoff. Es sind zwei di- μ -O- und eine mono- μ -O-Brücke zwischen den Mn-Atomen dargestellt. Abstände in Å.

Linear-Dichroismus-Daten vom S_1 -Zustand ergaben, dass der Winkel zwischen der Membrannormalen und dem $2,7\text{\AA}$ -Mn-Mn-Vektor etwa 60° beträgt und für den anderen Mn-Mn-Vektor wird ein Winkel $>80^\circ$ angegeben [Dau et al., 2001; Dau und Haumann, 2003; Dau et al., 2003]. Für die Mn-Ca-Distanzen bei über 3\AA wurde ein Winkel von etwa 45° bestimmt [Cinco et al., 1999; Haumann et al., 2001; Yachandra, 2002; Pospisil et al., 2003]. Dieser Winkel wird durch XAS-Untersuchungen an der Sr K-Kante an Sr^{2+} -substituierten PSII-Proben bestätigt [Cinco et al., 2004].

Der Vergleich zwischen den Daten von Cinco et al. [2002] und dieser Arbeit zeigt, dass die besten Fit-Ergebnisse mit Mangan bei einer Ca-Mn-Distanz von $3,4\text{\AA}$ erzielt werden. In beiden Fällen wird eine Koordinationszahl von $N=2$, d.h. zwei Mn-Ca-Vektoren pro vier Mn, ermittelt. Die Ca-O-Distanz wird in der hier vorliegenden Arbeit, vergleichbar mit [Cinco et al., 2002], mit $2,3\text{-}2,4\text{\AA}$ und einer Koordinationszahl von $N=5\text{-}6$ bestimmt. Die Koordination des Calciums mit sechs Sauerstoffatomen stimmt mit Daten über Calcium-Koordinationen in anderen Proteinen überein [Kretsinger und Nelson, 1976; Powers et al., 1978]. Die Bestätigung der Calcium-Koordination erfolgte in dieser Arbeit durch die Analyse der Kantenspektren. Zudem konnte eine Photoreduktion der Proben ausgeschlossen werden, da vor den XAS-Messungen der Zeitverlauf der Strahlenschädigung durch Analyse der röntgeninduzierten Fluoreszenzänderungen bestimmt wurde (Abschnitt 6.3). Eine Berücksichtigung der Strahlenschädigung fand bei Cinco et al. [2002] dagegen nicht statt.

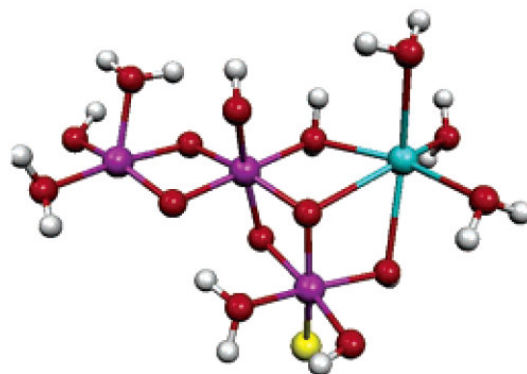


Abbildung 6.9: Schematische Darstellung der Bindungsstelle von Ca^{2+} im PSII, beruhend auf ^{87}Sr -ESEEM-Untersuchungen. Der abgebildete Komplex mit drei Mangan- und einem Calciumatom wurde entsprechend [Siegbahn, 2000] konstruiert und teilweise nach DFT-Berechnungen unter Verwendung der Kristallstrukturen von Concanavalin A und α -Lactalbumin optimiert. Farbcodierung: Wasserstoff (weiß), Sauerstoff (rot), Calcium (hellblau), Mangan (violett), Chlorid (gelb). Entnommen aus [Kim et al., 2004].

Auf der Basis der Ergebnisse aus den Ca-XAS-Messungen in dieser Arbeit kann ein Modell für die Koordination des Ca^{2+} -Ions im Mn_4Ca -Komplex vorgeschlagen werden (Abb. 6.8 (B)). Der Mn_4Ca -Komplex im S_1 -Zustand besitzt wahrscheinlich zwei di- μ -O-verbrückter Mn-Dimere, die über eine mono- μ -O-Brücke miteinander verbunden sind [Pospisil et al., 2003; Dau et al., 2001, 2003; Haumann et al., 2002a]. Ein Mn-Ca-Abstand von $3,3\text{-}3,4\text{\AA}$ deutet auf ein verbrückendes Sauerstoffatom (Ca-(μ -O)-Mn) hin (Abb. 6.8 (A)). Dies wird durch quantenchemische Berechnungen mit DFT-Methoden bei [Siegbahn, 2000] bestätigt. Zusammen mit Ergebnissen aus ^{87}Sr -ESEEM-Untersuchungen [Kim et al., 2004] ergab sich ein ähnliches Modell, bei dem Calcium direkt am Mn_4Ca -Komplex über μ -OH- oder μ -O-Liganden gebunden ist (Abb. 6.9). Wenn die Koordination des Ca^{2+} -Ions mit zuvor aufgestellten Strukturmodellen des Mn_4Ca -Komplexes im S_1 [Pospisil et al., 2003; Dau et al., 2001, 2003; Haumann et al., 2001] kombiniert wird, ergibt sich eine exponierte Position des Ca^{2+} -Ions im Komplex.

Die Anordnung der fünf Metallatome kann mit der Elektronendichte, die aus der Proteinkristallographie ermittelt wurden, in Deckung gebracht werden [Zouni et al., 2001; Kamiya und Shen, 2003; Ferreira et al., 2004; Biesiadka et al., 2004]. In der neuesten Kristallstruktur von Loll et al. [2005b] werden erstmals Angaben zu den Distanzen zwischen Mangan und Calcium gemacht (Abb. 6.10). In dem dort aufgestellten Modell wird das Ca^{2+} -Ion im Abstand von 3,3 Å zu drei Manganatomen angeordnet. Dieses Ergebnis stimmt mit den in dieser Arbeit ermittelten Ca-Mn-Distanzen und der Anzahl der Ca-Mn-Vektoren überein. Die Struktur unterscheidet sich deutlich von dem bei [Ferreira et al., 2004] postulierten kubischen Modell, siehe dazu auch Abschnitt 1.4.2. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Mn_4Ca -Komplex in PSII-Kristallen während der Röntgenstrukturanalyse nachweislich durchreduziert wird [Yano et al., 2005; Grabolle et al., 2006] und damit eine intakte Struktur des Mn_4Ca -Komplexes in Frage gestellt werden sollte.

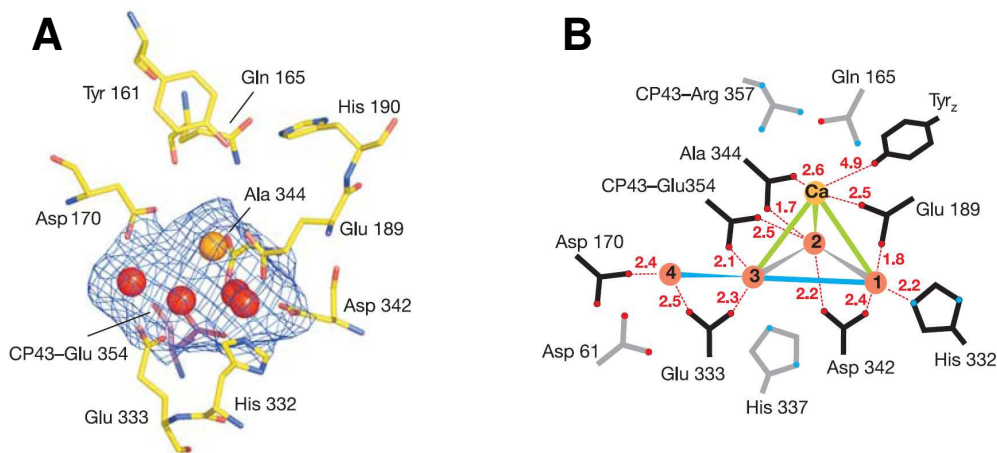


Abbildung 6.10: Neueste kristallographische Daten des Mn_4Ca -Komplex in Cyanobakterien. (A) Elektronendichte des PSII-Komplexes in *T. elongatus*. Das Ligandenumfeld aus den Aminosäuren von D1 (gelb) und CP43 (magenta) ist mit dargestellt. Rote Kugeln: Mangan, orange Kugel: Calcium. (B) Schematische Darstellung des Mn_4Ca -Komplexes. Die Abstände zwischen Mangan und Calcium sind mit durchgezogenen Linien markiert (grau: 2,7 Å; blau: 3,3 Å; grün: 3,4 Å). Entnommen aus [Loll et al., 2005b].

6.7 Zusammenfassung

- Es konnte die Position des Ca^{2+} -Ions innerhalb des Mn_4Ca -Komplexes vom PSII durch XAS an der Ca-K-Kante bestimmt werden. Es zeigte sich, dass gebundenes Calcium durch 5-6 Sauerstoffatome koordiniert wird und sich im Abstand von $\sim 3,3$ Å zu zwei bis drei Manganatomen befindet. Diese Ergebnisse sind kompatibel mit Daten aus Mn- und Sr-XAS-Untersuchungen an nativen und an substituierten PSII-Proben.
- Durch die Auswertung von XANES-Spektren konnte die Koordination vom Ca^{2+} -Ion mit 5-6 Sauerstoffatomen in den PSII_{Ca} -Proben bestätigt werden.
- Es wurde durch Aufzeichnung des zeitlichen Verhaltens der Fluoreszenz die Strahlenschädigung in den PSII_{Ca} -Proben bestimmt und damit die Dauer eines XAS-Scans ohne nennenswerte Photoreduktion ermittelt. Dadurch konnte während der XAS-Messungen an der Ca-K-Kante eine Photoreduktion und damit Änderungen

der Oxidationszustände und der Konformation im Mn_4Ca -Komplex ausgeschlossen werden.

- Das auf der Basis von Ca-XAS-Daten erstellte Modell des Mn_4Ca -Komplexes im PSII unter Berücksichtigung von Ergebnissen aus Mn- und Sr-Dichroismus-Messungen ist kompatibel mit den neuesten Strukturdaten aus der Proteinkristallographie. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die PSII-Kristalle während der Röntgenstrukturanalyse nachweislich vollständig reduziert werden und damit eine intakte Struktur des Mn_4Ca -Komplexes angezweifelt werden kann.