

# Kapitel 7

## Zusammenfassung

Die photosynthetische Wasseroxidation des  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplexes im Photosystem II (PSII) ist für die Atmosphäre und das Leben auf der Erde von fundamentaler Bedeutung. Jedoch ist dieser Prozess nur unzureichend verstanden. Mit Hilfe von Röntgenabsorptionsspektroskopie (*X-ray Absorption Spectroscopy*, XAS) zur Untersuchung der Struktur des  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplexes und insbesondere der strukturellen Veränderungen im katalytischen Zyklus wurden wichtige Resultate erzielt, die zu den weltweiten Bemühungen beitragen, den Mechanismus der photosynthetischen Wasseroxidation zu enträtseln. In der hier vorliegenden Arbeit werden zwei spezielle Beiträge dazu vorgestellt: (i) die methodischen Entwicklungen, welche schließlich die Beobachtung des im Protein gebundenen Metallkomplexes durch zeitaufgelöste XAS-Messungen ermöglicht haben, und (ii) XAS-Messungen an der Ca-K-Kante, um so die Position des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions relativ zu den Mn-Atomen im Komplex zu ermitteln.

*(i) Raumtemperatur- und zeitaufgelöste XAS-Messungen zu Intermediatzuständen des katalytischen Zyklus*

Kürzlich gelang es, die Bildung eines Zwischenzustandes im katalytischen S-Zyklus des PSII durch zeitaufgelöste XAS-Untersuchung nachzuweisen. Diese Ergebnisse wurden in der renommierten Fachzeitschrift *Science* veröffentlicht [Haumann et al., 2005a]. In einem begleitenden Kommentar in derselben Ausgabe von *Science* weisen J. E. Penner-Hahn und C. F. Yocum [2005] auf die besonderen experimentellen Schwierigkeiten dieses richtungsweisenden Experiments hin. Es wurde lange Zeit angenommen, dass ein solches Experiment unmöglich sei. Anträge auf Messzeiten an den Synchrotronstrahlungsquellen wurden auf Grund der vermeintlichen Undurchführbarkeit nicht bewilligt. Tatsächlich konnten diese Experimente nur durch die Entwicklung neuer Methoden für Probenpräparation und XAS-Messungen realisiert und zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht werden. Entwicklung und Optimierung der folgenden Methoden bzw. Techniken stellten die notwendige Grundlage für die zeitaufgelösten Studien sowie für weitere XAS-Untersuchungen bei Raumtemperatur dar:

- Ein optimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis erfordert einen minimalen Wassergehalt in den Proben. Es wird in dieser Arbeit gezeigt, dass durch die Trocknung von PSII-Membranfragmenten, die zuvor durch eine spezielle Zentrifugationsprozedur geschichtet wurden, eine Reduktion des Wassergehalts auf 50 % (Gewichtsprozent) erzielt werden konnte. Dieser Wassergehalt ist vergleichbar mit dem in PSII-Kristallen. Eine weitere Reduktion führt graduell zum Verlust der Sauerstoffbildungsaktivität.

- Durch die Nutzung eines elektronischen Dosiersystems konnte die automatisierte, schnelle und reproduzierbare Auftragung von 20 „Punkten“ mit PSII-Suspension auf einen speziell entworfenen Probenträger erreicht werden. Durch die Ermittlung der optimalen Parameter bei Herstellung der PSII-Suspension und bezüglich der Trocknung unter Vakuum konnte ich einen ausreichend niedrigen Wassergehalt erreichen. Dies gelang ohne einen zeitaufwändigen Zentrifugationsschritt während der Präparation und ohne signifikanten Verlust der Sauerstoffaktivität des Photoenzym.
- Ferner wurde eine Apparatur für den automatisierten Probenwechsel während der XAS-Messungen entwickelt. Damit war es möglich, einzelne Proben mit Laserblitzsequenzen zu belichten und simultan XAS-Daten aufzunehmen. Da anschließend in weniger als einer Sekunde eine neue Probe eingefahren werden konnte, gelangen XAS-Messungen an bis zu 10.000 PSII-Proben pro Messtermin.

Die oben erwähnten methodischen Entwicklungen sind in Kapitel 3 näher erläutert. Einzelne Aspekte sind ferner in zwei Artikeln im Journal of Synchrotron Radiation beschrieben [Haumann et al., 2002a, 2005c].

Nur mit der Hilfe der verbesserten Methodik wurde eine Reihe von Untersuchungen am katalytischen Zyklus des PSII-Komplexes möglich. An diesen Untersuchungen arbeiteten mehrere Mitglieder in der Gruppe von Prof. Holger Dau mit. Insbesondere Dr. Michael Haumann (Entwicklung der experimentellen Strategie mit Prof. Holger Dau, Datenanalyse und Interpretation) und Dr. Peter Liebisch (XAS-Messungen, Entwicklung der Software für die Datenanalyse, XANES-Simulationen) waren maßgeblich daran beteiligt. Die folgenden Ziele wurden erreicht:

- Geschwindigkeitskonstanten und Temperaturabhängigkeit der durch Röntgenstrahlung induzierten Photoreduktion des  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplexes wurden ermittelt. Dies ermöglichte die Entwicklung von experimentellen Protokollen, die einen signifikanten Einfluss der Photoreduktion auf die XAS-Ergebnisse ausschließen [Haumann et al., 2002a; Grabolle et al., 2006], Supporting Information in [Haumann et al., 2005b].
- Zum ersten Mal wurde die Struktur und die Oxidationszustände des  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplexes bei Raumtemperatur (funktionale und quasi-native Bedingungen) für alle vier semistabilen Intermediatzustände charakterisiert und mit Daten, die bei 20 K ermittelt wurden, verglichen [Haumann et al., 2005b]. Von besonderer Bedeutung ist, dass wir für den heftig diskutierten  $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ -Übergang deutliche Hinweise auf eine Mn-Oxidation erhalten haben, die verbunden ist mit einer  $\mu$ -O-Brückenbildung und einem Übergang von fünffach koordiniertem  $\text{Mn}^{\text{III}}$  zu sechsfach koordiniertem  $\text{Mn}^{\text{IV}}$ .
- Zeitaufgelöste XAS-Messungen mit einer Auflösung von 10  $\mu\text{s}$  ermöglichten die Entdeckung und Identifizierung eines neuen Reaktionszwischenzustandes [Haumann et al., 2005a]. Diese Ergebnisse führten zu einer Erweiterung des fundamentalen S-Zyklus und sind von wesentlicher Bedeutung für den Entwicklung mechanistischer Modelle zur photosynthetischen Wasseroxidation.

(ii) *XAS an der Ca-K-Kante zur Bestimmung der Position und der Koordination von Calcium*

Zu Beginn der Jahres 2001 war wenig über die Position des Calciums im  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplex des PSII bekannt. Einige XAS-Experimente, bei denen Calcium entfernt und durch  $\text{Sr}^{2+}$ - oder anderen Metallionen ersetzt wurde, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen (siehe Abschnitt 1.4.3 und 6.6). Auch die damals verfügbare Kristallstruktur [Zouni et al., 2001] lieferte keine eindeutigen Hinweise auf die Position des Calciums. Daher versuchte ich die Koordinationsumgebung des Calciums direkt durch XAS an der Ca-K-Kante zu untersuchen. Zu beachten sind die ungewöhnlichen experimentellen Schwierigkeiten, die mit diesem Experiment einhergehen: (i) In typischen PSII-Proben sind einige Hundert  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen pro PSII enthalten. Die Verringerung auf weniger als 2-3  $\text{Ca}^{2+}$  pro PSII ist für sinnvolle XAS-Experimente an dem einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion, welches mit dem PSII-Komplex verbunden ist, erforderlich. (ii) Glas, die meisten Kunststoffe, Haut, Haare und der menschliche Atem sind erheblich mit Calcium kontaminiert. Diese Kontaminationen führen zu einem extremen Problem bei der Herstellung von Proben mit sehr niedrigem Calciumgehalt. Dieses Problem tritt besonders bei Verdünnungsschritten während der Elementaranalyse durch Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) auf. (iii) XAS-Messungen bei der Energie der Ca-K-Kante stellen eine experimentelle Herausforderung dar, und zwar auf Grund der starken Absorption der Röntgenstrahlung durch Gase, Wasser und Fenstermaterialien, durch die geringe Eindringtiefe der Strahlung in die PSII-Proben und durch die hohe Rate der Strahlenschädigung. Im Rahmen dieser Arbeit konnten folgende Zeile erreicht werden:

- Durch die Optimierung der Prozedur zur Entfernung von überschüssigen Calcium konnte ich den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt auf weniger als 2-3 Ca/PSII reduzieren - ohne signifikanten Verlust der Sauerstoffaktivität. Jedoch sind die Schwankungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt, der durch AAS bestimmt wurde, überraschend hoch. Die Schwankungen in den Eigenschaften des PSII-Pflanzenmaterials sowie die schwer zu kontrollierenden Ca-Kontaminationen bei der Herstellung der AAS-Proben sind vermutlich die Quelle für die problematischen Schwankungen [Müller et al., 2004]. (In zukünftigen Experimenten können durch die Anwendung alternativer Techniken für die Elementaranalyse an unverdünnten PSII-Proben die experimentellen Probleme bei der Bestimmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts wahrscheinlich gelöst werden. Jedoch wird das entsprechende Gerät nicht vor Februar 2006 in der Gruppe von Prof. Dau zur Verfügung stehen.)
- Trotz der experimentellen Schwierigkeiten konnten Ca-XAS-Spektren aufgenommen und analysiert werden, und zwar für PSII-Proben im  $S_1$ -Zustand [Müller et al., 2005]. Es wurden außerdem erste Versuche zur Charakterisierung des  $S_2$ -Zustandes unternommen. Jedoch konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob in der Mehrzahl der PSII-Zentren der  $S_2$ -Zustand erreicht wurde. Daher schätze ich die Ergebnisse diese Versuches als nicht hinreichend schlüssig ein.
- Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion befindet sich in einem Abstand von  $\sim 3.3 \text{ \AA}$  zu mindestens einem Manganatom. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit den neusten kristallographischen Daten [Loll et al., 2005b] und mit den XAS-Ergebnissen aus der Gruppe von K. Sauer und V. K. Yachandra in Berkeley (siehe Abschnitt 6.6, [Cinco et al., 2002]). Die Ergebnisse aus den XANES- und EXAFS-Spektren legen

nahe, dass das Calcium im  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplexes nur durch fünf oder sechs leichte Atome (wahrscheinlich Sauerstoff) koordiniert wird. Dies ist eine niedrigere Zahl als in Lösung (7-8 Liganden). Die Koordinationsumgebung scheint weniger symmetrisch als in Lösung zu sein. Es ergaben sich keine Hinweise, dass Chlorid ein Ligand des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions im PSII ist.

## 7.1 Ausblick

Bisher konnte eine direkte Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  an der Wasserspaltung, z.B. als Brückenligand eines Substratwassermoleküls, nicht geklärt werden. Weitere Ca-XAS-Untersuchungen an PSII-Proben in höheren S-Zuständen könnten die daraus resultierenden Änderungen in Ca-O- und Ca-Mn-Abständen zeigen. Röntgenabsorptionsmessungen bei Raumtemperatur bieten sich nicht an, da die Strahlenschädigung nochmals drastisch zunehmen und zusätzlich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis sich sehr verschlechtern würde.

XAS-Messungen bei Raumtemperatur an der Mangan-K-Kante könnten bei einer weiter verbesserten Zeitauflösung weitere Erkenntnisse über die Kinetik und die Zwischenzustände im viel diskutierten  $\text{S}_3 \rightarrow (\text{S}_4) \rightarrow \text{S}_0$ -Übergang liefern. Eine weitere Überlegung wäre, die einzelnen S-Zustandsübergänge chemisch (z.B. Inhibitoren) oder physikalisch (z.B. Druck) zu verlangsamen. Dabei sollte jedoch sicher gestellt sein, dass die strukturellen und elektronischen Eigenschaften des  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplexes nicht beeinflusst werden, d.h. der native Zustand möglichst erhalten bleibt.

Die technischen Entwicklungen für die zeitaufgelösten Messungen geben neue Anregungen für Messungen von katalytischen Zyklen in anderen Metalloproteinen. Dabei muss es sich nicht um lichtgetriebene Übergänge handeln. Stattdessen könnte anstelle eines Lasers ein Dosiersystem eingesetzt werden, um durch Änderungen des pH-Wertes oder Zugabe von Redoxmitteln die verschiedenen Zustände des jeweiligen Metallzentrums einzustellen.