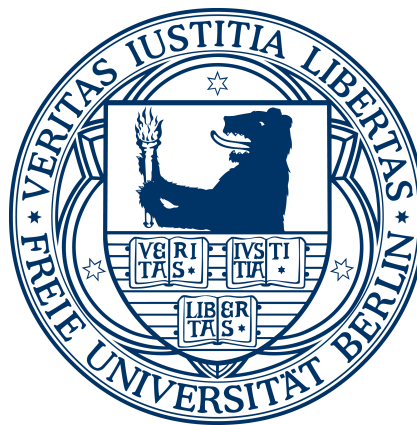


Elektronenspin-Resonanzspektroskopie an einkristallem Photosystem II

Im Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
eingereichte Dissertation

vorgelegt von
Sven Keßen
aus Recklinghausen



Institut für Experimentalphysik der Freien Universität Berlin
2011

Erster Gutachter: *Prof. Dr. Robert Bittl*
Zweiter Gutachter: *Prof. Dr. Holger Dau*
Tag der mündlichen Prüfung: *7. Juli 2011*
Institut für Experimentalphysik der Freien Universität Berlin

Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

- zu Teil II, Mn_4Ca :

Christian Teutloff, Sven Keßen, Jan Kern, Athina Zouni, Robert Bittl; **High-field (94-GHz) EPR spectroscopy on the S_2 multiline signal of photosystem II;** *FEBS Lett.* 580; 3605-3609 (2006)

- zu Teil III, Y_D^\bullet :

Christian Teutloff, Susanne Pudollek, Sven Keßen, Matthias Broser, Athina Zouni, Robert Bittl; **Electronic structure of the tyrosine D radical and the water splitting complex from pulsed ENDOR spectroscopy on photosystem II single crystals;** *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11; 6715-6726 (2009)

Sven Keßen, Christian Teutloff, Jan Kern, Robert Bittl; **High Field ^2H -Mims-ENDOR Spectroscopy on PSII Single Crystals: Hydrogen Bonding of Y_D^\bullet ;** *ChemPhysChem* 11; 1275-1282 (2010)

Kurzfassung

Sven Keeken

Elektronenspin-Resonanzspektroskopie an einkristallinem Photosystem II

Oxygene Photosynthese ist einer der für die Biosphäre der Erde zentralsten biochemischen Prozesse, der zum einen zur Gewinnung chemischer und damit letztlich biologisch verwendbarer Energie aus dem Sonnenlicht dient, zum anderen als Produkt dieser Reaktion den Sauerstoff erzeugt und an die Umwelt abgibt, der in der Erdatmosphäre angereichert erst die Voraussetzung liefert für die Entstehung Sauerstoff umsetzender Lebewesen. Die Sauerstoffherzeugung sowie ein guter Teil der Energiegewinnung für die Produktion von Nährstoffen findet dabei im Photosystem II (PSII) statt, einem Multiproteinkomplex in Cyanobakterien und den Chloroplasten von Grünpflanzen.

In der vorliegenden Arbeit werden EPR-Untersuchungen am PSII aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* vorgestellt. EPR nutzt das Auftreten ungepaarter Elektronen und die Wechselwirkung ihrer magnetischen Momente in einem äußeren Magnetfeld, um über die Vermessung von Energieübergängen Rückschlüsse auf Bindungen, Aufbau und Orientierungen innerhalb von biochemischen Stoffen zu gewinnen. Als spektroskopische, wenig-invasive Methode eignet sie sich gerade auch für die Charakterisierung von Zwischenzuständen, die für andere biophysikalisch wichtige Methoden (etwa Röntgenkristallspektroskopie) nicht ohne Weiteres zur Verfügung stehen. Die Anwendung von gepulsten EPR- und ENDOR-Methoden unter Hochfeldbedingungen und im Besonderen die Verwendung von Einkristallen kann dazu wesentliche Einblicke in die innere Geometrie von Proteinen und Radikalen liefern.

Die Wasseroxidation erfolgt an einem Metallkomplex im Innern des PSII, dessen Struktur erst kürzlich aufgelöst und der als Mn_4CaO_5 -Komplex identifiziert wurde. Nach Absorption eines Photons passender Energie durch das PSII geht dieser Komplex in den paramagnetischen sogenannten S_2 -Zustand über. Im Hochfeld wird das EPR-Signal dieses Komplexes und daraus die Komponenten seines g -Tensors bestimmt. Anhand von PSII-Einkristallen kann die Orientierungsabhängigkeit der sichtbaren Hyperfeinstruktur auf dem Signal demonstriert werden, die unter Hochfeldbedingungen drastische Unterschiede zum S_2 -Signal bei niedrigeren Mikrowellenfrequenzen aufweist. Ferner erlauben die EPR-Spektren eine weitergehende Beurteilung der in der Literatur publizierten Parametersätze für die Hyperfeinkopplungen der Manganionen des Komplexes. Gleichzeitig demonstriert dies aber auch die Schwierigkeiten und Grenzen des gezeigten Ansatzes bei der Charakterisierung eines spektroskopisch so komplexen Systems.

Im Hauptteil der Arbeit werden die Möglichkeiten der bislang wenig genutzten Puls-ENDOR-Methoden an Einkristallen an einem weiteren prominentem Radikalsignal im PSII, dem Y_D^\bullet , aufgezeigt. Dieses Tyrosin-Neutralradikal nimmt nicht an der eigentlichen Reaktion oder dem nachfolgenden Elektronentransport teil und weist darum eine wesentlich höhere Lebensdauer auf als vergleichbare Radikale. Die Verwendung von Einkristallen erlaubt die Bestimmung der Y_D^\bullet -Orientierung sowohl zur Magnetfeldrichtung als auch zu den Kristallachsen und etabliert das Radikal als für weitere Einkristalluntersuchungen wesentlichen Orientierungsmarker für das PSII. Die vollständige Charakterisierung aller relevanten Hyperfeinwechselwirkungen und die so ermöglichte Rekonstruktion der Bindungsgeometrien am Tyrosinring sowie die Aufklärung der Kopplungen der am β -Kohlenstoffatom des Moleküls gebundenen Protonen zeigen mit Y_D^\bullet als Modellsystem die vielfältigen und exakten Ergebnisse, die am Einkristall möglich sind. Zuletzt wird die für die Oxidation des Y_D^\bullet in der Photoaktivierung des PSII relevante Wasserstoff-Brückenbindung zu einem nahe liegenden Histidin mittels Deuteroneaustausch und Deuteronen-Hochfeld-ENDOR näher untersucht und über die Rekonstruktion dieser Kopplung die Bestimmung des Wasserstoffbrücken-Bindungspartners ermöglicht.

Abstract

Sven Keken

EPR Spectroscopy on Single-Crystal Photosystem II

Among the vast multitude of biochemical processes that constitute our planet’s biosphere, oxygenic photosynthesis is one of the most consequential. By opening an effective pathway for cyanobacteria and green plants to convert the energy provided by sunlight to chemical energy usable for growth and maintenance, they themselves become a source of energy for their environment—ultimately powering entities ranging from herbivores to fossil-fuel dependent civilizations. As a by-product of this reaction, molecular oxygen is synthesized and released into the atmosphere, thereby bioengineering our planet into a habitable world for a diverse fauna of oxygen-breathing metazoans. All this starts in an enzyme known as Photosystem II (PSII), a membrane-bound protein-pigment complex, where light energy is employed to split water, electrons and protons are separated for further use in the cell, and oxygen is formed.

The present work uses advanced methods of pulse-EPR to analyze the PSII of the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. EPR explores the chemical structure of molecules and complexes by inducing unpaired electrons to undergo energy state transitions created by their quantum-mechanical spin observable when an external magnetic field is applied. Using microwave radiation to induce these transition, EPR methods are generally less invasive than comparable spectroscopic methods in biophysics, e.g. x-ray crystallography, promoting it to a method of choice to characterize transitional states. By combining advanced pulsed methods of EPR and ENDOR with high magnetic fields and the usage of single-crystal preparations of PSII, it is possible to gain detailed insights about the inner geometry and interaction strengths of protein cofactors and radicals.

Oxidizing water (and releasing oxygen) is a four-step process that takes place at a metal center within the PSII, the so-called oxygen-evolving complex (OEC), whose structure recently was revealed to contain four manganese, one calcium and five oxygen ions. After the absorption of one suitable photon’s energy, the center turns into the transitional S_2 state which is semi-stable and paramagnetic. High-field EPR is used to gain the S_2 -state signal at W-Band frequencies, derive its \mathbf{g} -tensor components, and compare it to model complexes and reference values gained from different frequency bands. Single-crystal EPR rotation patterns were taken to demonstrate the orientation dependency of the visible hyperfine structure to explain the drastic differences in appearance between the W-band spectra presented here and the well-known spectra at X-band frequencies. This approach also illuminates the experimental difficulties and limitations the presented approach has to face when applied onto a system as complex as the oxygen-evolving center. In the main part of the work, pulsed ENDOR methods are employed under high-field conditions to characterize the couplings and orientations of and within a neutral radical found in PSII, the tyrosine-160 of the D2 subunit, Y_D^\bullet . This radical is not part of the electron transfer chain and therefore more stable than comparable radicals in PSII. Using single crystals, Y_D^\bullet ’s orientation with respect to the magnetic-field direction and within the crystal is resolved, thereby establishing the tyrosine as a marker of the molecular orientation of PSII. Furthermore, high-field conditions allow the reconstruction of the coupling strengths and orientation of all four protons bound to the tyrosine ring and of the two bound to the carbon in the β -position. By selective deuteration, a proton known to be hydrogen-bound to Y_D^\bullet is exchanged against a deuterium ion, thus separating its coupling signals due to the different gyromagnetic moment and free Larmor frequency. A reconstruction of this hydrogen bond, its strength and orientation offers direct spectroscopic proof of the bonding partner, a near-by histidine residue also bound to the D2-subunit.

Auswahl wichtiger Abkürzungen und Symbole

A	Hyperfein-Wechselwirkungsmatrix
ATP	Adenosintriphosphat
BBY	Präparationsprotokoll nach Berthold, Babcock, Yocum
Chl	Chlorophyll
<i>cw</i>	von engl. <i>continuous wave</i> , bei konstanter MW (auch: Dauerstrichmessung)
DFT	Dichtefunktionaltheorie
ENDOR	<i>Electron Nuclear Double Resonance</i>
ESR, EPR	Elektronenspinresonanz, engl. <i>Electron Paramagnetic Resonance</i>
EXAFS	<i>Extended X-Ray Absorption Fine Structure</i>
FID	Freier induzierter Zerfall (engl. <i>Free Induction Decay</i>)
FSE	gepulst aufgenommenes EPR-Resonanzspektrum (von engl. <i>Field Swept Echo</i>)
g , <i>g</i>	g -Matrix, <i>g</i> -Wert
hfc	Hyperfeinkopplung (von engl. <i>hyperfine coupling</i>)
MLS	<i>Multiline Signal</i> des S_2 -Zustands des Mangankomplexes
MW	Mikrowelle
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMR	Kernmagnetresonanz (von engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
OEC	Sauerstofferzeugender Komplex (von engl. <i>oxygen-evolving complex</i>)
P680	Primärer Elektronendonator im PSII
Pheo	Pheophytin
PQ	Plastochinon (von engl. <i>plastoquinone</i>)
PSI, PSII	Photosystem I, Photosystem II
PSII _{cc}	Präparation des PSII-Kerns (von engl. <i>core complex</i>)
R	Drehmatrix zur Beschreibung einer Tensordrehung
Q	Tensor der Quadrupolaufspaltung
Q _A , Q _B	primärer und sekundärer Akzeptor im PSII
RF	Radiofrequenz
srt	Pulswiederholzeit (von engl. <i>shot repetition time</i>)
<i>Th. elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> , das verwendete Cyanobakterium
Y _D [•]	Neutralradikal des Tyrosin-160 der D2-Untereinheit von PSII
Y _Z	Tyrosin-161 der D1-Untereinheit von PSII
WOK	Wasseroxidierender Komplex (auch Mangankomplex und OEC)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	15
I	Grundlagen	19
2	Photosystem II in der oxygenen Photosynthese	21
2.1	Einführung	21
2.2	Oxygene Photosynthese	22
2.2.1	Die Lichtreaktion	23
2.3	Aufbau und Funktion des Photosystems II	24
2.3.1	Primäre Reaktion und Elektronentransport	26
2.3.2	Wasseroxidierender Komplex	26
2.3.3	D1-Tyr161 und D2-Tyr160	30
3	Methodisches	35
3.1	Elektronenspinresonanz	35
3.1.1	Grundlagen	35
3.1.2	Anteile des Spin-Hamilton-Operators	36
3.2	Gekoppelte Spinzustände	42
3.3	Methoden und Verfahren der Elektronenspinresonanz	46
3.3.1	<i>cw</i> -EPR	46
3.3.2	Puls-EPR	48
3.3.3	Elektronen-Kern-Doppelresonanz-Spektroskopie	49
3.3.4	Puls-Davies-ENDOR	50
3.3.5	Puls-Mims-ENDOR	51
3.3.6	Orientierungsabhängigkeit und Orientierungsselektion	52
3.4	PSII-Kernkomplexe und der PSIIcc-Einkristall	54
3.5	Probenpräparation	56

3.5.1	Cyanobakterielle Lösung und Einkristalle	56
3.5.2	D ₂ O-ausgetauschtes PSIIcc-Lösung und -Einkristalle	57
3.5.3	Lösungsproben aus Spinat	58
3.6	Experimenteller Aufbau	58
3.6.1	Bruker-Spektrometer, W- und X-Band	58
3.6.2	Beleuchtungsaufbau und Zustandsgenerierung	59
3.6.3	Winkelabhängige Messungen mit Goniometern	60
II	Mn₄Ca	63
4	Der Mangankomplex im Kok-Zyklus	65
4.1	Schrittweise Wasseroxidation	65
4.2	Der Zustand S_2 in der EPR	68
4.2.1	Höhere Spin-Zustände des Mangankomplexes	69
4.2.2	Das <i>Multiline</i> -Signal des S_2 -Zustands	71
5	Hochfeld-EPR am Mangankomplex	73
5.1	Das Mangansignal unter Hochfeldbedingungen	73
5.2	Auflösung der Hyperfeinkopplungsstruktur unter Hochfeldbedingungen	76
5.3	Rekonstruktion von g -Tensor und Hyperfeinkopplungs-Parametern	78
III	Y_D[•]	87
6	Y_D[•] im Photosystem II	89
6.1	Tyrosin-D als innermolekulare Referenz	89
6.2	Tyrosin-D als Modellsystem	90
7	EPR am Tyrosin-D	93
7.1	EPR an Y _D [•] -Proben gefrorener Lösung	94
7.2	EPR am Tyrosin-D-Einkristall	94
7.3	Orientierung des aromatischen Rings	100
8	Protonen-ENDOR am Tyrosin-D	103
8.1	Orientierungselektives Davies-ENDOR an Proben gefrorener Lösung	104
8.2	Protonen-ENDOR am Einkristall	110
8.3	Diskussion	118

8.3.1	Dihedralwinkel der β -Protonen	122
9	Deuteronen-ENDOR am Tyrosin-D	125
9.1	Orientierungsselektives ^2H -ENDOR an Proben gefrorener Lösung	126
9.1.1	Signalunterdrückungseffekte im Mims-ENDOR	127
9.2	EPR und Mims-ENDOR am deuterierten Einkristall	131
9.2.1	^2H -Mims-ENDOR am Einkristall	136
9.3	His189 als Bindungspartner	143
9.4	Die Wasserstoff-Bindung im ^1H -Davies-ENDOR	145
10	$\text{Y}_\text{D}^\bullet$, ein Fazit	153
IV	Anhang	159
A	EPR-Simulationen unter MATLAB	161
A.1	Molekulare Orientierungen	161
A.1.1	Definition der Euler-Winkel	161
A.1.2	Orientierung der \mathbf{g} - und Hyperfeinkopplungs-Tensoren	162
A.2	Simulation von Kristallspektren	163
A.3	Simulation der Orientierungsselektion bei 94 GHz	163
A.4	Simulation der Mims-Löcher	165
B	Davies-ENDOR am PSII-Einkristall	167
C	Mims-ENDOR am deuterierten PSIIcc-Einkristall	175

Kapitel 1

Einleitung

Im Verlauf des letzten Jahrhunderts hat sich die Biologie und vor allem die Auffassung über das Wesen lebendiger Systeme gewandelt. Wenn heute Biologen, Biochemiker und Biophysiker mit großer Selbstverständlichkeit die ihren Fachgebieten eigenen Methoden einbringen, um mit ihnen dieselben biologischen Systeme zu erforschen, dann legen sie damit in der alltäglichen wissenschaftlichen Praxis einen Disput bei, der im 16. Jahrhundert noch auf dem Gebiet der Philosophie verortet war. Das Bild, das sich uns heute über den Aufbau und die Funktionsweise biologischer Systeme bietet, mag im Detail nur wenige Übereinstimmungen mit den damaligen mechanistischen Vorstellungen aufweisen. Unbestritten ist jedoch die heute nahezu uneingeschränkte Dominanz des mechanistischen Paradigmas, wenn es an die Erklärung biologischer Fragestellungen geht: so sehr die evolutionär gewachsene Komplexität biologischer Systeme auch scheinbar über die unbelebte Natur hinausweist und gerade dadurch die wissenschaftliche Untersuchung motivieren mag, so belegt sie aus heutiger Sicht damit keine darüber hinausgehende, prinzipielle Sonderstellung des Lebendigen in der Natur, und eine *vis vitalis* erwartet man nicht mehr zu entdecken.

Es ist darum nur folgerichtig, dass die Beschreibung biologischer Systeme in zunehmenden Maße auf ihre biochemischen und schließlich physikalischen Grundlagen verweist und die entsprechende Forschung dadurch zu einem Sammelpunkt der naturwissenschaftlichen Disziplinen wird. Knapp einhundert Jahre nach Begründung der Quantenphysik zur Beschreibung von in der Thermodynamik auftauchenden statistischen Eigenheiten, aus der sich danach eine Umwälzung in der Beschreibung der elementaren Grundbausteine der Natur entwickelte, werden heute diejenigen Prozesse auf quantenphysikalisch beschreibbare Abläufe zurückgeführt, zu deren Erklärung man vor noch überschaubaren Zeiträumen dualistische Konzepte für zwingend notwendig erachtete. Umso mehr trifft das auf die Biophy-

sik zu, die zur Aufklärung dieser Prozesse in der Quantenphysik verankerte experimentelle Methoden beisteuert.

Ein solcherart im Fokus des interdisziplinären Interesses befindliche System ist das Photosystem II (PSII). Als zentraler Bestandteil von unter Sauerstofferzeugung ablaufender Photosynthese ist dies der transmembrane Proteinkomplex in den Thylakoiden der Chloroplasten von Grünpflanzen und in Cyanobakterien, in dem in einem mehrschrittigen Prozess unter Absorption von Lichtenergie Wasser oxidiert und molekularer Sauerstoff freigesetzt wird. Dies stellt den ersten Schritt dar, mit dem Pflanzen Energie aus dem Sonnenlicht gewinnen und umsetzen, um so die für ihr Wachstum und die Aufrechterhaltung ihrer Zellfunktionen notwendigen Grundstoffe synthetisieren und mithin überleben zu können. Mit diesem Schritt begründet die Pflanze nicht nur ihre eigene Existenz, sondern bildet die Basis der Nahrungskette, von der nahezu alle komplexeren, selbst nicht autotrophen Lebewesen abhängen. Dazu sind es die Produkte dieser biochemischen Prozesse, die — über die Zeitalter in der Erde angelagert — heute als fossile Brennstoffe einen guten Teil der für unsere technisierte Zivilisation notwendigen Energien liefern. Nicht zuletzt sorgte der seit Jahrmilliarden andauernde Prozess der Sauerstofferzeugung dafür, den Sauerstoffgehalt in unserer Atmosphäre auf heutige Werte anzureichern, gegen alle Sauerstoff verbrauchenden Prozesse stabil zu halten und damit die Voraussetzungen für die Entstehung Sauerstoff atmenden Lebens zu schaffen.

Das Herz des PSII, an dem sowohl die Wasserspaltung wie auch die Erzeugung molekularen Sauerstoffs abläuft, bildet dabei ein Metallkomplex, dessen genauere Struktur erst kürzlich bestimmt werden konnte und der aus vier Mangan-, einem Kalzium- und fünf Sauerstoffionen besteht. Dieser durchläuft einen durch Lichtabsorption angetriebenen Kreisprozess, dessen Zwischenstufen und Reaktionsschritte nachzuvollziehen heute noch nicht vollständig gelungen, für eine mögliche Nachbildung des Systems oder seiner Funktionen in technischen Umsetzungen aber mit entscheidend ist.

Zur Charakterisierung der paramagnetischen Zwischenzustände dieses Zyklus bietet sich hier die Elektronenspin-Resonanzspektroskopie (EPR) an, die mittels dem mit ungepaarten Elektronen verbundenen magnetischen Moment in einem äußeren Magnetfeld Übergänge zwischen durch den Zeeman-Effekt aufspaltende Energieniveaus untersucht und so Einblicke in Zusammensetzungen, Bindungen und Oxidationsstufen im Reaktionszentrum erlangen kann. Über eine Erweiterung der EPR-Methodik, sogenannten Elektronen-Kern-Doppelresonanz-Experimenten (ENDOR), gelingt die Detektion von mit der Spindichte wechselwirkenden Kernen, was weitere Rückschlüsse über die Molekülgeometrie erlaubt. Dies gilt im Besonderen unter Hochfeldbedingungen, unter denen ansonsten überlagern-

de Wechselwirkungen experimentell voneinander getrennt und so mit größerer Präzision und Sicherheit bestimmt werden können. In Verbindung mit der Verfügbarkeit der um das Jahr 2000 zuerst gewachsenen photosynthetisch funktionalen Einkristalle ergeben sich eine Vielzahl experimenteller Möglichkeiten, mittels Methoden der Elektronenspin-Resonanzspektroskopie zu den noch offenen Fragen über die Funktion des PSII Erkenntnisse beizutragen.

Die vorliegende Arbeit versucht dazu, nach einem Überblick über das biologische System und seine hier relevanten Komponenten (Kap. 2) und einer knappen Einführung in die Prinzipien und die experimentellen Methoden der EPR (Kap. 3) durch Anwendung von Hochfeld-Spektroskopie am sauerstofferzeugenden Komplex sein S_2 -EPR-Signal weitestmöglich zu charakterisieren (Teil II). Diese ergänzen Messungen am Einkristall zur Aufklärung der wenig sichtbaren Hyperfeinstruktur auf dem Signal, sowie eine Darstellung der mit dem System noch verbundenen Unklarheiten und experimentellen Schwierigkeiten bei der Betrachtung eines sehr komplexen Systems mit hochauflösender EPR- und ENDOR-Spektroskopie. In Teil III wird versucht, die experimentellen Möglichkeiten der Methode anhand des Tyrosin-Radikals Y_D^\bullet im PSII umfassend darzustellen. Dazu werden im Hochfeld sowohl EPR- wie auch ENDOR-Methoden an Proben gefrorener Lösung wie an Einkristallen angewandt und auf diesem Wege das EPR-Signal des Radikals, seine Orientierung im PSII sowie die Bindungssituation von sechs direkt an ihm gebundenen Protonen rekonstruiert. In einem weiteren Schritt wird gezeigt, wie durch H_2O/D_2O -Austausch am Y_D^\bullet die Kopplung einer Wasserstoff-Brückenbindung experimentell von anderen Hyperfein-Wechselwirkungen getrennt und anschließend detailliert untersucht werden kann, sodass mit Hilfe der Kristallstruktur des PSII der Brückenbindungspartner direkt bestimmt werden kann.

Teil I

Grundlagen

Kapitel 2

Photosystem II in der oxygenen Photosynthese

2.1 Einführung

Photosynthese scheint in der Geschichte des Lebens zu einem außerordentlich frühen Zeitpunkt aufgetreten zu sein [1]. Selbst wenn man die zuvor auf ein Alter von bis zu 3,5 Milliarden Jahre geschätzten, Cyanobakterien ähnelnden Mikrofossilien [2] heute in Datierung und Aussagekraft eher anzweifelt, so deuten doch geologische Belege auf die Akkumulation von Sauerstoff in der Atmosphäre zu einem Zeitpunkt von vor etwa 2,8 Milliarden Jahren, nicht wesentlich unterscheidbar vom Auftauchen photosynthetischer Eukaryoten, das durch Fossilien belegt etwa 2,7 Mrd. Jahre zurück verfolgt werden kann [3], wobei die eigentliche Entstehung oxygenen Photosynthese dabei eher weiter zurückliegen kann. Die evolutionäre Herkunft des in der vorliegenden Arbeit im Zentrum stehenden Photosystem II dabei im Detail zu verfolgen, dürfte eine nur schwer lösbare Aufgabe sein. Aufgrund des inneren heterodimeren Aufbaus (vergl. Abschnitt 2.3 und Abb. 2.7) erscheint ein homodimerer Vorläufer wahrscheinlich, an dem sich nach der Entwicklung zweier voneinander abweichender Untereinheiten an einem von beiden ein sauerstofferzeugender Komplex bilden konnte [4]. Aus welchen zuvor bestehenden Systemen sich dabei der heutige wasserspaltende Metallkomplex gebildet hat, ist ohne die exakte Entschlüsselung des Mechanismus der Wasserspaltung nur in Ansätzen untersuchbar [5].

Die Bedeutung, welche der Erforschung des PSII zukommt, zeigt sich in den letzten Jahren auch wieder vermehrt im Bemühen, die Effizienz der Energieumwandlung der oxygen photosynthetisierenden Organismen quantitativ zu verstehen, was nicht zuletzt motiviert wird durch den Bedarf nach einer möglichst effektiven Ausnutzung der Sonnenenergie als

nicht-fossile Energiequelle [6, 7].

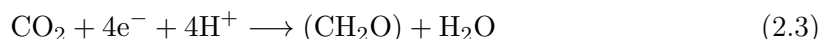
2.2 Oxygene Photosynthese

Der eigentliche geschichtliche Beginn der Photosyntheseforschung¹ lässt sich vielleicht auf das späte 18. Jahrhundert datieren: erste Experimente von van Helmont im 17. Jahrhundert hatten die Wichtigkeit von Wasser für das Pflanzenwachstum beleuchtet, aber nun, in den 1770er und 1780er Jahren, folgten in kurzer Zeit die Entdeckung des Sauerstoffs als Produkt der Pflanzenaktivität (Priestley und Lavoisier) und die Erforschung der Bedeutung von Licht und Kohlendioxid für diese (Ingenhousz und Senebier) [8]. Die grundlegende photosynthetische Reaktion, die Pflanzen vollführen, konnte damit zumindest qualitativ beschrieben werden, insbesondere nachdem Mayer 1845 die grundsätzliche Einsicht gewonnen hatte, dass Photosynthese im Wesentlichen einen Prozess der Umwandlung von Lichtenergie in für die Pflanze nutzbare chemische Energie darstellt [9]:



Die bei der Reaktion entstehende organische Materie sollte im Folgenden als Kohlenwasserstoffe identifiziert werden.

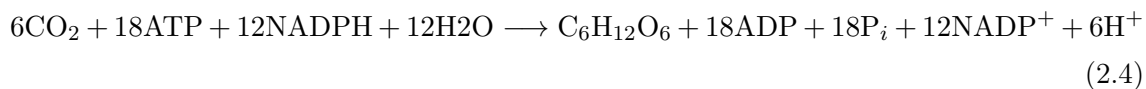
Nachdem man die Gesamtreaktion schließlich näherungsweise erschlossen hatte, stellte sich die Frage, ob es sich um eine einzelne, direkte Reaktion in der Pflanze handelte oder um eine Abfolge einzelner Reaktionsschritte. Erst durch Entdeckungen von van Niel an anoxygen photosynthetisierenden Bakterien und Hill durch Verwendung künstlicher Elektronenakzeptoren an beschädigten Chloroplasten setzte sich schließlich durch, dass die beschriebene Reaktion aus zwei lokal getrennten Einzelschritten besteht, einer Oxidation und einer Reduktion, die von van Niel unter Einführung des variablen Bestandteils A zusammengefasst wurden als [8]:



¹Die Skizzierung der geschichtlichen Abläufe folgt im Wesentlichen (und wo nicht anders vermerkt) Blankenship, 2002 [8]. Wissenschaftsgeschichtlich lässt die Geschichte der Photosyntheseforschung immer wieder schlaglichtartig Einblicke in das methodische wie paradigmatische Fortschreiten von Biologie, Chemie und Physik zu. Dies angemessen darzustellen überstiege allerdings den Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Im Falle oxygener Photosynthese bildet Wasser das in Gl. 2.2 auftretende Reduktans H_2A und entsprechend molekularer Sauerstoff O_2 das Oxidationsprodukt $2A$.

Wie wir heute wissen, entsprechen diese beiden Reaktion auch den von Emerson und Arnold 1932 postulierten Licht- und Dunkelreaktion von denen die erste (Gl. 2.2) in der Thylakoidmembran der pflanzlichen Chloroplasten stattfindet, die zweite (Gl. 2.3) im Stroma. Analoges gilt für die prokaryotischen Cyanobakterien, bei denen die Thylakoide sich allerdings als Lamellarmembrane durch das Zytoplasma ziehen. Vereinfacht mag man die Lichtreaktionen als Energielieferant für die Dunkelreaktionen ansehen, wobei die in den Lichtreaktionen gewonnene Energie zuerst zur Generierung von NADPH und ATP führt, welches dann in den Dunkelreaktionen zur Reduktion von Kohlendioxid und damit der Biosynthese von Kohlenhydraten umgesetzt wird [10]. Die Fixierung des Kohlendioxids wird dabei durch den Calvinzyklus beschrieben, deren effektive stöchiometrische Reaktionsgleichung angegeben werden kann als [11]



Da die vorliegende Arbeit sich mit Phänomen innerhalb der Thylakoiden beschäftigt, sei an dieser Stelle für eine genauere Darstellung des Calvin-Kreisprozesses und der im Stroma ablaufenden Reaktionen auf entsprechende weiterführende Literatur verwiesen [8, 11, 12].

2.2.1 Die Lichtreaktion

Insbesondere weiterführende Untersuchungen der Lichtreaktion durch Emerson, Hill und Bendall sowie Duysens [13–15] führten um 1960 zu einem weiteren Fortschritt im Verständnis der oxygenen Photosynthese, indem die in der Thylakoid ablaufenden Reaktionen als kombinierter Prozess zweier hintereinander geschalteter, durch Licht angetriebener Photosysteme gedeutet werden konnten [8]. In ausgearbeiteter Form ist dieses noch heute gültige Schema in den Abb. 2.1 und 2.2 wiedergegeben.

Abb. 2.1 zeigt das von Hill und Bendall entworfene Energiediagramm, das als Z-Schema bekannt geworden ist, in einer detaillierteren aktuellen Version. Die in diesem Energiediagramm durchlaufenen Enzyme finden sich in Abb. 2.2 in einer schematischen räumlichen Darstellung entlang der Thylakoidmembran, die den Transport von Elektronen und Protonen bis hin zur Generierung von ATP und NADPH illustrieren soll. In der Abfolge des Prozesses handelt es sich dabei um das Photosystem II, den Cytochrom- b_6f -Komplex, das Photosystem I und schließlich die ATP-Synthase.

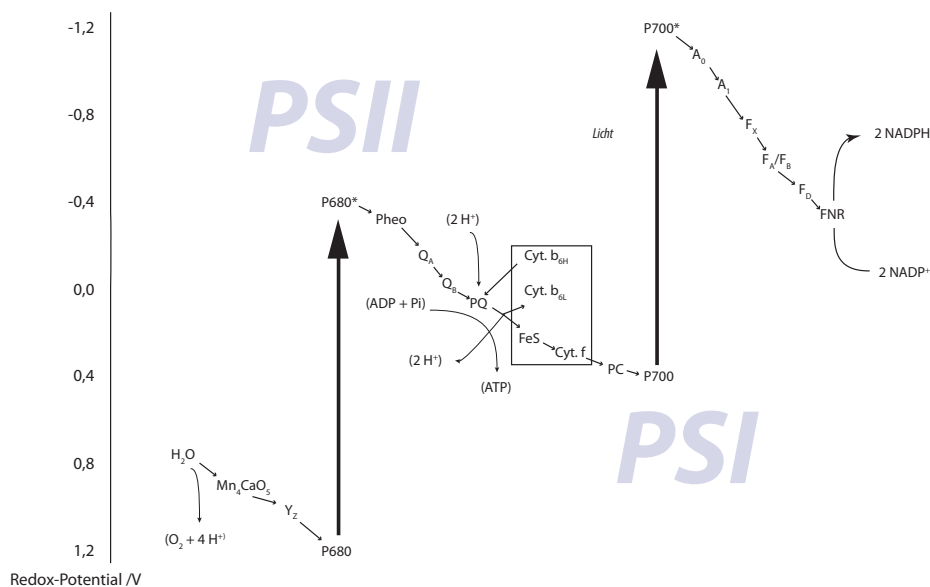


Abbildung 2.1: Z-Schema der Lichtreaktionen oxygener Photosynthese. Das Diagramm zeigt den Ladungstransport entlang der teilhabenden Kofaktoren. In dem von Hill und Bendall entworfenen Energiediagramm erscheinen sie hier ihrem Redoxpotential entsprechend angeordnet. Die dick gezeichneten Übergänge zwischen P680/P680* und P700/P700* markieren die durch Lichtabsorption in den Antennensystemen induzierten primären Reaktionen der Photosysteme I (PSI) und II. Zwischen beiden Systemen vermittelt der Cytochrom- b_6f -Komplex den Ladungstransport (vergl. Abb. 2.2). Das Diagramm verwendet eine Darstellung, die an Govindjee und Weit angelehnt ist [16].

2.3 Aufbau und Funktion des Photosystems II

Wichtigster Quell für die Aufklärung des molekularen Aufbaus des PSII ist die röntgenkristallographische Untersuchung, die mit der Anfang des letzten Jahrzehnts erstmal gelungenen Kristallisation von PSIIcc-Präparationen durch Zouni *et al.* [18] ihren Anfang nahm. Mit steigender Auflösung der veröffentlichten Kristallstrukturen an Einkristallen aus *Th. elongatus* [18–22] bzw. *Th. vulcanus* [23,24] konnten neben der Rekonstruktion der Proteinuntereinheiten Vorkommen und Position der Kofaktoren und schließlich die Zusammensetzung des wasseroxidierenden Komplexes bestimmt werden.² Abb. 2.3 zeigt einen so

²Die von Umena *et al.* [24] vorgelegte Kristallstruktur hat mit 1,9 Å endlich eine genügend hohe Auflösung, den WOK in seinen Details aufzeigen zu können. Ihre Veröffentlichung erfolgte unmittelbar vor Drucklegung der vorliegenden Arbeit, sodass die damit bekannt werdenden Ergebnisse noch im Materia-

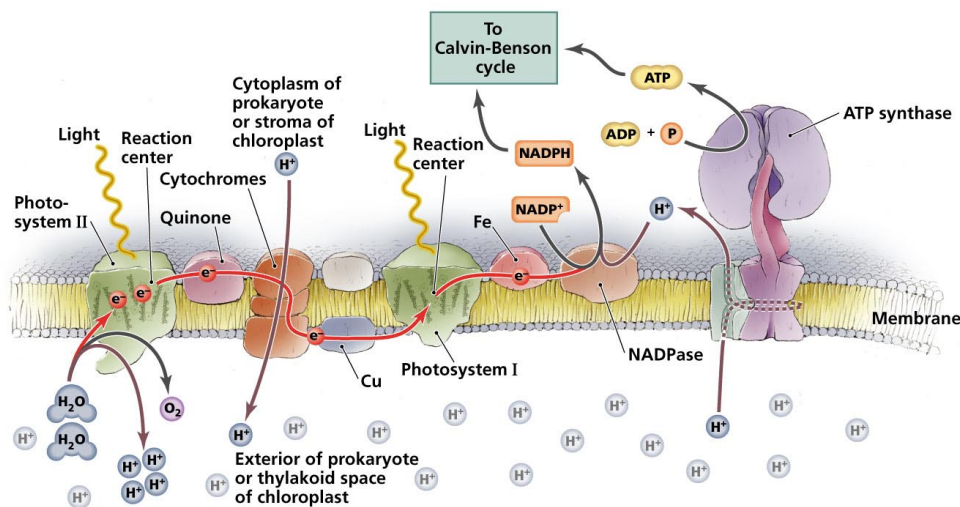


Abbildung 2.2: Übersicht über die in der Thylakoidmembran an den Lichtreaktionen teilhabenden Enzyme von der Wasseroxidation im Photosystem II, dem Ladungstransport zum PSI und schließlich zur ATP-Synthase [17]. Wiedergabe hier mit freundlicher Genehmigung von *Pearson Education, Inc.*, Upper Saddle River, NJ.

gewonnenen Überblick über das PSII basierend auf der Kristallstruktur [3ARC] der RCSB PROTEIN DATA BANK³ [24]. Hier sind von den insgesamt zwanzig Proteinuntereinheiten in der Präparierung 19 erhalten, nämlich alle abzüglich des eventuell nur schwach gebundenen PsbY. Gezeigt ist das in der Struktur beschriebene Homodimer, dessen beide Monomere in der Darstellung gut erkennbar rechts und links einer zentralen Trennungsebene liegen.⁴ Ein Blick in das Monomer findet sich Abb. 2.4, in welcher der Wasseroxidierende Komplex und die Moleküle entlang der Elektronentransportkette des PSII hervorgehoben wurden, also des Weges, auf dem die bei der Photooxidation des P680 bzw. bei der Oxidation des Wassers am Mangankomplex entstehende negative Ladung aus dem PSII geleitet wird (vergl. Abb. 2.2 für den von dort aus weiteren Ladungstransport). Das Monomer selbst kann man sich dabei zu einem guten Teil als Heterodimer zweier Untereinheiten, D1 und D2, vorstellen, von denen eine, D1, nun den Wasseroxidierenden Komplex bindet (vergl. Abb. 2.7). Die entsprechenden Äquivalente zur Elektronentransportkette in der D2-Untereinheit fin-

lienteil, allerdings nicht mehr innerhalb der aufwendigeren Auswertungen im Ergebnisteil berücksichtigt werden konnten.

³Web-Adresse: <http://www.pdb.org>

⁴Inzwischen existiert auch eine röntgenkristallographische Auswertung einer Monomer-Kristallisation von *Th. elongatus*, wenn auch mit einer geringeren Auflösung von 3,6 Å [25]. Inwieweit PSII in der Natur auch als Monomer vorkommt, wird aufgrund solcher Funde voll funktionaler PSIIcc-Monomere weiter diskutiert [26,27].

den sich entsprechend ebenfalls in Abb. 2.4.

2.3.1 Primäre Reaktion und Elektronentransport

Die am Beginn der Reaktion stehende Photochemie führt über Lichtabsorption in den Antennensystemen des PSII und über Ladungstransfer zum P680, dem aus zwei Chlorophyllen bestehenden primären Elektronendonator, zu einer Oxidation des P680 zu $P680^+$. Die dabei stattfindende Ladungstrennung setzt ein Elektron frei, das über ein weiteres Chlorophyll auf ein nunmehr anionisches Pheophytin-Radikal, $Pheo^-$, übergeht [28,29]. Über das Pheophytin wird zuerst ein fest im PSII verankertes Plastoquinon, Q_A , und von dort aus das nur schwach gebundene Plastoquinon Q_B reduziert. Das Q_B verlässt nach zwei Reduzierungen und anschließender Protonierung als Hydrochinon Q_BH_2 das PSII und diffundiert in die Membran, bis es schließlich vom Cytochrom- b_6f -Komplex reoxidiert wird, während die Bindungsstelle des Q_B von einem weiteren Plastoquinon neu besetzt wird [22, 28, 29]. Auf der Donorseite wird über das außerordentlich hohe Redox-Potential des $P680^+$ -Kations zunächst ein Tyrosin aus der Seitenkette der D1-Untereinheit, D1-Tyr161 bzw. Y_Z , oxidiert. Dieses ist über ein komplexes Netzwerk von Wasserstoff-Verbrückungen sowohl mit dem Wasseroxidierenden Komplex als auch mit der lumenalen Seite des Systems verbunden [24]. Das Y_Z wird wieder rereduziert durch die Oxidation des WOK.

2.3.2 Wasseroxidierender Komplex

Wasserspaltung und Sauerstofferzeugung finden an einem lumenar gebundenen Metallkomplex statt, den man entsprechend seiner Funktion dann auch als Wasseroxidierenden oder Sauerstofferzeugenden Komplex bezeichnet (WOK oder OEC, letzteres von engl. *oxygen-evolving complex*). Die effektive Reaktion kann zusammengefasst werden als:



Diese benötigt zur Extraktion von vier Elektronen aus den zwei Wassermolekülen das Energieäquivalent von vier primären Photooxidationen, sodass eine der Hauptaufgaben des WOK die Akkumulation chemischer Energie darstellt; nach vier Oxidationen des Metallkomplexes, geht er unter Freisetzung des Sauerstoffs wieder in seinen Grundzustand über und bindet neue Wassermoleküle.

War die Zusammensetzung des Metallkomplexes im Detail noch lange unklar, zeigt die aktuelle Kristallstruktur einen aufgelösten Komplex aus vier Manganionen und einem Kalziumion, die durch fünf Sauerstoffe oxo-verbrückt werden [24]. Das entsprechend als Mn_4CaO_5 -Komplex bezeichnete Zentrum bildet einen verformten Kubus, dessen Ecken

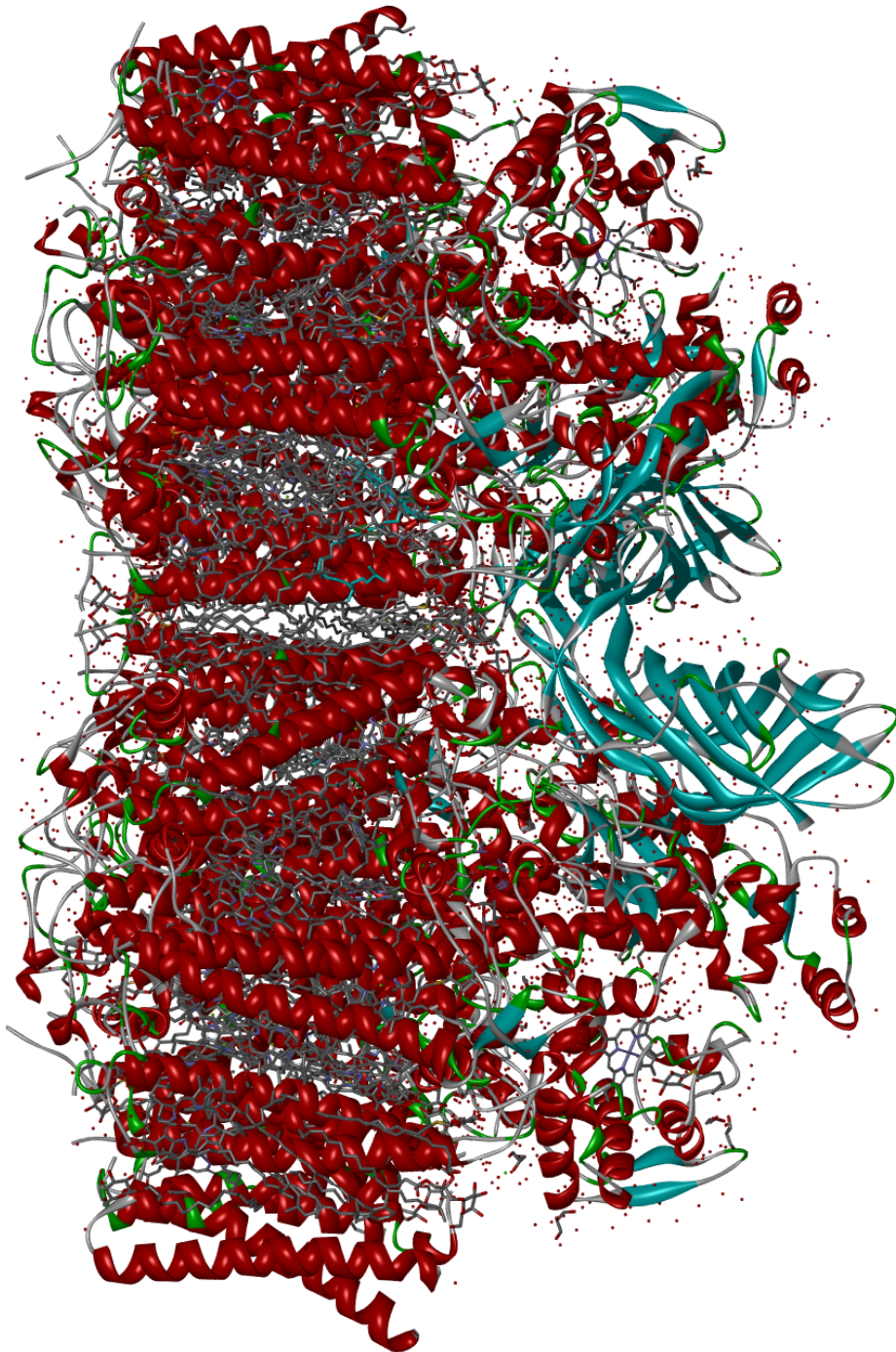


Abbildung 2.3: Aufbau des Photosystem-II-Homodimers in der Röntgenstruktur von Umena *et al.*, 2011 [24] mit einer Auflösung von 1,9 Å. Neben den Proteinketten sind alle Kofaktoren sowie die in der Struktur enthaltenen Wassermoleküle abgebildet.

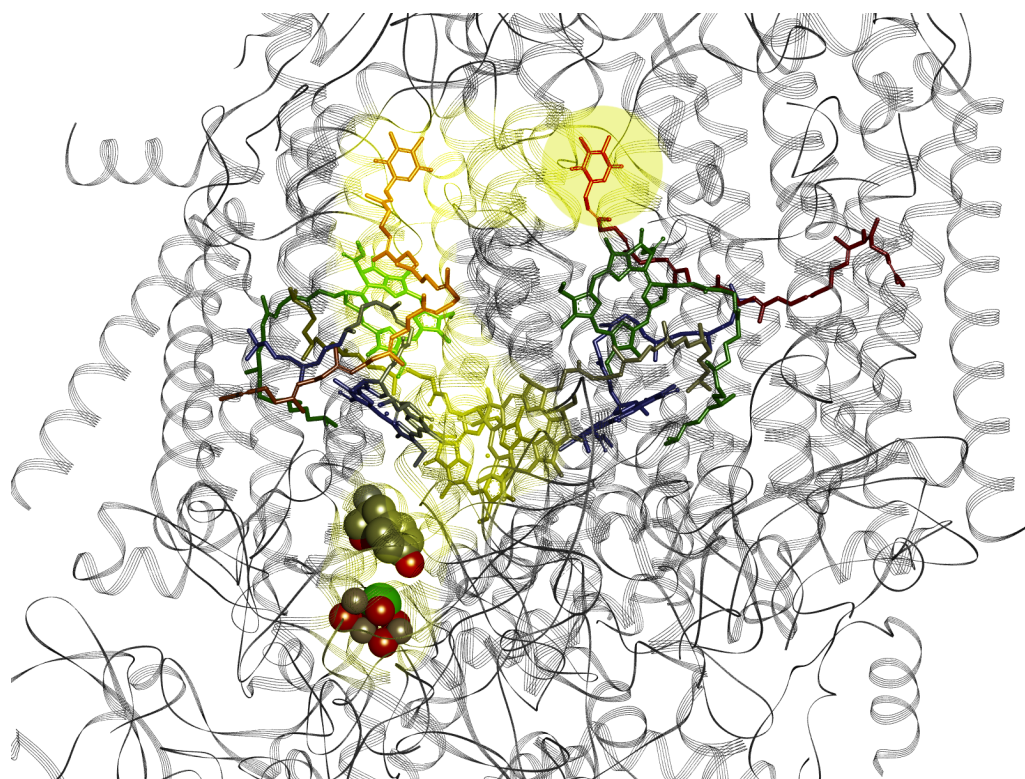


Abbildung 2.4: Die am Elektronentransport maßgeblich beteiligten Moleküle in der Röntgenstruktur von Umena *et al.* [24]. Durch Verbindungschlorophylle (blau) wird das P680 (gelb) photooxidiert. Das freiwerdende Elektron reduziert erst ein naheliegendes Pheophytin (grün), dann das Plastiquinon Q_A , schließlich Q_B (beide rot). Dieses verlässt das Photosystem nach zweifacher Reduzierung zum Hydrochinon PQ_BH_2 . Das P680 oxidiert über das verbindende Y_Z den Mangankomplex, das seinerseits Wassermoleküle oxidiert. Der vollständige Elektronentransportweg zum Q_B ist hier hell unterlegt; dargestellt sind zudem die nicht direkt am Ladungstransport beteiligten Äquivalenzpartner im D1-D2-Heterodimer.

aus dem Kalziumatom, drei Mangan- und vier Sauerstoffatomen bestehen; das verbleibende Manganatom und der Sauerstoff hängen zusammen an einer Kante dieses Kubus (vergl. Abb. 2.5). Erstmals konnten auch Wassermoleküle in der direkten Nähe des Mangankomplexes röntgenkristallographisch nachgewiesen werden; zwei binden dabei an das Kalziumion, zwei weitere an eines der Manganionen. Es steht zu vermuten, dass die in der Reaktion des WOK oxidierten Wassermoleküle unter diesen vier zu finden sein werden.

Kok-Zyklus

Das auch zumeist heute noch verwendete Modell eines vierphotonigen Kreislaufs der Wasserspaltung und Sauerstofferzeugung geht auf einen Vorschlag Joliot's und Koks zu-

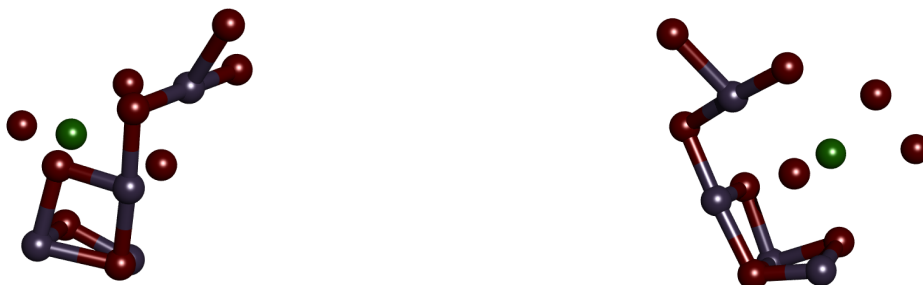


Abbildung 2.5: Aufbau des wasseroxidierenden Mangankomplexes in der Röntgenstruktur von Umena *et al.* [24] bei 1,9 Å. Drei Manganionen bilden mit dem Kalziumion eine würfelförmige Struktur, an die ein weiteres Manganion gebunden ist. An diesem Mangan sind wie am Kalzium je zwei Wassermoleküle gebunden.

rück [30–32]. Hierbei stammt die erste Messung der Periodizität und die Interpretation der Zwischenschritte als Ladungsakkumulation von Pierre Joliot *et al.*, die korrekte Deutung von Bessel Kok *et al.*. Demnach befinden sich dunkeladaptierte Systeme im Zustand S_1 und durchlaufen mit jedem Lichtblitz einen weiteren metastabilen Zwischenzustand. Nach zwei vollzogenen Schritten überführt weitere Anregung das Wasseroxidierende Zentrum vom Zustand S_3 in einen vorgeschlagenen S_4 -Zustand, von dem aus die Emission molekularen Sauerstoffs und die anschließende Bindung zweier neuer Wassermoleküle spontan vonstatten geht und der Zyklus von neuem beginnen kann. Dieses Schema ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

Man kann somit die wissenschaftliche Untersuchung der Sauerstofferzeugung damit gleichsetzen, diesen von Kok und Joliot beschriebenen Kreislauf mit Details zu füllen. Zu klären wird sein, wie der Komplex, der diese Reaktion katalysiert, biochemisch beschaffen ist, durch welchen Mechanismus die Lichtanregungen den Komplex vorantreiben und wie die aus den Wassermolekülen gewonnenen Protonen und Elektronen aus dem Komplex abgeleitet werden. Die Klärung einiger dieser Fragen haben derweil zu Verfeinerungen des Kok-Zyklus geführt, wie sie in Abschnitt 4.1 weiter beleuchtet werden.

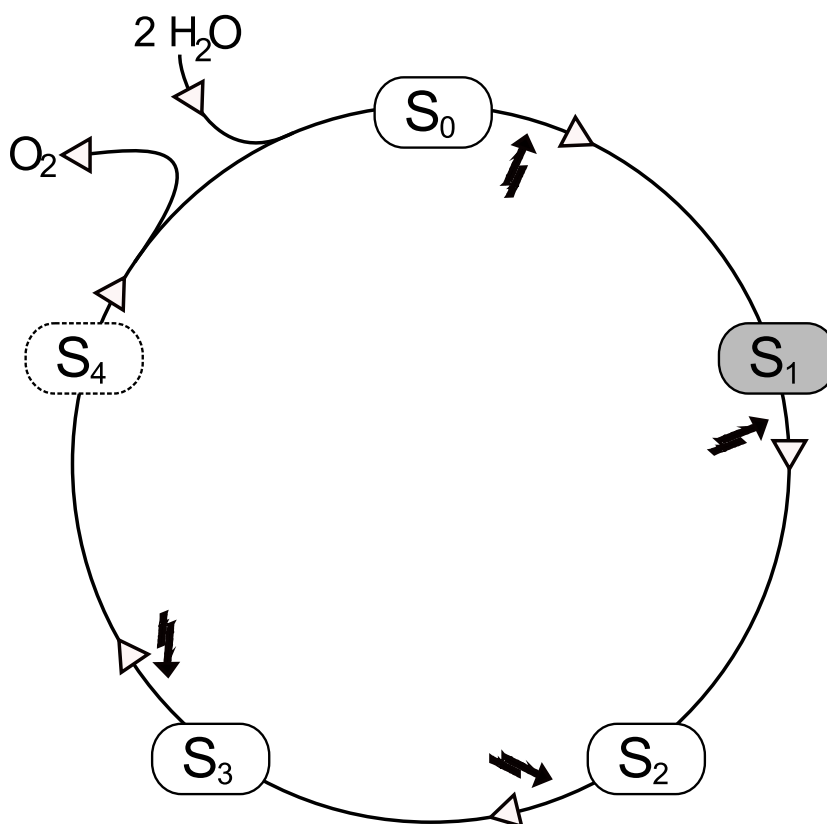


Abbildung 2.6: Schema des Photozyklus des PSII nach Kok und Joliot [30–32]. Das Schema zeigt die vier metastabilen Zustände S_0 bis S_3 und den Übergangszustand S_4 , der unter Sauerstoffemission wieder in S_0 übergeht. Fällt kein Licht passender Wellenlänge auf das System, adaptiert sich PSII im schraffiert gezeigten Dunkelzustand S_1 .

2.3.3 D1-Tyr161 und D2-Tyr160

Die EPR am Photosystem II nahm ihren Anfang mit der Untersuchung von Tyrosin-Radikalsignalen.⁵ Erste Messungen hatten zwei dominante EPR-Signale in Tabak-Chloroplasten-Suspensionen gefunden [40]: ein instabiles lichtinduziertes, dessen Ursprung im Photosystem I liegt, und ein im Dunkeln stabiles, das später zum PSII zurückverfolgt werden konnte. Letzteres erhielt den naheliegenden Namen *Signal II*, bevor man zeigen konnte, dass offenbar zwei voneinander unabhängige Radikale einander sehr ähnliche Signale erzeugten: ein nach Blitzbeleuchtung nur sehr langsam zerfallendes mit einer mehrstündigen Lebensdauer [41], *Signal II_s* für *slow*, und ein je nach Präparation schnell bzw. praktisch instantan verschwindendes, *Signal II_f* bzw. *II_{vf}* für *fast*, respektive *very*

⁵Die Darstellung der EPR-Historie folgt zum Teil Styring *et al.*, 2011 [33]. Für über die hier vorliegende Ausarbeitung hinausreichende Einführungen in die relevante Physik der Tyrosin-Radikale im Photosystem II sei auf diesbezügliche Übersichtsartikel verwiesen [34–39].

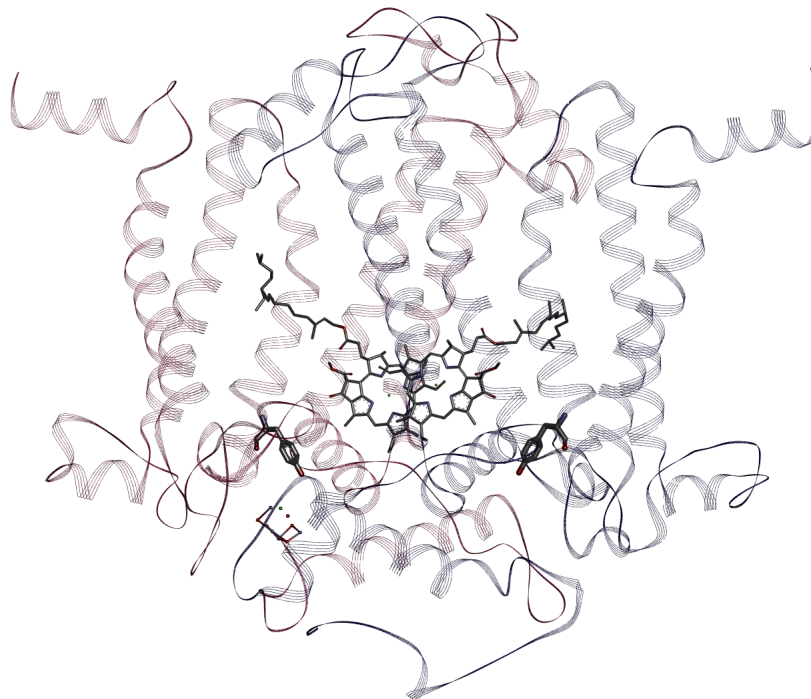


Abbildung 2.7: Die Untereinheiten D1 (rot) und D2 (blau) des PSII bilden ein Heterodimer, der auf eine gemeinsame evolutionäre Herkunft hinweist. Der bedeutendste Unterschied zwischen beiden Untereinheiten ist heute die funktionale Verknüpfung des Sauerstofferzeugenden Komplexes mit einem zur Untereinheit D1 gehörenden Tyrosin, Y_Z . Dieses vermittelt den Elektronentransport zwischen OEC und P680 im Zentrum des PSII. Sein Dimergegenstück erscheint nach der Photoaktivierung des PSII überwiegend als stabiles Neutralradikal, Y_D^\bullet , eines der prominentesten und verlässlichst nachweisbaren Signale des PSII in der EPR.

fast. Schließlich konnten als Urheber beider Signale Tyrosin-Radikale ausgemacht werden [42, 43].

Die beiden Tyrosine bezeichnet man heute als Y_Z und Y_D . Y_Z , identifiziert als Tyr161 im D1-Polypeptid⁶ vermittelt den Elektronentransport zwischen dem PSII-Reaktionszentrum und dem Wasseroxidierenden Komplex. Das dabei kurzzeitig entstehende Radikal führt zum *vf*-Signal [44]; entfernt man den Wasseroxidierenden Komplex oder blockiert den Elektronentransport an dieser Stelle, entsteht der etwas längerlebige *f*-Zustand [45]. D2-Tyr160 oder Y_D , dessen Index *D* noch auf *dark* verweist, also auf das im Dunklen stabile

⁶In der vorliegenden Arbeit wird durchgängig die für Cyanobakterien zutreffende Nummerierung verwendet

s-Signal, ist dagegen nicht Teil der primären Elektronentransportkette. Beide Tyrosine nehmen allerdings korrespondierende Positionen im D1-D2-Heterodimer [46] ein und sind als Motiv so in allen bekannten oxygen photosynthetischen Organismen erhalten [33] (vergl. Abb. 2.7), was im Licht der Evolution betrachtet eine wichtige funktionale Rolle dieses Arrangements im Gesamtablauf der Prozesse im PSII nahelegt.

Die zentrale Rolle des Y_Z ist dabei einerseits als primärer Elektronendonator des $P680^+$ und Elektronenakzeptor des OEC offensichtlich, andererseits ist das Radikal und die Reaktion aufgrund der kurzen Lebensdauer wesentlich schwerer experimentell in seinen Details zu erfassen. Entsprechend seiner Position nahe dem Wasseroxidierenden Komplex befindet sich das Y_Z in einer für Lösungsmittel zugänglicheren Umgebung [47] und ist von einer Anzahl Wassermoleküle umgeben sowie in ein Netzwerk von Wasserstoff-Brückenbindungen eingebunden [24]. Einen funktionalen Anteil am Ladungstransport bzw. der Redox-Reaktion um das Y_Z scheint das benachbarte D1-His190 innezuhaben [48, 49], das wasserstoffverbündet [50] das Y_Z deprotoniert, um es nach Oxidation des OEC wieder zu reprotonieren [51, 52]. Die exakte Chemie am Y_Z während des Kok-Zyklus des OEC und insbesondere, ob Y_Z während der Wasseroxidation eine direkte Rolle innehat, ist dabei immer noch Gegenstand der Untersuchung.

Die Funktion des Y_D ist weniger klar ersichtlich, zumal auch Pflanzen, die künstlich ihres Y_D entzogen wurden, noch zur oxygenen Photosynthese in der Lage sind [53, 54]. Wenn gleich das Y_D nicht am eigentlichen Ladungstransport im PSII teilnimmt, steht es doch in chemischer Verbindung zum wasseroxidierenden Komplex. Der im Dunkeln stattfindende, langsame Zerfall des Y_D^\bullet -Signals beruht zum Teil auf einer Rekombination mit OEC-Zentren im S_0 -Zustand [55, 56], eine Reaktion, die auch experimentell hergestellte S^{-n} -Zustände vollziehen [57]; andererseits kann auch das Y_D vom OEC oxidiert werden, wenn das OEC im S_2 - oder S_3 -Zustand vorliegt [58]. Auch die Reduktion des $P680^+$ kann stattfinden [59], die dazu gehörige Photochemie ist im Vergleich aber wesentlich langsamer als im Falle des Y_Z [45]. Eine mögliche Rolle insbesondere während der Photoaktivierung des Systems und zum Schutz vor Strahlungsschäden scheint wahrscheinlich [60–62]. Man sollte dabei nicht vergessen, dass die während der Dunkeladaption zu durchlaufende Chemie für die Pflanze in der Natur im wahrsten Sinne Alltag ist [33], wenn sie im Laborsystem auf den Experimentator auch erst mal wie ein Sonderfall wirken mag.

Verträglich damit sind frühe Funde, dass Pflanzen ohne Y_D in der Tat langsamer wachsen [53, 54, 63]. Die Anwesenheit von Y_D^\bullet scheint zudem die Reaktionskinetik um das Y_Z und das Redoxpotential des $P680^+/P680$ zu erhöhen [4, 62], sodass die Rolle des Y_D vielleicht keine unabdingbare für die Funktion des PSII darstellt, aber doch eine so essentiell

die Funktion unterstützende, dass die Natur bisher keinen Weg gefunden hat, das Y_D mit einen effektiveren Entwurf zu ersetzen.

Kapitel 3

Methodisches

3.1 Elektronenspinresonanz

Als physikalische Methode wurde die Elektronenspin-Resonanz begründet durch Yevgeny Zavoiskys Experimente in den Jahren 1943-45 an Mangan- und Kupfersalzen [64, 65]. Seitdem wurde das Feld der EPR beständig um neue experimentelle Methoden und Anwendungen erweitert. In diesem Kapitel soll versucht werden, einen einführenden Überblick über die Methoden der Elektronen-Spinresonanz und die ihr zugrunde liegende quantenphysikalische Theorie sowie eine Darstellung der experimentellen Eigenheiten von Probenpräparation und Messaufbau zu vermitteln. Naturgemäß muss die theoretische Betrachtung an der Oberfläche bleiben. Für eine detaillierte Darstellung muss hier auf ausführlichere Ausarbeitungen verwiesen werden [66–69]. Desgleichen liegen weiter gefasste Darstellungen experimenteller Techniken vor [45, 70], während hier der Fokus auf den in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden lag. Die folgende Darstellung orientiert sich in ihrer Strukturierung hauptsächlich an Charles Pooles und Horacio Farachs *THE THEORY OF MAGNETIC RESONANCE* [68].

3.1.1 Grundlagen

Spektroskopie ist die experimentelle Betrachtung elektromagnetischer Strahlung unter besonderer Beachtung ihrer Wechselwirkung mit Materie. Die Erforschung von Absorptions-, Streuungs- und Emissionseffekten erlaubt einen Rückschluss auf Anordnung und Eigenschaften der mit der Strahlung wechselwirkenden Atome und Moleküle. Innerhalb der Biowissenschaften bietet sie so eines der direktesten Fenster in die anderen Methodiken weitgehend entzogene Ebene des Submikroskopischen. Die Elektronenspin-Resonanzspektroskopie studiert dabei das Verhalten von Atomen oder chemischen Ver-

bindungen mit ungepaarten Elektronen in einem äußeren Magnetfeld. Durch entsprechend gewählte elektromagnetische Strahlung werden Übergänge zwischen den durch das Magnetfeld aufgespaltenen Elektronenspin-Energieniveaus induziert. Die dazu verwendete Frequenz der Strahlung umfasst heutzutage üblicherweise den Bereich zwischen etwa 2 GHz (aus dem mit S bezeichneten Frequenzband elektromagnetischer Strahlung oder kurz: S-Band) und 100 GHz (W-Band) mit 10 GHz (X-Band) als vermutlich verbreitetste Frequenz; einzelne Spektrometer arbeiten bis zu Strahlungsfrequenzen von 1000 GHz, womit die verwendeten Frequenzen in der EPR praktisch den gesamten Mikrowellenbereich des elektromagnetischen Spektrums abdecken.

Um die auftretenden Übergänge auf die Physik des Systems zurückführen zu können, bedarf es einer Bestimmung seiner Energieniveaus. Diese sind für paramagnetische Verbindungen mit ungepaarten Elektronen und spintragenden Atomkernen gegeben durch den Hamilton-Operator [68]:

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_{\text{el}} + \mathcal{H}_{\text{Kf}} + \mathcal{H}_{\text{LS}} + \mathcal{H}_{\text{SS}} + \mathcal{H}_{\text{Ze}} + \mathcal{H}_{\text{Hf}} + \mathcal{H}_{\text{Zn}} + \mathcal{H}_{\text{II}} + \mathcal{H}_{\text{Q}} \quad (3.1)$$

Von diesen Operatoren können die ersten drei — \mathcal{H}_{el} als elektronischer, \mathcal{H}_{Kf} als Kristallfeld- und \mathcal{H}_{LS} als Spinbahn-Kopplungs-Operator — zusammengefasst werden zum atomaren Anteil des Hamilton-Operators. Die Summe der verbleibenden — \mathcal{H}_{SS} als Operator für die Elektronen-Spin-Spin-, \mathcal{H}_{Ze} für die Elektronen-Zeeman-, \mathcal{H}_{Hf} für die Hyperfein-, \mathcal{H}_{Zn} für die Kern-Zeeman-, \mathcal{H}_{II} für die Kern-Spin-Spin- und \mathcal{H}_{Q} für die Quadrupolwechselwirkung — bildet den Spin-Anteil bzw. den sogenannten Spin-Hamilton-Operator. Die von diesen für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit relevanten Operatoren sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

3.1.2 Anteile des Spin-Hamilton-Operators

Die EPR befasst sich mit Übergängen zwischen verschiedenen Energieniveaus, die im Wesentlichen von den Zeeman-Wechselwirkungen von Elektronen- und Kernspins mit dem magnetischen Feld bestimmt wird. Diese Energieniveaus werden weiter modifiziert durch die Wechselwirkung zwischen Elektronen- und Kernspin, der Hyperfeinkopplung (hfc)¹, der Wechselwirkung von Elektronenspins untereinander und, für Kerne mit einem Kernspin von 1 oder mehr, der Wechselwirkung zwischen magnetischem Kernquadrupol und Magnetfeld:

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_{\text{Ze}} + \mathcal{H}_{\text{Zn}} + \mathcal{H}_{\text{Hf}} + \mathcal{H}_{\text{SS}} + \mathcal{H}_{\text{Q}} \quad (3.2)$$

¹von engl. *hyperfine coupling*, was sich als Abkürzung auch im Deutschen weitgehend durchgesetzt hat

Spins und Elektronen-Zeeman-Wechselwirkung

Die magnetischen Momente von Elektronenspin \mathbf{S} und Kernspin \mathbf{I} ergeben sich als μ_e bzw. μ_N (mit $\gamma = g\mu/\hbar$):

$$\boldsymbol{\mu}_e = -g_e\mu_B\mathbf{S} \quad (3.3)$$

$$\boldsymbol{\mu}_N = g_N\mu_N\mathbf{I} = \gamma_N\mathbf{I}\hbar \quad (3.4)$$

Die analogen Gleichungen enthalten das jeweilige Magneton (Kernmagneton μ_N bzw. das für Elektronen aus historischen Gründen so benannte Bohrsche Magneton μ_B):

$$\mu = e\hbar/2m \quad (3.5)$$

Hier geben e die Ladung und m die Masse von jeweils Elektron oder Kern an. γ_N in Gl. 3.4 bezeichnet man auch als gyromagnetisches Verhältnis. Für Elektronen geht hier der g -Wert des freien Elektrons als Proportionalitätsfaktor ein. Dieser gilt als eine der am präzisesten vermessenen Konstanten der Physik, ihr Wert beträgt $g = -2,002\,319\,304\,3622(15)$ [71]. Ein magnetisches Moment tritt in Wechselwirkung mit einem äußeren Magnetfeld, und analog der klassischen Beschreibung

$$E_Z = -\boldsymbol{\mu}_e \cdot \mathbf{B} \quad (3.6)$$

ergibt sich für den entsprechenden Hamilton-Operator für einen Elektronenspin \mathbf{S} in einem Magnetfeld \mathbf{B}_0 :

$$\mathcal{H}_{Ze} = \mu_B\mathbf{B}_0\mathbf{g}_e\mathbf{S} \quad (3.7)$$

\mathbf{g} , im Allgemeinen oft als \mathbf{g} -Tensor bezeichnet, beschreibt als Wechselwirkungsmatrix die Anisotropie der Zeeman-Wechselwirkung und damit die Orientierungsabhängigkeit der EPR-Resonanzbedingung bezüglich der Magnetfeldrichtung. Dieser Effekt beruht auf einer Kopplung des Bahnmoments mit dem Elektronenspin. Definiert man eine der Hauptachsen des Laborsystems, gewöhnlich die z -Achse, entlang der Magnetfeldrichtung, sodass $\mathbf{B}_0 = B_0\mathbf{z}$, lassen sich (unter der Annahme von Quantisierung des Elektronenspins entlang der Magnetfeldrichtung) aus dem so vereinfacht entstehenden Hamilton-Operator

$$\mathcal{H}_{Ze} = g_e\mu_B B_0 S_z \quad (3.8)$$

die resultierenden Energien der Energieniveaus bestimmen:

$$E_{Ze} = m_s g_e \mu_B B_0 \quad (3.9)$$

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten $S=1/2$ -Systeme sind für die Magnetquantenzahl m_s nur zwei quantenmechanische Einstellungen erlaubt, $m_s=+1/2$ und $m_s=-1/2$, wobei erlaubte EPR-Übergänge den Bedingungen $\Delta m_s=\pm 1$ und $\Delta m_I=0$ gehorchen (vergl. Abb. 3.1). Die Energie des Übergangs zwischen beiden Einstellungen ergibt sich somit zu:

$$E_{Ze} = g_e \mu_B B_0 \quad (3.10)$$

Dieser Übergang wird in der EPR durch elektromagnetische Strahlung induziert ($S=1$), mithin durch eingestrahlte Energie, deren Größe gegeben ist durch $E = h\nu$. Damit ist der g -Wert experimentell zu bestimmen über die eben bekannten Größen ν , die Frequenz der Mikrowellenstrahlung, und B_0 , die Stärke des Magnetfelds:

$$g_e = \frac{h\nu}{\mu_B B_0} \quad (3.11)$$

Für das freie Elektron beschreibt dies eine isotrope, orientierungsunabhängige Beziehung. Im Falle gebundener, mit ihrer Umgebung wechselwirkenden Elektronen, wird die Resonanzbedingung selbst orientierungsabhängig. Je nach Ausrichtung des Moleküls zur Richtung des einwirkenden Magnetfelds ergibt sich also ein anderer effektiver g_e -Faktor für dieses eine Molekül bzw. dessen Orientierung (s. Abschnitt 3.3.6).

Kern-Zeeman-Wechselwirkung

Die Behandlung der Kern-Zeeman-Wechselwirkung kann ausgehend von Gl. 3.4 parallel zur Elektron-Zeeman-Wechselwirkung durchgeführt werden. Im Falle der Kern-Zeeman-Wechselwirkung ist die Anisotropie im Allgemeinen aber so gering, dass diese in der EPR nicht weiter betrachtet und als linienverbreiternder Effekt verbucht wird. Der g -Faktor kann damit skalar beschrieben werden und Gl. 3.7 ergibt sich zu:

$$\mathcal{H}_{Ze} = \mu_N g_N \mathbf{B}_0 \mathbf{I} \quad (3.12)$$

Dabei ist g_N der Kern- g -Wert, \mathbf{I} der Kernspin-Operator.

Als isotrope Wechselwirkung führt die Kern-Zeeman-Kopplung zu einer orientierungsunabhängigen Aufspaltung der Energieniveaus. Wie aus der schematischen Darstellung in Abb. 3.1 leicht ersichtlich, führt eine solche nicht zu einer Veränderung der Energie der EPR-Übergänge, da beide $\Delta m_s=\pm 1$ -Übergänge der gleichen Übergangsenergie und damit der gleichen Resonanzbedingung entsprechen.

Hyperfein-Wechselwirkung

Die Wechselwirkung eines Elektronenspins \mathbf{S} mit einem Kernspin \mathbf{I} wird beschrieben durch die Hyperfeinkopplungsmatrix \mathbf{A} :

$$\mathcal{H}_{\text{Hf}} = \mathbf{SAI} \quad (3.13)$$

Die in der Hyperfeinkopplung enthaltene Anisotropie lässt sich von dem isotropen Anteil der Kopplung getrennt betrachten:

$$\mathcal{H}_{\text{Hf}} = \mathbf{SA}_{\text{dip}}\mathbf{I} + a_{\text{iso}}\mathbf{SI} \quad (3.14)$$

Der anisotrope Anteil der Wechselwirkung ergibt sich aus der dipolaren Kopplung von Elektron- und Kernspin (mit \mathbf{r} : Vektor zwischen Elektronen- und Kernort):

$$\mathcal{H}_{\text{Hf}}^{\text{dip}} = \mathbf{SA}_{\text{dip}}\mathbf{I} = -\frac{1}{4\pi}\mu_0\mu_B\mu_N g_e g_N \left(\frac{3(\mathbf{I} \cdot \mathbf{r})(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})}{r^5} - \frac{\mathbf{I} \cdot \mathbf{S}}{r^3} \right) \quad (3.15)$$

Dieser beschreibt die Wechselwirkung zwischen Kernspin und Elektronenspins von Elektronen-Orbitalen mit nicht-verschwindendem Bahndrehimpuls. Dagegen wird der isotrope Anteil verursacht von der endlichen Aufenthaltswahrscheinlichkeit $|\psi|^2$ von s-Orbital-Elektronen im Ort des Atomkerns $r=0$. Er entspricht der Fermi-Kontaktwechselwirkung:

$$\mathcal{H}_{\text{Hf}}^{\text{iso}} = a_{\text{iso}}\mathbf{SI} = -\frac{2}{3}\mu_0\mu_B\mu_N g_e g_N |\psi(r=0)|^2 \quad (3.16)$$

Die so auftretenden Aufspaltungen der Energieniveaus und die in EPR- und ENDOR-Experimenten erlaubten Übergänge sind in Abb. 3.1 schematisch dargestellt.

Elektronen-Spin-Spin-Wechselwirkung

Die Entsprechung zur Hyperfeinwechselwirkung zwischen Kern- und Elektronenspin ist für die Wechselwirkung zwischen zwei Elektronenspins die sogenannte Elektronen-Spin-Spin-Kopplung. Auch sie kann für eine getrennte Betrachtung in einen isotropen und einen anisotropen Anteil zerlegt werden:

$$\mathcal{H}_{\text{SS}} = \mathcal{H}_{\text{SS}}^{\text{dip}} + \mathcal{H}_{\text{SS}}^{\text{iso}} \quad (3.17)$$

Bezeichnet man die beiden Elektronenspin-Operatoren mit \mathbf{S}_1 und \mathbf{S}_2 , ergibt sich unter Einführung der dipolaren Kopplungsmatrix \mathbf{D} der dipolare Anteil analog zur Gl. 3.15 zu:

$$\mathcal{H}_{\text{SS}}^{\text{dip}} = \mathbf{S}_1 \mathbf{D} \mathbf{S}_2 = -\frac{\mu_0\mu_B^2 g_e^2}{4\pi} \left(\frac{3(\mathbf{S}_1 \cdot \mathbf{r}_1)(\mathbf{S}_2 \cdot \mathbf{r}_2)}{r^5} - \frac{\mathbf{S}_1 \cdot \mathbf{S}_2}{r^3} \right) \quad (3.18)$$

Gleichsam ergibt sich für den isotropen Anteil, vergl. Gl. 3.16:

$$\mathcal{H}_{\text{SS}}^{\text{iso}} = 2J\mathbf{S}_1\mathbf{S}_2 \quad (3.19)$$

J ist hier die Kopplungskonstante zwischen den beteiligten Elektronenspins, deren experimentelle Bestimmung Rückschlüsse auf das Spinsystem zulässt, wobei $2J$ unter Vernachlässigung anderer möglicherweise vorliegender Wechselwirkungen die Energiedifferenz zwischen Singlett- und Triplett-Zustand eines gekoppelten Systems angibt. Sie kann ausgehend von der klassischen elektrostatischen Coulomb-Wechselwirkung betrachtet werden (e : Ladung des Elektrons, ϵ_0 : elektrische Feldkonstante, r : Abstand der Elektronen):

$$E_{\text{es}} = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r} \quad (3.20)$$

Abhängig ist sie von der Überlappung der die Elektronenorbitale beschreibenden Wellenfunktionen ψ_A und ψ_B für die Elektronen (1) und (2):

$$J = \langle \psi_A^{(1)} \psi_B^{(2)} | \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r} | \psi_B^{(1)} \psi_A^{(2)} \rangle \quad (3.21)$$

Quadrupol-Wechselwirkung

Im Gegensatz zu Kernen mit einem Spin $I=1/2$ mit isotroper Ladungsverteilung, hat die axialsymmetrische Ladungsverteilung von Kernen mit $I \geq 1$ ein nicht-verschwindendes Quadrupolmoment des Kerns zur Folge. Für die Beschreibung des entsprechenden Operators ergibt sich der Ansatz²:

$$\mathcal{H}_Q = \mathbf{I}\mathbf{Q}\mathbf{I} \quad (3.22)$$

Die orientierungsabhängige Wechselwirkung wird dabei als eine symmetrische und spurlose 3×3 -Matrix \mathbf{Q} eingeführt. Deren Matrixelemente ergeben sich aus dem Produkt des skalaren Quadrupolmoments Q , welches ein Maß für die Abweichung der Ladungsverteilung von der Kugelform darstellt, und dem Gradienten des elektrischen Felds V_{ij} (mit e : Elementarladung):

$$Q_{ij} = \frac{eQ}{2I(2I-1)} V_{ij} \quad (3.23)$$

²Die folgende Darstellung ist eine auf die eingeschränkte Perspektive der vorliegenden Arbeit zugeschnittene Verkürzung der Behandlung von Poole und Farach, S. 208ff. [68]; auf diese sei auch bezüglich der Herleitung einzelner Terme und eine generalisierte Besprechung der Quadrupolmomente verwiesen.

Mittels des elektrischen Feldgradienten $V_{zz}=eV$ und eines Asymmetrieparameters η (mit $0 \leq \eta \leq 1$)

$$\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}} \quad (3.24)$$

ergibt sich für axiale Symmetrie ($\eta=0$) aufgrund der Spurlosigkeit des Tensors:

$$\begin{aligned} V_{xx} = V_{yy} &= -\frac{1}{2}eq \\ V_{zz} &= eq \end{aligned} \quad (3.25)$$

Dies erlaubt die Einführung einer Konstante P mit

$$P = \frac{e^2 q Q}{2I(2I - 1)} \quad (3.26)$$

Für die in der vorliegenden Arbeit mit ENDOR-Methoden untersuchten Kernspins $I=1$ ergibt sich damit

$$P = \frac{1}{2}e^2 q Q \quad (3.27)$$

und der Hamiltonoperator lässt sich diagonalisieren zu:

$$\mathcal{H}_Q^{\text{diag}} = \frac{1}{2}P \begin{pmatrix} 1 + \eta & 0 & 0 \\ 0 & -2 & 0 \\ 0 & 0 & 1 - \eta \end{pmatrix} \quad (3.28)$$

Für den vereinfachten orientierungsunabhängigen Fall sind die sich durch die Quadrupolaufspaltung ergebenden Verschiebungen der Energieniveaus in das Energieniveau-Schema eines $I=1$ -Kerns in Abb. 3.2 eingezeichnet, in dem auch die per ENDOR detektierbaren NMR-Übergänge vermerkt sind (s. u.). Zeigt das System ohne Berücksichtigung der Quadrupolkopplung zwei Übergänge, die $+A$ und $-A$ von der Larmorfrequenz verschoben sind, spaltet jeder dieser anschließend um einen Betrag von $3P$ auf. Anstelle eines Dublett-ENDOR-Spektrums für diesen einfachsten Fall, erhält man innerhalb von Störungstheorie erster Ordnung ein Vier-Strich-Spektrum mit den Linienpositionen (ν_0 : freie Larmorfrequenz) :

$$\begin{aligned}
\nu_1 &= |\nu_0 - A/2 - \frac{3}{2}P| \\
\nu_2 &= |\nu_0 - A/2 + \frac{3}{2}P| \\
\nu_3 &= |\nu_0 + A/2 - \frac{3}{2}P| \\
\nu_4 &= |\nu_0 + A/2 + \frac{3}{2}P|
\end{aligned} \tag{3.29}$$

Für die Simulation der Spektren führt man hier eine diagonalisierte Quadrupol-Aufspaltungsmatrix \mathbf{Q} ein, für die mit $I=1$ gilt:

$$\mathbf{Q} = 3P = \frac{3}{2}e^2qQ \tag{3.30}$$

Dies erlaubt eine analoge Behandlung zwischen Hyperfeinaufspaltung \mathbf{A} und Quadrupol-aufspaltung \mathbf{Q} mit jeweils um $A/2$ bzw. $Q/2$ verschobene Linienpositionen von der freien Larmorfrequenz bzw. nicht quadrupol-aufgespaltenen Hyperfeinlinie. Diese Konvention weicht z. T. von der nicht einheitlichen Verwendung in der Referenzliteratur ab, in der oft P [72] oder auch $\frac{3}{2}P=e^2qQ$ [73, 74] als Werte angegeben werden. In der hier gewählten Notation ergeben sich die Linien des ENDOR-Spektrums zu:

$$\begin{aligned}
\nu_1 &= |\nu_0 - A/2 - Q/2| \\
\nu_2 &= |\nu_0 - A/2 + Q/2| \\
\nu_3 &= |\nu_0 + A/2 - Q/2| \\
\nu_4 &= |\nu_0 + A/2 + Q/2|
\end{aligned} \tag{3.31}$$

3.2 Gekoppelte Spinzustände

Die bisherigen Betrachtungen beziehen sich auf einzelne Kerne mit ungepaarten Elektronen. Für Systeme, in denen mehrere Ionen zusammenkommen, wie es im Fall des wasseroxidierenden Metallzentrums im PSII der Fall ist, erscheint ein weiterer Operator im Spin-Hamiltonian, der die Austauschwechselwirkung zwischen den paramagnetischen Ionen beschreibt³. Für n eingehende Ionen ergibt sich ($j \neq k$):

³Eine ausführliche Darstellung sprengt den Rahmen dieser Arbeit, die sich nur am Rande mit den verschiedenen S -Zuständen des Mangankomplexes und deren Kopplungen befasst. Erschöpfend wird das Thema in einschlägiger Literatur behandelt [75]; die Ausführungen hier folgen der Darstellung von Peloquin und Britt [76].

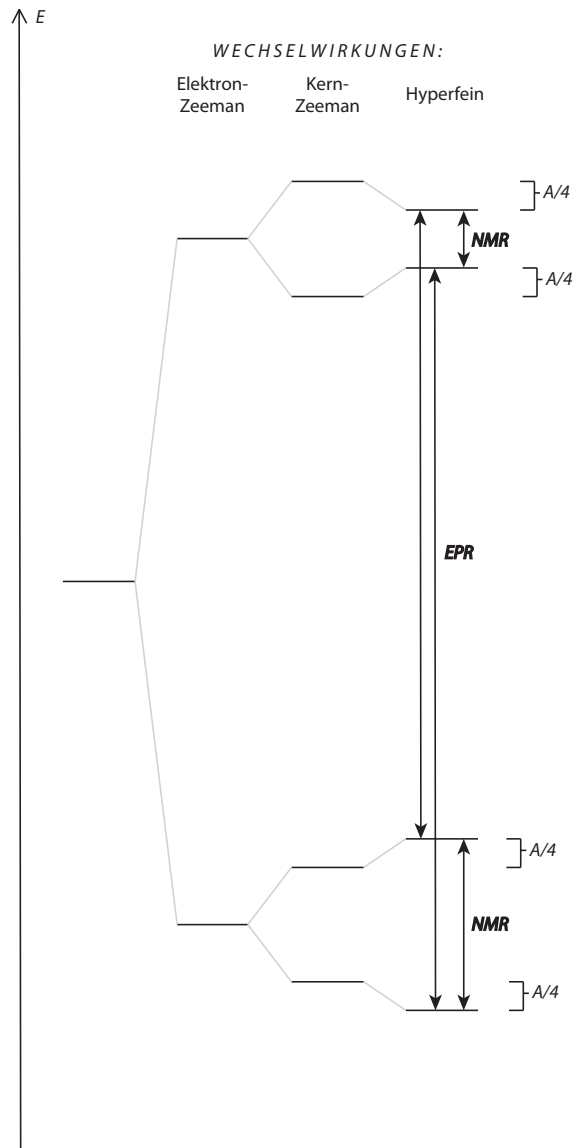


Abbildung 3.1: Energieniveau-Schema für ein System mit $S=1/2$, $I=1/2$ und einer Hyperfeinkopplung $A_{iso} > 0$. Eingezeichnet sind die EPR-Übergänge mit der Auswahlregel $\Delta m_s = \pm 1$ und $\Delta m_I = 0$, sowie die in ENDOR-Experimenten detektierbaren NMR-Übergänge mit $\Delta m_s = 0$ und $\Delta m_I = \pm 1$.

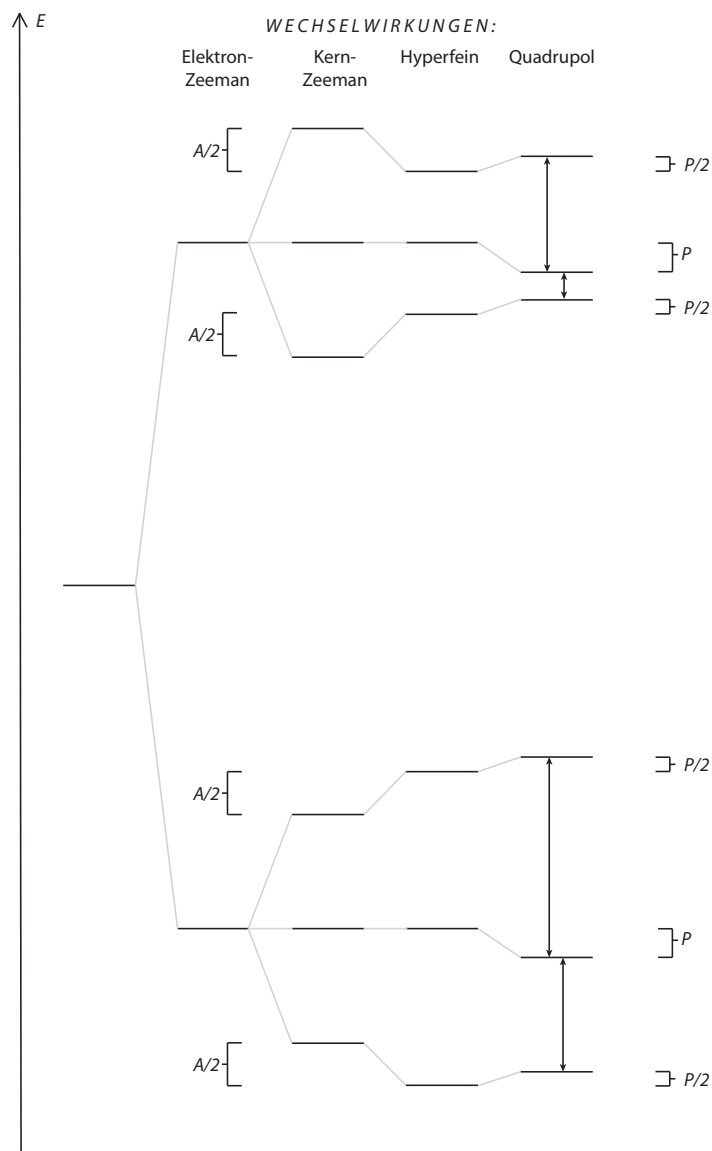


Abbildung 3.2: Energieniveau-Schema für ein System mit $S=1/2$, $I=1$, $A_{\text{iso}} > 0$ und nicht verschwindender Quadrupolkopplung $P > 0$. Die Verschiebung der Energieniveaus durch die Quadrupolwechselwirkung hebt die Entartung von je zwei zuvor äquivalenten NMR-Übergängen; die im ENDOR-Spektrum auftretenden Linien erscheinen um den Betrag $3P$ aufgespalten.

$$\mathcal{H}_{\text{ex}} = - \sum_{j,k}^n J_{jk} \mathbf{S}_j \mathbf{S}_k \quad (3.32)$$

Der gesamte Spin-Hamilton-Operator (unter Vernachlässigung von hier nicht betrachteter Nullfeldaufspaltung) lautet dann für den Fall von vier ungekoppelten Ionen wie im Mn_4CaO_5 [76]:

$$\mathcal{H} = \sum_i^4 (\mathbf{B}\mathbf{g}_i \mathbf{S}_i + \mathbf{S}_i \mathbf{A}_i \mathbf{I}_i + \mathbf{I}_i \mathbf{Q}_i \mathbf{I}_i - \gamma_i \mathbf{B} \mathbf{I}_i) - \sum_{j,k}^4 J_{jk} \mathbf{S}_j \mathbf{S}_k \quad (3.33)$$

In der Reihenfolge stammen die Teilbeträge aus der Elektronen-Zeeman-, der Hyperfein-, der Quadrupol-, der Kern-Zeeman- und schließlich der Austauschkopplung.

Eine elegantere Darstellung von Gleichung 3.33 zieht in Betracht, dass im Falle starker Austauschwechselwirkungen die Einzelspins zu einem gekoppelten Spin wechselwirken, der sich als Vektorsumme der Einzelspins bildet. Unter Einführung eines Gesamtspin-Operators \mathbf{S}_T ergibt sich:

$$\mathcal{H}_{\text{kpl}} = \mathbf{B}\mathbf{g}' \mathbf{S}_T + \sum_i^4 (\mathbf{S}_T \mathbf{A}'_i \mathbf{I}_i + \mathbf{I}_i \mathbf{Q}_i \mathbf{I}_i - \gamma_i \mathbf{B} \mathbf{I}_i) \quad (3.34)$$

Ein solcherart gekoppeltes System lässt sich im Weiteren über seine effektiven gekoppelten Parameter behandeln, also seinen Gesamtspin \mathbf{S}_T , der effektiven g -Wert-Matrix \mathbf{g}' und dem Set von effektiven Hyperfeinkopplungen \mathbf{A}' . Dabei entsprechen \mathbf{g}' und \mathbf{A}' nicht mehr den Matrizen der Einzelspins, sondern sind mit diesen über eine Projektionsmatrix ρ verknüpft, die ihrerseits von Gesamt- wie Einzelspins, intrinsischen Nullfeldaufspaltungen und respektiven Austauschwechselwirkungen bestimmt wird [76]:

$$\mathbf{A}'_i = \mathbf{A}_i \rho(\mathbf{S}_T, J_{jk}, \mathbf{D}_i) \quad (3.35)$$

Für eine Kombination von Kernen sind alle Vektor-Kombinationen möglich, einen Gesamtspin zu erhalten; im Falle anti-ferromagnetischer Kopplung ($J_{jk} < 0$) wird der Grundzustand vom kleinsten sich ergebenden Spin gebildet, im Falle ferromagnetischer Kopplung ($J_{jk} > 0$) vom höchsten.

Manganionen tragen in ihren im Mangankomplex verwirklichten Oxidationsstufen Mn(II), Mn(III) und Mn(IV) dabei Elektronenspins mit $S_{\text{Mn(II)}}=5/2$, $S_{\text{Mn(III)}}=2$ und $S_{\text{Mn(IV)}}=3/2$. Im S_2 -Zustand koppeln die vier Ionen im Grundzustand anti-ferromagnetisch zu einem Gesamtspin von $S_T=1/2$. So kann der Komplex, solange man ihn als Ganzes betrachtet, im Wesentlichen als $S=1/2$ -Zentrum behandelt werden.

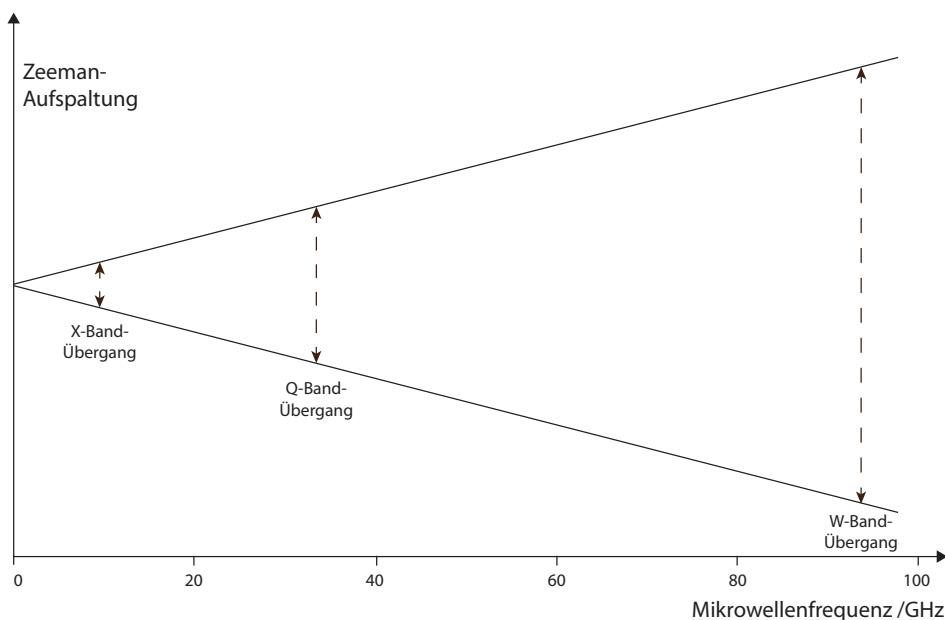


Abbildung 3.3: Die eingestrahelte Mikrowellenfrequenz und die Energie der Übergänge zwischen aufgespaltenen Zeeman-Niveaus bilden einen linearen Zusammenhang. Eingezeichnet sind drei in der EPR weitverwendete MW-Frequenzen: X-Band ($\sim 9,7$ GHz), Q-Band (~ 34 GHz) und W-Band (~ 94 GHz).

3.3 Methoden und Verfahren der Elektronenspinresonanz

3.3.1 *cw*-EPR

Aus Gl. 3.10 ergibt sich für die Resonanzbedingung eines einfachen $S=1/2$ -Systems ein linearer Zusammenhang zwischen dem im Resonator eines EPR-Spektrometers wirkenden Magnetfeld und der eingestrahelten Mikrowellenstrahlung. Dieser Zusammenhang ist in Abb. 3.3 veranschaulicht. Experimentell ist die Variation einer Magnetfeldstärke wesentlich einfacher zu realisieren als ein vergleichbares Durchfahren von Mikrowellenfrequenzen. Das einfachste EPR-Experiment besteht somit darin, eine Mikrowelle konstant einzustrahlen und das Feld um die Resonanzbedingung herum zu variieren, um die bei eintretender Resonanzbedingung stattfindende Mikrowellenabsorption in Abhängigkeit der Feldstärke zu vermessen. Hierbei spricht man aufgrund der kontinuierlichen, konstanten Mikrowelleneinstrahlung von einem *continuous wave*-Experiment oder von *cw*-EPR bzw. -Spektren. Dem Energieanstieg, den die resonanten Übergänge mit wachsenden Mikrowellenfrequen-

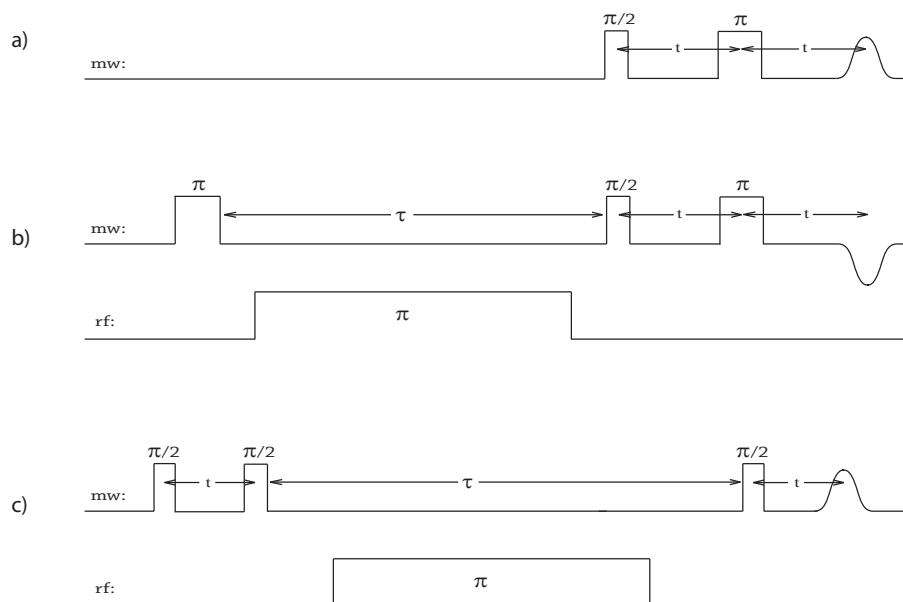


Abbildung 3.4: Die verwendeten ENDOR-Pulssequenzen. a) Hahn-Echo; b) Davies-ENDOR; c) Mims-ENDOR; mw: Mikrowellen-Pulse, rf: Radiofrequenz-Pulse.

zen aufweisen, steht kein entsprechender Anstieg in der Aufspaltung durch die Hyperfeinkopplung gegenüber, wie eine Betrachtung der Gl. 3.15 und 3.16 zeigt. Der Schritt von einem niedrigeren in ein höheres Frequenzband, wie er in den vergangenen Jahrzehnten durch die steigende Verfügbarkeit von Hochfrequenz-Mikrowellentechnik ermöglicht wurde, kann sich auf diesem Wege in einer wesentlich besseren Auflösung der \mathbf{g} -Anisotropie bei relativ betrachtet geringerer Überlagerung durch von \mathbf{A} -Kopplungen hervorgerufenen Hyperfeinstruktur oder durch die Auflösung inhomogener, nicht feldabhängiger Linienverbreiterungen auszahlen. Wird ein Signal bei verschiedenen Mikrowellenfrequenzen vermessen, erlaubt dies somit auch gezieltere Rückschlüsse auf die das Signal beeinflussenden Parameter, hauptsächlich \mathbf{g} - und \mathbf{A} -Anisotropie sowie \mathbf{g} -strain⁴, aber auch auf dynamische Effekte in z. B. flüssigen Proben.

Im *cw*-Modus aufgenommene EPR-Spektren zeigen als Ergebnis nicht direkt die Feldstärkenabhängigkeit der stattfindenden Mikrowellenabsorption, sondern einen der ersten Ableitung dieser sehr nahe kommenden Kurvenverlauf. Dieses ergibt sich aus der Detektion

⁴ \mathbf{g} -strain ist der auch im Deutschen gebräuchliche Term für \mathbf{g} -Verzerrungen und -Variationen, z. B. aus Gründen geometrischer Unterschiede in an sich äquivalenten Systemen [77, 78].

der Absorption, wofür eine Modulation des Magnetfelds um den auszulesenden Feldpunkt erzeugt wird. Das resultierende Signal wird mittels eines *Lock-in*-Verstärkers ausgelesen, der effektiv als Rauschfilter funktioniert⁵.

3.3.2 Puls-EPR

Die Entwicklung von Mikrowellenpulse nutzenden Experimenten in die EPR folgte einer vergleichbaren, der EPR um fast ein Jahrzehnt vorausgehenden Entwicklung in der NMR. Der nachfolgende Überblick über die Prinzipien der Puls-EPR am Beispiel der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden orientiert sich an der semiklassischen Darstellung von Keijzers, Reijerse und Schmidt [80], die darüber hinaus gehende Erläuterungen und weiterführende Verweise beinhaltet.

Mikrowellenpulse und Hahn-Echo

Betrachtet man ein EPR-Signal als Superposition einer Anzahl einzelner Spinpakete M_i (mit Proportionalitätskonstante $\gamma = g_e \mu_B / \hbar$, vergl. Gl. 3.3), dann ergibt sich aus der Bloch-Gleichung (mit \mathbf{B}_i : vom Spinpaket erfahrenes lokales Magnetfeld)

$$\frac{d\mathbf{M}_i}{dt} = -\gamma \mathbf{B}_i \times \mathbf{M}_i \quad (3.36)$$

eine für jedes Spinpaket unterschiedliche Larmorfrequenz

$$\omega_i = \gamma B_i \quad (3.37)$$

mit der die Magnetisierungen der Spins dieses Pakets um die Richtung des anliegenden Magnetfelds präzedieren. Im Falle eines ungestörten Systems mit einem konstanten Magnetfeld in z -Richtung richten sich die magnetischen Momente der Spins entlang dieser Richtung aus.

Kern der Pulsmethoden ist die Einstrahlung von Mikrowellenpulsen, also elektromagnetischer Strahlung bestimmter diskreter Dauer. Die den Puls ausmachende magnetische Oszillation B_1 führt unter Erfüllung der Resonanzbedingung zur Auslenkung der Spins aus ihrer Orientierung entlang der Magnetfeldrichtung. Wählt man die Pulslänge so, dass die Spinpakete in die xy -Ebene senkrecht zur Magnetfeldrichtung abgelenkt werden, spricht man bezüglich der stattfindenden 90° -Verdrehung von einem $\pi/2$ -Puls. Aufgrund ihrer

⁵Eine tiefergehende Darstellung findet sich z. B. in Kapitel 3 von Abragams *The Principles of Nuclear Magnetism* [79].

unterschiedlichen Präzessionsfrequenzen, beginnen die Spinpakete in der xy -Ebene umgehend zu dephasieren, die detektierbare Magnetisierung nimmt als FID⁶ ab. Während in der NMR dieser FID detektiert wird, ist dies in der EPR aufgrund der schnelleren Dynamiken der Elektronenspins instrumentell nicht möglich, wenn die durch die eingestrahlten Mikrowellenpulse bedingte Totzeit des Detektors die Länge des FID übersteigt.

Um den FID dennoch nachweisen zu können, wird in einer von Hahn angestoßenen und Carr und Purcell weiterentwickelten Methode [81, 82] ein zweiter Mikrowellenpuls mit der doppelten Länge des ersten benutzt (vergl. Abb. 3.4). Dieser π -Puls rotiert die auseinanderlaufenden Spinpakete um 180° um die y -Achse, was einer Spiegelung um die xz -Ebene gleichkommt, ändert aber nichts an ihrer Präzessionsrichtung und -geschwindigkeit, mit dem Ergebnis, dass die Spinpakete wieder in y -Richtung zusammenlaufen und ihre volle Magnetisierung als sogenanntes *Hahn-Echo* des FID nachgewiesen wird. Die Totzeiten der Apparatur lassen sich hierbei durch entsprechend lange Wahl der Pulsabstände, t , vermeiden, da dieser Parameter auch den zeitlichen Abstand zwischen π -Puls und Echo bestimmt.

3.3.3 Elektronen-Kern-Doppelresonanz-Spektroskopie

Die dargestellten Methoden der EPR erlauben bei geeigneter Wahl der experimentellen Parameter, die Übergänge zwischen verschiedenen elektronischen Zeeman-Niveaus ($\Delta m_s = \pm 1$, $\Delta m_I = 0$) sehr genau aufzulösen und dadurch präzise Hauptwerte für die orientierungsabhängige \mathbf{g} -Matrix zu ermitteln. Die Rekonstruktion von Hyperfeinaufspaltungen gelingt ohne Weiteres jedoch nur für einfache Systeme. Abb. 3.1 zeigt die Aufspaltung für eine wirkende Hyperfeinkopplung; steht mehr als eine Hyperfeinkopplung in Wechselwirkung mit der Spindichtevertellung, ergibt sich für die Zahl der auftretenden Übergänge N in Abhängigkeit vom Spin I und der Anzahl der eingehenden Hyperfeinkopplungen a :

$$N_{\text{EPR}} = \prod_j (2a_j I_j + 1) \quad (3.38)$$

Betrachtet man ein komplexes System wie das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Y_D^\bullet mit drei stark und drei schwach hyperfeinkoppelnden, am Molekül gebundenen Protonen sowie einer schwach hyperfeinkoppelnden Wasserstoffbrückenbindung, deren Kopplungen zudem starke Anisotropien und eine jeweils individuelle Verdrehung in Bezug auf die Geometrie des \mathbf{g} -Tensors zeigen, ist die Auflösung aller auftretenden Übergänge im EPR-Signal

⁶von engl. *Free Induction Decay*: störungsfreier Zerfall der durch den $\pi/2$ -Puls induzierten Magnetisierung

experimentell nicht realisierbar, und man ist auf zusätzliche Methoden angewiesen, die Niveaufspaltung durch Hyperfeinkopplungen direkt zu vermessen.

Um die in Abb. 3.1 eingezeichneten NMR-Übergänge über die der EPR zugänglichen Übergänge zu rekonstruieren, bedient man sich darum Doppelresonanz-Verfahren, die hier anhand ihrer grundlegenden gepulsten Methoden vorgestellt werden⁷. Doppelresonanz bezeichnet dabei die gleichzeitige Erfüllung zweier Resonanzbedingungen:

- die verwendeten Mikrowellenpulse müssen, wie in der Puls-EPR zuvor, resonant EPR-Übergänge anregen;
- ein elektromagnetischer Puls in der Größenordnung von Radiofrequenzen (RF) erzeugt resonante Übergänge zwischen den Besetzungszuständen der NMR.

Bezeichnet werden diese Methoden darum als Elektronen-Kern-Doppelresonanz-Methoden bzw., ausgehend vom englischen Term *Electron Nuclear Double Resonance*, mit dem Akronym ENDOR belegt. Der Nachweis der Kernspinübergänge erfolgt dabei bei konstantem Magnetfeld in Abhängigkeit von der Frequenz des eingestrahnten Radiofrequenz-Pulses, und die Hyperfeinkopplungen zeigen sich als paarweise Aufspaltungen um die freie Larmorfrequenz. Mit den für die NMR-Übergänge geltenden Auswahlregeln ($\Delta m_s=0$, $\Delta m_I=\pm 1$) ergibt sich die Anzahl der auf einer Seite der Larmorfrequenz auftretenden ENDOR-Signale dann nur noch zu:

$$N_{\text{ENDOR}} = (2S + 1) \sum_j I_j \quad (3.39)$$

Für den einfachen Fall einer einzelnen Hyperfeinkopplung und unter Nichtbeachtung von Orientierungsabhängigkeiten ergeben sich die Signalpositionen damit innerhalb einer Betrachtung mit Störungstheorie erster Ordnung zu (mit ν_0 : fr. Larmorfrequenz des Kernspins, $I=1/2$, A : Betrag der effektiven Hyperfeinkopplung):

$$\nu = |\nu_0 \pm A/2| \quad (3.40)$$

3.3.4 Puls-Davies-ENDOR

Das von Davies 1974 eingeführte Puls-ENDOR-Experiment [84] benutzt zur Detektion eines Signals eine Hahn-Echo-Sequenz (vergl. Abb. 3.4), vor der zwei Pulse die Echodetektion sensitiv auf die NMR-Übergänge schaltet. Der erste Puls, ein Mikrowellen- π -Puls,

⁷Eine Übersicht über spezialisiertere Puls-EPR und Puls-ENDOR-Experimente findet sich z. B. bei Schweiger [83].

invertiert die Magnetisierung der zu ihm beim anliegenden Magnetfeld resonanten Elektronenspins. Einen solchen π -Puls bezeichnet man als *selektiv*, sofern durch ihn nur die Polarisation eines einzelnen EPR-Übergangs invertiert wird und das erzeugte invertierte FID für diesen darum maximal wird. Nach diesem folgt der RF-Puls, der im Falle erfüllter Resonanzbedingung den entsprechenden in Abb. 3.1 verzeichneten NMR-Übergang induziert. Die Hahn-Echo-Pulsfolge zur Detektion bestimmt nun eben die verbleibende Polarisation und gibt dadurch ein Maß, inwieweit der RF-Puls resonant zu einer der Hyperfeinkopplungen war, da die nun nach dem NMR-Übergang ein anderes Energieniveau besetzenden Spinpakete nicht mehr resonant zu dem Hahn-Echo beitragen.

3.3.5 Puls-Mims-ENDOR

Die Mims-ENDOR-Sequenz beruht auf demselben Prinzip, durch einen Radiofrequenzpuls resonante NMR-Übergänge zu induzieren (vergl. Abb. 3.4). Anstelle der Erzeugung eines maximalen FID durch einen selektiven π -Puls und anschließender Detektion des Anteils, der nicht in Resonanz mit dem RF-Puls reagiert hat, wird in der von Mims 1965 vorgestellten Methode [85] allerdings eine Folge aus zwei nicht-selektiven $\pi/2$ -Pulsen verwendet. Nachdem der erste $\pi/2$ -Puls die Spinpakete in die xy -Ebene gedreht hat, beginnen diese zu dephasieren, sodass der zweite Puls ein von der Dephasierung abhängiges und somit für unterschiedliche Spinpakete unterscheidbaren Effekt hat — die resultierende Polarisation, auf die anschließend der RF-Puls zur Anwendung gebracht wird, ist dabei sinusförmig moduliert [86]. An den Stellen der Extrema treten an diesen Stellen im Mims-Experiment Detektionslöcher auf (s.u.).

Nach dem NMR-Übergänge induzierenden RF-Puls erzeugt ein letzter $\pi/2$ -Puls ein stimuliertes Echo, anhand dessen der Anteil der bei der verwendeten Radiofrequenz resonant hyperfeingekoppelten Spinpakete bestimmt werden kann und als Ergebnis ein der NMR entsprechendes Bild liefert.

Anwendungsgebiete der ENDOR-Methoden

Beide hier vorgestellten Puls-ENDOR-Methoden haben ihre Vor- und Nachteile, die vorgeben, unter welchen experimentellen Bedingungen man die eine der anderen vorziehen sollte. Die Davies-ENDOR-Sequenz stellt sich für schwach-gekoppelte Kerne als nicht sensitiv genug heraus, da der Inversionspuls nicht in jedem Fall selektiv genug wählbar ist und die Detektionssequenz schmale Polarisationsverschiebungen durch den RF-Puls als solche nicht erfasst [86]. Es unterdrückt darum die Signale um die freie Larmorfrequenz, für die Mims-ENDOR somit eine bessere Wahl darstellt. Die periodisch in Abhängigkeit

vom Pulsabstand t auftretenden Detektionslöcher bei [83]

$$|\nu - \nu_0| = \pi n/t \quad (\text{mit } n = 0, 1, 2, \dots) \quad (3.41)$$

müssen dabei durch geeignete Wahl des Pulsabstands so gesetzt werden, dass nurmehr die zentrale Signalunterdrückung in direkter Umgebung der freien Larmorfrequenz im Spektrum auftaucht. Dies ist für die Vermessung schwacher Kopplungen am einfachsten, sodass man sich in solchen Fällen nur bedingt um die Mims-Detektionslöcher kümmern muss.

Entsprechend dieser Überlegungen wurden in der vorliegenden Arbeit für die Vermessung der Protonen-Kopplungen am Y_D^\bullet Davies-Pulssequenzen zur Anwendung gebracht. Gerade die Verwendung von Einkristallen erlaubt experimentell die mehrmalige Vermessung von ENDOR-Spektren mit unterschiedlichen Pulsabständen nicht, sodass eine möglicherweise verminderte Intensität für die schwächer gekoppelten Protonensignale in Kauf genommen werden muss angesichts der möglichen, wesentlich schwerer wiegenden Beeinträchtigung durch in Einkristallspektren fehlende Einzelsignale.

Demgegenüber erwies sich die Mims-ENDOR-Methode für die Vermessung der deuteriumausgetauschten Wasserstoff-Brückenbindung als geeignet. Die durch das unterschiedliche gyromagnetische Moment stark verringerte Hyperfeinkopplung des Deuteriumkerns erlaubte zum einen eine Wahl des Pulsabstands, der die Detektionslöcher höherer Ordnung nicht mehr im untersuchten Frequenzbereich erscheinen ließ; zum anderen erforderte sie eine um die Larmorfrequenz möglichst sensitive Methode.

Die entsprechenden experimentellen Details finden sich in den Kap. 8 und 9.2; die Rekonstruktion der Wechselwirkungen mittels Simulationen der Kopplungen wird in Anhang A dargestellt.

3.3.6 Orientierungsabhängigkeit und Orientierungsselektion

Im Falle gebundener Elektronen bewirkt die Wechselwirkung der Elektronen mit ihrer Umgebung eine Orientierungsabhängigkeit des effektiv wirksamen g -Wertes aus der Resonanzbedingung in Gl. 3.10 bzw. 3.11. Dies führt zu einer Aufspaltung eines isotropen g -Wertes in eine 3x3-dimensionale \mathbf{g} -Matrix zur Beschreibung eben dieser Orientierungsabhängigkeit, analog dazu von einer isotrop verbreiterten Linie um die Resonanzbedingung zu einem anisotropen EPR-Spektrum — und begründet damit letztendlich die Möglichkeit der EPR, überhaupt etwas über Molekülgeometrien oder -orientierungen auszusagen. Physikalisch begründet ist diese Orientierungsabhängigkeit etwa in der räumlichen Ausdehnung des Elektronenorbitals und der Wechselwirkung mit in den g -Wert einfließenden Störungstermen wie etwa die Kopplung mit dem Bahndrehimpuls. Da sich die \mathbf{g} -Matrix

letztlich diagonalisieren lässt, umfasst der auch so bezeichnete **g**-Tensor schließlich die Angabe der drei Hauptkomponenten der diagonalisierten Matrix, im Folgenden als g_x , g_y und g_z bezeichnet (mit der Konvention $g_x \geq g_y \geq g_z$). Über die Angabe der Orientierung zum Magnetfeld kann der effektiv wirkende g -Wert bestimmt werden; gleichsam kann der **g**-Tensor auch durch einen Winkelsatz in eine Molekülgeometrie überführt werden und damit auf die Orientierung des Moleküls zur Magnetfeldrichtung zurück geschlossen werden. Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Formalisierung für Orientierungsberechnungen und -transformationen wird in Anhang A vorgestellt.

Für Proben gefrorener Lösung, in denen alle Orientierungen stochastisch vertreten sind, führt die Orientierungsabhängigkeit des **g**-Tensors zu einem kontinuierlichen Absorptionsspektrum zwischen den Resonanzpositionen der drei Hauptwerte⁸. Für orientierte Proben, etwa Einkristalle mit einer endlichen Anzahl in der Probe vorkommender Orientierungen, ergibt sich dagegen ein Spektrum diskreter Kopplungen, die allerdings durch Linienverbreiterungseffekte mit endlicher Breite erscheinen und somit überlagern können. Dessen ungeachtet erlaubt die Rekonstruktion dieser diskreten Kopplungen letztlich die Bestimmung von Radikal- und damit Probenorientierungen in Bezug auf die Magnetfeldrichtung, sofern die räumliche Relation zwischen **g**-Tensor-Ausrichtung und Molekülgeometrie bekannt ist.

Orientierungsselektion im Hochfeld

Die gezeigte Orientierungsabhängigkeit der in die Resonanzbedingung direkt eingehenden **g**-Matrix hat für ENDOR-Messungen unter Hochfeldbedingungen experimentell nutzbare Konsequenzen. Da für das ENDOR-Experiment magnetische Feldstärke und Mikrowellenfrequenz konstant gehalten werden und nur die Radiofrequenz variiert, nimmt nur ein Teil aller Spinpakete am Experiment teil, eben jene, die sich aufgrund ihrer Orientierung zur Magnetfeldrichtung bei der entsprechenden Kombination von Feld und Mikrowelle in Resonanz befinden⁹. Da neben der **g**-Matrix aber auch die Hyperfeinkopplungen beschreibenden

⁸Die einer Ableitung gleichenden *cw*- oder nachträglich pseudomodulierten Spektren müssen dabei nicht kontinuierlich sein, bei entsprechender g -Auflösung unter Hochfeldbedingungen erscheinen die einzelnen Komponenten isoliert. Dies hängt nicht zuletzt vom Auftreten anderer Wechselwirkungen wie Hyperfeinkopplungen ab.

⁹Eine exakte Behandlung der Orientierungsselektion würde eine genauere Parametrisierung und Diskussion der den Mikrowellenpulsen zukommenden Anregungsbandbreite umfassen. Dies erscheint für ein rein phänomenologisches Verständnis der Effekte hier nicht notwendig. Vor allem zeigt die Betrachtung der tatsächlichen Messspektren in Teil III, Y_D^\bullet , dass die entsprechenden Parameter semi-empirisch aus den Spektren gewonnen werden können. Die daraus resultierende Realisierung im Programmcode der ENDOR-Simulation ist in Anhang A zu finden.

A-Matrizen Orientierungsabhängigkeiten aufweisen, verursacht eine auf **g** basierende Auswahl an Radikalorientierungen gleichsam eine ebensolche Auswahl bezüglich der in den ENDOR-Spektren detektierbaren Hyperfein-Wechselwirkungen.

Während diese Effekte im X-Band bei einer Mikrowellenfrequenz von etwa 9,7 GHz vernachlässigbar sind, führen sie im W-Band bei etwa 94 GHz Mikrowellenfrequenz zu einer starken Feldabhängigkeit der ENDOR-Messspektren sowohl bei ENDOR-Messungen an Proben gefrorener Lösung wie auch am Einkristall¹⁰. Dies erfordert einerseits die Aufnahme mehrerer ENDOR-Spektren für ein gegebenes EPR-Spektrum, um auf diesem Wege die volle Orientierungsabhängigkeit der NMR-Übergänge vermessen zu können und letztendlich alle Hauptwerte der **A**-Matrizen rekonstruieren zu können. Andererseits bedeutet dies eine Entzerrung der ENDOR-Spektren in eine Reihe von Einzelspektren, zu denen jeweils nur eine reduzierte Anzahl aller Kopplungen beitragen. Bisher sich überlagernde Signale können so, wenn sie im System geeignet zueinander liegen, experimentell voneinander getrennt werden, und spektroskopische Ambivalenzen heben sich so auf. Dies ist im Besonderen von Bedeutung für die Einkristall-Spektren, in denen nur eine geringe Anzahl tatsächlicher Radikalorientierungen realisiert ist, die im ENDOR-Experiment diskrete Signale aufweisen — die Orientierungsselektion führt hier zu einer nochmaligen Reduktion der Anzahl zum Spektrum beitragender Linien. Für den experimentell kaum zu realisierenden Idealfall vollständiger Trennung der im Einkristall vorkommenden Radikalausrichtungen bestünde das entsprechende ENDOR-Spektrum dann nur aus jeweils zwei Signalen pro gekoppeltem Proton im Radikal.

Die Diskussion orientierungsselektiver Effekte im Hochfeld-ENDOR wird im Detail anhand der tatsächlichen Messspektren in den Abschnitten 8 und 9.2 stattfinden.

3.4 PSII-Kernkomplexe und der PSIIcc-Einkristall

Die in der vorliegenden Arbeit für EPR- und ENDOR-Messungen verwandten PSIIcc-Einkristalle aus *Th. elongatus* sind Gegenstand schon einiger EPR- [87, 88] wie auch EXAFS/XANES- [89–91], vor allem aber röntgenkristallographischer Untersuchungen gewesen [18, 20–22, 25, 92, 93]. Die zugrunde liegende PSIIcc-Präparation geht zurück auf Decker *et al.* [94], die Gewinnung von photosynthetisch funktionalen Einkristallen gelang zuerst um das Jahr 2000 herum [95, 96].

¹⁰Dies ist im Einzelfall natürlich abhängig von der **g**-Anisotropie des untersuchten Systems bzw., in Einkristallproben, von der Anzahl der im Einkristall realisierten Orientierungen; die Betrachtung setzt voraus, dass die Signale genügend aufspalten, wie sie es in der Anwendung in Teil III der vorliegenden Arbeit eben tun.

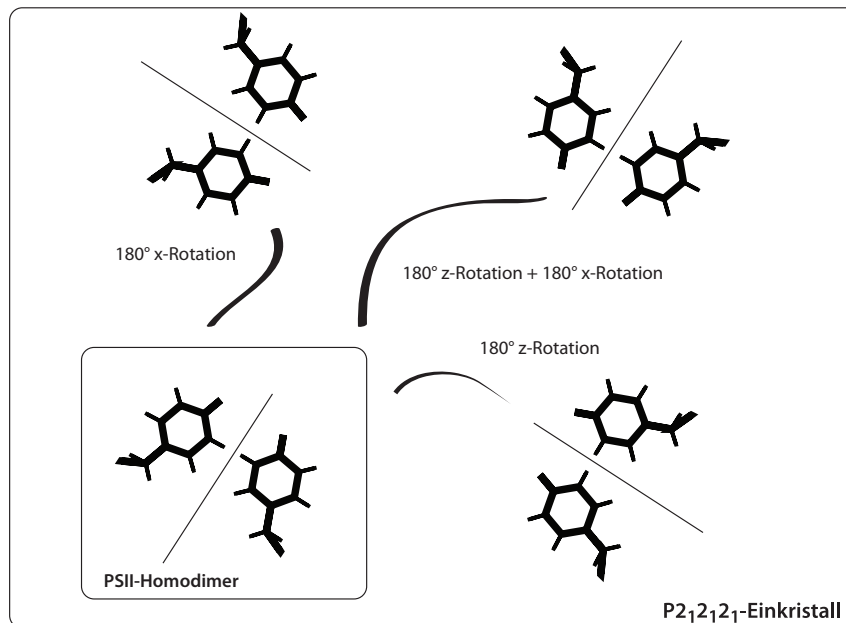


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Symmetrieeigenschaften im PSII-P₂₁₂₁₂₁-Einkristall. Das Homodimer selbst trägt zwei Y_D-Radikale, die durch eine 180°-Drehung um die nicht-kristallographische C₂-Dimerachse verbunden sind. Der P₂₁₂₁₂₁-Einkristall beinhaltet vier dieser Homodimere, die untereinander durch 180°-Transformationen um die Kristallachsen verbunden sind. In den in hier verwendeten Eulerwinkeln entspricht dies 180°-Drehungen um a) die x-Achse, b) die z-Achse, c) zuerst die z-, anschließend die neue x'-Achse für ein zu dem Kristallachsensystem *abc* anfangs kollineares Koordinatensystem *xyz*. Vergl. hierzu auch Anhang A.1.1.

Mittels der in der Literatur ausführlicher beschriebenen Präparation erhält man Kernkomplex-Präparationen, die als Dimer eine Gesamtmasse von etwa 760 kDa und 19 von 20 Untereinheiten im PSII-Kern enthalten [26, 97]. Etwa 94% der Zentren enthalten zudem mit der vollen Zahl von Manganionen ausgestattete Wasseroxidierende Komplexe. Die resultierenden PSIIcc-Präparationen sind sowohl in der Lösung, im Einkristall wie auch nach nochmaliger Auflösung des Einkristalls zur oxygenen Photosynthese fähig.

Die Abmessungen der für die hier vorgestellten Hochfeld-Studien verwandten Einkristalle war weitgehend begrenzt durch die Innenausmaße der W-Band-Probenröhrchen (Innendurchmesser: 0,7 mm) und die Montierung der Einkristalle an der Innenwand der Röhrchen mittels Schleifen. Diese Rahmenbedingungen führten zur Verwendung von eher schmaleren, wenn auch effektiv größeren Einkristallen als in vorherigen EPR-Studien [87] mit Ausmaßen von etwa 0,8 mm x 0,2 mm x 0,03 mm. Die Abmessungen der Einheitszelle ergeben sich

zu $a=127,5 \text{ \AA}$, $b=224,6 \text{ \AA}$ und $c=305,6 \text{ \AA}$ [26]. Sie umfasst vier in einer $P2_12_12_1$ -Symmetrie angeordnete PSIIcc-Homodimere, also insgesamt acht Photosysteme II.

Die für eine $P2_12_12_1$ -Raumgruppe geltenden Orientierungstransformationen sind, illustriert durch die Orientierung zweier Tyrosine im Homodimer, in Abb. 3.5 schematisch dargestellt. Ausgehend von einem Homodimer ergeben sich die drei anderen Ausrichtungen in der $P2_12_12_1$ -Symmetrie durch 180° -Drehungen um die Kristallachsen a , b und c . Aus dieser speziellen Kristallsymmetrie ergeben sich unmittelbare Folgen für EPR-Messungen am Einkristall. Verläuft etwa die Orientierung einer der Kristallachsen kollinear zur Magnetfeldrichtung, führt dies zu einer Entartung der Kopplungen, die durch die 180° -Rotationen in eine in Bezug auf die Magnetfeldrichtung äquivalente Orientierung gespiegelt wird. Solche Beispiele finden sich häufig in Rotationsspektren, wie sie in Teil III vorgestellt werden; dort werden sie am Beispiel näher diskutiert.

Für sich allein betrachtet führen die auf die $P2_12_12_1$ -Symmetrie zurückzuführenden Raumspiegelungen zur Ununterscheidbarkeit der einzelnen Kristallachsen in der EPR, da für jede Lösung der vier orientierten Einheitszellen auch weitere äquivalente Lösungen bestehen, die sich nur durch eine der 180° -Transformationen unterscheiden. Diese Ununterscheidbarkeit wird im Falle des PSII aufgehoben durch die Existenz einer nicht-kristallographischen C2-Achse; diese 180° -Rotation bildet die beiden Monomere des PSII-Homodimers und damit z. B. auch die Orientierung des Y_D^\bullet -Moleküls und seiner in der Molekülgeometrie verankerten Kopplungen aufeinander ab. Sofern man die C2-Transformation zwischen den zwei Y_D^\bullet im Homodimer kennt — aus den Dimer-Röntgenstrukturen ist sie ohne Weiteres zu entnehmen —, kann man durch die nicht kollinear zu einer der Kristallachsen und damit Kristall-Symmetrieoperationen verlaufenden Orientierungen auf die Ausrichtung des Kristallachsen-Systems zur Magnetfeldrichtung zurückschließen. Über Bestimmung der acht Radikalorientierungen kann man so das Y_D^\bullet zu einem Marker für die Orientierung des Kristalls im Resonator machen.

3.5 Probenpräparation

3.5.1 Cyanobakterielle Lösung und Einkristalle

Die in der vorliegenden Arbeit als gefrorene Lösung wie als Einkristalle verwandten Präparationen wurden im Rahmen einer Kooperation innerhalb des Sfb-498 von Prof. Dr. Athina Zouni und Dr. Jan Kern vom Max-Volmer-Institut für Biophysikalische Chemie der Technischen Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

Bei der in den entsprechenden Messungen verwendeten gefrorenen Lösung handelt es sich

um *core-complex*-Präparationen des Photosystem II aus dem Cyanobakterium *Th. elongatus*, die nach dem von Kern *et al.* [26,97] beschriebenen Verfahren hergestellt wurden. Aus diesen wurden auch die für die weiteren Messungen verwendeten Kristalle gewonnen, die näher in Abschnitt 3.4 beschrieben werden und die auch für die röntgenkristallographische Untersuchung zur Bestimmung der Röntgenstruktur Verwendung fanden. Insofern handelt es sich bei den später zu vergleichenden Daten nicht nur um vom selben Organismus stammende Präparationen, die hier untersuchten Kristalle sollten mit denen der Röntgenkristallographie strukturell identisch sein.

Die Lösung wurde entsprechend an der TU Berlin in Probenröhrchen für X- und W-Band gefüllt. Die Einkristalle wurden nach der Inkubation in Glycerin-Puffer, um sie gegen Schäden beim Einfrieren zu schützen, mit Schleifen in ein offenes Röhrchenende geschoben und an der Innenwand abgelegt. Die Größe der Kristalle war damit durch den Innendurchmesser beschränkt (0,7 mm im W-Band, 1 mm bei der Verwendung dickwandiger X-Band-Röhrchen). In früheren Untersuchungen an auf demselben Wege hergestellten Einkristallen [98] wurde gezeigt, dass bei der so vorgenommenen Platzierung einige Kristallorientierungen bevorzugt auftreten; da dies für die hier vorgenommenen Untersuchungen eine nur untergeordnete Rolle spielt, wurde auf die mit wesentlich größerem experimentellen Aufwand verbundene Befestigung der Kristalle an aus dem Röhrchen hängenden Schleifen, bei der die Kristallorientierung durch keine äußeren Vorgaben beeinträchtigt ist und damit größerer Variation unterliegt, verzichtet.

Präparation der Proben gefrorener Lösung wie auch der Einkristalle geschah unter schwachem Grünlicht, unmittelbar bevor die Proben zur Lagerung bis zur Messung in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Sofern nicht für die Aktivierung des Mangan-Komplexes eine in Abschnitt 3.6.2 dargestellte kontrollierte Beleuchtung durchgeführt wurde, erfolgte die gesamte weitere Handhabung und der Einbau in den vor Lichteinfall geschützten Resonator im Dunkeln bzw. bei schwachem Grünlicht und soweit möglich bei konstanter Kühlung durch flüssigen Stickstoff.

3.5.2 D₂O-ausgetauschtes PSIIcc-Lösung und -Einkristalle

Zur Untersuchung der Wasserstoffverbrückung des Y_D[•] (s. Kapitel 9) wurde ein D₂O-Austausch sowohl an Lösungsproben wie auch an aus diesen gewonnenen Einkristallen vorgenommen; die Präparation erfolgte auch hier an der TU Berlin. Die Lösungsproben wurden dabei in einem Verhältnis von 100 μ l H₂O-PSII-Lösung zu 1 ml D₂O-Puffer (40 mM PIPES pD 7.4, 5 mM CaCl₂, 0.015 % β -DM) versetzt und anschließend auf 100 μ l aufkonzentriert. Nach zweimaliger Wiederholung sollte die erreichte H₂O-Konzentration unter

0.1 % liegen. Einkristalle wurden in D₂O-Puffer (40 mM PIPES pD 7.4, 5 mM CaCl₂, 0.015 % β -DM, 10 % PEG 2000 in D₂O) eingelegt. In dem gleichen Puffer erfolgte dann die Inkubation mit Glycerin wie auch bei der Inkubation regulärer Kristalle in 4 Schritten, in denen die Glycerin-Konzentration von 10 über 15 und 20 auf letztendlich 30 % erhöht wurde. Während der einstündigen Inkubationszeit wurde darüber hinaus noch einmal der Puffer erneuert, um Reste an H₂O auszuspülen.

Durch die Behandlung erwartet man einen selektiven Austausch von vorwiegend ionisch gebundenen Protonen durch Deuteronen; im Fall des Tyrosin-D sollte so nur das wasserstoffverbrückte Proton am Brückenpartner austauschen, während die Protonen am Y_D selbst erhalten bleiben. Diese Annahme findet sich durch die in Kapitel 9 dargelegten Messungen bestätigt: es wurde jedenfalls keine Hinweise auf nennenswerte andere Deuteriumkopplungen am ausgetauschten Y_D[•] gefunden.

3.5.3 Lösungsproben aus Spinat

Die *cw*-EPR-Spektren in Abb 4.2 wurden an einer aus Spinat (*Spinacia oleracea*) gewonnenen Präparation gemessen, die im Rahmen einer Kooperation über die Generierung der verschiedenen Signale des S₂-Zustands des wasseroxidierenden Komplexes (s. Kap. 4.2) innerhalb des Sfb-498 von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dau zur Verfügung gestellt wurde. Die Präparation beruht auf einer Weiterentwicklung des ursprünglich von Berthold, Babcock und Yocum entwickelten [99] und darum auch unter der Bezeichnung *BBY* bekannten Präparationsverfahrens, das an anderer Stelle ausführlich dargestellt ist [100, 101].

3.6 Experimenteller Aufbau

3.6.1 Bruker-Spektrometer, W- und X-Band

Die Hochfeldspektren dieser Arbeit entstanden an einem BRUKER ELEXSYS 680 W-Band-Spektrometer. Dieses beinhaltet eine E680-PU Leistungserweiterung auf 100 mW, einen BRUKER TERAFLX EN-6000-1021H ENDOR-Resonator und als Radiofrequenzverstärker für die ENDOR-Messungen einen AMPLIFIER RESEARCH 140A400. Der Kryostat ist vom Typ OXFORD CF-960, der Temperaturregler ein OXFORD ITC-503.

Für die Aufnahme der in Abb. 4.2 gezeigten *cw*-EPR-Spektren wurde ein BRUKER SHQ-Resonator in einem BRUKER ELEXSYS 580 X-Band-Spektrometer verwandt.

3.6.2 Beleuchtungsaufbau und Zustandsgenerierung

Unter Lichteinfall durchläuft ein funktional vollständiges Photosystem II, wie zuvor dargestellt, den Kok-Zyklus, in dessen Ablauf es Wasser oxidiert und molekularen Sauerstoff freisetzt. Eine EPR-Untersuchung der dabei vorkommenden Zwischenzustände des Mangankomplexes ist zuvorderst daran gebunden, den gewünschten Zustand möglichst vollständig in der Probe zu generieren, um so das Signal zu optimieren und überlagernde Signale von anderen Zuständen zu unterdrücken. Dabei sind die im Kok-Zyklus auftretenden Übergänge abhängig von der Temperatur der Probe während der Belichtung; so geht der wasseroxidierende Komplex bei einer Temperatur von 200 K zwar vom Dunkelzustand S_1 in den *Multiline*-Zustand S_2 über, die für den weiteren Übergang zu S_3 notwendige Deprotonierung ist dabei aber energetisch nicht mehr möglich — der S_2 -Zustand wird also bei sättigender Beleuchtung von nahezu allen in der Probe befindlichen PSII angenommen. Um die Generierung verschiedener Zustände des Mangankomplexes bei den erforderlichen Temperaturen möglichst definiert gewährleisten zu können, wurde darum im Rahmen dieser Arbeit ein zwischen etwa 100 und 280 K frei temperierbarer Beleuchtungsaufbau realisiert. In diesem durchläuft das Licht einer 250-W-Lampe zuerst einen Wasserfilter, der aus dem Licht hauptsächlich die Ultraviolett- und einen Teil der Infrarot-Anteile herausfiltert. Ein daran anschließendes Linsensystem inklusive eines weiteren Infrarot-Filters dient zur Fokussierung des Strahls auf die Probe, die sich bereits im für die anschließende Messung verwandten EPR-Röhrchen befindet. Dieses ist frei drehbar in einem Glaskolben aufgehängt, durch den durchgehend Stickstoff geleitet und in dem ständig die Temperatur in Probenhöhe gemessen wird. Die Generierung und Temperatureinstellung des Stickstoff-Stroms erfolgt über eine Temperiereinheit vom Typ BRUKER ER 4111 VT. Ein um das Stickstoff leitende Röhrchen angebrachter Glaskolben wird ständig mit Druckluft durchspült, um ein Beschlagen der kalten Glasoberflächen zu verhindern. Dieser wurde von der Glasbläserei des Instituts für Chemie und Biochemie an der FU Berlin nach den erforderlichen Spezifikationen gefertigt.

Zur Generierung des *Multiline*- S_2 -Zustandes erwies sich eine zweiminütige Belichtung bei 200 K, wie sie für die in Kapitel 4 dargestellten Messungen vorgenommen wurde, als ausreichend. Die Proben wurden dabei durchgehend in flüssigem Stickstoff und vor Licht geschützt transportiert. Der Einbau in den Beleuchtungsaufbau erfolgte unter gedämpften Grünlicht unmittelbar vor der Belichtung mit ausreichend Zeit für die Probe, die Temperatur des umströmenden Stickstoffs anzunehmen.

Der hier beschriebene Belichtungsaufbau wurde für diese Arbeit zur Erzeugung des in Kapitel 4 untersuchten S_2 -*Multiline*-Zustands des Mangankomplexes verwendet; innerhalb

einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dau im Rahmen des Sfb 498 wurde ferner versucht, für nachfolgende EXAFS-Messungen die Generierung der verschiedenen S_2 -Zustände zu optimieren.

3.6.3 Winkelabhängige Messungen mit Goniometern

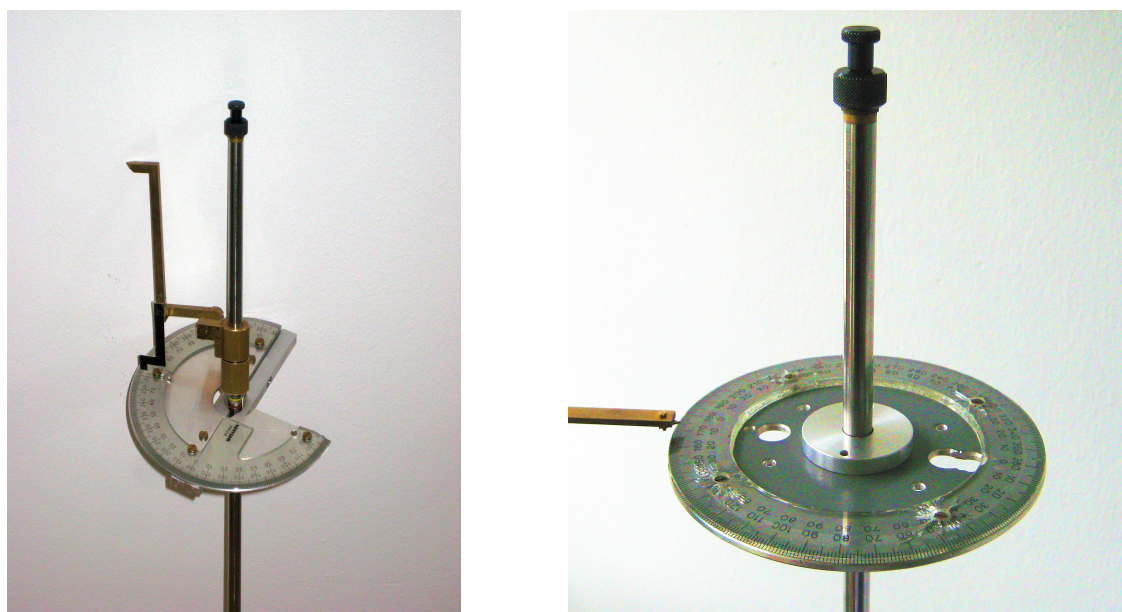


Abbildung 3.6: Die für die vorliegende Arbeit konstruierten und in ihr zur Winkeleinstellung der Einkristallproben angewandten Goniometer für das BRUKER-Spektrometer ELEXSYS E580 (X/Q-Band, links) und für das BRUKER-Spektrometer ELEXSYS E680 (W-Band, rechts). Im X/Q-Band dreht sich der Zeiger mit dem Probenstab, während die Winkelskala an der Apparatur fixiert ist; im W-Band ist es umgekehrt.

Die Aufnahme von EPR- und ENDOR-Rotationsspektren an Einkristallen erfordert eine exakte und — während der eigentlichen Messung — reproduzierbare Einstellung von Drehwinkeln des Probenröhrchens. Zu diesem Zweck wurden sowohl für das BRUKER E580- als auch für das BRUKER E680-Spektrometer Goniometer entworfen und anschließend von der Feinwerktechnik am Fachbereich hergestellt, die ein Ablesen des relativen Drehwinkels ermöglichen. Lichtbilder derselben finden sich in Abb. 3.6. Im Falle des X/Q-Bandes handelt es sich dabei um einen Zeiger, der am drehbaren Probenstab befestigt ist und auf eine am Probenstabhalter fixierte Winkelskala zeigt. Das W-Band-Goniometer besteht aus einer mitdrehend am Probenstab angebrachten Winkelskala, auf die ein fest am weiteren Aufbau installierter Zeiger gerichtet ist. In beiden Fällen muss der jeweils einzustellende

Drehwinkel per Augenschein abgelesen und gegebenenfalls nachjustiert werden. Die dabei erreichbare Genauigkeit liegt deutlich unter $\pm 1^\circ$ pro Winkeleinstellung und muss bei der Abschätzung der Ungenauigkeiten berücksichtigt werden — durch die Verwendung von bis zu 19 Spektren pro 180° -Rotationsspektrum werden die hierbei entstehenden zufälligen Abweichungen allerdings zum Teil wieder kompensiert.

Der mathematische Formalismus zur Beschreibung der so umgesetzten Einkristall-Drehung findet sich in Anhang A.1.1.

Teil II

Mn_4Ca

Kapitel 4

Der Mangankomplex im Kok-Zyklus

Die die oxygene Photosynthese definierende Reaktion von Wasserspaltung und die damit einhergehende Erzeugung molekularen Sauerstoffs wird in der Natur an einem auf der lumenaren Seite des PSII gebundenen Mangankomplex vollzogen. Die molekularbiologische Aufklärung dieser Reaktion erfordert ein detailliertes Verständnis über den Aufbau des Wasseroxidierenden Komplexes wie über seine chemischen Reaktionen innerhalb des mehrstufigen Prozesses. Einen wichtigen, lange erwarteten Beitrag hat kürzlich die Röntgenkristallographie mit der Veröffentlichung einer Struktur von 1,9 Å Auflösung geleistet, welche die Bestimmung der Zusammensetzung des Komplexes und über die Position der Metall- und Sauerstoffionen die chemische Bindungssituation innerhalb des Komplexes erschließen lässt [24]. Die schrittweise Oxidation des Wassers strukturell beschreiben zu können, erfordert im Weiteren eine genaue Vermessung der Intermediate des Wasseroxidierenden Komplexes entlang des Kok-Zyklus. Hier kann die EPR neben anderen spektroskopischen Methoden wichtige Beiträge leisten. Die Möglichkeiten der EPR, sehr detailliert und genau einzelne Kopplungen und Signale zu untersuchen, stellen im Fall eines komplexen, vielatomigen Reaktionszentrums, wie es das wasseroxidierende des Photosystem II ist, allerdings auch ihre größte Herausforderung dar. Bei aller Genauigkeit muss ein Weg gefunden werden, die Komplexität der gemessenen Signale einzugrenzen, um aus der sich überlagernden Vielzahl der Kopplungen auf die zugrunde liegende Natur der Reaktion schließen zu können.

4.1 Schrittweise Wasseroxidation

Zentral für das Verständnis der Wasserspaltung sind die chemischen Veränderungen, die der Mangankomplex beim lichtinduzierten Durchlauf durch den Kok-Zyklus, wie er in Ab-

schnitt 2.3.2 erläutert wurde, erfährt. Hierzu müssen nicht nur die im Komplex auftretenden Oxidationsstufen der Manganionen ermittelt werden, es muss ein insgesamt kohärentes Bild eines vierphotonigen Reaktionsablaufs mit mehreren metastabilen Zwischenschritten des Komplexes entworfen und überprüft werden.

Unter dieser Zielsetzung kam in jüngerer Zeit dem genauen Ablauf der einzelnen Schritte der Wasseroxidation vermehrt Aufmerksamkeit zu. Dies führte zu einer Präzisierung des klassischen, in Abschnitt 2.3.2 vorgestellten Kok-Zyklus. Derweil es über einzelne Zwischenzustände noch Klärungsbedarf gibt — insbesondere die den direkten Schritt der Wasseroxidation umgebenden¹ —, bildet sich mehr und mehr ein belastbares und detaillierteres Bild der Einzelprozesse heraus, die angeordnet nach den anregenden Blitzen dem bekannten Kok-Zyklus analog laufen. Ein entsprechendes Modell ist in Abbildung 4.1 dargestellt, welches den Ausführungen von Dau und Haumann, 2007 [103–105] folgt.

Die Modellierung des Mechanismus der Wasserspaltung ist dabei nur durch eine Kombination aller zur Verfügung stehenden Methoden erreichbar. Röntgenkristallographische Untersuchungen vermitteln einen detaillierten Einblick in die Struktur des Mangankomplexes und seiner Proteinumgebung und geben durch die räumlichen Strukturen Vorgaben für die möglichen Ligandierungen und an der Reaktion teilnehmenden Wassermoleküle; auf diese Art die Struktur von Intermediaten aufzulösen, erscheint derweil nicht im Bereich der Möglichkeiten. EXAFS liefert wichtige Daten über die Oxidationsstufen der Manganionen und ihrer Entfernung zueinander, aufgrund derer versucht werden kann, den Aufbau des Mangankomplexes zu rekonstruieren; es fehlt ihr allerdings — unter Verwendung nicht oder nur schwach orientierter Proben — ein direkter Zugang zu Richtungsinformationen, die für eine zuverlässige Verankerung der gefundenen Werte in der Molekülgeometrie Voraussetzung sind. Beide Methoden sehen sich zudem vor der Herausforderung, dass ihre Verwendung von Röntgenstrahlung in den Proben Strahlenschäden hervorrufen kann, was insbesondere die Untersuchung höherzahliger *S*-Zustände erschwert. Die Strahlenschäden können dabei durchaus zur Reduzierung der Mangan-Oxidationsstufen und damit einhergehender veränderter Bindungssituation wie auch zur Abtrennung einzelner Ionen aus dem Komplexverbund führen und wurden ausführlich studiert [89, 106, 107].

EPR kann an dieser Stelle einen wichtigen Teil zur Aufklärung der Bindungssituation und des Mechanismus beitragen. Durch orientierungsselektive Hochfeld-Messungen und schließlich die Verwendung von PSII-Einkristallen kann sie Aussagen über die Orientierung von Kopplungen innerhalb des Proteins treffen; durch eine Analyse der Hyperfeinstruktur am

¹vergl. hierzu auch die Debatte um die Identifizierung eines möglichen Intermediats $S_2Y_ZH_2O_2$ zwischen S_4 und S_0 durch Clausen und Junge, 2004 im *Commentary*-Teil von *Science*, Vol. 312 [102]

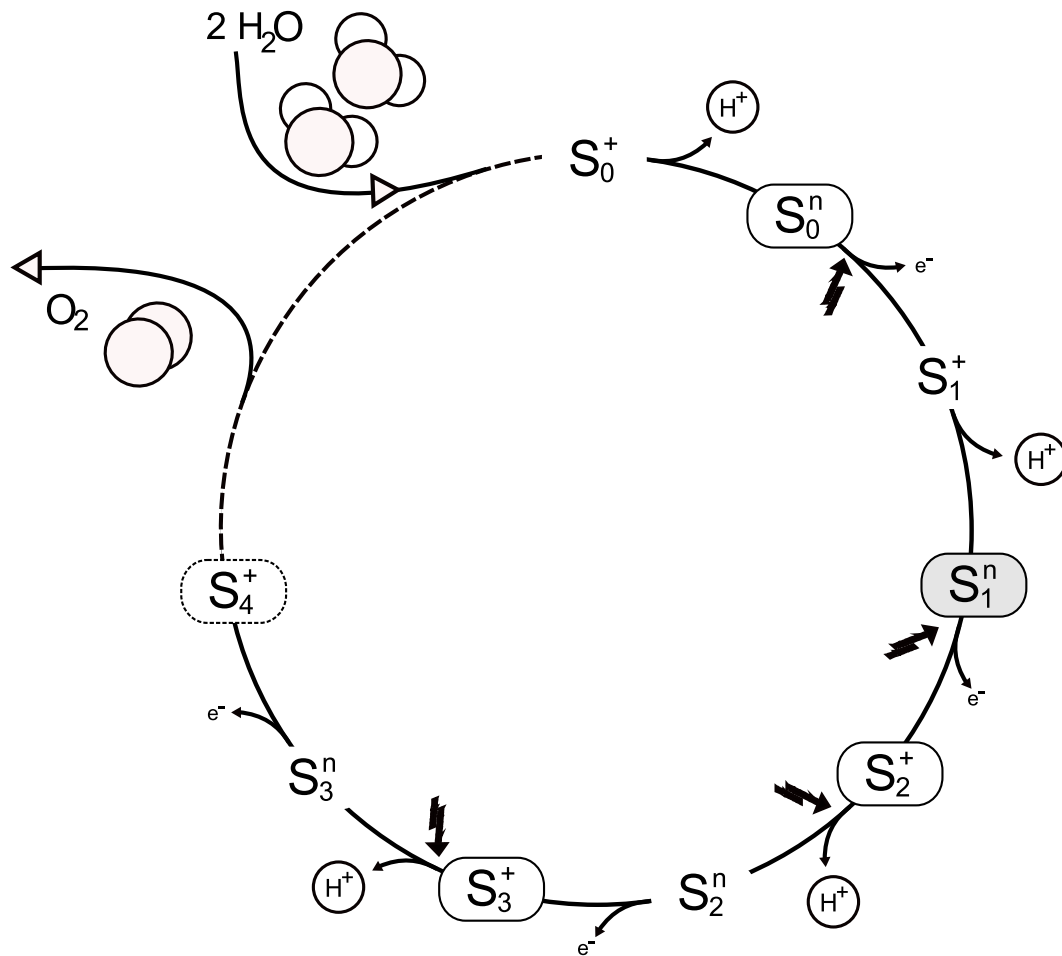


Abbildung 4.1: Der Photozyklus des Mangankomplexes nach Dau und Haumann [104, 105]. Am Komplex binden zwei Wassermoleküle. Die eingezeichneten Lichtblitze treiben die Reaktion voran; dem Gesamtkomplex werden so im Wechsel Elektronen und Protonen entzogen, bis schließlich molekularer Sauerstoff freigesetzt wird und neue Wassermoleküle an den Komplex binden können. Die eingerahmten Zustände entsprechen den S-Zuständen des klassischen Kok-Zyklus. Zudem ist der Ladungszustand des Komplexes relativ zum Dunkelzustand S_1 angegeben.

Mangankomplex kann sie zudem Erkenntnisse über dessen Ligandierungen innerhalb des Reaktionszyklus gewinnen. Von den vier semi-stabilen S -Zuständen S_0 bis S_3 sind zwei, S_0 und S_2 , paramagnetisch und stehen somit einer Untersuchung mittels EPR-Methoden direkt zur Verfügung. Von diesen beiden konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf den Zustand S_2 , um an diesem leichter zu untersuchenden Zustand exemplarisch die Möglichkeiten wie auch die noch bestehenden Schwierigkeiten der EPR an dem biologisch komplexen Reaktionszentrum aufzuzeigen.

4.2 Der Zustand S_2 in der EPR

Der aus dem Dunkelzustand S_1 nach Lichtabsorption des PSII hervorgehende Zustand S_2 im Kok-Zyklus ist einer der am weitesten mit EPR-Methoden untersuchten Zwischenstufen des Mangankomplexes auf dem Weg zur Wasserspaltung. Er ist als Zustand mit einem effektiven Gesamtspin $S=1/2$ paramagnetisch, vergleichsweise einfach zu generieren und weist bei den für die Messung erforderlichen Tieftemperaturen die für längere Messungen notwendige Stabilität auf. Welche Kombination von Einzelspins sich zu dem Gesamtspin zusammensetzen — zumeist wird heute ein $\text{Mn}_4(\text{III},\text{IV},\text{IV},\text{IV})$ -Komplex angenommen, aber auch ein $\text{Mn}_4(\text{III},\text{III},\text{III},\text{IV})$ -Zusammensetzung ist in der Diskussion [108] — kann nicht als abschließend entschieden betrachtet werden. Die Signale zeigen zudem sehr komplexe Linienformen, sodass eine schlüssige Simulation der Daten und damit die Bestimmung der physikalisch interessanten Größen bislang nur näherungsweise möglich war.

Zu unterscheiden ist zwischen dem um $g=2$ zentrierten Signalzustand, der 1981 von Dismukes und Siderer erstmals gezeigt werden konnte [109] und auf dem das Hauptaugenmerk der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen liegt; und Signalen um $g=4,1$ bzw. $g=6$ und $g=10$, die auf höhere Spinzustände des Mangankomplexes zurückgehen. Diese können durch chemische Vorbehandlung der Probe oder Beleuchtung bei sehr tiefen Temperaturen angeregt werden, zeigen aber nur begrenzte Lebensdauer. Sie lassen sich zudem durch geeignete Signalgenerierung aus dem $g=2$ -Signal erzeugen, zerfallen aber auch wieder in dieses. Diese aufwendiger hergestellten Signale bieten sich für eine einleitende Aufklärung der Natur des S_2 -Zustands weniger an: sie sind weniger stabil, was die Messzeiten gerade an Kristallen empfindlich einschränkt. Ihr sehr breites Signal findet sich zudem im Niederfeldbereich, das vom verwendeten W-Band-Magneten standardmäßig schwerer zu erfassen ist. Auch sind Änderungen in der Präparation von Kristallen nicht trivial. All dies schließt eine detaillierte Untersuchung dieser Zustände mittels EPR nicht aus, macht aber das Signal um $g=2$ zum logisch ersten Schritt der Charakterisierung des Mangankomplexes im

S_2 -Zustand.

4.2.1 Höhere Spin-Zustände des Mangankomplexes

Die Generierung höherer Spinzustände erfolgt für gewöhnlich durch eine Probenbelichtung bei sehr niedrigen Temperaturen unter 150 Kelvin [110, 111] oder durch die Verwendung von Zuckern als Gefrierschutz und das Weglassen von normalerweise hierfür verwendeten Alkoholen [112, 113]; im letzteren Fall treten diese Zustände dann auch durch Belichtungen mit infrarotem Licht bei 200 K auf. Bei diesen Temperaturen ist zudem ein Protonen-transfer und damit der Schritt von S_2 nach S_3 energetisch nicht mehr möglich, sodass eine im idealen Fall maximale Zustandspopulation der in der Probe enthaltenen Zentren im S_2 -Zustand erzeugt wird. Inzwischen wird davon ausgegangen, dass als Ergebnis beider Verfahren derselbe Zustand auftritt, in dem das Mangan-Tetramer zu einem effektiven Spin $S=5/2$ koppelt [114–117]. Eine Übersicht über die möglichen Prozesse, die zu den höheren Spinzuständen führen, findet sich bei Yachandra, 2005 [118].

Abbildung 4.2.b zeigt das X-Band-Spektrum einer bei 130 K für 150 Sekunden mit intensivem Weißlicht beschienenen PSII-Spinat-Probe, die nach dem BBY-Protokoll mit verringertem Alkoholanteil präpariert wurde. Das das Spektrum dominierende, breite Signal im Bereich von etwa 1200 bis 2100 Gauß ist eben das $g=4,1$ -Signal. Nach einer Abklingzeit von 15 Minuten bei 200 Kelvin ist, wie in Abb. 4.2.c zu ersehen, der größte Teil des $g=4,1$ -Signals zerfallen und erscheint umgewandelt als das sogenannte *Multiline*-Signal um etwa $g=2$. Das Differenzspektrum 4.2.d zwischen beleuchtetem und abgeklungenem Signal (MLS minus $g=4,1$) zeigt den zerfallenen Anteil des $g=4,1$ -Signals invertiert und das entstehende ML-Signal im Vergleich und bereinigt von Untergrundsignalen.

Konsistent mit der Literatur zeigt sich in den Spektren das Auftreten eines noch nicht vollständig aufgeklärten langlebigen Anteils des $g=4,1$ -Signals, der sich in seiner Lebenszeit nicht grundlegend von dem des MLS unterscheidet und auch in der $g=3$ -Signalgenerierung bei einer Temperatur von 200 K auftritt [117].

Zudem wurde das Auftreten weiterer vom S_2 -Zustand hervorgerufener Signale berichtet [119, 120], die nach einer Belichtung zwischen etwa 20 und 65 Kelvin auftreten und ebenfalls auf einen Zustand mit effektivem Spin $S=5/2$ zurückgeführt wird.

Höhere Spin-Zustände wurden auch für Cyanobakterien wie das hier im Weiteren untersuchte *Th. elongatus* berichtet, wenn sich die Ergebnisse bezüglich des Auftretens eines $g=4,1$ -Signals hier auch noch widersprechen [121–123]. Dies ist für die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Untersuchungen an Einkristallen insoweit von Bedeutung, als dass das Auftreten anderer S_2 -Zustände auf Kosten des *Multiline*-Signals zur Optimierung der

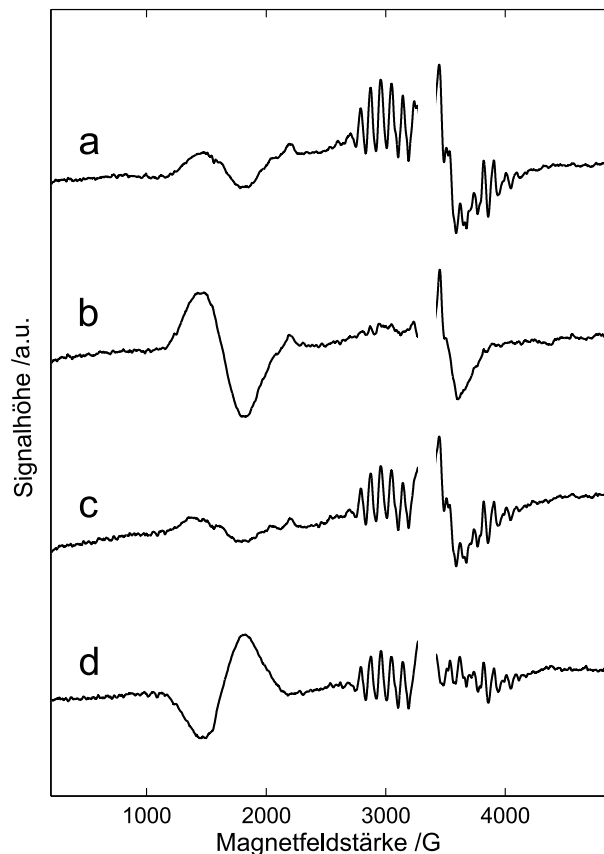


Abbildung 4.2: EPR-*cw*-Spektren des S_2 -Zustandes bei einer Mikrowellenfrequenz von 9,4 GHz in Spinat-BBY-Präparierung. *a*: Probe nach 2-minütiger Belichtung mit intensivem Weißlicht (siehe Abschn. 3.6.2) bei 200 Kelvin; das *Multiline*-Signal zwischen etwa 2600 und 4200 Gauß dominiert das Spektrum, um etwa 1700 Gauß erscheint ein schwächerer Anteil des $g=4,1$ -Signals. *b*: Probe nach 150-sekündiger Belichtung bei 130 Kelvin; alle im S_2 -Zustand befindlichen Zentren zeigen das $g=4,1$ -Signal. *c*: Dieselbe Probe wie in *b* nach 15-minütiger Abklingzeit bei 200 Kelvin; das bei dieser Temperatur instabile $g=4,1$ -Signal wandelt sich zu einem großen Teil in das *Multiline*-Signal um; ein Anteil des $g=4,1$ -Signals bleibt stabil, der von den Größenverhältnissen in etwa dem Anteil entspricht, der auch in Spektrum *a* als $g=4,1$ -Signal auftritt. *d*: Differenzspektrum $c - b$ zeigt invertiert den zerfallenen Anteil des $g=4,1$ -Signals und das entstandene *Multiline*-Signal.

In allen Spektren wurde der Bereich des von der Signalthöhe dominierenden Signals des Y_D^\bullet ausgeblendet. Von den Spektren *a* bis *c* wurde zudem das Spektrum einer dunkeladaptierten BBY-Probe subtrahiert, um Hintergrundsignale zu entfernen; in diesen Spektren erscheinen allerdings noch durch die Beleuchtung induzierte Hintergrundsignale. Im Differenzspektrum *d* sieht man dagegen die reinen Anteile des $g=4,1$ - bzw. *Multiline*-Signals.

Spektren aufgenommen bei einer Temperatur von 130 bzw. 200 K.; Mikrowellenenergie 20 mW; Modulationsbreite 20 G.

Signalausbeute möglichst verhindert werden sollte. Da das *Multiline*-Signal im W-Band nur bei Tieftemperaturbedingungen um 5 K nachgewiesen werden kann, erschwert dies die nachträgliche Beleuchtung der Probe im Resonator; gleichzeitig erlaubt die Verwendung von Einkristallen in der Praxis nicht den Ausbau der Probe ohne Verlust der für die Messung elementaren Orientierungsinformation.

4.2.2 Das *Multiline*-Signal des S_2 -Zustands

Das *Multiline*-Signal entlehnt seinen Namen aus dem Auftreten von etwa achtzehn bis zwanzig Linien im EPR-Spektrum [109] bei einer Mikrowellenfrequenz von 9,4 GHz (dargestellt in Abb. 4.2.a und .c, untergrundbereinigt in 4.2.d), die durch eine komplexe Überlagerung von Hyperfein-Wechselwirkungen entstehen. Dass zu dem Signal, entgegen früheren Modellen [124, 125], nach neueren Untersuchungen [126, 127] alle vier Manganionen beitragen, steht auch in Übereinstimmung mit vorliegenden ^{55}Mn -ENDOR-Messungen [128–131]; die dichte Konfiguration der Manganionen in den neueren Röntgenstrukturen und die sich aus den EXAFS-Daten ergebenden geringen Abstände der Ionen untereinander legen dies zudem zumindest nahe.

Aufgrund seiner komplizierten Struktur müssen bisherige Bemühungen, den \mathbf{g} -Tensor wie die Hyperfein-Wechselwirkungen der Manganionen aufzuklären, als nicht abgeschlossen angesehen werden. Allerdings konnte EPR bei 94 GHz bereits zur Aufklärung der Hauptwerte zweikerniger Mangan-Modellkomplexe beitragen [132–134]. Erste W-Band-*cw*-EPR-Messungen an einem PSII_{cc}-Einkristall, nicht aber an gefrorener Lösung, wurden von Kawamori *et al.* präsentiert [135, 136].

In dieser Arbeit werden im Folgenden Puls-EPR-Untersuchungen an gefrorener Lösung wie an Einkristallen aus *Th. elongatus* bei 94 GHz Mikrowellenfrequenz dargestellt und mit bisher erreichten Ergebnissen verglichen.

Kapitel 5

Hochfeld-EPR am Mangankomplex

5.1 Das Mangansignal unter Hochfeldbedingungen

Das im X-Band noch als Multiline-Signal auftretende EPR- $g=2$ -Signal zeigt bereits im Q-Band eine feststellbare Reduktion in der sichtbaren Hyperfeinstruktur [129]; die Messung einer Probe gefrorener PSIIcc-Lösung bei einer W-Band-Mikrowellenfrequenz von 94 GHz — gezeigt in Abb. 5.1 — weist ebenfalls ein breites, nurmehr gaußförmiges Signal auf. Spektrum *a* in Abb. 5.1 gibt dabei das Signal nach einer zweiminütigen Beleuchtung bei einer Temperatur von 200 K mit einer 180-W-Weißlichtlampe wieder. Spektrum *b* zeigt das Signal vor der Beleuchtung, sodass sich hier die Reaktionszentren überwiegend im dunkeladaptierten, nicht paramagnetischen S_1 -Zustand befinden. Spektrum 5.1c entsteht als Differenzspektrum aus der Operation ($a - b$) und repräsentiert damit im Wesentlichen das durch die Belichtung erzeugte Signal des S_2 -Zustandes.

In allen Spektren finden sich in einem Bereich um $g=2,005$ Spuren des im Vergleich scharf ausgeprägten Signals des Tyrosinradikals Y_D^\bullet , das in den Kapiteln 6 bis 9 näher untersucht wird. Die Existenz des Y_D^\bullet -Signals in der dunkeladaptierten Probe, Spektrum 5.1b, ist ein Hinweis auf die wesentlich längere Lebensdauer des Radikals im Vergleich zum hier betrachteten S_2 -Zustand des Mangankomplexes. Durch die Beleuchtung verursachte Veränderungen innerhalb des Y_D^\bullet führen dazu, dass dieses Signal auch im Differenzspektrum 5.1c nicht vollständig verschwindet.

Als weitere Untergrundsignale tauchen die wohlbekanntesten Linien freier Manganionen, Mn^{2+} , in den Spektren *a* und *b* auf. Diese sechs Signale — von denen eines hier mit dem Y_D^\bullet -Signal zusammenfällt — erscheinen bei hochfrequenten EPR-Messungen als scharfe äquidistante Linien, sobald Spuren freien Mangans in der Probe enthalten sind, etwa aus beschädigten Manganzentren [137]. Ihr Auftreten in den Spektren als ins Negative

Tabelle 5.1: **g**-Tensor-Hauptwerte

	Ref.	g_x	g_y	g_z	Mw-Frq.
Kulik <i>et al.</i> , 2005	[129]	1,97	1,97	1,99	34 GHz
Charlot <i>et al.</i> , 2005	[139]	1,988	1,985	1,975	9 GHz
Peloquin <i>et al.</i> , 2000	[128]	1,97	1,97	1,99	9 GHz
Hasegawa <i>et al.</i> , 1998	[127]	1,993	1,990	1,976	9 GHz
Zheng <i>et al.</i> , 1996	[126]	2,00	2,00	1,98	9 GHz
diese Arbeit		1,997	1,970	1,965	94 GHz

Tabelle 5.1: Die hier bestimmten **g**-Tensor-Hauptwerte im Vergleich mit früheren Veröffentlichungen.

verkehrte Signale verweist auf die unterschiedlichen Übergangsmomente und das dadurch veränderte Spinflip-Verhalten des $S=5/2$ -Spins von freiem Mn^{2+} in Puls-Experimenten, da die experimentellen Pulsparameter für die Messung von $S=1/2$ -Zuständen optimiert sind, wie sie der S_2 -Mangankomplex und das Y_D^\bullet zeigt. Da die Mangansignale im Differenzspektrum weitgehend verschwinden, wurde hier darauf verzichtet, diesen Effekt für eine experimentelle Signaltrennung auszunutzen, wie es andernorts erfolgreich demonstriert werden konnte [138].

Zusätzlich findet sich in den Spektren *a* und *b* auf der Niederfeldseite des S_2 -Signals ein wesentlich breiteres Untergrundsignal, das durch die Probenbelichtung keine Veränderung erfährt und darum im Differenzspektrum 5.1c nicht mehr auftaucht.

Das eigentliche Signal des Mangankomplexes im S_2 -Zustand zeigt eine gaußförmige Gestalt um eine Signalmitte bei etwa $g=1,976$ mit einer Signaltbreite¹ von etwa 85 mT bzw. einer gesamten Signalausdehnung von 202 mT. Damit ist das Signal etwa 25 mT breiter als im X-Band bei 9,4 GHz.

¹gemäß voller Breite bei halbem Signalmaximum, *FWHM*

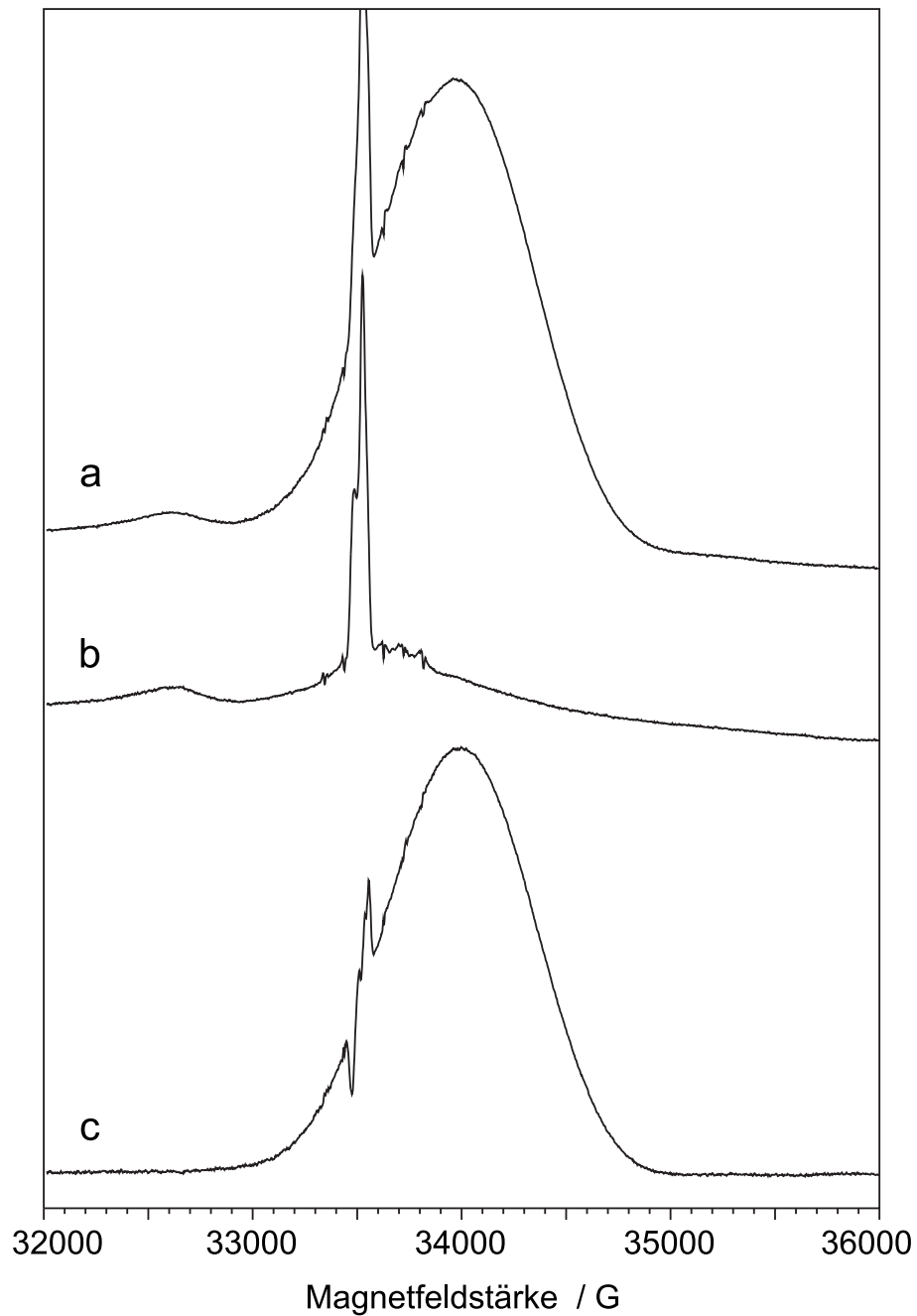


Abbildung 5.1: 94-GHz-FSE-Spektrum gefrorener PSIIcc-Lösung von *Th. elongatus* im S_2 -Zustand; *a*: nach zweiminütiger Beleuchtung bei 200 Kelvin mit einer 180-Watt-Weißlichtlampe; *b*: das Dunkelsignal vor der Beleuchtung; *c*: das Differenzspektrum $a - b$ zeigt das bereinigte ML-Signal ohne Resonatorhintergrund. Die das Y_D^\bullet -Signal umgebenden Einzellinien stammen von unspezifisch gebundenem freien Mn^{2+} -Ionen. Alle Spektren wurden im W-Band bei einer Temperatur von 5 K aufgenommen. Die Spektren setzen sich aus 4096 Akkumulationen zusammen mit Pulslängen von 28 ns bzw. 56 ns für $\pi/2$ - bzw. π -Pulse

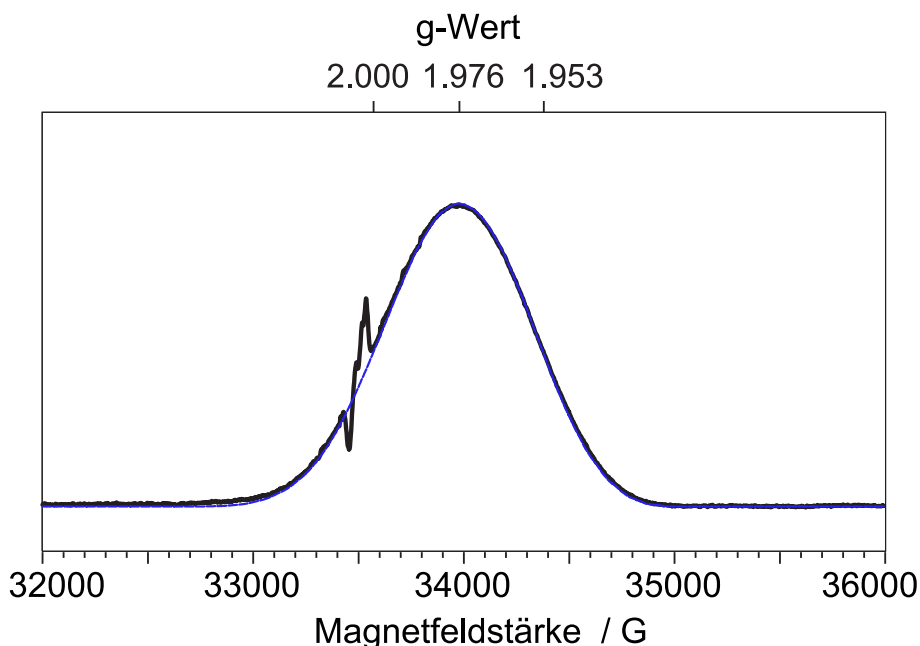


Abbildung 5.2: 94-GHz-FSE-Spektrum gefrorener PSIIcc-Lösung von *Th. elongatus* im S_2 -Zustand nach Abzug des Dunkelspektrums, wie in Abb. 5.1; dazu die Simulation des Signals mit den in Tab. 5.1 angeführten g-Tensor-Hauptwerten. Die Simulation beruht auf einer Behandlung des Problems mit Zweiter-Ordnung-Störungstheorie und berücksichtigt eine Spin-Hamilton-Funktion mitsamt Elektronen-Zeeman- und Hyperfein-Wechselwirkungstermen. Zur Bestimmung der eingehenden Parametersätze s. Kap. 5.3.

5.2 Auflösung der Hyperfeinkopplungsstruktur unter Hochfeldbedingungen

Am Mangankomplex des PSII sowie an vergleichbaren Modellkomplexen konnte eine starke Frequenzabhängigkeit im Auftreten sichtbarer Hyperfeinstruktur nachgewiesen werden [129, 133, 134]. An PSII-Einkristallen konnte eine dazu komplementäre Orientierungsabhängigkeit der sichtbaren Hyperfeinaufspaltungen gezeigt werden [135], wobei die in *cw*-EPR-Spektren bei 94 GHz Mikrowellenfrequenz auftretenden Strukturen jeweils weniger ausgeprägt erschienen als bei X-Band-Messungen an Proben gefrorener Lösung. Die Ergebnisse eines mit Pulsmethoden analog zur EPR an gefrorener Lösung aufgenommenen 180° -Rotationsspektrums am PSIIcc-Einkristall findet sich in Abb. 5.3 und ermöglicht hier eine Einordnung des Phänomens unter identischen Bedingungen für Lösungs- wie Einkristallspektren. Die weitergehende Diskussion dieser Rotationsspektren erfolgt in Abschnitt 5.3. Zur hier relevanten Klärung der nicht mehr erscheinenden Hyperfeinstruktur auf den breiten Mangankomplex-Signalen werden in Abb. 5.4 vier exemplarische Einkris-

tallspektren in einer pseudomodulierten Form dargestellt, um wie zuvor die Details der Signaländerungen visuell stärker hervorzuheben. Hierbei wurden in den FSE-Spektren der Bereich der Y_D -Radikalsignale sowie in den abgeleiteten Spektren zusätzlich der breitere Bereich der Signale freien Mangans ausgeblendet.

Anhand der pseudomodulierten Spektren zeigen sich hier sehr deutlich die Unterschiede im Auftreten von Hyperfeinstruktur: in Spektren wie etwa dem bei 20° Kristallorientierung findet sich über den gesamten Spektralverlauf keine nennenswert aufgelöste, signifikant über das Rauschniveau hinausreichende Struktur; für andere Orientierungen des Einkristalls relativ zur Magnetfeldrichtung treten in Teilbereichen (170° , Abb. 5.4) oder über das gesamte Signal (120°) dem *Multiline*-Signal vergleichbare Hyperfeinstrukturen auf. Die hierbei feststellbaren Signale wirken teils ähnlich regelmäßig wie in Spektren bei einer Mikrowellenfrequenz von 9,4 GHz (vergl. Abb. 4.2) oder auch wie in einigen der von Kawamori *et al.* [135] gezeigten Einkristallspektren, etwa bei 170° auf der Niederfeld-Signalflanke oder bei 120° um das Signalmaximum. An anderer Stelle, etwa bei 120° oder 70° jeweils unterhalb des Y_D^\bullet -Signals, wirken die sichtbaren Strukturen ungeordneter und zeigen keine einheitlich Frequenz im Auftreten lokaler Extrema. Solche Variation ist nicht ungewöhnlich für ein Gesamtsignal, das aus der Überlagerung diskreter orientierungsabhängiger Einzelsignale besteht. Wie in Kapitel 3.4 dargestellt, besteht der PSII_{cc}-Einkristall in seiner $P2_12_12_1$ -Symmetrie aus Elementarzellen mit jeweils vier PSII-Homodimeren, wodurch im allgemeinen Fall und unter Beachtung der nicht-kristallographischen C_2 -Dimerachse acht unterscheidbare Raumorientierungen für jedes Radikal relativ zur Magnetfeldrichtung auftreten.² Die in der Literatur angegebenen Parametersätze für die Hyperfeinkopplungen zeigen zudem vier Kopplungen ähnlicher Größe, die sich im EPR-Spektrum folglich kaum experimentell auflösen lassen und deren Aufspaltungen in vergleichbarer Größenordnung mit der g -Anisotropie in das Spektrum eingehen.

Die beobachtete starke Orientierungsabhängigkeit der auf den Mangankomplex-Signalen liegenden Hyperfeinstruktur legt somit nahe, dass es sich bei dem Verschwinden derselben in Messungen gefrorener Lösung um eine Auswirkung destruktiver Überlagerung der eingehenden Aufspaltungen und Anisotropien handelt, die zu einem Verlust aufgelöster spektraler Details führt. Unorientierte Proben zeigen ein rein stochastisches Auftreten einzelner Wechselwirkungs-Orientierungen, sodass sich die orientierungsabhängigen Hyperfeinkopplungen in der Überlagerung gegenseitig annähernd auslöschen können. In diesem Fall

²In einzelnen Kristallausrichtungen kann das Zusammenfallen von Kristallsymmetrieachsen mit der Magnetfeldrichtung die Unterscheidbarkeit der einzelnen Orientierungen zum Teil aufheben. Dies wird in Kap. 6 anhand vertiefender Untersuchungen von Y_D^\bullet -Rotationsspektren deutlicher hervortreten und entsprechend dort thematisiert.

Tabelle 5.2: Hauptwerte der ^{55}Mn -Hyperfeinkopplungen

Mn_A	Mn_B	Mn_C	Mn_D	Ref.
a_x, a_y, a_z	a_x, a_y, a_z	a_x, a_y, a_z	a_x, a_y, a_z	
235,235,265	185,185,245	310,310,265	175,175,230	[129]
324,351,312	240,306,225	248,263,217	181,184,193	[139]
232,232,270	200,200,250	311,311,270	180,180,240	[128]
248,232,245	291,284,194	110,106,117	295,304,294	[127]
237,237,237	237,237,237	257,257,337	280,280,300	[126]

Tabelle 5.2: Die zu den ^{55}Mn -Hyperfeinkopplungen im S_2 -Zustand publizierten Parametersätze, die in der Analyse der EPR-Spektren zur Anwendung kamen; alle Hauptwerte in MHz. In der vorliegenden Arbeit wurde kein eigenständiger Parametersatz für die Hyperfeinkopplung ermittelt; zur Berechnung der gezeigten Simulationen (Abb. 5.2 und 5.5) wurde der Parametersatz von Kulik *et al.* [129] verwandt.

würden der \mathbf{g} -Anisotropie in der Größe ähnelnde Hyperfeinkopplungen zu einem Verlust sichtbarer Hyperfeinstruktur führen. Dies würde im Besonderen das Auftreten deutlicher Hyperfeinstruktur bei einigen Kristallausrichtungen, das Verarmen und Verschwinden bei anderen Kristallausrichtungen beschreiben, eine Beobachtung, die mittels alternativer Erklärungsansätze, etwa über *g-strain*, nur schwerlich verstehbar erscheint. Gleichsam könnte der Effekt auch vergleichbare Beobachtungen verschwindender Hyperfeinstruktur in anderen Frequenzbereichen und an anderen S -Zuständen des Mangankomplexes erklären [129].

5.3 Rekonstruktion von \mathbf{g} -Tensor und Hyperfeinkopplungs-Parametern

Die Vermessung des Mangankomplex-ML-Signals in Proben gefrorener Lösung allein erlaubt nicht die Bestimmung vollständiger Parametersätze für die \mathbf{g} -Matrix und die eingehenden Hyperfeinkopplungen. Die Simulation des Signals muss beide Wechselwirkungen berücksichtigen, um die Signalposition und -breite sowie die in Abb. 5.4 demonstrierte Orientierungsabhängigkeit im Auftreten von Hyperfeinkopplungsstrukturen auf den Signalen korrekt wiederzugeben. Der Schritt von Proben gefrorener Lösung zu Messungen an Ein-

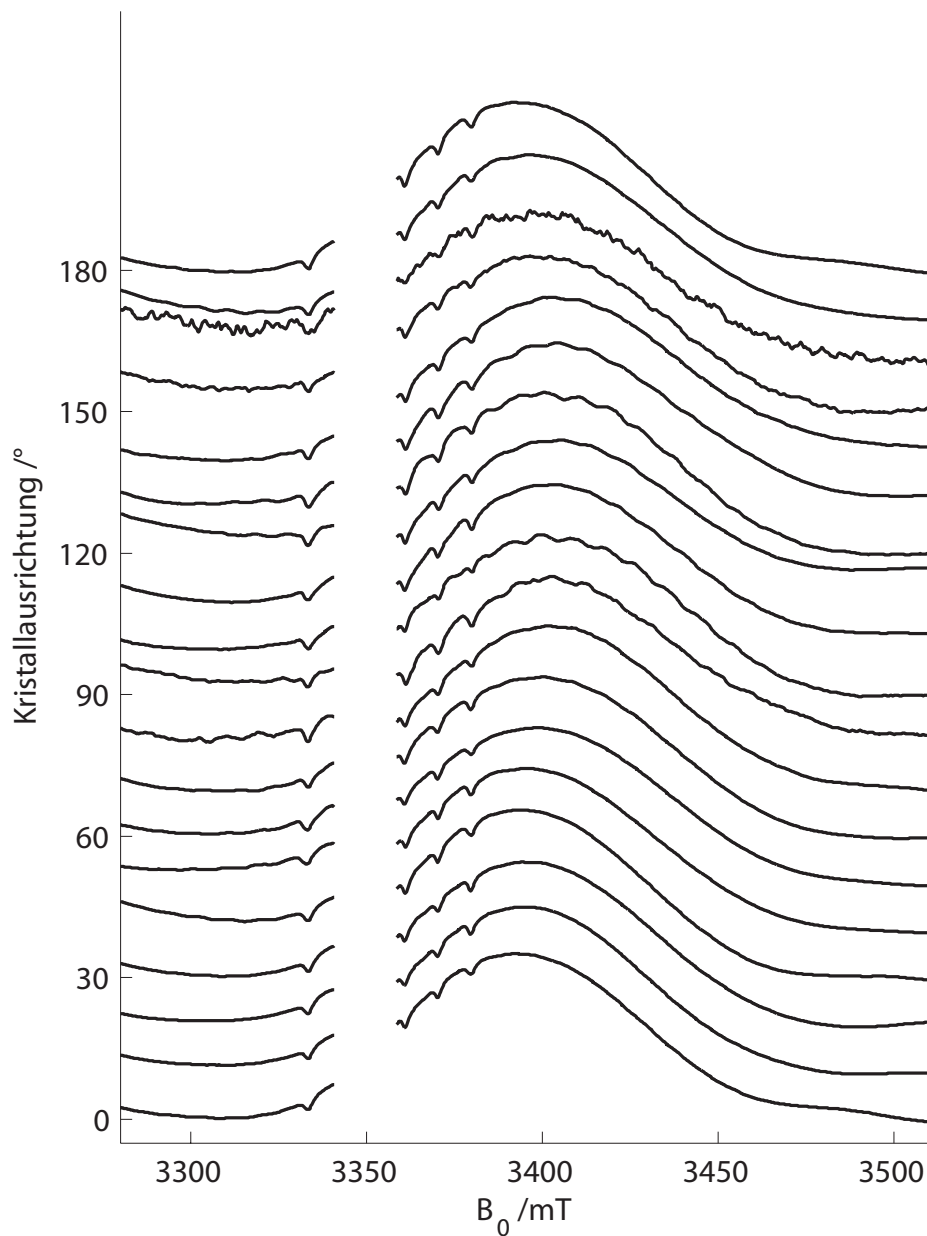


Abbildung 5.3: 94-GHz-Kristallrotationsspektrum des S_2 -Signals des Mangankomplexes bei einer Temperatur von 5 K. Das Signal selbst erscheint vergleichsweise breit und unstrukturiert, orientierungsabhängig zeigt sich bei manchen Kristallausrichtungen Hyperfeinstruktur auf den Signalen. Der vom Signalen des Y_D dominierte Feldbereich wurde ausgelassen. Jedes Spektrum besteht aus insgesamt 4096 Akkumulationen.

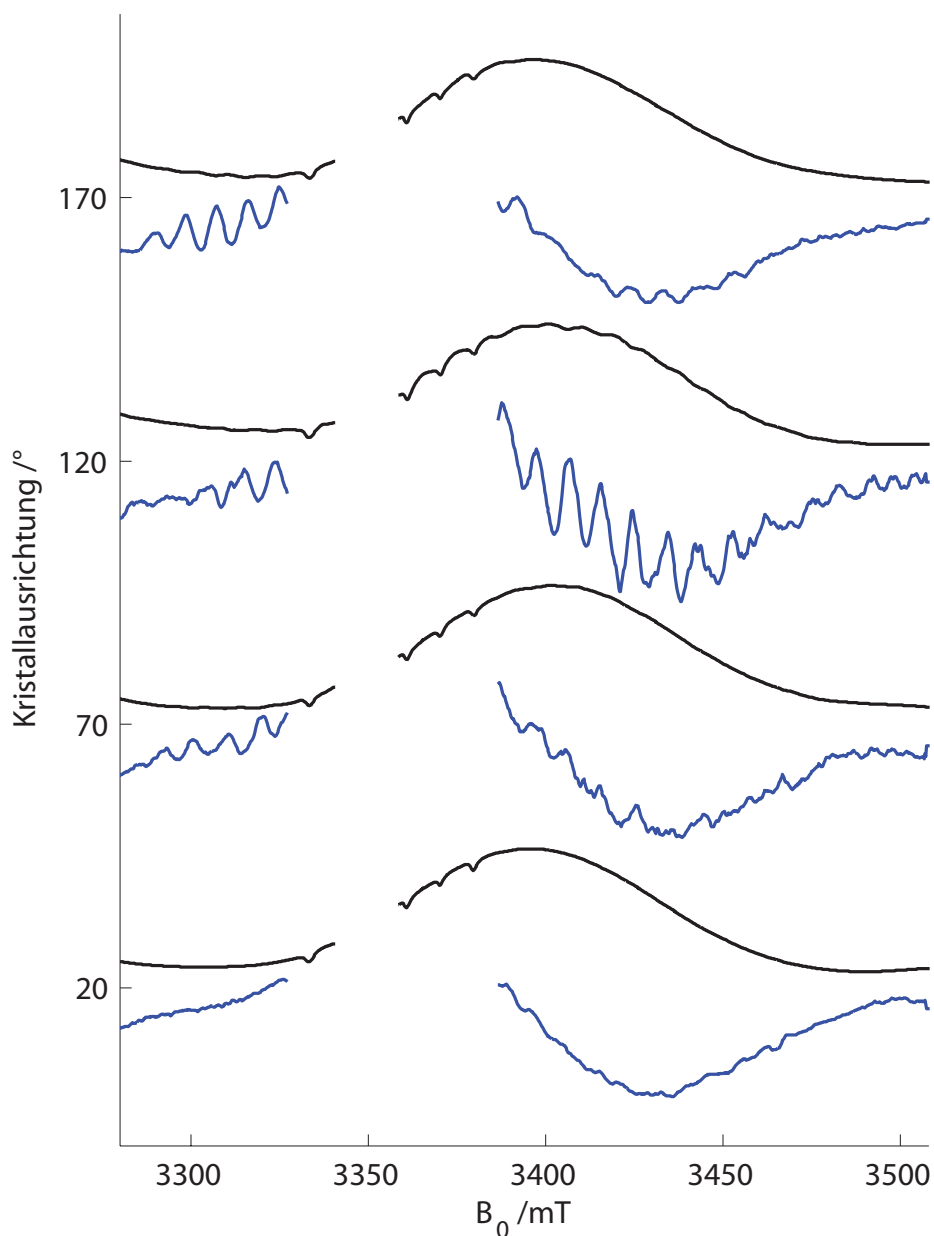


Abbildung 5.4: 94-GHz-Einkristallspektren des S_2 -ML-Signals als FSE (schwarz) und in der einer Ableitung vergleichbaren pseudomodulierten Darstellung (blau) für vier ausgesuchte Orientierungen entlang der in Abb. 5.3 gezeigten vollständigen 180° -Rotation. Die Winkelabhängigkeit der das EPR-Signal modulierenden Hyperfeinstruktur wird so visuell hervorgehoben.

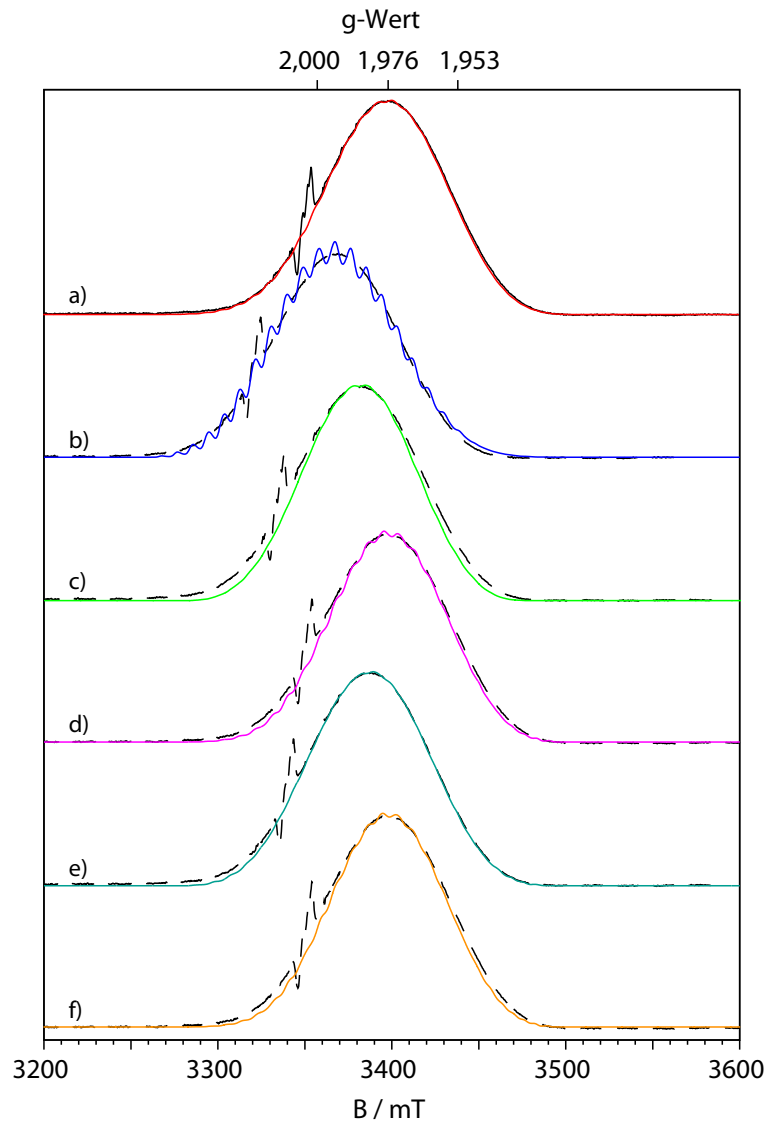


Abbildung 5.5: Simulationen verschiedener Parametersätze, siehe Tab. 5.1 und 5.2, und Vergleich mit der hier durchgeführten Messung des S_2 -Signals, vergl. Abb. 5.2. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde das gemessene Spektrum jeweils an die Feldposition der mit den Parametern der Referenzpublikationen errechneten Simulation verschoben. *a)* hier bestimmte bzw. verwendete Parameter; *b)* Zheng und Dismukes, 1996 [126]; *c)* Hasegawa *et al.*, 1998 [127]; *d)* Peloquin *et al.*, 2000 [128]; *e)* Charlot *et al.*, 2005 [139]; *f)* Kulik *et al.*, 2005 [129].

kristallen, wie er in Abb. 5.3 mittels einer vollständigen 180° -Rotation unternommen wird, erlaubt der EPR einen detaillierteren Einblick in die Geometrie der untersuchten Zentren. Wie in den Kapiteln 6 bis 9 gezeigt werden wird, ermöglicht die Verwendung gerichteter Proben weitreichende Rekonstruktionen der Orientierung von elektromagnetischen Wechselwirkungen, benötigt andererseits aber auch der Komplexität des Systems entsprechendes Vorwissen bzw. einen adäquaten Datenbestand, der eine solch umfassende Rekonstruktion erst realisierbar werden lässt.

Diese Vorbedingungen für eine unabhängige Bestimmung vollständiger Parametersätze sind für den Fall des Wasseroxidierenden Komplexes hier nicht gegeben. Die spektralen Details werden nicht annähernd aufgelöst, sondern erscheinen nur in einer spektral komplexen, stark orientierungsabhängigen Überlagerung, die zu rekonstruieren durch eine schrittweise Anpassung der Simulation an die Daten wenig aussichtsreich ist. Die EPR ergänzende ENDOR-Spektren, die zur Aufklärung der Hyperfeinkopplungen der Manganionen beitragen könnten, waren experimentell mit dem zur Zeit der hier geschilderten Untersuchungen existierenden Aufbau nicht realisierbar. Dazu fehlte bis zur Veröffentlichung der derzeit aktuellen Kristallstruktur [24] der nötige Kenntnisstand des geometrischen Aufbaus des Mangankomplexes und damit auch die Grundlage, über die Orientierung der Wechselwirkungen innerhalb des Komplexes belastbare Aussagen treffen zu können. Für die Simulation des Mangankomplexes eines einzelnen Monomers waren somit eine große Zahl von Parametern zu bestimmen, nämlich sechs für die Hauptwerte und Orientierung der \mathbf{g} -Matrix sowie jeweils vier für die vier hier axial angenommenen Mangan-Hyperfeinkopplungen. Dies ergibt 22 voneinander unabhängige Parameter für die Simulation eines Monomers. Aus diesen muss dann durch die beschriebenen Kristallsymmetrie-Transformationen der Einkristall in seiner $P2_12_12_1$ -Symmetrie erzeugt, eine Simulation berechnet und mit der Messreihe abgeglichen werden.

Um die Zahl unabhängiger Parameter zu senken, kann man zum einen die Komponenten des \mathbf{g} -Tensors — nicht aber seine Orientierung innerhalb des PSII — anhand der Messung an gefrorener Lösung bestimmen. Eine erfolgreiche Simulation benötigt dazu einen Parametersatz für die wirkenden Hyperfeinkopplungen der Manganionen. Da eine eigenständige Bestimmung dieser Wechselwirkungen aus den EPR-Daten allein ausgeschlossen scheint, bleibt hier nur der Rückgriff auf veröffentlichte Daten in Referenzpublikationen, wobei auch hier keine Orientierungsdaten bezüglich der Wechselwirkungen vorliegen. Unter Verwendung der Kombination von \mathbf{g} -Werten und Hyperfeinkopplungen, die anhand der Messung gefrorener Lösung die beste Rekonstruktion der Daten erlauben, erscheint es möglich, die Zahl unabhängiger Parameter für eine Simulation der Einkristall-EPR-Spektren

damit auf die elf Euler-Winkel zur Beschreibung der Orientierung der Wechselwirkungen zu reduzieren.

Zu diesem Zweck zeigt Abb. 5.5 den Vergleich einer Zahl von Parametersätzen mit den hier erzielten Messdaten an gefrorener Lösung (vergl. Tab. 5.1 und 5.2). Die Position des Messspektrums, Spektrum *a*), wird dabei am Besten durch die \mathbf{g} -Parameter von Peloquin *et al.* [128], Spektrum *d*), und von Kulik *et al.* [129], Spektrum *f*), wiedergegeben. Beide verwenden identische \mathbf{g} -Parametersätze mit einem g_{iso} von 1,977. Die Parametersätze der anderen Referenzpublikationen zeigen dagegen mit Werten von 1,983 bis 1,997 zu hohe isotrope \mathbf{g} -Hauptwerte. Die Breite der simulierten Spektren war dabei für die Parametersätze *c*), *d*) und *f*) zu gering, wohingegen die von Zheng und Dismukes [126]³, Spektrum *b*), und Charlot *et al.* [139], Spektrum *e*), eine der Messung vergleichbare spektrale Breite zeigten. Um dies zu veranschaulichen wurden in Abb. 5.5 das Messspektrum auf die jeweilige Mitte der simulierten Spektren verschoben. Die unterschiedlichen Breiten gehen dabei direkt zurück auf die unterschiedlichen \mathbf{g} - und Hyperfeinkopplungs-Anisotropien in den Parametersätzen.

Weitere Unterschiede zeigen sich zwischen den Parametersätzen hinsichtlich des Auftretens von Hyperfeinstruktur auf den simulierten Signalen. Keine bzw. praktisch keine Hyperfeinstruktur lässt sich für die Parametersätze von Hasegawa, *c*), und Charlot, *e*), nachweisen, während die simulierten Spektren für Peloquins und Kuliks Datensätze, *d*) und *f*), eine geringe aber mithin feststellbare Struktur aufweisen. Die extensive Hyperfeinstruktur von Zheng und Dismukes, *b*), lässt sich dagegen kaum mit dem Fehlen derselben im Messspektrum übereinbringen. Das vollständige Fehlen von Hyperfeinkopplungsstruktur in der Simulation des Datensatzes von von Hasegawa *et al.* [127] geht hauptsächlich auf die im Vergleich zu den anderen Parametersätzen größere Varianz und Anisotropie in den Hyperfeinkopplungen zurück, wohingegen Zheng und Dismukes [126] zwei Hyperfeinkopplungen als isotrop angeben. Dazu verwenden Hasegawa *et al.*, wie im Übrigen auch Charlot *et al.* [139], vollständig rhombische \mathbf{g} - und Hyperfeinkopplungs-Tensoren, während die anderen Parametersätze axiale annehmen. Die in dieser Hinsicht deutlichen Unterschiede in den simulierten Spektren bei gleichzeitig nur geringen Unterschieden in den Parametern mögen auch als weiterer Hinweis gelten, wie destruktive Interferenz allein in Abwesenheit von *g-strain* oder anderen Effekten zum Verschwinden von nachweisbarer Hyperfeinstruktur führen kann.

³Die gezeigte Simulation in Abb. 5.5 und Parameter in Tab. 5.1 und 5.2 beziehen sich auf das $\text{Mn}^{\text{III}}\text{Mn}_3^{\text{IV}}$ -Modell des S_2 -Mangankomplexes in Zheng und Dismukes, 1996 [126]; Spektren mit dem angegebenen Parametersatz für ein $\text{Mn}_3^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{IV}}$ -Modell zeigen ähnlich wie von Åhrling *et al.* [125] publizierte Parameter ein deutlich zu breites Spektrum.

g-Tensor und Hyperfeinkopplungen

Obgleich die Parametersätze von Zheng und Dismukes [126] sowie Charlot *et al.* [139] zumindest in der Signalbreite als auch, bei Letzteren, in der Unterdrückung von Hyperfeinstruktur dem Messspektrum nahe kommen, sind die angegebenen Hyperfeinkopplungen nur schwer in Einklang zu bringen mit den ^{55}Mn -ENDOR-Rekonstruktionen, die deutlich kleinere Kopplungen liefern [128, 129]. Unter Verwendung der im Q-Band-ENDOR abgeleiteten Parameter für die Hyperfeinkopplungen der Manganionen von Kulik *et al.* [129] kommen wir zu den in Tab. 5.1 angegebenen Werten für den **g**-Tensor, der ein identisches g_{iso} von 1,977 zum **g**-Tensor von Peloquin *et al.* zeigt, wenn dieser auch in der Anisotropie signifikant abweicht. Ein von Kawamori *et al.* [135] publizierter g_{iso} -Wert von 1,975 liegt nur um ein Geringes niedriger. Mit 1,977 entspricht der ermittelte isotrope g -Wert auch praktisch der bei $g=1,976$ liegenden Signalmitte des annähernd gaußförmigen EPR-Spektrums. Die Ungenauigkeit der **g**-Tensor-Komponenten ergibt sich, sofern man die Hyperfeinkopplungen als gegeben annimmt, als etwa $\pm 0,002$ aus der Toleranz zwischen Simulationen variierteter Komponenten zum Messspektrum.

Zweikernige Mangankomplexe aus Mn^{III} - und Mn^{IV} -Ionen zeigen im Vergleich zu den hier erzielten Ergebnissen deutlich höhere g_{iso} -Werte [133, 140], wohingegen vergleichbare Werte an vierkernigen gemischten $\text{Mn}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{IV}}$ -Komplexen nachgewiesen werden konnten [134]. Dies ist — neben der demonstrierten Unterschiedlichkeit im Relaxationsverhalten zwischen dem S_2 -Mangankomplex und dimeren Modellkomplexen [141, 142] — ein weiterer Hinweis, dass im S_2 -Zustand des wasseroxidierenden Mangankomplexes mehr als zwei Manganionen zum $S=1/2$ -Spin beitragen.

Zur Simulation der Einkristallmessungen

Mit den ermittelten **g**-Matrix-Hauptwerten und den von Kulik *et al.* publizierten Hyperfeinkopplungswerten wurde versucht, das in Abb. 5.3 gezeigte Einkristall-Rotationsspektrum des S_2 -Mangankomplexes wiederzugeben und dadurch vielleicht einige der für eine solche Simulation ausstehenden Orientierungsinformationen rekonstruieren zu können. Simulation und Anpassungsroutine entsprachen den im nächsten Kapitel wesentlich ausführlicher dargestellten Methodiken. Neben dem orientierten **g**-Tensor und vier orientierten Hyperfeinkopplungs-Tensoren ging ein Linienbreitentensor für die Simulation nicht aufgelöster Wechselwirkungen und Linienbreiteneffekte mit in die Simulation ein. Im Laufe der Versuche, die Messspektren zu reproduzieren, wurden ferner verschiedene der in Tab. 5.2 aufgeführten Parametersätze getestet oder die Tensorkomponenten von Hyperfeinkopplung und **g**-Tensor für die Anpassung freigegeben. Sowohl die hier dargestellten FSE-Spektren

als auch die in Abb. 5.4 angedeuteten pseudomodulierten Spektren wurden für Anpassungsversuche verwandt. Auf eine detaillierte Diskussion einzelner Simulationsansätze und Anpassungsversuche und ihrer jeweiligen Probleme soll hier verzichtet werden. Anhand der Spektren in Abb. 5.3 sollen aber abschließend die auftretenden Schwierigkeiten und Anforderungen an eine erfolgreiche Rekonstruktion illustriert werden.

Hauptschwierigkeit bei Spektren wie den abgebildeten des S_2 -Mangankomplexes ist die geringe Varianz der spektralen Position über die 180° -Rotation. Dass das EPR-Signal nur eine geringe Orientierungsabhängigkeit zeigt, kann zum einen durch eine ungünstig getroffene Kristallorientierung in Bezug auf die Rotationsachse verursacht sein (s. Abschnitt 7.2), zum anderen aber auch durch die Überlagerung von acht diskreten Orientierungen in der kristallinen Einheitszelle bei im Vergleich hoher Signalbreite und geringer \mathbf{g} -Anisotropie. Durch den Mangel an für eine Anpassungsroutine kritischen Merkmalen, fehlen die Unterscheidungsmöglichkeiten für einen zuverlässigen Simulations-Messspektren-Abgleich über eine χ^2 -Bestimmung. Die bei nur einigen Kristallausrichtungen auftretenden Hyperfeinstrukturen sind in sich spektral zu komplex und nicht über einen iterativen Ansatz durch die Simulation zu rekonstruieren — jedenfalls nicht bei der zu hohen Zahl eingehender Parameter, und, aufgrund ihres Ursprungs durch Überlagerungen bestimmter Wechselwirkungen in bestimmten Orientierungen, auch nicht durch die Zusammenfassung von Parametersätzen in abstrahierte isotrope Wechselwirkungen und ähnliche Versuche, die Freiheitsgrade der Anpassungsroutine zu beschneiden.

Ein zusätzliches Problem bei den gezeigten S_2 -Spektren stellen die am Einkristall nur schwer experimentell aufzulösenden Untergrundsignale dar. Etwa ein Drittel des eigentlichen gaußförmigen Signals, darunter fast die gesamte Niederfeldflanke des Signals, wird von den Signalen des Y_D^\bullet und freien Mangans modifiziert. Dies muss insbesondere für eine automatisierte Anpassung, wie sie im nächsten Teil der Arbeit anhand der Y_D^\bullet -Einkristallmessungen verwandt wird, berücksichtigt werden. Anders als die bekannten und berechenbaren Komponenten von Y_D^\bullet und Mn^{2+} unterliegen beiden Flanken des breiten Signals aber weitere orientierungsabhängige Signale, die ohne Weiteres nicht durch die Simulation erfasst werden können, Signalform und -breite aber augenscheinlich mitbestimmen (vergl. die in beide Signalflanken wandernden Untergrundsignale in den Orientierungen 0° bis 40° , Abb. 5.3).⁴ Anders als bei unorientierten Proben gefrorener Lösung ist die Vermessung eines dunkeladaptierten Spektrums zur Berechnungen eines Hell-Dunkel-Differenzspektrums

⁴Bei den vorliegenden Untergrundsignalen scheint es sich zudem um $S=1/2$ -Signale zu handeln; anders als die Signale freien Mangans ließen sich diese auch nicht durch eine gezielte Beschneidung des Integrationsintervalls von den Signalen des S_2 -Mangankomplexes trennen. Vergl. Hofbauer und Bittl, 2000 [138], Daten hier nicht gezeigt.

(vergl. Abb. 5.1) nicht trivial, da die exakte Orientierung des Einkristalls im Resonator gewahrt bleiben muss. Dies schließt eine nachträgliche Beleuchtung des Einkristalls außerhalb des Resonators effektiv aus. Eine aufwendigere Beleuchtung (oder Dunkeladaption) im Resonator bei höheren Temperaturen wäre experimentell realisierbar; ob der nicht zu vernachlässigende experimentelle Aufwand zur Aufnahme eines dann 36 Einzelspektren umfassenden Rotationsspektrums durch das zu erwartende Ergebnis gerechtfertigt sein würde, ist hier angesichts der breiten, wenige Einzelheiten offenbarenden Spektren zumindest fraglich.

Insgesamt muss als Hauptproblem festgestellt werden, dass die Einkristall-EPR im Falle des S_2 -Signals für sich allein genommen nicht genügend differenzierte Informationen liefert, um die Vielzahl an eingehenden Parameter auflösen zu können, das zu beschreibende System durch die Messung also noch unterdefiniert ist und eine Unterscheidung zwischen gültigen und ungültigen Parametersätzen aufgrund der in das Rotationsspektrum eingehenden zusätzlichen Simulationsparameter⁵ nicht erlaubt. Der weitere Weg führt fast zwangsläufig — unter Einbeziehung der neueren Erkenntnisse aus der Röntgenkristallographie — über direkte ENDOR-Messungen der Hyperfeinkopplungen und ihrer Orientierungen im Einkristall. Auf diesem Gebiet wurden gerade in letzter Zeit einige Fortschritte gemacht [143]. Dass dieser Ansatz ein durchaus Erfolg versprechender ist und wie mit Hilfe von EPR und kombinierten ENDOR-Messungen unter Verwendung von Einkristallen sehr detaillierte Rekonstruktionen elektromagnetischer Parametersätze und daraus Rückschlüsse auf biologische Zusammenhänge in komplexen Proteinkomplexen ermöglicht werden, soll im Weiteren im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen. Der Fokus liegt dabei auf einem anderen prominenten Signal im Photosystem II.

⁵Orientierungen von \mathbf{g} -Tensor und Hyperfeinkopplungen

Teil III

Y_D^\bullet

Kapitel 6

Y_D^\bullet im Photosystem II

Mit der Identifizierung des bis dahin als *Signal II_{slow}* bezeichneten stabilen Radikalsignals [144] als Tyrosin [43,53] begannen die Anstrengungen, die magnetischen und strukturellen Eigenschaften des Radikals zu charakterisieren [145]. Waren diese vor allem dadurch motiviert, die Funktion des Y_D^\bullet innerhalb der Struktur und der Abläufe im Photosystem II zu verstehen — worauf hier näher in Abschnitt 2.3.3 eingegangen wird —, dient die Untersuchung des Y_D^\bullet in letzter Zeit vermehrt als erster Schritt zu einer mit EPR-Methoden zu erarbeitenden Aufklärung der photosynthetischen Kernprozesse am Wasseroxidierenden Komplex. Dabei stellt das Y_D^\bullet zum einen ein Modellsystem eines in einem komplexen Protein gebundenen Radikals zur Verfügung, an dem sich weiterentwickelte Methoden wie Hochfeld-ENDOR-Studien am Einkristall bewähren können und müssen. Zum anderen dient das leicht zu vermessende und über eine Kristallrotation zu verfolgende Y_D^\bullet -Signal als benötigter Referenzpunkt, um in Einkristallstudien gefundene orientierte Wechselwirkungen mit dem eigentlichen Protein und seinem Aufbau in Beziehung setzen zu können.

6.1 Tyrosin-D als innermolekulare Referenz

Der Einsatz von Einkristallen in der EPR ermöglicht über die so in die Messung eingeführten diskreten Orientierungen der Radikale zum Magnetfeld die Bestimmung geometrischer Beziehungen innerhalb des PSII-Supermoleküls. Dies ist im Besonderen im Fall des viermanganigen OEC mit seiner Vielzahl interner Wechselwirkungen von Bedeutung, eröffnet es doch gegebenenfalls einen Weg, eine in ihrer Orientierung rekonstruierte Wechselwirkung zur Geometrie des Wasseroxidierenden Komplexes in Bezug zu setzen. Die Rückführung von im Laborachsensystem gefundenen Signalen auf eine im Kristallachsensystem orientierte Wechselwirkung benötigt dabei eine Bestimmung der Kristallausrichtung in Bezug

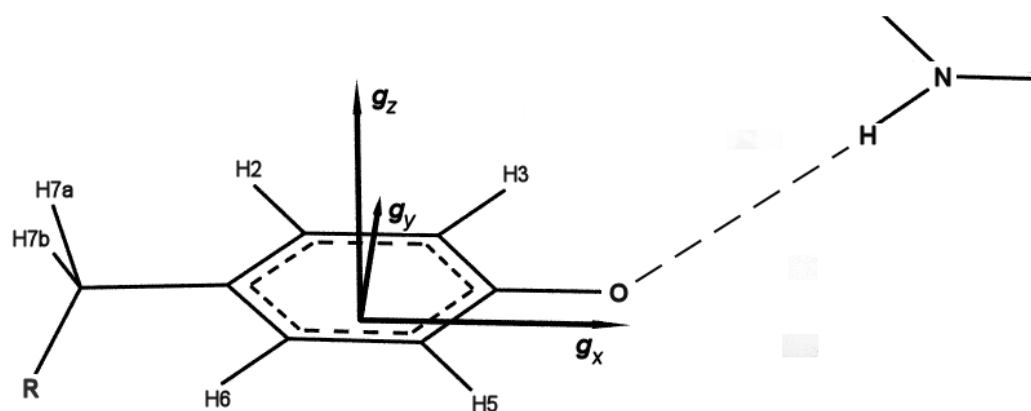


Abbildung 6.1: Struktur des Tyrosin-D. Eingezeichnet sind die Positionen der α -Ringprotonen H2 bis H6 und die der beiden Protonen am β -Kohlenstoff, H7a und H7b. Die Achsen des \mathbf{g} -Tensors verlaufen kollinear zu den Molekülachsen. Angedeutet ist zudem die Wasserstoff-Brückenbindung des Tyrosins in seiner neutralen Radikalform Y_D^\bullet .

zu den Laborachsen. Dies kann einerseits durch eine Ausmessung des Kristalls mit mikroskopischen oder röntgenkristallographischen Methoden erfolgen; ausgehend von der Orientierung des \mathbf{g} -Tensors entlang der Molekülachsen [146] (vergl. Abb. 6.1) bietet sich für EPR-Untersuchungen eine praktikablere und als sehr genau nachgewiesene [87] Methode über die Rekonstruktion der Winkelabhängigkeit der EPR-Resonanzen an.

In den Abschnitten 7.2 und 9.2 wird dieser Ansatz zur Bestimmung der Orientierung des jeweiligen Einkristalls angewandt. Hier wird auch klar, wie aufgrund der kristallinen $P2_12_12_1$ -Symmetrie und der Dimernatur der PSIIcc-Präparation auch im Einkristall eine dreifache Raumpiegelung zweier Y_D -Radikale die Gesamtheit von acht magnetisch unterscheidbaren Y_D^\bullet -Ausrichtungen im Einkristall und damit ein Gesamtspektrum sich komplex überlagernder Signale nach sich zieht. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit einer vorangehenden Orientierungsbestimmung von Einkristallen für EPR-Untersuchungen am OEC mit seiner noch wesentlich höheren spektralen Komplexität. Dazu ist es von wesentlicher Bedeutung, die Landschaft elektronischer Wechselwirkungen am Y_D^\bullet umfassend zu kartographieren, um auf diese Art die Rolle des D2-Tyr160 als Referenz für innermolekulare Orientierungsbestimmungen auf eine sichere und exakte Basis zu stellen.

6.2 Tyrosin-D als Modellsystem

Seitdem Y_D^\bullet zuerst und als erstes EPR-Signal am PSII berichtet wurde [40], stellt es aufgrund seiner Prominenz und Stabilität in den gängigen PSII-Präparationen ein bevorzug-

Tabelle 6.1: Methodik und verwendete Präparationen der Referenzpublikationen

	Ref.	Organismus	Methode	MW-Frq
Barry <i>et al.</i> , 1988	[145]	<i>Synechocystis</i> 6803	EPR	9,7
Barry <i>et al.</i> , 1990	[147]	<i>Synechocystis</i> 6803	EPR	9,7
Hoganson <i>et al.</i> , 1992	[148]	<i>Synechocystis</i> 6803	EPR/cwE	9,7
	[148]	Spinat	cwE	9,7
Rigby <i>et al.</i> , 1994	[149]	Spinat	EPR/cwE	9,7
	[149]	<i>C. reinhardtii</i>	EPR/cwE	9,7
	[149]	<i>P. laminosum</i>	EPR/cwE	9,7
Warncke <i>et al.</i> , 1994	[150]	<i>Synechocystis</i> 6803	² H-ESEEM	9,1
Gilchrist <i>et al.</i> , 1995	[151]	Spinat	DE/cwE	14,8 / 10,3
Un <i>et al.</i> , 1995	[152]	Spinat	EPR	245
Force <i>et al.</i> , 1995	[74]	Spinat	ME	10,1
	[74]	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	ME	10,1
Un <i>et al.</i> , 1996	[153]	Spinat	EPR	245
	[153]	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	EPR	9 / 245
Farrar <i>et al.</i> , 1997	[154]	Spinat	EPR	139,5
Diner <i>et al.</i> , 1998	[47]	<i>Synechocystis</i> 6803	² H-ESEEM	9,4
	[47]	Spinat	² H-ESEEM	9,2
Dorlet <i>et al.</i> , 2000	[155]	Spinat	EPR	285 / 190
Hofbauer <i>et al.</i> , 2001	[87]	<i>Th. elongatus</i> [◇]	EPR	94
	[87]	<i>Th. elongatus</i>	DE	9,7
Kammel, 2003	[156]	Spinat	DE/HYSCORE	9,7
diese Arbeit		<i>Th. elongatus</i> [◇]	EPR/DE	9,7 / 94,0
		<i>Th. elongatus</i> [◇]	ME	94,0

◇ Ergebnisse gestützt durch Messungen an Kristallen

Tabelle 6.1: Die in dieser Arbeit als Referenz für die Protonen-Hyperfeinkopplungen herangezogenen Publikationen, ihre Methodik und die untersuchten Präparationen. Sofern nicht anders angegeben handelt es sich ausschließlich um Untersuchungen an gefrorener Lösung. Nur die zur Bestimmung der relevanten Ergebnisse verwandten Methoden werden aufgeführt. MW-Frq: Mikrowellen-Frequenz in GHz; cwE: *continuous-wave-ENDOR*; DE: *Davies-ENDOR*; ME: *Mims-ENDOR*; ESEEM: *Electron Spin Echo Envelope Modulation*; HYSCORE: *Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy*.

tes Modellsystem für Untersuchungen an proteingebundenen Aminosäureradikalen dar. So reflektiert die in den letzten 20 Jahren verstärkt vorangetriebene Untersuchung des Y_D[•] einen Teil der Entwicklung der EPR und der instrumentellen wie biochemischen Fortschritte am PSII in dieser Zeit. Eine Übersicht über die relevantesten Publikationen in diesem Zeitraum mit besonderem Gewicht auf Studien zu den am Y_D[•] wirkenden Protonen-Hyperfeinkopplungen findet sich in Tab. 6.1. Von Anfang an war das System dabei Gegenstand von cw-EPR-Untersuchungen [145, 147–149], cw-ENDOR-Studien [148, 149] und gepulster EPR, im Besonderen ESEEM [150, 151, 157]. Gleichzeitig ermöglichte die Erschließung der Hochfelddomäne oberhalb von 10 MHz [151] und bis hin zu 285 MHz [155] weitergehende Auflösung der Hyperfeinkopplungs-Aufspaltungen. Neben der Anwendung von HYSCORE-Methoden [156, 158] auf das Y_D[•] führte dann vor allem die Verfügbarkeit von PSIIcc-Einkristallen zu weiteren Fortschritten [87, 136] in der Aufklärung der Orientierungs- und Kopplungssituation des D2-Tyr161.

Für solche Untersuchungen insbesondere hinsichtlich der Hyperfeinkopplungen am Radikal, bietet sich das Y_D[•] aufgrund seiner schon in der EPR nachweisbaren Signalaufspaltungen an, die schon im X-Band komplexe ENDOR-Signale offenbaren und über die Verknüpfung von Kopplungsstärken und -geometrien mit dem Molekülaufbau Rückschlüsse auf die chemische Struktur des im Protein gebundenen Tyrosinradikals zulassen. Zu einer möglichst kompletten Charakterisierung der Hyperfeinkopplungen am Y_D[•] gehören dabei die vier Protonen am aromatischen Ring, zwei Protonen des am Ring gebundenen β -Kohlenstoffs C7 sowie das mit dem Y_D[•] über eine Wasserstoff-Brückenbindung verbundene Proton (vergl. Abb. 6.1). Eine solche vollständige Charakterisierung soll hier anhand von Puls-ENDOR-Methoden unter Verwendung einkristalliner PSIIcc-Präparationen dargelegt werden. Dazu gehören für jede Protonen-Hyperfeinkopplung die Rekonstruktion des vollständigen Kopplungstensors, also aller drei Hauptachsenwerte inklusive der Orientierung der Hauptachsen relativ zum \mathbf{g} -Tensor und damit innerhalb des Kristallachsensystems. Für das Y_D[•] kann so gezeigt werden, wie in ein an sich spiegelsymmetrisches Molekül durch die Wechselwirkungen mit der es umgebenden Proteinmatrix eine Inäquivalenz zwischen den Protonen H2 und H6 sowie zwischen H3 und H5 eingeführt wird. Ferner erlaubt die Rekonstruktion der Kopplungsorientierung einen direkten Rückschluss auf den Brückenbindungspartner von Y_D[•].

Kapitel 7

EPR am Tyrosin-D

Die Vermessung von Tyrosinradikal-EPR-Signalen in einkristallinen Proben verschiedener Organismen wurde zuletzt wiederholt erfolgreich angewandt [87, 136, 159, 160], um so molekulare Orientierungen innerhalb von Proteinen aufzuklären. Dies stellt auch hier den Ausgangspunkt dar, um die später in den ENDOR-Studien zu gewinnenden Daten und Beziehungen in der Proteingeometrie verankern zu können. Dabei erfüllt die Aufnahme der Einkristall-EPR-Signale über eine 180°-Rotation hinweg den zweifachen Zweck, einerseits die Situation im Einkristall der PSIIcc-Präparation an sich aufzuklären, nämlich die Orientierung des Y_D^\bullet zu den Kristallachsen, wie andererseits auch die konkrete Lage des einzelnen Kristalls im Resonator, mithin also seine Orientierung im Laborachsensystem, zu rekonstruieren. Beides sind notwendige Schritte auf dem Weg vom Laborachsensystem zu den Orientierungen einzelner Hyperfeinkopplungen am Molekül, wie er in Anhang A.1.2 skizziert ist.

Bei allen in diesem Teil der Arbeit verwandten Proben handelt es sich, sowohl bei Proben gefrorener Lösung wie auch bei den Einkristallen, um PSIIcc-Proben aus *Th. elongatus*, deren Präparation in Abschnitt 3.5.1 erläutert wurde. W-Band-Messungen erfolgten im BRUKER ELEXSYS E680 Spektrometer (s. Kap. 3.6.1). Kristalle wurden mittels Schleifen an der Innenwand der Quarzröhrchen (0,7 mm Innendurchmesser) befestigt oder mitsamt einem Tropfen Nährlösung in das beidseitig offene Röhrchen gesaugt. Kristall- wie Lösungsproben wurden anschließend umgehend in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Messung tiefkühl aufbewahrt. Generierung des Y_D^\bullet -Signals erfolgte durch Umgebungslicht während der weiteren Handhabung vor Einbau der Probe in das Spektrometer. Das Signal war bei der Messtemperatur von 40 K über die gesamte, teils mehrtägige Messdauer ausreichend stabil, sodass keine Nachbeleuchtung im Resonator notwendig wurde.

7.1 EPR an Y_D^\bullet -Proben gefrorener Lösung

Bei dem in Abb. 7.1 gezeigtem Spektrum handelt es sich um das als *Field Swept Echo (FSE)* aufgenommene Y_D^\bullet -EPR-Signal im W-Band, normiert auf 94 GHz Mikrowellenleistung. Unmittelbar vor der Aufnahme des Y_D^\bullet -Spektrums wurde eine Li:LiF-Standardprobe vermessen, mittels derer, dank ihres wohlbekanntes \mathbf{g} -Wertes, die tatsächlich im Resonator wirkende Magnetfeldstärke bestimmt werden konnte [161]. Abgebildet ist das Spektrum in durch Pseudomodulation der Spektren errechneten abgeleiteten Form, da diese Art der Darstellung für einen visuellen Abgleich zwischen Messung und Simulation einen detailreicheren, leichter in seinen Unterschieden zu beurteilenden Spektrensatz ergibt. Die Pseudomodulation entspricht damit etwa der Rolle der Feldmodulation in konventionellen *cw*-EPR-Spektren. Im W-Band wird das Y_D^\bullet -Signal in seine \mathbf{g} -Komponenten aufgelöst und zeigt auf diesen Signalkomponenten die durch Protonenbindungen erzeugte Hyperfeinstruktur. An g_x und g_z tritt eine deutlich sichtbare *1:3:3:1*-Intensitätsverteilung zutage, während an g_y nur eine einfache Aufspaltung ablesbar ist, was bereits auf eine anisotrope, in Richtung auf g_x und g_z stärkere effektive Hyperfeinkopplung hindeutet, wie an späterer Stelle zu zeigen sein wird. Die in Abb. 7.1 gezeigte Simulation, die alle wesentlichen Details des Spektrums wiedergibt, erfasst bereits alle in Tabelle 10.2 aufgelisteten Hyperfeinkopplungen. Damit ergibt sich der in Tab. 7.1 aufgeführte und in Relation zu den Referenzpublikationen gesetzte \mathbf{g} -Tensor für Y_D^\bullet . Dieser ist verträglich mit dem in [87] ebenfalls an PSIIcc-Präparationen von *Th. elongatus* ermittelten Wert. Der Abgleich mit anderen in der Literatur zu findenden Werten für die \mathbf{g} -Hauptachsen von PSII weist auf mögliche Unterschiede zwischen Präparationen von *Th. elongatus* zu Spinat bzw. *Synechocystis*, sodass ein direkter Vergleich möglicherweise nur bedingte Aussagekraft hat.

7.2 EPR am Tyrosin-D-Einkristall

Die unternommenen orientierungsabhängigen EPR-Messungen am Einkristall bestehen aus 19 einzeln aufgenommenen FSE-Spektren, die untereinander durch eine 10° -Drehung des Einkristalls im Resonator um eine Drehachse senkrecht zum magnetischen Feldvektor verbunden sind. Aufgrund des Vorliegens von PSII als dreifach gespiegeltem Dimer in der Kristalleinheitszelle einer $P2_12_12_1$ -Symmetrie tragen so acht Y_D -Radikale unterscheidbarer Orientierung zu den Einzelspektren bei. Spektren dieser Art lassen sowohl Rückschlüsse auf die Natur der PSIIcc-Präparation zu, etwa die Orientierung des Y_D^\bullet im Kristall, wie auch über den geometrischen Einbau des Kristalls in Bezug zum Magnetfeld im Resonator, was für eine nachfolgende ENDOR-Studie am Einkristall benötigtes Vorwissen für

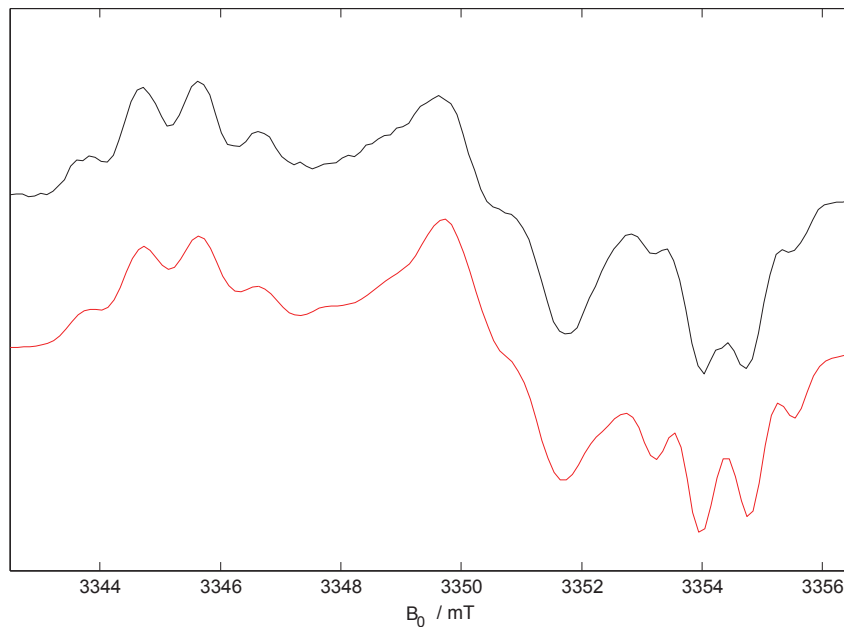


Abbildung 7.1: EPR-Spektrum des Tyrosin-160-Radikals einer PSIIcc-Präparation von *Th. elongatus* bei 94 GHz Mikrowellenleistung. Das Spektrum wurde als *Field Swept Echo* (FSE) aufgezeichnet und wird hier, zur Verdeutlichung der strukturellen Details, als erste Ableitung gezeigt; das Original-FSE findet sich z.B. in Abb. 8.2. Schwarz zeigt die Messung, rot die Simulation, in welcher die Kopplungen aller vier Ringprotonen und beider Protonen am β -Kohlenstoff enthalten sind.

eine darauf folgende Analyse der Kopplungsorientierungen darstellt. Dieser zweite Aspekt stand in dieser Arbeit im Vordergrund, zumal der grundsätzliche Aufbau des Kristalls und der Einheitszelle im Hinblick auf das Y_D^\bullet durch die Röntgenspektroskopie als zumindest grundsätzlich aufgeklärt betrachtet werden kann. Die experimentelle Herstellung möglichst unterschiedlicher Kristallorientierungen mit Bedacht auf die Drehung zum Magnetfeld im Resonator durch eine aufwendigere Montierung des Kristalls an am Röhrchen hängenden Schleifen oder an der Unterseite von Röhrchen, erwies sich diesbezüglich daher als nicht notwendig.

Die Abbildungen 7.2 und 7.3 zeigen die Rotationsspektren zweier PSIIcc-Einkristalle; ein drittes Beispiel findet sich in Abb. 9.3. Simulation und Simulationsabgleich erfolgten durch Anwendung eines selbstgeschriebenen MATLAB-Makros mittels einer auf Störungstheorie erster Ordnung beruhenden Spektrensimulation und einem auf Zufallsschritten basierendem

Tabelle 7.1: **g**-Tensor-Hauptwerte

g_x	g_y	g_z	Δg_n	Ref.
2,00767	2,00435	2,00215	$\pm ,00003$	hier
2,00767	2,00438	2,00219	$\pm ,00002$	[87]
2,00756	2,00432	2,00215	$\pm ,00010$	[155]
2,00782	2,00450	2,00232		[154]
2,00737	2,00420	2,00208		[153]
2,00740	2,00425	2,00205		[153]
2,00745	2,00422	2,00211		[152]
2,00745	2,00422	2,00212	$\pm ,00020$	[162]
2,00752	2,00426	2,00212	$\pm ,00007$	[163]

Tabelle 7.1: Die hier bestimmten und in der weiteren Arbeit verwendeten **g**-Tensor-Hauptwerte im Vergleich mit älteren Messungen. Mit Ausnahme von [87], wozu die hier gefundenen Werte verträglich sind, liegen Messungen an anderen Systemen vor, hauptsächlich an Spinat-BBY-Präparationen (vergl. Tab. 6.1). Die Bestimmung des Magnetfelds erfolgte über eine direkt vorangegangene Vermessung einer Li:LiF-Standardprobe [161].

Fit-Algorithmus, der nach dem geringsten Abweichungsquadrat zwischen Messspektren und Simulationen sucht. Eingezeichnet sind ferner die von der Kristallstellung abhängigen Resonanzfeldpunkte der in den unterschiedlichen Orientierungen vorliegenden Y_D^\bullet .

Es ist dabei bekannt, dass die Befestigung der Einkristalle an der Innenwand des Probenröhrchens die längste morphologische Kristallachse so montiert, dass eine der kristallographischen Symmetrieachsen, b , nahe der experimentellen Drehachse der Kristallrotation im Spektrometer zu liegen kommt. Dies zeigt sich bei allen drei vermessenen Einkristallen durch ein paarweises Zusammenfallen der orientierungsabhängigen Resonanzfeldpunkte der einzelnen magnetisch inäquivalenten Tyrosine. Eine perfekte Übereinstimmung zwischen der Kristallrotationsachse und einer der kristallographischen Achse hätte eine vollständige magnetische Entartung von jeweils zwei der Y_D^\bullet in der Kristalleinheitszelle zur Folge, womit nur noch vier magnetisch inäquivalente Y_D^\bullet -Orientierungen zu den Spektren beitragen würden. Am stärksten ausgeprägt ist dieser Effekt beim im Kapitel 9.2 besprochenen deuterierten Einkristall, der paarweise Resonanzfeld-Verlauf lässt sich aber auch in den

Abb 7.2 und 7.3 beobachten. In allen drei Fällen ist es die kristallographische b -Achse, die fast kollinear zur Rotationsachse verläuft. Die genaue Orientierung der drei Einkristalle findet sich in den Tab. 7.2 und 9.1 in Form von Richtungskosinussen.

Für das Verständnis der Rotationsspektren hervorzuhebende Punkte sind diejenigen, in denen eine der kristallographischen Achsen während der Kristalldrehung mit dem Magnetfeld zusammenfällt. Da die kristallographische b -Achse in etwa kollinear zur Drehachse verläuft, finden sich solche Punkte in allen drei Rotationsspektren und zeigen sich hier durch das Zusammenfallen aller acht Resonanzlinien um nur zwei Feldstellen. Dies ist für den Kristall in Abb. 7.2 gemäß der Simulation zwischen den Messungen für 60° und der für 70° gegeben. Hier liegt gemäß der Simulation die kristallographische a -Achse fast parallel zum Magnetfeldvektor im Resonator und die Resonanzlinien konzentrieren sich um zwei Feldpunkte bei etwa 3350 mT und 3353 mT. Diese verbleibende Aufspaltung geht zurück auf die nicht-kristallographische C_2 -Symmetrie des PSII-Dimers, während alle anderen Orientierungen hier zusammenfallen. Dass sie dies nicht exakt tun, sondern um beide Feldpunkte je zwei mal zwei zusammenfallende Resonanzen unterscheidbar bleiben, liegt an der geringen noch bestehenden Kippung der a -Achse zum Magnetfeldvektor, die letztlich auf die Verdrehung der kristallographischen b -Achse zur Drehachse zurückgeht.

Tabelle 7.2: Orientierung der Einkristalle I und II

	a_I	b_I	c_I	a_{II}	b_{II}	c_{II}
X	0,440	-0,180	0,880	-0,958	-0,012	-0,286
Y	-0,894	-0,177	0,411	0,281	-0,239	-0,930
Z	0,082	-0,968	-0,239	-0,057	-0,971	0,232

Tabelle 7.2: Orientierung der Einkristalle I (vergl. Abb. 7.2) und II (vergl. Abb. 7.3) in Bezug zum durch die Richtung des Magnetfeldvektors definierten Laborsystem als Richtungskosinusse der Kristall- zu den Laborachsen. Die Transformation vom Laborachsen- ins Kristallachsensystem erlaubt im Weiteren die Rekonstruktion der Y_D^\bullet -Orientierung im PSIIcc-Einkristall; siehe dazu Tab. 7.3 und Anhang A.1.2.

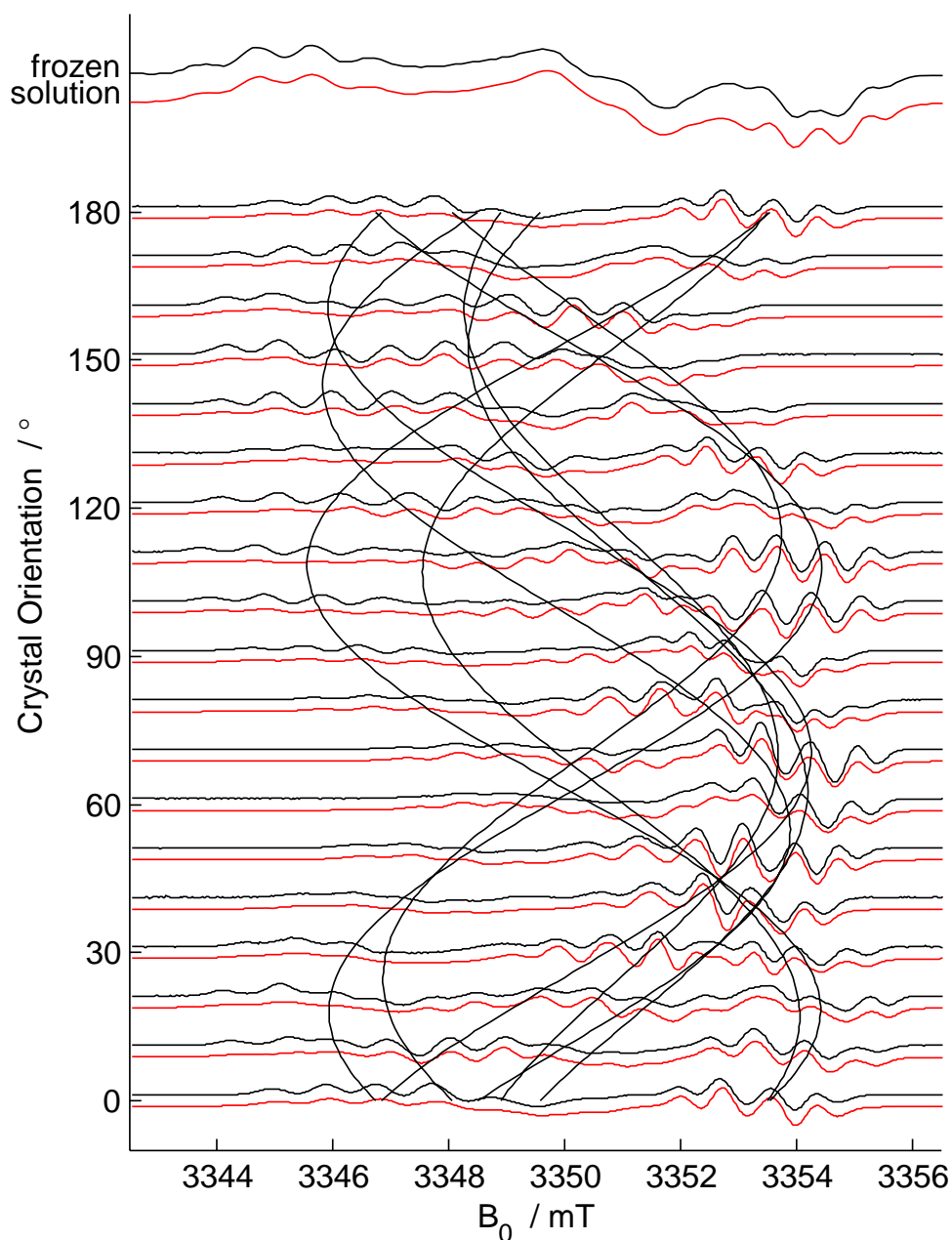


Abbildung 7.2: Winkelabhängigkeit der Einkristall-EPR-Signale von Y_D^\bullet bei einer Mikrowellenfrequenz von 94 GHz für den in Kapitel 8.2 mit Davies-ENDOR vermessenen Einkristall, hier Einkristall I. Messung in schwarz, Simulation in rot. Die über die Spektren gelegten Rotationsmuster kennzeichnen die so rekonstruierten Winkelabhängigkeiten der einzelnen Y_D^\bullet -Ausrichtungen in der Kristalleinheitszelle. Zur Orientierung darüber das EPR-Spektrum an gefrorener Lösung. Messparameter: Temperatur 40K; srt 2 ms; π -Pulslänge 128 ns.

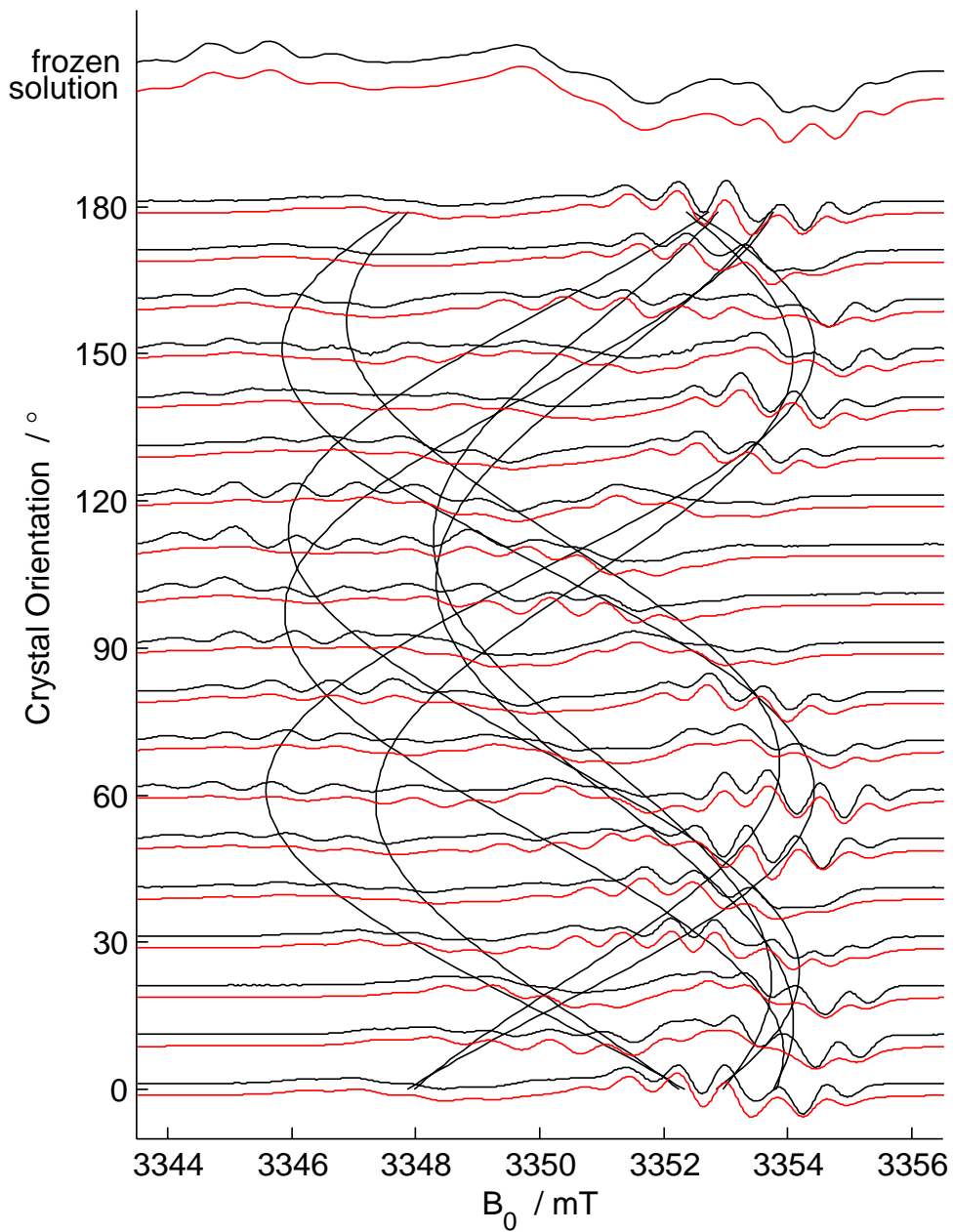


Abbildung 7.3: Winkelabhängigkeit der Einkristall-EPR-Signale für den in Kapitel 5.2 verwandten Einkristall, hier Einkristall II. Art der Darstellung wie in Abb. 7.2. Die Orientierung des Einkristalls im Resonator ist ebenfalls der von Einkristall I vergleichbar, ablesbar an den Richtungskosinussen in Tab. 7.2. Der Vergleich beider Rotationsspektren zeigt auch, wie geringe Abweichungen in der Kippung zur Rotationsachse deutliche Veränderung in den Spektren nach sich ziehen und entsprechend zuverlässig rekonstruiert werden können.

7.3 Orientierung des aromatischen Rings

Die Geometrie des Tyrosinrings und der \mathbf{g} -Tensor von Y_D^\bullet hängen wie in Abb. 6.1 dargestellt in der Art zusammen, dass die g_x -Achse der C–O-Bindung vorne am Molekül und die g_z -Achse der Ringnormalen entspricht [146]. Durch die Rekonstruktion der \mathbf{g} -Tensor-Orientierung innerhalb der Simulation lässt sich somit auf die Lage des Moleküls im Protein schließen.¹ Die hier gefundene \mathbf{g} -Tensor-Orientierung bestätigt dabei die schon von Hofbauer *et al.* [87] gefundene. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass in den hier gezeigten Spektren insgesamt sechs Protonen-Hyperfeinkopplungen eingehen, wie sie in Abschnitt 8.2 rekonstruiert werden. Im Vergleich dazu berücksichtigte die vorangegangene Studie [87] lediglich die drei stärksten Hyperfeinkopplungen, die sich für eine Simulation der \mathbf{g} -Tensor- und Kristall-Orientierung als ausreichend herausstellen. Auch die Qualität der Spektrensimulation ist grob vergleichbar. Für eine Verbesserung der Übereinstimmung zwischen Messung und Simulation erscheint eine aufwändigere Simulation von Linienbreiteneffekten, die bislang nur durch einen einzelnen Linienbreitentensor vorgenommen wird, vielversprechender als eine noch genauere Bestimmung von Hyperfeinkopplungen. Die Resultate von Hofbauer *et al.* wie auch die der verschiedenen hier vermessenen Kristalle lassen eine Ungenauigkeit in der Rekonstruktion von \mathbf{g} -Tensor-Orientierung (innerhalb des Kristalls) wie Kristallorientierung (relativ zum Magnetfeld) von weniger als 3° annehmen. Der Vergleich mit den verfügbaren Röntgenstrukturen zeigt dabei eine bemerkenswerte Entwicklung auf. Die in der Röntgenkristallographie dargestellte Ringorientierung des Tyrosins wich über mehrere Strukturen hinweg von der in der Einkristall-EPR aufgefundenen \mathbf{g} -Tensor-Orientierung ab [98]. Zur Illustration ist der Vergleich zwischen der Berliner 2005-Struktur [21] mit der PDB-Kennzeichnung 2AXT und der hier bestimmten Orientierung in Abb. 7.4 gezeigt. Dies trifft für die 2009er Röntgenstruktur [22] mit $2,9 \text{ \AA}$ Auflösung (PDB-Kennzeichnung 3BZ1/3BZ2) nicht mehr zu. Beide Orientierungen, dargestellt in Abb. 7.5, entsprechen sich hier bis auf wenige Grad. Diese Annäherung ist gerade anhand der Richtungskosinusse der Orientierungen in Tabelle 7.3 zu erkennen.

¹Die Bestimmung der \mathbf{g} -Tensor-Orientierung erfolgt in der Simulation durch das Freigeben dieses Parameters zur automatisierten Anpassung. Details zur Simulation und den eingehenden Orientierungsparametern finden sich im Abschnitt 3.4 und im Anhang A.

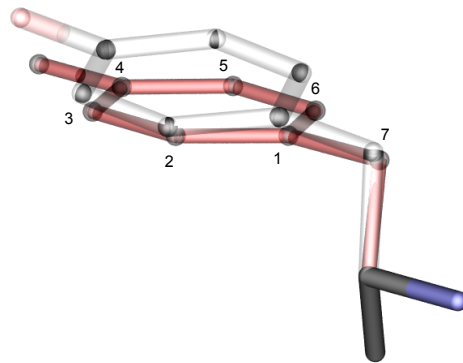


Abbildung 7.4: Die aus der Simulation von PSII-Einkristallen abgeleitete räumliche Ausrichtung des Rings von Y_D^\bullet (rot) im Vergleich mit der Röntgenstruktur 2AXT [21] (durchscheinend).

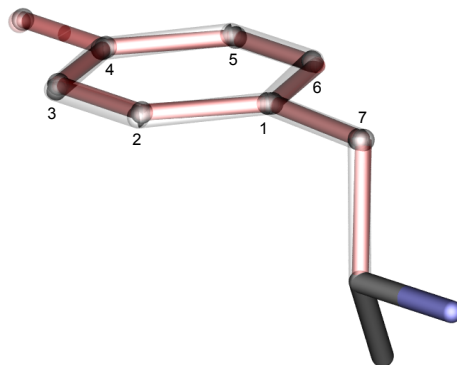


Abbildung 7.5: Die aus der Simulation von PSII-Einkristallen abgeleitete räumliche Ausrichtung des Rings von Y_D^\bullet (rot) im Vergleich mit der Röntgenstruktur 3BZ1 [22] (durchscheinend). Die Struktur von Guskov *et al.* 2009 ist der von Hofbauer *et al.* 2001 [87, 98] gefundene und hier bestätigte Orientierung des aromatischen Rings nahezu identisch.

Tabelle 7.3: Orientierung des \mathbf{g} -Tensors im Kristall

	x	y	z	x_{3BZ1}	y_{3BZ1}	z_{3BZ1}	x_{2AXT}	y_{2AXT}	z_{2AXT}
<i>a</i>	0,163	0,253	0,954	0,164	0,212	0,964	0,270	0,103	0,958
<i>b</i>	-0,531	-0,793	0,301	-0,552	-0,794	0,267	-0,560	-0,794	0,242
<i>c</i>	0,832	-0,555	0,005	0,818	-0,570	-0,014	0,783	-0,599	-0,156

Tabelle 7.3: Richtungskosinusse der Orientierung des \mathbf{g} -Tensors im Kristallachsensystem *abc* wie hier hergeleitet und im Vergleich dazu in den beiden Röntgenstrukturen 3BZ1 [22] und 2AXT [21]. Die Molekülachsen, zu denen der \mathbf{g} -Tensor parallel angenommen wird, wurden bestimmt aus den Koordinaten der Ringkohlenstoffe als C4–C1 und C5–C3.

Kapitel 8

Protonen-ENDOR am Tyrosin-D

Die Bestimmung der Hyperfeinkopplungen der am Tyrosin gebundenen Protonen mitsamt der Bindungs- und Kopplungsgeometrie am Molekül erfordert einen mehrstufigen Ansatz. Während grundsätzlich alle relevanten Parameter in die in Abschnitt 8.2 besprochenen Einkristall-ENDOR-Spektren eingehen, sind diese Informationen allein aus diesen Spektren kaum zu bestimmen: für jeden der sechs direkt am Y_D^\bullet gebundenen Wasserstoffkerne sind jeweils drei Hauptwerte und drei Winkel zu bestimmen. Nimmt man an, dass die Bindungen der vier am Tyrosinring befindlichen α -Protonen sich nur in der Ringebene verschieben, ihre Kopplungsorientierung sich damit mit einer Winkelangabe beschreiben lässt, ergibt sich so immer noch eine Gesamtzahl von 32 zu rekonstruierenden Parametern. So ergibt sich, dass die in Anhang B gezeigten Einzelspektren in ihrer Gesamtheit zwar sehr detailreich, aber ohne zusätzliche Anhaltspunkte über die Kopplungen ungeordnet und kaum interpretierbar erscheinen. Der Rückgriff auf Proben gefrorener Lösung bietet eine Möglichkeit, dieses Problem zu reduzieren und vor Beginn der eigentlichen Einkristallstudie die elementaren Kopplungsparameter einzugrenzen. In solchen liegen die PSII-Dimere in ungeordneter Form vor, die Spektrenform entspricht damit einer Superposition aller möglichen Y_D^\bullet -Orientierungen. In dieser Form kann man aufgrund des Tensorverlaufs erkennbarer Kopplungen wesentlich leichter Bestimmungen der Hauptwerte und — über die in Abschnitt 3.3.6 beschriebenen Effekte der Orientierungsselektion von Wechselwirkungen im Hochfeld — erste Abschätzungen über die Geometrie der Kopplungen in Relation zum Molekül treffen. Die so gewonnenen Informationen können dann für die detailliertere, auf die Kopplungsorientierung jeweils sehr empfindliche Rekonstruktion der Einkristallspektren angewandt werden.

8.1 Orientierungsselektives Davies-ENDOR an Proben gefrorener Lösung

Davies-ENDOR bei 9,7 GHz

Um die Bedeutung der Orientierungsselektion für die Rekonstruktion der Hyperfeinkopplungen direkt am PSII zu zeigen, findet sich in Abb. 8.1 ein bei 9,7 GHz Mikrowellenfrequenz aufgenommenes Davies-ENDOR-Spektrum. Das Spektrum wurde normalisiert um die freie Protonen-Larmorfrequenz. Nur die hochfrequente Seite des Spektrums ist gezeigt. Die Simulation dazu beinhaltet bereits alle sieben in diesem Teil der Arbeit bestimmten Protonen-Hyperfeinkopplungen, wie sie in Kapitel 10, Abbildung 10.1, noch einmal detaillierter dargestellt werden. Für sich allein betrachtet, offenbart das Spektrum einige wichtige Anhaltspunkte über die stärkeren Kopplungen. Etwa zwischen 12,5 MHz und 16,5 MHz findet sich ein vom Rest des Spektrums getrennt erscheinendes Signal, das ausgehend von früheren Hochfeld-EPR- und ENDOR-Studien [87, 148, 149, 151, 154] sowie theoretischer Betrachtungen [164] der stärkeren Protonenkopplung am β -Kohlenstoffatom, H7a, zugeordnet werden kann. Daneben zeugt das Doppelsignal um 10 MHz von der Aufspaltung der Kopplungsentartung der beiden vorne am Ring gebundenen α -Protonen H3 und H5. Die Übergänge zwischen dem H7a-Signal und dem H3/H5-Doppelsignal sind praktisch nicht aufgelöst, wie auch die schwächste Kopplungskomponenten der α -Protonen sich kaum verlässlich bestimmen lassen. Da es sich um eine ungeordnete Probe ohne Richtungsbevorzungen handelt, lässt sich über Kopplungsorientierungen nichts aussagen; im Besonderen lässt sich keine Aussage treffen, welchem der beiden stark wechselwirkenden α -Protonen welches der beiden Doppelsignale entspricht, mithin ob H3 oder H5 nach der Aufhebung der Kopplungssymmetrie die stärkere bzw. schwächere Kopplung bildet.

Über die Kopplungen der verbleibenden Protonen — H2 und H6 am Ring, H7b am β -Kohlenstoff und das über eine Wasserstoff-Brückenbindung an das Y_D^\bullet koppelnde Proton — kann keine konkrete Aussage getroffen werden. Der Hauptteil dieser Signale wird in dem nicht aufgelösten Teil der Protonenmatrix zwischen 1 und 4 MHz erwartet. [145, 148–151] Insgesamt stellt das aufgenommene Spektrum im Speziellen in diesem Bereich, in geringerem Ausmaß aber auch für die stärkeren Kopplungen eine keineswegs triviale Überlagerung von mindestens sieben relevanten Einzelsignalen dar, die im X-Band nicht weiter aufgelöst werden.

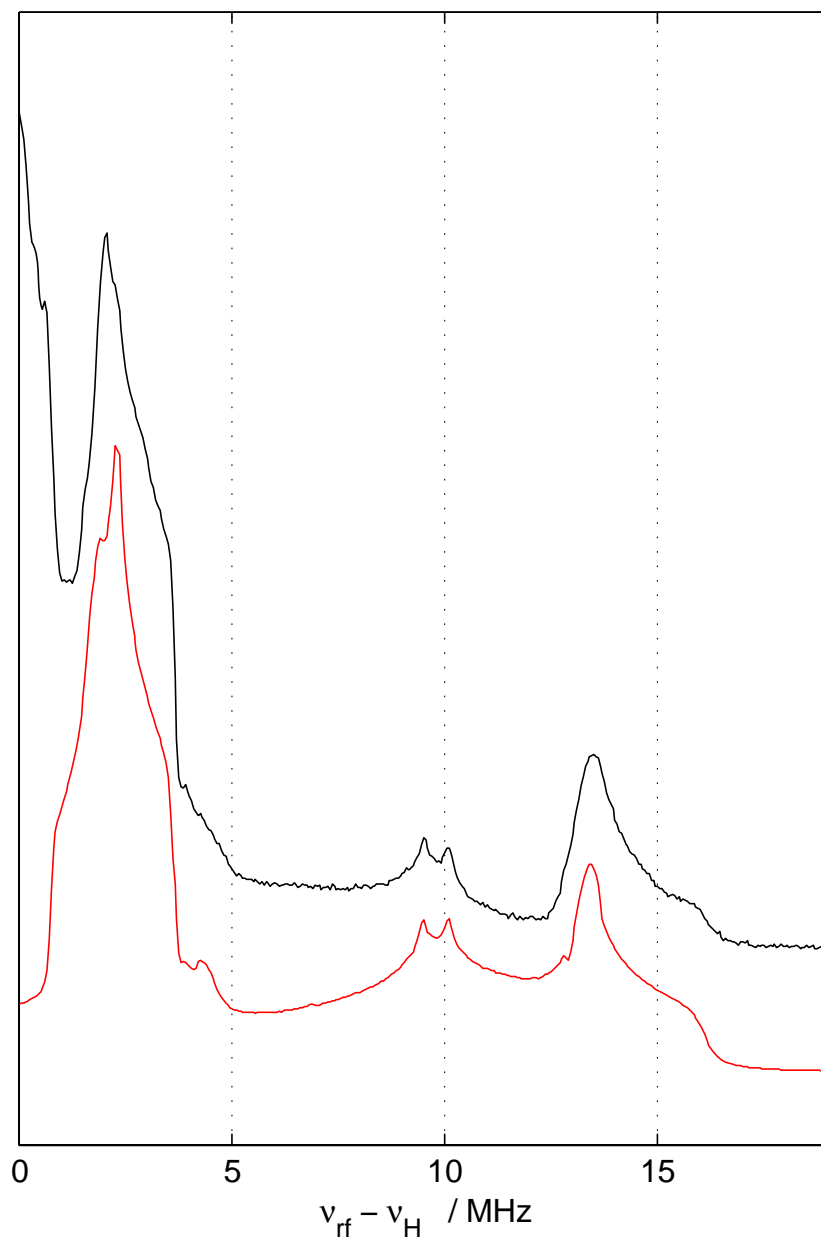


Abbildung 8.1: Bei 9,7 GHz Mikrowellenfrequenz aufgenommenes Davies-ENDOR von Y_{D}^{\bullet} in einer gefrorenen PSIicc-Lösungspräparation aus *Th. elongatus*. Das X-Band-Spektrum zeigt ob der im X-Band praktisch nicht auftretenden Orientierungsselektion alle relevanten Protonenwechselwirkungen, die aufgrund starker Überlagerung allerdings nur schwer zu identifizieren sind. Die Simulation wendet bereits alle in dieser Arbeit gewonnenen Informationen über die Wechselwirkungen an, vergl. Tab. 10.2 und für eine nähere Betrachtung der eingehenden Signale Abb. 10.1.

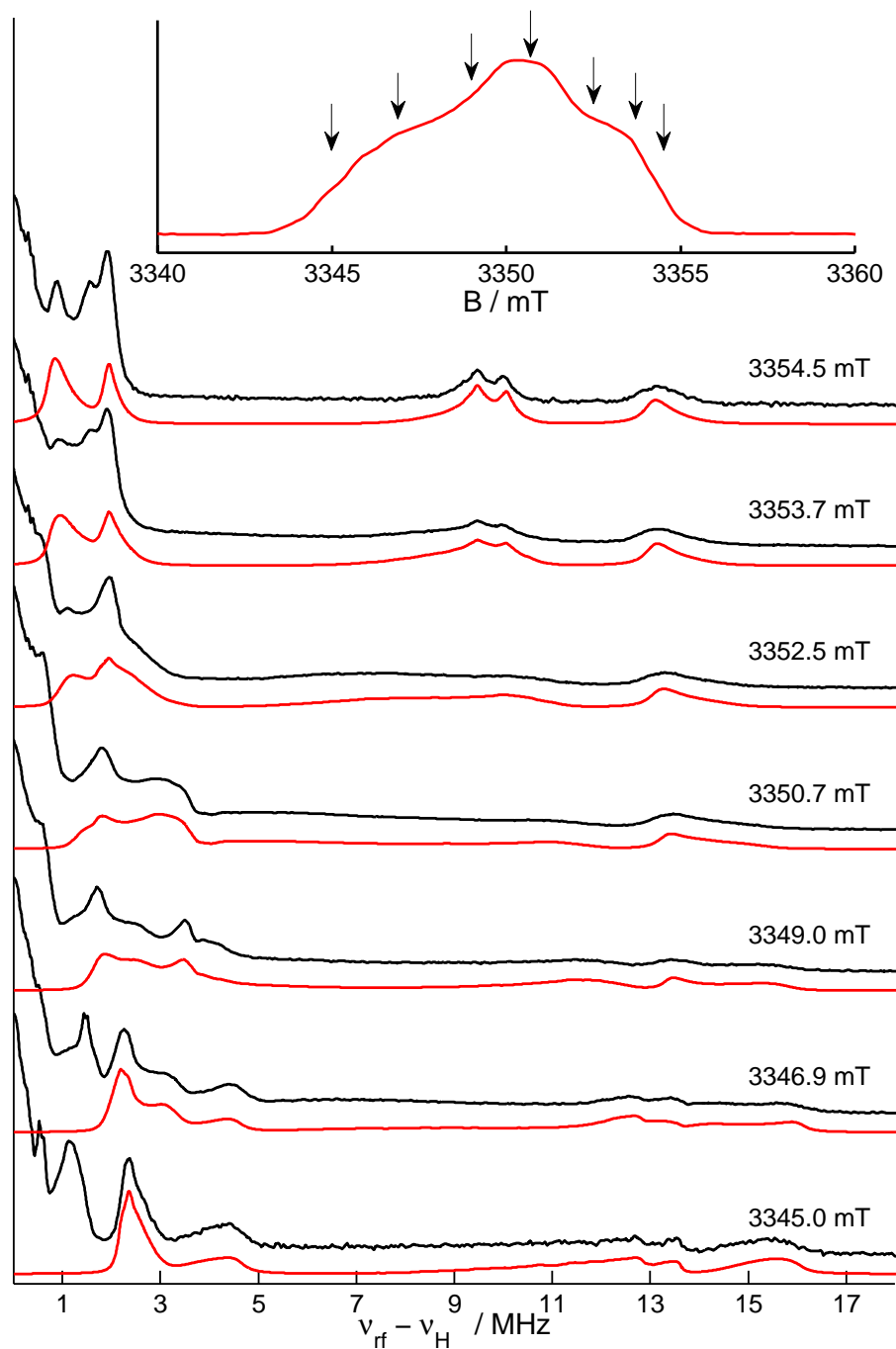


Abbildung 8.2: Orientierungsselektives 94-GHz-Davies-ENDOR an einer Probe gefrorener PSII-Lösung von *Th. elongatus*. Gemessen wurde an den im oberen Teil in Bezug zum Gesamt-EPR-Signal gesetzten Feldstellen. Messparameter: Temperatur 40 K; *srt* 5 ms; π -Mikrowellen-Pulslänge 240 ns; π -Radiofrequenz-Pulslänge 23 μ s.

Davies-ENDOR bei 94 GHz

Dass man einen Teil der bei 9,7 GHz Mikrowellenfrequenz noch auftretenden Ambivalenzen durch orientierungsselektive Hochfeld-ENDOR-Methoden überwinden und damit wesentlich zur Aufklärung der Kopplungsstärken und -orientierungen beitragen kann, wurde unter anderem schon von Rohrer *et al.* [165] und Bennati *et al.* [166] demonstriert. Für die vollständige Abdeckung des Y_D^\bullet -Signals benötigt es sieben orientierungsselektiver Einzelspektren, die in Abb. 8.2 abgebildet sind. Im Einschub am oberen Ende der Abbildung findet sich zudem das schon in Abb. 7.1 gezeigte EPR-Spektrum, hier in seiner ursprünglichen Form als FSE, mitsamt Markierungen an den zudem bei den Einzelspektren notierten Mess-Feldpunkten der ENDOR-Spektren. Die ENDOR-Spektren starten mit der niedrigsten Feldposition unten und gehen bis zur höchsten Feldposition am oberen Ende der Spektrenreihe und beschreiben damit einen Aufstieg vom Bereich g_x nach g_z . Gezeigt werden die Spektren wieder nach einer Symmetrisierung und einer Normalisierung um die freie Protonen-Larmorfrequenz, was die grafische Vergleichbarkeit der Spektren hinsichtlich der ENDOR-Aufspaltungen herstellt.

Verglichen mit dem ENDOR-Spektrum bei 9,7 GHz Mikrowellenfrequenz stellen sich schon erstem Augenschein nach deutliche Verbesserungen dar. Der mittlere Bereich der Spektren wird wie zuvor von dem Doppelsignal der α -Protonen H3 und H5 dominiert. Die schon im X-Band-Spektrum deutlich hervortretende Doppelspitze kann hier durch ihr Auftreten in den Spektren bei 3353,7 mT bzw. 3354,5 mT einer Orientierung in der Nähe von g_z zugeordnet werden. Die stärkeren Ausläufer der Kopplungen finden sich hier in den Spektren bei 3345,0 mT bzw. 3346,9 mT, mithin im Bereich von g_x . An diesen Messstellen erscheinen sie um 13 MHz sowohl voneinander als auch vom darüber liegenden Signal des β -Protons H7a aufgelöst, sodass diese Hauptwerte hier schon mit großer Zuverlässigkeit zugeordnet werden können. Die schwächeren Kopplungskomponenten lassen sich hingegen bei 3349,0 mT bzw. 3350,7 mT zwar um etwa 4,5 MHz ausmachen, erscheinen aber nicht vollständig aufgelöst, was aber immerhin eine vorsichtige Zuordnung zu möglichen Hauptwerten erlaubt. Kann man die Hauptwerte des Kopplungstensors für die beiden Protonen H3 und H5 so schon zuweisen, weil sich die Kopplungen deutlich in den Spektren abzeichnen, ist die Argumentation für die Orientierung der beiden Protonen weniger eindeutig. Die Orientierung der Kopplungen zeigt sich zuvorderst daran, in welchen Spektren welche Kopplungskomponente erscheint, was für die Zuordnung dieser Komponenten schon verwandt wurde; will man darüber hinaus die Orientierung der Kopplung näher bestimmen, ist man auf Vergleiche zwischen Messung und Simulation angewiesen, wie ausgeprägt welche Signale in welchen Spektren erscheinen, mithin über die Entwicklung der Kurvenform.

Auf diesem Weg und mit dem Vorwissen, dass die am Ring gebundenen Protonen weiter in der Ringebene orientiert sein müssen, ergibt sich für die beiden Protonen ein Bindungswinkel zwischen 20° und 25° relativ zur Lage des \mathbf{g} -Tensors. Dies bedeutet, da bei den vorderen α -Protonen g_y die ausgezeichnete Achse darstellt und der Bindungswinkel eine Drehung um die z -Achse beschreibt, eine Orientierung, die zwischen fünf und zehn Grad von der Bindungsgeometrie des ungestörten Moleküls verdreht erscheint (vergl. hierzu die Lage der \mathbf{g} -Tensorachsen in Abb. 6.1). Aufgrund der der Orientierungsselektion im Hochfeld inhärenten Symmetrien, durch die eine positive und negative Drehung in den Spektren ununterscheidbar erscheinen, lässt sich aber auch durch diese Spektren keine Zuordnung treffen, welche der beiden Hyperfeinkopplungen die stärkere ist bzw. wie die Signale den einzelnen Protonen zuzuordnen sind. Diese Ambivalenz zwischen H3 und H5 wird durch die Orientierungsselektion nicht aufgehoben und findet sich entsprechend in allen diese Protonen besprechenden Veröffentlichungen (vergl. hierzu auch Tab. 8.2).

Aussagen über das stark wechselwirkende β -Proton H7a werden in den orientierungsselektiven Spektren an gefrorener Lösung vor allem durch die höhere Linienbreite des Signals erschwert, die keine detaillierte Struktur ausmachen lässt. Zudem ist die Orientierung der Protonenkopplung nicht wie bei den Ringprotonen auf eine Dimension beschränkt. Beides versieht die aus den Spektren abzuleitende Orientierung der Hyperfeinkopplung in Bezug zum \mathbf{g} -Tensor mit einer größeren Unzuverlässigkeit. Die nachweisbare Kopplung vollzieht in den Spektren eine Entwicklung von einem Signal um etwa 15,5 MHz bei g_x über ein breites Signal, das sich bis zum Spektrum bei 3350,7 mT zwischen etwa 13 MHz und 16 MHz erstreckt, zu einem wieder etwas definierterem Signal im g_z -Bereich der Spektren um etwa 13 MHz. Dies erlaubt, zusammen mit dem X-Band-Spektrum in Abb. 8.1, eine Abschätzung der Hauptwerte auf den Bereich zwischen 26 MHz und 32 MHz mit dem niedrigeren Wert eher als A_z , einem etwas höheren um A_y und der höheren Grenze als A_x . Exaktere Werte und eine über die grobe Zuordnung der Hauptwerte zu den Tensor-Hauptachsen hinausgehende Bestimmung der Kopplungsorientierung benötigen aber wieder eine Betrachtung der Kurvenform und deren Verlauf zwischen den Spektren. Dies liefert immer noch wichtige Informationen für die spätere Rekonstruktion des Hyperfeinkopplungs-Tensors am Einkristall, die genauen Werte für Hauptwerte und Orientierung der Kopplung müssen dann aber auch an diesen Spektren gewonnen werden.

Die schwächeren Signale mit Kopplungsstärken unterhalb von 10 MHz werden im Hochfeld durch die Orientierungsselektion zwischen den Spektren zumindest zum Teil voneinander aufgelöst. Durch die weitgehend ähnlichen Kopplungsstärken dieser Protonen überlappen deren Signalverläufe über die Spektren hinweg allerdings soweit, dass man in den gezeigten

Lösungsspektren schwerlich einen Ansatzpunkt finden kann, die Signalspitzen einzelnen Protonen zuzuordnen. Selbst unter Berücksichtigung geometrischer Beschränkungen für die Kopplung der beiden hinteren α -Protonen H2 und H6 dahingehend, dass ihre Kopplung lediglich in der Ringebene verdreht ist, erhält man kein klares Bild über den Verlauf der zusammengehörenden Protonensignale wie bei den stärkeren Kopplungen von H3/H5 und H7a. Ein Hinweis, der eine Zuordnung ermöglichen würde, wäre die Aufspaltung der H2/H6-Signale in Doppelspitzen, wie man sie für zumindest zwei der drei Komponenten der H3/H5-Kopplungen erhält. Obgleich mehrere Signale den Eindruck vermitteln könnten, eine ähnliche Aufspaltung aufzuweisen — etwa die zwei Spitzen um 2 MHz in den Spektren bei 3353,7 mT und 3354,5 mT oder das Signal bei etwa 1,5 MHz im 3346,9-mT-Spektrum, besser ersichtlich in Abb. 9.7 —, lässt sich dies aus den Lösungsspektren allein nicht belegen. Die in Abb. 8.2 gezeigten Spektrensimulationen, die bereits alle im Abschnitt 8.2 rekonstruierten Protonenkopplungen beinhalten, zeigen dann auch, dass das Signal der beiden hinteren Protonen H2 und H6 im Lösungsspektrum spektroskopisch hier voneinander nicht getrennt erscheint. Als weitere Schwierigkeit erweist sich aus dem Vergleich von Spektren und Simulation die Tatsache, dass der Bereich schwacher Kopplungen nicht nur von den drei weiteren, am Tyrosin gebundenen Protonen ausgemacht wird, sondern noch weitere, nicht zuordenbare Kopplungen zur Spektrenintensität beitragen. Selbst nach Rekonstruktion aller beschriebenen Protonen-Hyperfeinkopplungen bleiben so Signalspitzen und Einzelheiten im Verhältnis der einzelnen Signalintensitäten, die sich durch diese Protonen nicht erklären lassen und vermutlich auf Protonen im Proteinrückgrat oder von außerhalb der direkten Y_D^\bullet -Umgebung zurückzuführen sind.

Unterhalb von 10 MHz wird auch das breite, dipolare Signal des per Wasserstoff-Brückenbindung an das Y_D^\bullet koppelnden Protons vermutet. Aufgrund der Schwierigkeiten der Signalzuordnung, dem großen Überlapp der Einzelsignale und den von außen beitragenden Intensitäten in diesem Bereich erscheint eine Bestimmung dieser Kopplung allein über das Protonen-ENDOR kaum möglich und bedarf eines getrennten experimentellen Ansatzes. Dieser wird in Kapitel 9 vorgestellt, und die gefundene Kopplung für die Wasserstoff-Brückenbindung wird im Anschluss daran in die hier gezeigte Hochfeld-ENDOR-Messung an Proben gefrorener Lösung eingeordnet und diskutiert.

Insgesamt erweisen sich die aus Abb. 8.2 gewonnenen Informationen als wichtiger Schritt zur Simulation der Einkristallspektren und damit zur Aufklärung der Protonen-Hyperfeinkopplungen. Für die stärkeren Kopplungen H7a und insbesondere H3 und H5 lassen sich bereits zuverlässige Abschätzungen der Kopplungsorientierung, vor allem aber der Kopplungsstärke treffen. Diese können direkt in die Rekonstruktion der Einkristall-

spektren eingehen, wenn auch aufgrund der in Lösungsspektren trotz der Orientierungsselektion immer noch wirkenden Symmetrien noch wichtige Informationen fehlen, etwa die Unterscheidbarkeit der Protonenkopplungen H3 und H5 voneinander. Für die schwächer koppelnden Protonen kann die Analyse der Lösungsspektren immerhin mögliche Hauptwerte als Startpunkte für die Simulationsanpassung an die Messungen liefern, was die Kombinationsmöglichkeiten für die beiden α -Protonen H2 und H6 mit ihrer geometrisch eingeschränkteren Kopplungsorientierung deutlich beschränkt. Zudem können in der Simulation der Einkristallspektren gefundene Kopplungstensoren darauf überprüft werden, ob sie auch im Verlauf der Signale über die verschiedenen Feldstellen im ENDOR an gefrorener Lösung eine sinnvolle Lösung darstellen. Eine solche zusätzliche Falsifikationsmöglichkeit erscheint ob des nur schwer zu überschauenden Detailreichtums der Einkristall-Spektren dringend geboten.

8.2 Protonen-ENDOR am Einkristall

Ein Ziel der Hochfeld-ENDOR-Einkristall-Studie war die Rekonstruktion der vollständigen Hyperfeinkopplungs-Tensoren aller sechs direkt am Y_D^\bullet gebundenen Wasserstoffkerne. Im Gegensatz zu Proben gefrorener Lösung, in der eine Überlagerung der Signale aller beliebigen Molekülorientierungen die Spektrenform bestimmt, setzt sich ein Einkristallspektrum nur aus den Signalen der acht magnetisch unterscheidbaren Y_D^\bullet -Orientierungen der Kristalleinheitszelle zusammen. Einer gegebenen Kristallorientierung entsprechen somit 48 Hyperfeinkopplungen diskreter Stärke, die experimentell zu bestimmen sind. Dies geschieht zum einen — analog zu der in Abschnitt 7.2 gezeigten Einkristall-EPR — durch die Aufnahme und Rekonstruktion des orientierungsabhängigen Spektrenverlaufs unter Drehung des Einkristalls relativ zum Magnetfeld. Zum anderen ermöglicht die Orientierungsselektion bei einer Mikrowellenfrequenz von 94 GHz und einer entsprechenden Magnetfeldstärke von 3,35 T die schrittweise Vermessung der Kopplungen einer Kristallorientierung und damit die Separation von ansonsten überlappenden Signalen in einzelne Spektren. Dies ist in Abb. 8.3 dargestellt, welche das schon in Abb. 7.2 gezeigte Einkristall-Rotationsspektrum mitsamt Simulation der Orientierungsabhängigkeit der Y_D^\bullet - g -Werte zeigt. Eingezeichnet sind zudem die Feldstellen, an denen an diesem Kristall in den jeweiligen Orientierungen ENDOR-Messungen vorgenommen wurden. Die Auswahl der Mess-Feldpunkte beruht dabei auf einer vorläufigen Simulation des vor den eigentlichen ENDOR-Messungen aufgenommenen EPR-Rotationsspektrums. In diese vorläufige Simulation gingen nur die drei größten Hyperfeinkopplungen ein. Dies erscheint einerseits gegeben aufgrund der experi-

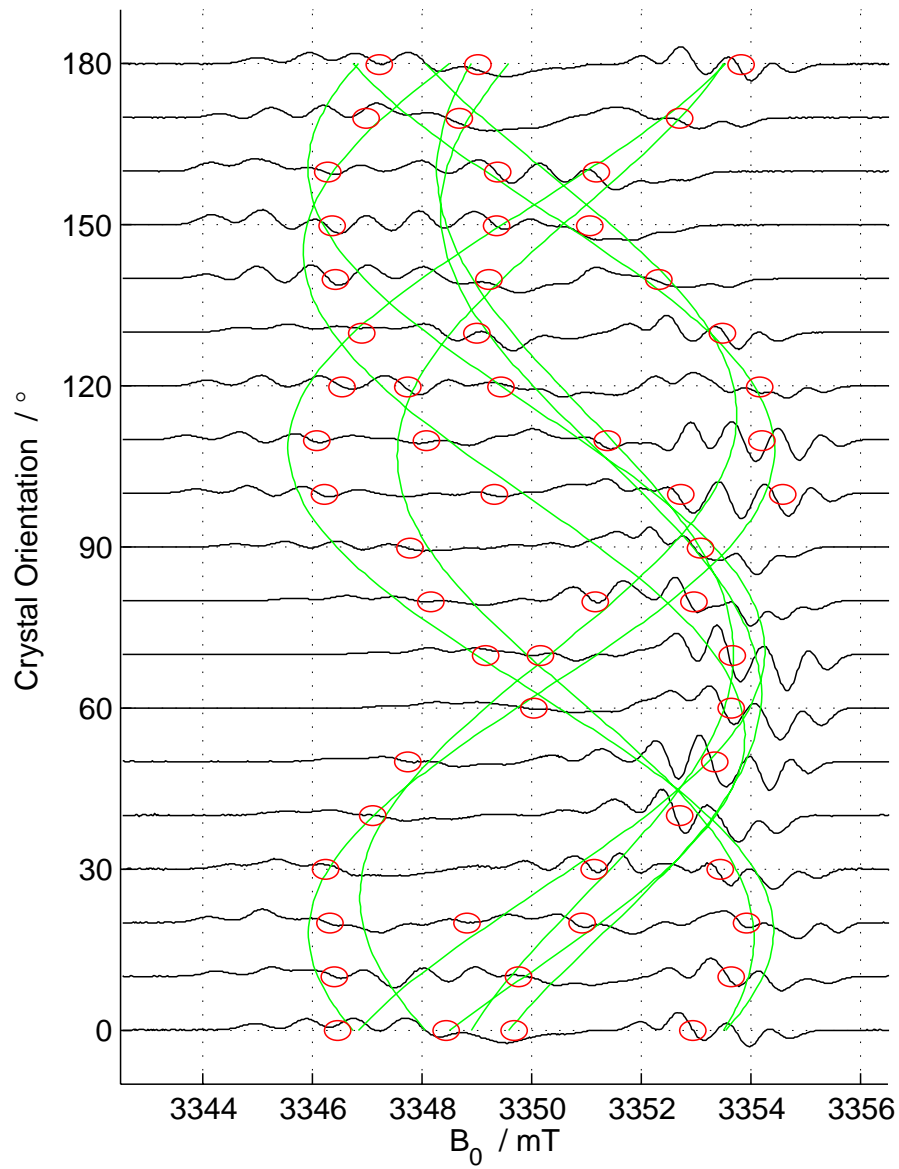


Abbildung 8.3: EPR-Rotationsspektren von Kristall I (vergl. Abb. 7.2) und daraus abgeleitete Feldstellen für die in Abb. 8.4 und 8.5 dargestellten ENDOR-Messungen. Siehe Haupttext für Details und Abb. 7.2 für Messparameter.

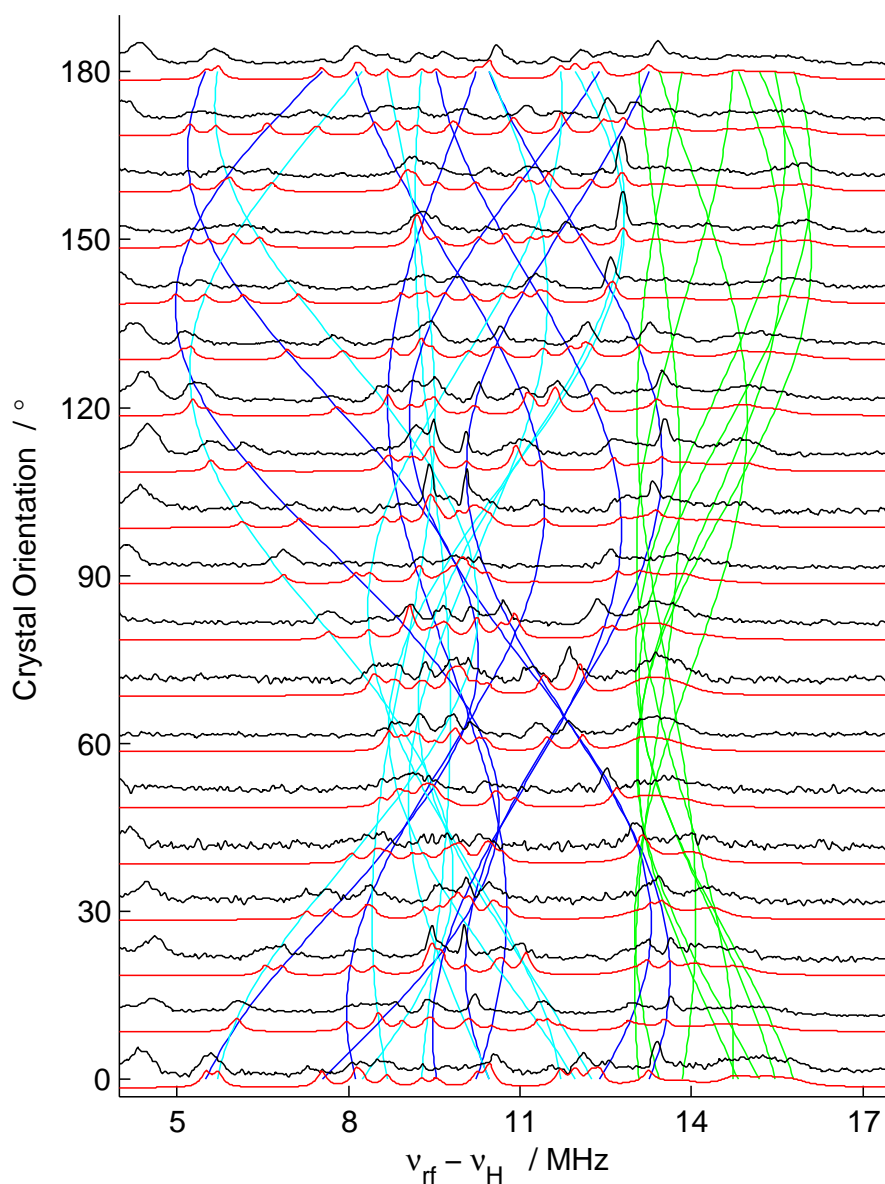


Abbildung 8.4: Davies-ENDOR-Rotationsspektren (schwarz) von Y_D^\bullet in einem PSII-Einkristall von *Th. elongatus*. Nur der äußere Bereich mit einem Abstand zur Larmor-Frequenz von 4 MHz und mehr ist dargestellt. Jedes Spektrum setzt sich als Summe aus den in Abb. 8.3 gekennzeichneten Einzelmessungen zusammen; vergl. dazu die Abb. B.2 bis B.5 im Anhang B. Die Simulation der Spektren ist in rot abgebildet, dazu in grün, dunkel- und hellblau die Rotationsabhängigkeit der Protonensignale von H7a, H5 und H3 in der Einkristall-Basiszelle. Messparameter: Temperatur 40 K; *srt* 8 ms; Mikrowellen- π -Pulslänge 128 ns; Radiofrequenz- π -Pulslänge 16 μ s.

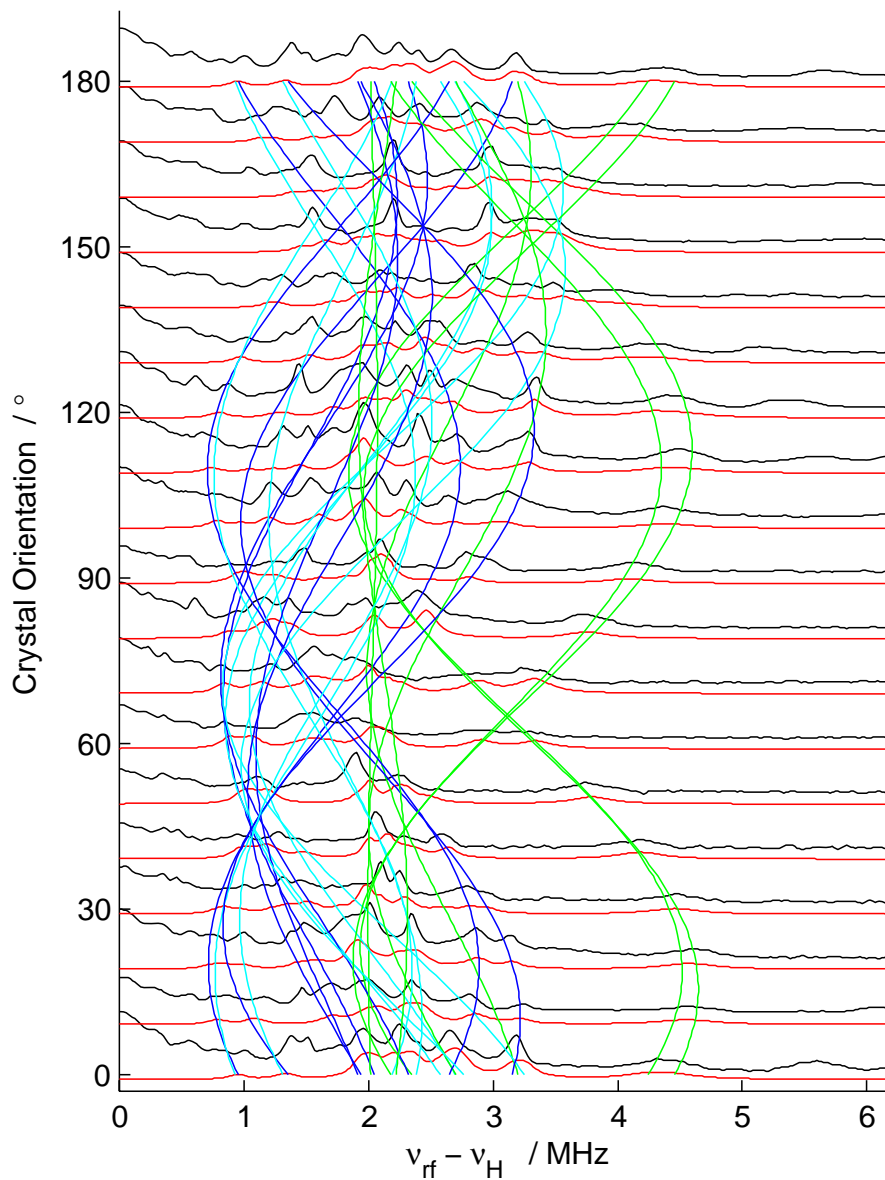


Abbildung 8.5: Davies-ENDOR-Rotationsspektren (schwarz) von Y_D^\bullet in einem PSII-Einkristall von *Th. elongatus*, hier der innere Teil der Spektren um die Protonen-Larmorfrequenz. Bei den hier erfassten Protonen handelt es sich um das zweite β -Proton H7b (grün) und die beiden verbleibenden α -Protonen an den dem Phenyl-Sauerstoff abgewandten Ringpositionen, H2 und H6 (in hell-, bzw. dunkelblau). Messparameter und Einzelheiten ansonsten wie in Abb. 8.4.

mentellen Notwendigkeit, die Probe im Resonator zu belassen, um die so zu rekonstruierende Orientierung nicht zu verändern, was Rechenzeit zu einer kritischeren Variable macht als in der nachträglichen Analyse der Kristallorientierung, wobei die Anzahl der eingehenden Kopplungen exponentiell die Rechenzeit bestimmt; andererseits erscheint dies gerechtfertigt durch die erwiesenermaßen gute Rekonstruierbarkeit der Orientierung, wie in Abschnitt 7.3 gezeigt wurde, und die durch die Anregungsbreite recht hohe Toleranz bezüglich der Wahl der Feldstellen.

Die aus der anschließend erstellten, vollständigen Simulation des EPR-Rotationsspektrums hergeleitete Orientierung des Kristalls im Resonator sowie die Orientierung des Y_D -Radikals in der Kristalleinheitszelle gehen als Parameter direkt in die Simulation der Einkristall-ENDOR-Spektren ein. Für diese ist die Rekonstruktion der absoluten Kopplungsorientierung im Laborsystem für jede Hyperfeinkopplung für jedes der acht Tyrosine der Kristall-Einheitszelle Voraussetzung. Vorgehen und in die Simulation einfließende Parameter werden dazu ausführlicher in Anhang A.2 behandelt.

Wie in Abb. 8.3 ersichtlich waren für die vollständige Erfassung der Signale aller Molekülorientierungen im Kristall zwei bis vier ENDOR-Messungen für jede Kristallorientierung notwendig. An den 19 Kristallorientierungen wurde so eine Gesamtzahl von 58 ENDOR-Spektren aufgezeichnet. Diese finden sich in ihrer Vollständigkeit und mitsamt Simulation der Einzelspektren¹ in Anhang B. Wie Abb. 8.3 und nähere Begutachtung der Einzelspektren aufzeigt, liegt die Signaltrennung aufgrund der Orientierungsselektion im W-Band noch deutlich unterhalb der Grenze, einzelne Radikalorientierungen isolieren zu können. Dies liegt zunächst am weitgehend paarweisen Linienverlauf, bedingt durch die Montierung des Kristalls an der Probenröhrchen-Innenwand; dann aber vor allem an den starken Hyperfeinkopplungen der Y_D^\bullet -Protonen im Vergleich zur \mathbf{g} -Tensor-Anisotropie, welche selbst bei weniger geordneter Kristallmontierung zu einer Überlappung der Einzelsignale führt. Trotzdem stellen diese Einzelspektren für die Simulation wertvolle Informationen zur Verfügung, die aus nicht-orientierungsselektiven Messungen nur schwer zu gewinnen wären: so gelingt es an einer Vielzahl von Messstellen, ENDOR-Spektren aufzunehmen, zu denen nur zwei Radikalorientierungen beitragen und die darum nur 16 diskrete, relevante Kopplungssignale beinhalten. Dies vereinfacht einerseits die Simulation, indem Ungewissheit in der Zuordnung der Signale zur entsprechenden Radikalorientierung wesentlich verringert wird, andererseits stellt es eine Möglichkeit zur Überprüfung der in die Simulation eingehenden Kopplungstensoren dar, da in der abschließenden Simulation die Zuordnung dieser Signale

¹siehe Abschnitt 9.4 zu den Details der dort gezeigten Simulation unter Einbeziehung der rekonstruierten Kopplung für die Wasserstoff-Brückenbindung

zu den entsprechenden Y_D^\bullet -Orientierungen ebenso wieder auftauchen muss. Darüber hinaus bieten die Einzelspektren Gelegenheit, Einzelheiten der Simulation zu überprüfen, die ansonsten in der Überlagerung aller Signale überdeckt würden: etwa die Gültigkeit und Qualität der simulierten Orientierungsselektion nach dem in Anhang A.3 beschriebenen Verfahren, die nicht nur Linienposition und -auswahl für die Simulation eines Spektrums festlegt, sondern ebenso auch Linienhöheneffekte für die Signale, die über partielle Orientierungsselektion noch gedämpft im Spektrum auftauchen.

Die eigentliche Aufgabe zur Rekonstruktion der zu untersuchenden Hyperfeinkopplungen besteht darin in der simulativen Rekonstruktion der aufgenommenen Einzelspektren, und die Qualität dieser Simulation ist das entsprechende Maß für das Gelingen dieses Unterfangens, weswegen die im Anhang wiedergegebenen Einzelspektren hier und in Kapitel 9 die notwendige Referenz für solche Beurteilungen darstellt. Um die Einzelspektren aber verstehen und interpretieren zu können und etwa die Orientierungsabhängigkeit der einzelnen Hyperfeinkopplungen und ihren Verlauf innerhalb der 180° -Kristallrotation zu veranschaulichen, bietet es sich an, aus diesen Einzelspektren wieder ein virtuelles Gesamtspektrum zu errechnen. Dies ist in den Abb. 8.4 (für den Signalbereich der stärkeren Kopplungen zwischen 4 und 17,5 MHz) und 8.5 (für den Signalbereich schwächerer Kopplungen bis und 17,5 MHz) geschehen. Zur Berechnung beider Abbildungen wurden für Messung (schwarz) und Simulation (rot) die symmetrisierten, auf die freie Protonen-Larmorfrequenz umgerechnete und auf ihren Signalinhalt normierten Einzelspektren der einzelnen Kristallausrichtungen addiert. Die Aufspaltung in zwei Abbildungen dient der besseren Veranschaulichung und wurde dadurch ermöglicht, dass es in den Spektren zu keinerlei Überlapp zwischen den Signalen starker Kopplungen (H3, H5, H7a) mit denen schwacher Kopplungen (H2, H6, H7b) kommt. Da, wie weitere Analyse zeigen wird, es sehr wohl Überlapp zwischen den Hyperfeinkopplungen gibt, primär zwischen der A_y -Komponente der Protonen H3 und H5 mit der A_x -Komponente von H7b,² ist dies Eigenschaft der getroffenen Radikalorientierungen in den einzelnen Kristalleinstellungen. Damit ein einzelner Hauptwert eines Hyperfeinkopplungs-Tensors in einem ENDOR-Rotationsspektrum eines Einkristalls überhaupt vollständig ausgedrückt wird, muss eine Orientierung getroffen werden, in der die Orientierung dieser Tensorkomponente exakt parallel zum Magnetfeldvektor verläuft. Dies ist innerhalb der gemessenen Spektren wohl für die A_x -Komponente von H7b, nicht aber für die A_y -Komponente der beiden stark koppelnden α -Protonen gegeben. Während die geringsten Kopplungen von H3 und H5 in den Spektren gefrorener Lösung darum

²vergl. Abb. 10.1 sowie Tab. 10.2 für die gesamte Breite dieser Hyperfeinkopplungen und Abb. 8.2, im Besonderen die Spektren an 3345 mT und 3349 mT, für eine erste visuelle Identifizierung als y - bzw. x -Komponente der genannten Protonenkopplungen

bis etwa 4 MHz hinunter reichen, liegt die schwächste in den Einkristall-Spektren auftretende H3/H5-Kopplung bei etwa 5 MHz. Das Nichtauftreten von Kopplungen in diesem Bereich zwischen 4 und 5 MHz verdeutlicht weiter die Wichtigkeit der orientierungsselektiven ENDOR-Spektren an Proben gefrorener Lösung zur Aufklärung der Hauptwerte der hfc-Tensoren. Demgegenüber erreicht die H7b-Kopplung sowohl in Messungen gefrorener Lösung als auch an dem vermessenen Einkristall Kopplungsstärken bis etwa 4,7 MHz, nämlich in den Spektren bei etwa 15° und nochmals bei etwa 110° in Abb. 8.5.

Die stärker koppelnden Protonen: H3, H5, H7a

Die drei die Signale im höherfrequenten Bereich der Spektren hervorrufenden Kopplungen lassen sich aufgrund bestehender Veröffentlichungen analog zum ENDOR an Proben gefrorener Lösung den beiden vorderen α -Protonen H3 und H5 sowie der größeren der beiden β -Kopplungen H7a zuordnen. Dies ist gezeigt in Abb. 8.4, in der neben der Simulation der Spektren auch die Orientierungsabhängigkeit der Hyperfeinkopplungen abgebildet ist: in hellblau die des H3, in dunkelblau die des H5 und in grün die des H7b. Die Zuordnung der hochfrequenten Resonanzsignale zum β -Proton H7a erfolgt dabei sowohl aufgrund der in der Literatur zu findenden Angaben als auch durch die Ergebnisse des orientierungsselektiven ENDOR an gefrorener Lösung, in der die aufgrund der ursprünglichen, im Y_D^\bullet leicht gebrochenen Molekülsymmetrie fast äquivalenten α -Protonenkopplungen ein deutlich erkennbares Doppelsignal verursachen, das nicht über 14 MHz hinausreicht. Die Signale oberhalb 14 MHz in den Einkristallspektren, am ehesten zu beurteilen in den Einzelspektren im Anhang, zeigen dabei eine breite, wenig aufgelöste Struktur im Vergleich mit scharfen, wohl definierten Spitzen, die nur bis etwa 14 MHz auftreten. Dies ist ein Hinweis auf eine möglicherweise weniger einheitliche oder in sich flexiblere Bindung des H7a-Protons an das β -Kohlenstoffatom C7. Die Unterscheidung zwischen den Signalen von H3 und H5, die Rekonstruktion der Orientierungsabhängigkeit und im Besonderen die Zuordnung, welcher Satz orientierungsabhängiger Hyperfeinkopplungen zu welchem der beiden Protonen gehört, muss auf der Basis der vollständigen Diskussion der Simulationsergebnisse in Abschnitt 8.3 erfolgen.

Der Vergleich von Messspektren mit Simulationen in den Abb. 8.2 und 8.4 zeigt hier, wie durch die Kombination von orientierungsselektiven ENDOR-Messungen an Proben gefrorener Lösung mit denen an Einkristallen eine umfassende Aufklärung der Hyperfeinkopplungen für die drei Protonen H3, H5 und H7a ermöglicht wurde. Die vollständigen Sätze an Hauptwerten und die Orientierung der Kopplungstensoren in Relation zum \mathbf{g} -Tensor findet sich in den Tabellen 8.1a und 8.2. Die auf dieser Grundlage errechneten Simulationen re-

produzieren alle klar aufgelösten Details oberhalb von 5 MHz. Für die α -Protonen H3 und H5 konnte die y -Komponente, die als solche in den Spektren selbst nicht in reiner Form auftaucht, über die Bestimmung der Kopplungsorientierung und den daraus folgenden Beitrag dieser Komponente zu der effektiven Kopplung bei gegebenen Kristallausrichtungen rekonstruiert werden. Die H7a-Signale erscheinen in der Spektrensumme in Abb. 8.4 weitgehend unaufgelöst, aber der orientierungsabhängige Verlauf der Signale wird durch die Simulation wiedergegeben. Hier ist der Vergleich mit dem Satz orientierungsselektiver Einzelspektren im Anhang aufschlussreich, der für die einzelnen Kristallausrichtungen die Trennung einzelner Signale und damit die Rekonstruktion der Kopplungsorientierung für das β -Proton H7a auf eine Genauigkeit von $\pm 5^\circ$ erlaubt. Insgesamt erscheinen die Abweichungen zwischen Simulation und Experiment hinsichtlich der Signalposition in einer Höhe von etwa 200 kHz angesichts der Vielzahl der eingehenden Parameter im Rahmen des Erwartbaren; hierbei ist auch die Einstellung der Kristallausrichtung während der Aufnahme der Rotationsspektren zu beachten, die manuell mittels Verwendung eines Goniometers erfolgte und selbst mit einer Ungenauigkeit von etwa $\pm 1^\circ$ behaftet ist.

In Abschnitt 7.2 wurden bereits die geometrisch hervorgehobene Orientierung während der Drehung des Kristalls gegen das Magnetfeld zwischen etwa 60° und 70° besprochen. Dort verläuft die kristallographische a -Achse annähernd kollinear mit dem Magnetfeldvektor, und die Signale ordnen sich in zwei nur durch die nicht-kristallographische Dimer-Rotationsachse des Kristalls aufgespaltene Gruppen. Dieselbe Symmetrie dominiert entsprechend die an denselben Orientierungen aufgenommenen ENDOR-Spektren, und so zeigen die orientierungsabhängigen Verläufe der Hyperfeinkopplungen zwischen 60° und 70° ebendiese Aufspaltung in zwei Gruppen, sowohl an dieser Stelle als auch in Abb. 8.5.

Die schwächer koppelnden Protonen: H2, H6, H7b

Die Abb. 8.5 umfasst den Bereich niedrigfrequenter Kopplungen, in denen die Hauptkopplungen diejenigen der beiden hinteren α -Ringprotonen H2 und H6 sowie die schwächere der beiden β -Protonen H7b darstellen. Analog zu Abb. 8.4 finden sich im oberen Bereich über 3,5 MHz vergleichsweise breite Kopplungen, hier hervorgerufen durch das wieder offenbar flexibler gebundene β -Proton H7b, und schärfere Signale im niederen Bereich von 1 bis etwa 3 MHz. Im Unterschied zur Situation der stärker koppelnden Protonen findet sich hier aber ein wesentlich größerer Überlapp der Signale im Bereich von etwa 2 MHz bis 3,5 MHz. Dies belastet die Simulation dieses Bereiches und die eindeutige Rekonstruktion der teilhabenden Hyperfeinkopplungen. Erschwerend hinzu kommen die schon in Abschnitt 8.1 gefundenen, nicht dem Y_D^\bullet zuordenbaren ENDOR-Intensitäten, die, wie aus Abb. 8.2 er-

sichtlich, bis etwa 3 MHz in die Spektren hineinragen.

Die Aufhebung dieser Schwierigkeiten gelang nur unter Verwendung aller vorliegenden Informationen über die Kopplungen aus den im Anhang wiedergegebenen Einzelspektren und im ständigen Vergleich mit den an gefrorener Lösung gefundenen Signalen. Die breiten Signale, die sich bis etwa 5 MHz erstrecken, konnten so dem zweiten β -Proton H7b zugeschrieben werden, sodass neben den Hauptwerten auch die Kopplungsorientierung zum \mathbf{g} -Tensor rekonstruiert werden konnte. Diese Ergebnisse finden sich in Tab. 8.2. Für die α -Kopplungen konnten durch die grundsätzliche Kenntnis der Bindungsgeometrie die Kopplungsorientierung bis auf eine Genauigkeit $\pm 2^\circ$ gefunden und die entsprechenden Hauptwerte anhand der Lösungs- und Einkristallspektren zugeordnet werden. Diese finden sich in Tab. 8.1b.

8.3 Diskussion

Für den Vergleich der hier gefundenen Hyperfeinkopplungen mit den in den Tab. 8.1 und 8.2 aufgeführten Angaben anderer Autoren muss berücksichtigt werden, dass diese — mit Ausnahme der Ergebnisse von Hofbauer *et al.* [87] — nicht an Proben aus *Th. elongatus* gewonnen wurden. Eine Übersicht über die verwendeten Organismen und Methoden findet sich in Tab. 6.1. Abweichungen in den berichteten Hyperfeinkopplungen könnten so auf tatsächliche biologische Unterschiede oder auf Unterschiede in der Probenpräparation der verschiedenen Organismen zurückgehen. Demgegenüber finden sich allerdings bemerkenswerte Übereinstimmungen zwischen den hier erzielten Ergebnissen und denen von Rigby *et al.* [149], die an Spinat gewonnen wurden und so eine grundsätzliche Vergleichbarkeit der Zustände in *Th. elongatus* und Spinat nahelegen.

Insgesamt wenig berichtete Werte können für die Hyperfeinkopplungen der beiden hinteren α -Protonen H2 und H6 gefunden werden. Dies mag auf die Schwierigkeiten zurückgehen, die schwachen Kopplungen aus dem Hintergrund überlagernder Signale und voneinander aufzulösen, im Besonderen mittels X-Band-EPR an Proben gefrorener Lösung. Vor allem für die sehr schwache Kopplung entlang der z -Achse des \mathbf{g} -Tensors ist dies kaum erfolgreich durchführbar. Die hier gefundenen Hauptwerte zeigen dabei gute Übereinstimmung mit den von Rigby *et al.* [149] berichteten für die x - und y -Komponenten, die hier um die Rekonstruktion der z -Komponente und insbesondere um die der Kopplungsorientierung vervollständigt werden. Die Orientierung beider β -Kopplungen wurde dabei, sofern sie überhaupt von Relevanz war, für Zwecke der Simulation von fast allen Autoren als kol-

Tabelle 8.1: Vergleich der α -Protonen-Hyperfeinkopplungen

$A_x^{\alpha 3}$	$A_x^{\alpha 5}$	$A_y^{\alpha 3}$	$A_y^{\alpha 5}$	$A_z^{\alpha 3}$	$A_z^{\alpha 5}$	$A_{\angle}^{\alpha 3}$	$A_{\angle}^{\alpha 5}$	Ref.
-25,7	-27,3	-7,6	-8,4	-19,0	-20,2	-23,8	21,3	hier
	26,1		8,1		19,5		∓ 20	[156]
-26,8	-25,5	≈ -8		-20,1	-19,0	∓ 20		[87]
	24,0		3		19	∓ 26		[155]
	23,0		14,8	20,3	18,8	∓ 30		[154]
	23,0		12,3	20,3	18,8			[151]
	-25,4		-7,2		-19,5			[150]
-27,5	-25,6	-8,0		-20,5	-19,1	(∓ 22)		[149]
	-29,5	-9,0		-19,6		∓ 22		[148]

Tabelle 8.1a: Vergleich der Hyperfeinkopplungs-Hauptwerte und -Orientierung relativ zum \mathbf{g} -Tensor für die beiden vorderen α -Protonen H3 und H5. Alle Hauptwerte in MHz, Orientierung als Verdrehung um die g_z -Achse in Grad. In den Publikationen in Gauß angegebene Werte wurden umgerechnet. Die der Referenzliteratur entnommenen Werte wurden, da methodisch bedingt zuvor keine Unterscheidung zwischen beiden Protonen möglich war, der jeweils näher liegenden der hier bestimmten Protonen-Hyperfeinkopplung zugeordnet. Die Ungenauigkeit der hier ermittelten Werte beträgt $\pm 1^\circ$ für die Bindungswinkel und $\pm 0,1$ MHz für die Hauptwerte.

$A_x^{\alpha 2}$	$A_x^{\alpha 6}$	$A_y^{\alpha 2}$	$A_y^{\alpha 6}$	$A_z^{\alpha 2}$	$A_z^{\alpha 6}$	$A_{\angle}^{\alpha 2}$	$A_{\angle}^{\alpha 6}$	Ref.
4,7	4,5	7,4	7,1	1,5	1,4	22	-24	hier
	5,5		9,3		5,5		± 20	[156]
	3,7		7,0		3,7			[151]
4,4	4,8	7,15	7,4			(± 10)		[149]
	4,4		7,3			(± 10)		[149]

Tabelle 8.1b: Vergleich der Hyperfeinkopplungs-Hauptwerte und -Orientierung relativ zum \mathbf{g} -Tensor für die beiden vorderen α -Protonen H2 und H6. Alle Hauptwerte in MHz, Orientierung als Verdrehung um die g_z -Achse in Grad. Die Hauptwerte von [156] und [151] wurden zur besseren Vergleichbarkeit den sich aus den hier vorgestellten Untersuchungen ergebenden Tensorachsen zugeordnet. Zu [149] angegebene Winkel wurden dort für die Simulation von EPR-Spektren verwendet, aber nicht explizit in den Resultaten aufgeführt. Die hier gefundenen Hauptwerte sind mit einer Ungenauigkeit von $\pm 0,2$ MHz behaftet, die Winkelangaben mit $\pm 2^\circ$. Der Anstieg in der Unsicherheit der rekonstruierten Werte im Vergleich zu den vorderen α -Protonen ist dabei der höheren spektralen Komplexität und geringeren Signalaufösung für die schwächeren Kopplungen geschuldet.

Tabelle 8.2: Vergleich der β -Protonen-Hyperfeinkopplungen

$A_x^{\beta 7a}$	$A_y^{\beta 7a}$	$A_z^{\beta 7a}$	φ	ϑ	ψ	Ref.	$A_x^{\beta 7b}$	$A_y^{\beta 7b}$	$A_z^{\beta 7b}$	φ	ϑ	ψ
32,2	26,8	26,0	-64	12	37	hier	9,3	3,4	4,0	8	-24	15
32,8	25,8	25,8	0	0	0	[156]						
32,8	27,2	27,2				[87]						
31	28	27				[155]	7	9	3			
27,0	27,0	30,5	0	± 47	0	[154]						
27,0	27,0	30,5	0	± 47	0	[151]	3,7	3,7	9,2	0	∓ 73	0
20,2	20,2	29,3				[150]	5,2	5,2	14,3			
27,2	27,2	31,5				[149]	4,6	4,6	9,75			
28,5	28,5	33,0				[149]	3,9	3,9	9,3			
24,5	24,5	29,0				[149]	6,4	6,4	11,5			
23,3	21,6	21,6				[148]	6,2	6,2	6,2			
31,4	27,2	27,2				[145]	5,9	5,2	4,9			

Tabelle 8.2: Vergleich der Protonen-Hyperfeinkopplungen am β -Kohlenstoff C7. Alle Hauptwerte in MHz (gegebenenfalls umgerechnet aus Gauß), alle Winkel in Grad. Zur Definition der Euler-Winkel siehe Anhang A.1.1. Kopplungswinkel wurden nur aufgeführt, sofern sie in der Originalpublikation ausdrücklich als Orientierung des Hyperfeinkopplungs-Tensors angegeben wurden. Ein Vergleich der sich für die Geometrie der β -Protonen ergebenden Dihedralwinkel findet sich in Abschnitt 8.3.1 und grafisch aufbereitet in Abb. 8.8. Die Orientierung der Kopplung an sich ist in Abb. 8.7 dargestellt. Entgegen anders angegebener Deklaration dürfte es sich bei den angegebenen Orientierungen in der Referenzliteratur um den Dihedralwinkel (vergl. Kap. 8.3.1) [151,154] oder um für die Simulation benutzte [156], aber nicht eigens bestimmte Orientierungen der Wechselwirkung handeln.

linear zu den \mathbf{g} -Tensor-Achsen angenommen³ und entsprechend nicht weiter rekonstruiert. Einzelne Studien [149,151,154] beschränken sich auf die aus der Heller-McConnell-Relation gewonnenen Angabe des Dihedralwinkels der Protonen, die von der Orientierung der Hyperfeinkopplung zum \mathbf{g} -Tensor zu unterscheiden ist. Zuletzt mögen Abweichungen in den Angaben der β -Protonen-Kopplungen auch auf Schwierigkeiten zurückzuführen sein, exakte Hauptwerte aus den breiten und unaufgelösten Signalen zu gewinnen, ohne Informationen über die eigentliche Kopplungsorientierung rekonstruieren zu können. Insbesondere im Fall von X-Band-Untersuchungen, in denen Signale der α -Protonen die der β -Protonen überlagern, mag das zu einer falschen Zuschreibung von Hauptwerten führen — die senkrechten Komponenten der H7a-Kopplung mögen so leicht als zu hoch angenommen werden, die der Parallelkomponente als zu niedrig.

Anders als in vorhergehenden Studien erlaubt die Kombination aller hier gewonnenen Kenntnisse — über die Orientierung des Radikals im PSII-Einkristall, die Zuordnung der Hyperfeinkopplungen der Protonen H3/H5 und H2/H6 mitsamt ihrer Orientierung und die Verwendung orientierungsaufgelöster ENDOR-Einkristall-Daten — die Auflösung der Ambiguität zwischen H3/H5- und H2/H6-Kopplungen. Dies ermöglicht erstmals die Zuordnung der in ENDOR-Spektren gefundenen Signalen zu einem bestimmbar Proton. Die Aufhebung der Symmetrie in der Kopplung zwischen H3 und H5 bzw. zwischen H2 und H6 reflektiert dabei eine durch die Proteinumgebung induzierte Asymmetrie in der Elektronenspin-dichte, die sich nach den hier gefundenen Ergebnissen auch auf die Orientierung der Hyperfein-Kopplungsorientierung auswirkt. Die sich ergebene Kopplungsgeometrie am Ring des Y_D^\bullet findet sich grafisch in Abb. 8.6 dargestellt.

Versuche, die genaue Ursache dieser Asymmetrie mittels Berechnung über dichtefunktionaltheoretische Modelle zu bestimmen, sind dabei noch zu keinem eindeutigen Ergebnis gekommen. Himo *et al.* [167] berichten zum einen über Symmetriebrechung durch die Wasserstoffbrücken-Bindung, die Y_D^\bullet eingeht. Zum anderen finden Un *et al.* [168] Einführung von Asymmetrien in Phenoxyl-Radikale als von Wasserstoff-Verbrückungen unabhängig und stattdessen erklärbar durch die Verdrehung einer als Substitut für das Proteinrückgrat agierenden Ethylgruppe. Die Beiträge beider Effekte voneinander trennen und damit zu einer Aufklärung über die Verursachung der festgestellten Asymmetrie im Y_D^\bullet kommen zu können, bedarf sorgfältiger weiterer quantenchemischer Berechnungen, einschließlich einer genauen Nachbildung der Proteinumgebung des Y_D^\bullet . Dies würde in seinen Ausmaßen den Fokus dieser Arbeit überschreiten. Die hier rekonstruierte volle tensorielle

³In Euler-Winkeln entspricht dies, zum Vergleich mit den hier vorgestellten Werten, einer Orientierung von (0,0,0), und die Achsen des Hyperfein-Kopplungstensors verlaufen kollinear zu den \mathbf{g} -Tensor-Achsen.

Beschreibung der Hyperfeinkopplungen der sechs direkt am Y_D^\bullet gebundenen Protonen — insbesondere über die asymmetrische Verteilung der Spindichte mit einem Überschuss an C5 und C2 verglichen mit C3 und C6 — liefert allerdings wertvolle Informationen, die einer solchen zu unternehmenden DFT-Studie als benötigter Standard dienen dürften.

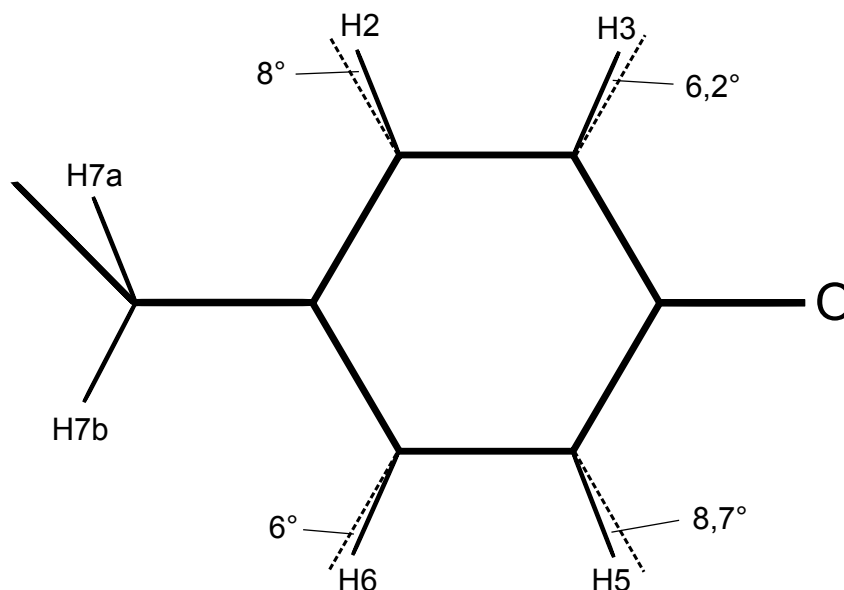


Abbildung 8.6: Die hier rekonstruierten Kopplungsorientierungen für die vier Ringprotonen am Y_D^\bullet im Vergleich mit der Standardgeometrie von 60° -Winkeln (gestrichelt). Mit Ausnahme der Bindungen am Kohlenstoff C7 befinden sich alle Orientierungen in der Ringebene.

8.3.1 Dihedralwinkel der β -Protonen

Der Dihedralwinkel der am β -Kohlenstoff C7 gebundenen Protonen zum π -Orbital des benachbarten C4-Atoms ist mit der isotropen Hyperfein-Kopplungsstärke über die Heller-McConnell-Beziehung (B_0 : Polarisierung, B_2 : Hyperkonjugation)

$$A_{\text{iso}} = (B_0 + B_2 \cos^2\theta)\rho \quad (8.1)$$

verknüpft. Über die Bestimmung der darin enthaltenen empirischen Konstante B_2 und der Elektronenspindichte ρ konnten so Werte für die Dihedralwinkel der Protonen bestimmt werden [149, 151], ebenso wie über Spektrensimulation spezifisch ^2H -markierter Präparationen [169]. Der Dihedralwinkel ist dabei geometrisch nicht identisch mit der hier bestimmten Orientierung der Hyperfeinkopplung im \mathbf{g} -Tensor-Koordinatensystem, zu der auch kein augenscheinlicher geometrischer Zusammenhang zu bestehen scheint. Vergleicht

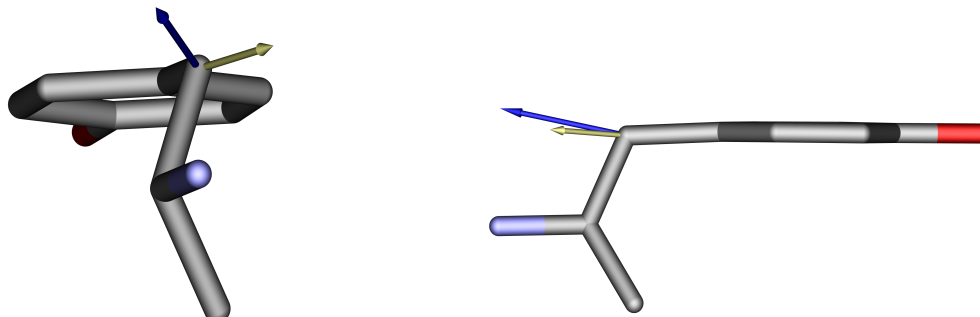


Abbildung 8.7: Orientierung der Hyperfeinwechselwirkung der beiden am β -Kohlenstoff C7 gebundenen Protonen, H7a (blau) und H7b (oliv), im dreidimensionalen Modell von Y_D^\bullet . Beide Wechselwirkungen liegen deutlich näher an der Ringebene als für die Geometrie der Protonenbindung zu erwarten ist und über die Kopplungsstärken mittels der Heller-McConnell-Beziehung rekonstruiert werden kann. Das näher an der Ringebene orientierte H7b koppelt deutlich schwächer als das weiter aus der Ringebene verdrehte H7a.

man hingegen die isotrope Kopplungsstärke A_{iso} der beiden β -Protonen mittels der Heller-McConnell-Beziehung — 28,3 MHz für H7a, 5,6 MHz für H7b —, errechnet sich für die Dihedralwinkel der Protonenbindungen 47° für H7a und 73° für H7b. In Abb. 8.8 sind diese Werte in einer Newman-Projektion am C7-Atom eingezeichnet. Entnimmt man der Röntgenstruktur 3BZ1 [22] die verbleibende C–C-Bindung am C7, bildet diese zu den ermittelten Dihedralwinkeln einen Winkel von 119° bzw. 121° . Diese Übereinstimmung zwischen Bindungsgeometrie, Röntgenspektroskopie und mittels reiner EPR-Methodik gewonnener Ergebnisse ohne Zuhilfenahme weiterer abgeleiteter empirischer Konstanten, ist ein weiteres Indiz für die Genauigkeit, mit der die Kopplungsstärken und -orientierungen aus den Einkristalldaten rekonstruiert werden konnte.

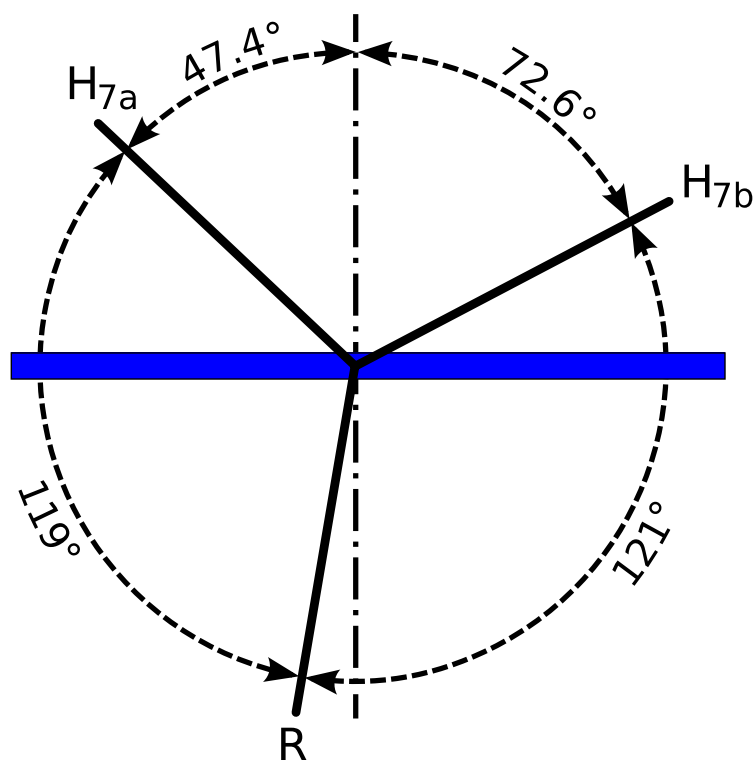


Abbildung 8.8: Schematische Newman-Projektion der Protonenbindung am β -Kohlenstoffatom relativ zur Normalen (gestrich-punktet) der Ringebene (blau). Die angegebenen Winkel zur Ringnormalen ergeben sich aus der Heller-McConnell-Beziehung; die Orientierung der C–C-Bindung ist der Röntgenstruktur [22] entnommen.

Kapitel 9

Deuteronen-ENDOR am Tyrosin-D

Erste Anzeichen für die Existenz einer Wasserstoff-Brückenbindung zwischen Y_D^\bullet und anderen Bestandteilen der Proteinumgebung gehen zurück auf die Zeit, als das damals als *Signal II* benannte EPR-Signal noch nicht als Tyrosinradikal hatte identifiziert werden können. Versuche, die Wasserstoff-Verbrückung des Y_D^\bullet aufzuklären, wurden mittels selektiver Mutation des Proteins unternommen und demonstrierten das Verschwinden von der Wasserstoff-Brückenbindung zugeschriebenen Effekten unter Austausch des naheliegenden Histidins 189 [53, 170]. Diese Ergebnisse stimmten überein mit frühen Versuchen, die Proteinumgebung des Y_D durch Kraftfeld-Molekülmodellierung zu rekonstruieren, welche ebenfalls His189 als möglichen Bindungspartner ausgemacht hatten [171, 172]. EPR-Studien wurden unternommen an D_2O -ausgetauschten und ^{15}N -markierten Präparationen [74, 150, 152, 154, 169, 173–175] und konnten einige der elektronischen Eigenschaften der Wasserstoff-Brückenbindung rekonstruieren. Während die Hinweise auf D2-His189 als Bindungspartner in einer Wasserstoff-Verbrückung des D2-Tyr160 damit ausreichend abgesichert erscheinen, bleiben Fragen offen, inwieweit Y_D^\bullet neben dieser einen Bindung eventuell noch weitere einget oder gar Teil eines komplexeren Wasserstoff-Brückenbindungsnetzwerks ist und ob Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen der reduzierten Form Y_D und Y_D^\bullet bestehen [47, 172, 176, 177].

Die Methode, diese Fragen aufzuklären, besteht hier aus der selektiven Ersetzung lösemittelzugänglicher Protonen mit Deuteronen durch einen H_2O/D_2O -Austausch an ansonsten erhaltenen PSIIcc-Präparationen nach der in Abschnitt 3.5.2 wiedergegebenen Prozedur. Die so entstehende Deuterium-Brückenbindung ist direkter Untersuchung mittels gepulsten Hochfeld-EPR-Methoden zugänglich, wobei sich für das schwerere Deuterium und das entsprechend des gyroskopischen Verhältnisses schwächer koppelnde Deuterium Mims-ENDOR für die Untersuchung anbietet (vergl. Kap. 3.3.5). Die Untersuchung im Hochfeld

bei 94 GHz Mikrowellenfrequenz und entsprechender Magnetfeldstärke um 3350 mT folgen dabei dem in Kapitel 6 vorgestelltem Muster und machen durchweg Gebrauch von der herrschenden Orientierungsselektion im ENDOR sowohl an Proben gefrorener Lösung als auch an Einkristallen.

9.1 Orientierungsselektives ^2H -ENDOR an Proben gefrorener Lösung

Das FSE einer deuterierten gefrorenen Lösungsprobe — abgedruckt oberhalb der ENDOR-Spektren in Abb. 9.1 und in seiner pseudomodulierten Form noch einmal und mitsamt Simulation über Abb. 9.3 — zeigt bei 94 GHz Mikrowellenfrequenz keine sichtbaren Unterschiede zum FSE einer nach Standardprotokoll erstellten PSIIcc-Präparation. Die Simulation in Abb. 9.3 verwendet somit dieselben Parameter, wie sie im voran gegangenen Kapitel hergeleitet und für die EPR-Simulation verwendet wurden. Dies zeigt nicht nur, dass die Deuterierung der Wasserstoff-Brückenbindung keine messbaren Auswirkungen auf die ermittelten \mathbf{g} -Hauptachsenwerte hat (s. Tab. 10.1). Auch die das Spektrum bestimmenden Hyperfeinkopplungen liegen in der deuterierten Probe unverändert vor. Dies ist ein erster Hinweis, dass der $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austausch allein auf das Proton der Wasserstoff-Brückenbindung Auswirkungen hatte und die Bindungsstellen entlang des Rings und am β -Kohlenstoff weiter mit Protonen besetzt sind.

Zur Aufnahme aller Hyperfein-Wechselwirkungen am deuterierten $\text{Y}_\text{D}^\bullet$ wurden insgesamt sieben Mims-ENDOR-Spektren entlang des EPR-Signals aufgenommen. Diese Feldstellen wurden in Abb. 9.1 vermerkt und ihre Position zum FSE als Pfeil im oberen Einschub eingezeichnet. Der untere Teil zeigt die an diesen Feldstellen aufgenommenen Mims-ENDOR-Spektren mitsamt ihrer Simulation, die, wie im vorherigen Kapitel, an dieser Stelle bereits alle in dieser Studie rekonstruierten Werte für die Hyperfeinkopplung enthält. Die Spektrenfolge startet mit der an der g_x -Flanke aufgenommenen Spektren unten (bei 3345,4 mT und 3346,7 mT) und endet oben mit den Spektren der g_z -Flanke (bei 3352,7 mT und 3354,2 mT). Für die Darstellung wurden die ENDOR-Spektren wiederum skaliert auf ihren Signalinhalt, symmetrisiert und anschließend auf die freie Deuteronen-Larmorfrequenz normalisiert, also als Differenz $\nu_{\text{rf}} - \nu_{\text{D}}$ abgebildet, um so die optische Verzerrung durch verschiedene Deuterium-Larmorfrequenzen bei verschiedener Magnetfeldstärke auszugleichen.

An der höchsten Magnetfeldstelle bei 3354,2 mT zeichnet sich ein gut aufgelöstes Spektrum mit zwei diskreten Signalen oberhalb und unterhalb der Larmorfrequenz ab. Dieses

wird hervorgerufen, wie für ein ENDOR-Spektrum an einem einzelnen Deuteron zu erwarten, aus der Wechselwirkung durch die Hyperfeinkopplung, welche den Abstand der zwei Linien von der Larmorfrequenz verursacht; auf diese Wechselwirkung wirkt die für den Deuteriums-Kern mit Gesamtspin $I = 1$ nicht verschwindende Quadrupolwechselwirkung, welche diese Kopplung in zwei Linien, zentriert um die Signalposition der Hyperfeinkopplung, aufspaltet. Für ein einzelnes Deuteron werden somit vier Signale gemessen, deren Aufspaltung zueinander durch die Quadrupol-Aufspaltungsmatrix \mathbf{Q} und deren Aufspaltung um die freie Larmorfrequenz durch die Hyperfeinkopplung \mathbf{A} bestimmt wird. Im Fall des Mims-ENDOR-Spektrums an der g_z -Position bei 3354,2 mT lässt sich so bereits rein optisch eine Hyperfeinkopplung von etwa 580 kHz und eine Quadrupolaufspaltung von etwa 120 kHz ausmachen.

Ein ähnlich einfach zu interpretierendes Spektrum findet sich nahe der g_x -Feldstelle bei 3346,7 mT mit Signalspitzen, die auf eine etwa 500 kHz große Hyperfeinkopplung und eine etwa 150 kHz große Quadrupolaufspaltung an dieser Feldstelle hinweisen. Die größten in der Spektrenfolge auftretenden Signale finden sich im bei einer Magnetfeldstärke von 3349,9 mT aufgenommenem Spektrum und zeigen dort eine Quadrupolaufspaltung um 270 kHz bei einer Hyperfeinkopplung von etwa 1060 kHz. Diese aus den Spektren ablesbaren Werte sind erste Anhaltspunkte für die Hauptwerte der Hyperfeinkopplungs- und Quadrupolaufspaltungs-Tensoren, wobei die Parallelanteile A_{\parallel} und Q_{\parallel} damit entlang der Orientierung von g_y verlaufen. Die so bestimmten Werte sollten allerdings nicht mit den eigentlichen Hauptwerten der Kopplungen verwechselt werden, da sie ohne eine exakte Bestimmung der Kopplungsorientierungen — und da beide weder kollinear zum \mathbf{g} -Tensor noch kollinear zueinander verlaufen müssen — noch Präzisierung bedürfen.

9.1.1 Signalunterdrückungseffekte im Mims-ENDOR

Ein weiterer Effekt, der zur erfolgreichen Simulation der in Abb. 9.1 gezeigten Lösungsspektren Berücksichtigung finden muss, besteht in der ENDOR-typischen Signalunterdrückung um die freie Larmorfrequenz. Diese bildet auch bei der im Falle kleiner Kopplungen unterhalb von 1 MHz zu bevorzugenden Mims-ENDOR-Pulsfolge ein wohlbekanntes Problem [69], dessen simulative Erfassung durchaus entscheidend für die richtige Interpretation eines ENDOR-Spektrum sein kann [72]. Das hier verwendete Modell für die Abbildung der Signalunterdrückung für Unterdrückungsmaxima nullter Ordnung, $n = 0$ und im Weiteren auch als Mims-Loch bezeichnet, folgt dabei dem Ansatz:

$$\text{ENDOR} - \text{Signal} \propto \sin^2(\pi A \tau) \quad (9.1)$$

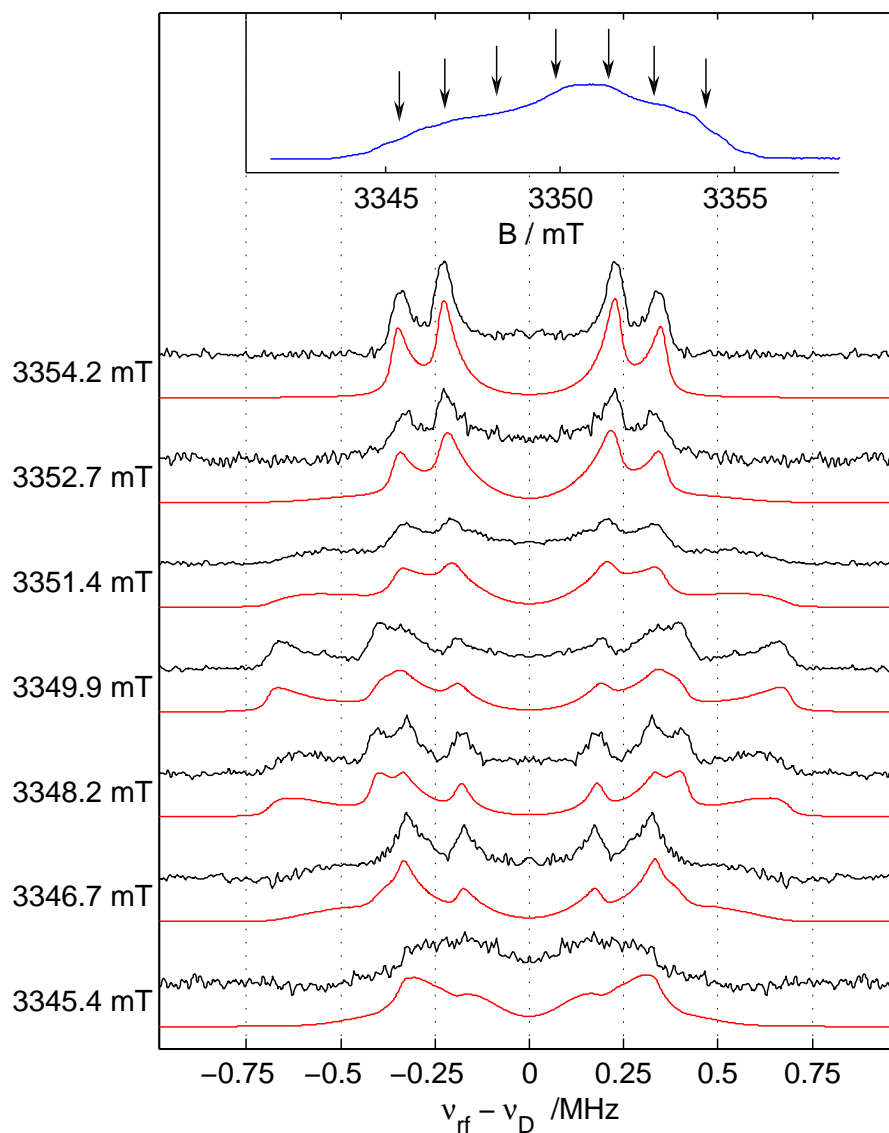


Abbildung 9.1: Bei 94 GHz Mikrowellenfrequenz aufgenommene orientierungsselektive Mims-ENDOR-Spektren von Proben deuterierter gefrorener Lösung aus *Th. elongatus*. Das EPR-Signal von Y_D^\bullet mit den markierten Feldstellen der ENDOR-Messungen findet sich eingekapselt an der Spitze. Die Messungen sind zentriert und symmetrisiert um die freie Deuteronen-Larmorfrequenz.

In diesem Fall wirkt die Signalunterdrückung nur in Abhängigkeit von der wirkenden Hyperfeinkopplung A und wird auch an dieser Stelle in der Simulation berücksichtigt. Erst danach erfolgt die durch die Quadrupolwechselwirkung verursachte Signalaufspaltung zur Ermittlung der eigentlichen Signalposition. Für den in der Mims-ENDOR-Pulsfolge gewählten Wert des Pulsabstands von $\tau = 248$ ns folgt damit eine auf die Spektren wirkende Modulation mit einer Frequenz von 4 MHz; die Funktionsmaxima erster Ordnung, $n = 1$, befinden sich damit deutlich außerhalb des in den Spektren aufgenommenen und von den Deuteriumsignalen bevölkerten Frequenzbereichs. Dabei hätte die Wahl eines kürzeren Pulsabstands τ ein entsprechend schmaleres Mims-Loch zur Folge gehabt. Diesem Vorteil hätte allerdings ein allgemeiner Verlust an Echointensität entgegengestanden, sodass eine τ -Länge von 248 ns als Kompromiss gewählt wurde.

Um den Effekt der Modellierung von Signalunterdrückungseffekten auf die Simulation deutlich zu machen, wurde in Abb. 9.2 die aus Abb. 9.1 bekannte Spektrenfolge erneut wiedergegeben. Die in Abb. 9.2 gezeigte Simulation enthält dabei alle Effekte und dieselben Parameter wie die in Abb. 9.1 mit Ausnahme der Signalunterdrückungseffekte durch das Mims-Loch um die freie Larmorfrequenz. Die Auswirkungen auf die Simulation der einzelnen Spektren hängen in ihren Ausmaßen hierbei offensichtlich von der Intensitätsverteilung innerhalb der Messung ab. Für Spektren mit inhärent geringer Signalintensität um die freie Larmorfrequenz, etwa das Spektrum bei 3354,2 mT, ergeben sich nur geringe Veränderung im Signalverlauf und hauptsächlich, da auch die Simulation entsprechend der Spektren auf den Signalinhalt normiert werden, auf die Linienhöhe der Signallinien. Dies kann, wie z.B. die Spektren bei 3349,9 mT und 3348,2 mT zeigen, scheinbar drastische Intensitätsverschiebungen bedeuten und eine entsprechend weitgehende Misrepräsentation der relativen Signalintensitäten und Linienhöhen in der Simulation. Dies lässt die Signale hoher Aufspaltungen, die hier zur $A_{||}$ - bzw. $Q_{||}$ -Komponente gehören, in der Simulation fast verschwinden; tatsächlich treten sie in der Messung gerade deshalb so deutlich hervor, weil das Mims-Loch um die freie Larmorfrequenz die dort eigentlich wirkenden Kopplungen weitgehend unterdrückt. So ist die Flanke höherer Kopplungen bei 3346,7 mT wohl in der Messung, aber kaum noch in der Simulation zu erkennen, mit entsprechend weitreichenden Konsequenzen, wollte man diese Flanke durch Änderung der Kopplungsstärken oder -orientierungen in der Simulation stärker zum Ausdruck bringen. Noch deutlichere Effekte hat die Signalunterdrückungs-Modellierung auf die Simulation des Spektrums bei 3345,4 mT. Die diesen Effekt nicht berücksichtigende Simulation in Abb. 9.2 zeigt eine breite Signalintensitätsverteilung um die freie Larmorfrequenz bei $\nu_{\text{rf}} - \nu_{\text{D}} = 0$, in der die eigentlichen Kopplungen nur anhand der Umkehrpunkte der Funktion zu erschließen

sind. Die Modellierung des gemessenen Signals erfolgt dabei fast ausschließlich durch Signalunterdrückungseffekte, welche die Anhaltspunkte für die eigentlichen Kopplungen fast vollständig überlagern.

Der Vergleich der simulierten Spektren zum Messspektrum bei 3345,4 mT illustriert auch die Grenzen der hier zum Einsatz gebrachten Modellierung. Wiewohl die Spektrenform der Simulation inklusive Lochmodellierung in Abb. 9.1 dem Linienverlauf des gemessenen Spektrums weitaus besser entspricht als die der Simulation ohne Lochmodellierung in Abb. 9.2, so werden die Signalunterdrückungseffekte im Bereich um 1,5 MHz eher zu stark berücksichtigt und die Signalintensität mehr als in der Messung aufzufinden reduziert. Diese Diskrepanz kann man auch im darauf folgenden Spektrum bei 3346,7 mT auffinden. Hier erscheint in der Simulation die Intensität der jeweils inneren Signalspitze bei etwa 200 kHz zu deutlich abgesenkt. Dies scheint aber hier wie in den weiteren Spektren keine Auswirkung auf die Rekonstruktion der eigentlich relevanten Signalposition zu haben. Bedenkenswert bleibt insbesondere, dass in der Modellierung des Mims-Lochs in der Simulation an der Stelle der freien Larmorfrequenz praktisch keine Intensität zu verzeichnen ist.¹ In den Messungen ist das in dieser Stärke nicht zu beobachten; hier erscheint, wie die Rekonstruktion es nahelegt, die entsprechende Intensität zwar deutlich abgesenkt, bleibt aber auch bei der freien Larmorfrequenz in allen Spektren noch erhalten. Diese Begrenzungen bei der Modellierung des Mims-Lochs beeinflusst auch die Simulation der Einkristall-ENDOR-Daten und muss dann für eine korrekte Interpretation dieser Daten entsprechend berücksichtigt werden.

Unter Berücksichtigung der Signalunterdrückungseffekte beim Mims-ENDOR kann man die Simulation der Spektrenfolge an gefrorener Lösung in Abb. 9.1 als weitgehend gelungen betrachten. Da es sich auch an dieser Stelle um eine simultane Simulation dieser Daten zusammen mit den Messungen am Einkristall handelt und über die oben genannten Anhaltspunkte hinsichtlich der Tensor-Hauptwerte hinaus eine Einschätzung schwer fiel, wie weit eine Simulation anhand der an gefrorener Lösung unternommenen Messungen allein schon einen zuverlässigen Datensatz für die magnetischen Deuteron-Wechselwirkungen ergeben hätte, werden die eingehenden Parameter im folgenden Abschnitt über die ENDOR-Messungen am Einkristall vorgestellt und erläutert. An dieser Stelle sei festzuhalten, dass in der Spektrenfolge alle Signalpositionen und weitgehend auch der Signalverlauf erfolg-

¹Das ist nicht ganz exakt: aufgrund der Abhängigkeit der Signalunterdrückung allein von der Hyperfeinkopplung A kann auch in der Simulation leichte Intensität über die Quadrupol-Aufspaltung an der Stelle $\nu_f - \nu_D$ erscheinen; da dies nur für sehr schwache, wenngleich von Null verschiedene Hyperfeinkopplung A möglich ist, ist dies nur sehr begrenzt der Fall, kann aber im Spektrum bei 3345,4 mT noch ausgemacht werden.

reich rekonstruiert werden konnten. Die einzig auftretende Einschränkung ergibt sich für das Spektrum bei 3345,4 mT, das aufgrund der geringen EPR-Signalintensität an dieser äußersten Stelle des eigentlichen EPR-Signals schwer aufzunehmen und geringe ENDOR-Intensität verglichen mit den anderen aufgenommenen Spektren innehat. Diese vordergründigen Abweichungen ergeben sich, wie gezeigt werden konnte, aus einer nicht exakten Modellierung der Signal-Unterdrückung, nicht aufgrund fehlerhaft gewählter Parameter für die Simulation der Hyperfeinkopplung und der Quadrupolaufspaltung.

9.2 EPR und Mims-ENDOR am deuterierten Einkristall

Eine vollständige ENDOR-Studie am Einkristall unter Bedingungen der Orientierungsselektion bei 94 GHz bedarf der Aufnahme eines vollen EPR-Rotationsspektrums, um über dieses sowohl die Orientierung des Einkristalls im Resonator zu rekonstruieren, als auch die für die ENDOR-Messungen benötigten Feldstellen zu bestimmen. Das entsprechende Rotationsspektrum ist in Abb. 9.3 wiedergegeben, die daraus abgeleiteten, für die ENDOR-Studie verwandten Feldstellen bei den einzelnen Kristallausrichtungen in Abb. 9.4. Da sich für das an der Spitze des Rotationsspektrums in pseudomodulierter Form abgebildete EPR-Spektrum an gefrorener Lösung keine Unterschiede zum EPR-Spektrum an nicht-deuteriertem PSII_{cc} hinsichtlich der \mathbf{g} -Werte oder wirkenden Hyperfeinkopplungen feststellen ließen, erfolgte die Simulation dieser Spektren unter Anwendung der in den Tabellen 10.1 und 10.2 angegebenen Wechselwirkungsparameter. Die so erreichte Simulation ist in ihrer Güte vergleichbar mit den in den Abb. 7.2 und 7.3 gezeigten, sodass die grundsätzlichen spektralen Eigenschaften gut wiedergegeben werden und nur geringe Unterschiede aufgrund in der Simulation nur unzureichend berücksichtigter anisotrop-inhomogener Linienverbreiterungs-Effekte auftreten. Diese mögen in der gegebenen Orientierung des Einkristalls zum Magnetfeld auch dadurch deutlicher betont auftreten, dass die kristalline b -Achse in diesem Fall sehr nahe der Kristall-Rotationsachse liegt, nämlich nur um etwa 3° von dieser verdreht.

Die hier festgestellte Orientierung entspricht in Euler-Winkeln bei einer Kristallausrichtung von 0° einem Winkelsatz von $(55^\circ, 90^\circ, -3^\circ)$ mit der entsprechenden Definition der Euler-Winkel als nachfolgende Drehung um die z -, die x' - und die z'' -Achse und dem so gegebenen Laborsystem mit dem Magnetfeld in x - und der Rotationsachse des Kristalls in z -Achsenrichtung. Die festgestellte Ausrichtung der Probe ist wie zuvor durch die Montierung des Einkristalls an der Innenwand des W-Band-Probenröhrchens bedingt, welche eine solche Bevorzugung der kristallinen Achsen bewirkt.

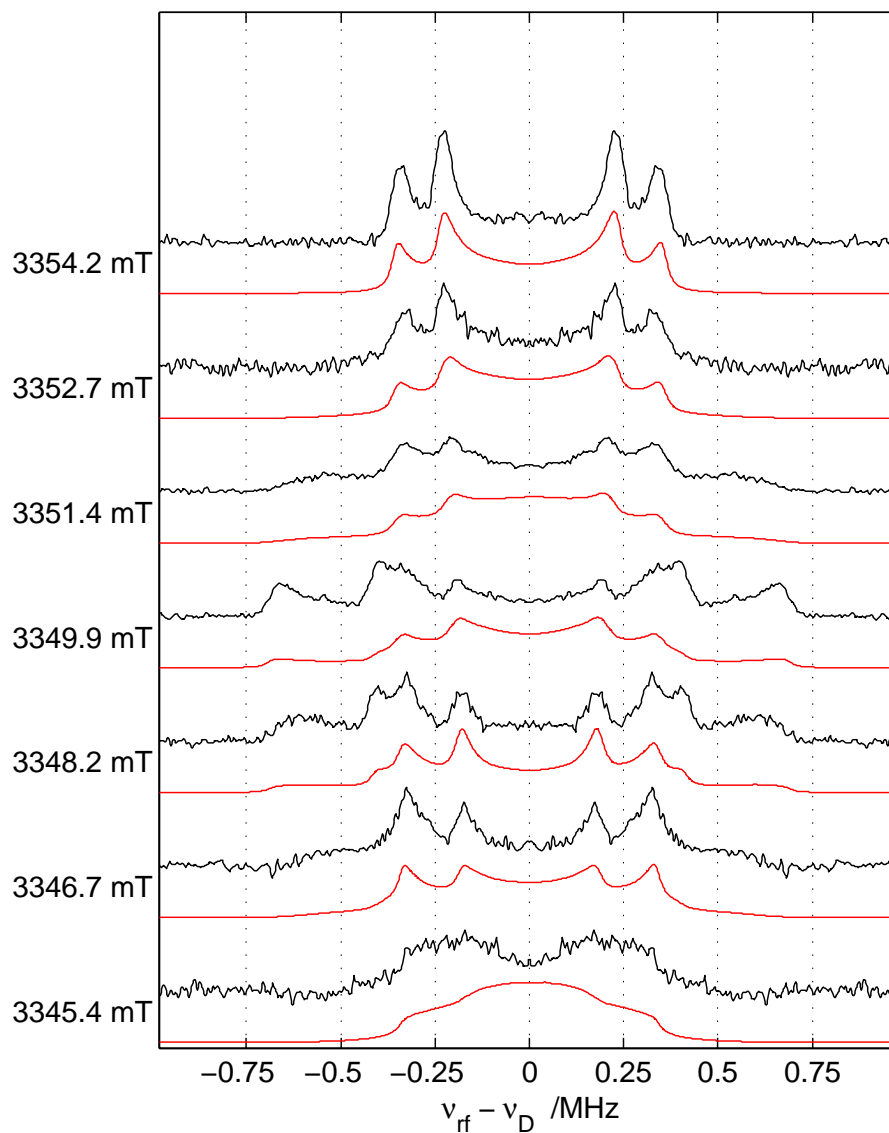


Abbildung 9.2: Zur Illustration der Signalunterdrückung im Mims-ENDOR die Simulation der schon in Abb. 9.1 gezeigten Spektren ohne Berücksichtigung der Mims-Löcher um die freie Larmorfrequenz. Die in der Messung unterdrückten Intensitäten führen in der Simulation zu drastisch veränderter Signalform (etwa bei 3345,4 mT) und in skalierten Spektren zum scheinbaren Verschwinden breiter, hochfrequenter Signale, in diesem Falle fast des gesamten A_y -Flügels zwischen 3348,2 und 3351,4 mT.

Als Folge der Orientierung des Einkristalls mit seiner kristallographischen b -Achse nahe der Rotationsachse lässt sich ein starke paarweise Entartung der effektiven \mathbf{g} -Werte für die verschiedenen magnetisch inäquivalenten Radikalausrichtungen in der Kristalleinheitszelle feststellen. Fiele eine der kristallographischen Achsen exakt mit der Rotationsachse zusammen, läge der Magnetfeldvektor bei jeder der Messungen in der von den beiden anderen kristallographischen Achsen aufgespannten Ebene und die magnetisch inäquivalenten Radikalorientierungen im Kristall würden sich auf vier reduzieren. Für die Orientierungen, in denen eine der kristallographischen Achsen exakt kollinear zum Magnetfeldvektor verläuft, erscheinen dagegen alle vier Kristalluntereinheiten magnetisch gleich wechselwirkend, und die verbleibende Aufspaltung der Spektren in zwei Signale lässt sich allein auf die Dimer-natur des PSII in der Kristalluntereinheit zurückführen. Für den gegebenen Spektrensatz kann man dies bei einer Kristallausrichtung zwischen 30° und 40° feststellen. Gemäß der über die Simulation gewonnenen Rekonstruktion liegt hier die kristallographische a -Achse exakt parallel zu den Magnetfeldlinien. Jeweils vier Kopplungen, die auf das vierfach gespiegelte Y_D^\bullet in einem der Monomere des Dimers zurückgehen, konzentrieren sich dabei um ein Signalzentrum bei 3341,1 mT, während die Y_D^\bullet des anderen Monomers ein ebenso konzentriertes Signal um 3350,5 mT hervorrufen. Diese Entartung der effektiven Werte geht so auch direkt in die Mims-ENDOR-Spektren ein, sollte es sich an dieser Stelle um eine gültige Orientierungsbestimmung handeln.

Nach einer weiteren Kristalldrehung um 90° findet man zwischen 120° und 130° eine ähnliche Situation, diesmal hervorgerufen durch die zu den Feldlinien fast parallele Ausrichtung der kristallographischen c -Achse. Die Entartung der effektiven \mathbf{g} -Werte ist hier allerdings merklich uneinheitlicher ausgeprägt. Dies ist eine Auswirkung der 3° -Verdrehung der b -Achse von der tatsächlichen Rotationsachse, die hier eine ebensolche Verdrehung der c -Achse vom Magnetfeldvektor bewirkt und neben der Aufspaltung durch den dimeren Charakter der PSIIcc-Kristalleinheitszelle eine weitere kleine Aufspaltung der \mathbf{g} -Wertlinien nach sich zieht.

Entsprechend der so gewonnenen Erkenntnisse über die effektiven \mathbf{g} -Werte an den verschiedenen Kristallausrichtungen wurden die Feldstellen für die Aufnahme der Mims-ENDOR-Spektren ermittelt, wie sie in Abb. 9.4 zu finden sind. Dabei wurden wieder zwei bis vier ENDOR-Spektren pro Kristallausrichtung aufgenommen, um eine vollständige Abdeckung der Hyperfeinkopplungen und Quadrupolwechselwirkungen bei allen Radikalorientierungen zu gewährleisten.

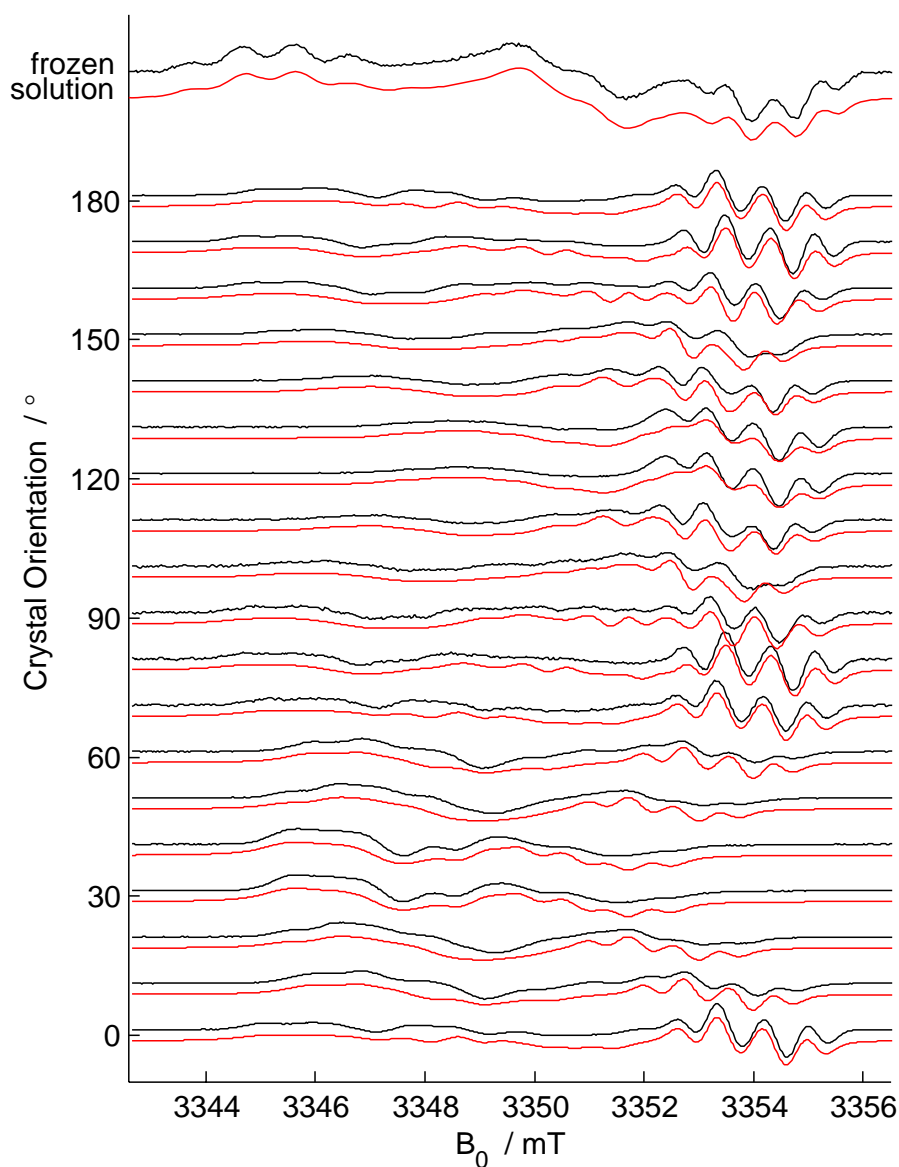


Abbildung 9.3: Rotations-EPR-Spektren eines deuterierten PSII-Kristalls bei einer Mikrowellenfrequenz von 94 GHz; Messung in schwarz, Simulation in rot. Darüber findet sich das EPR-Spektrum einer deuterierten Probe gefrorener Lösung als Referenz; diese zeigt keine merklichen Abweichungen zu dem nicht-deuterierten Lösungsspektren in Abb. 7.2.

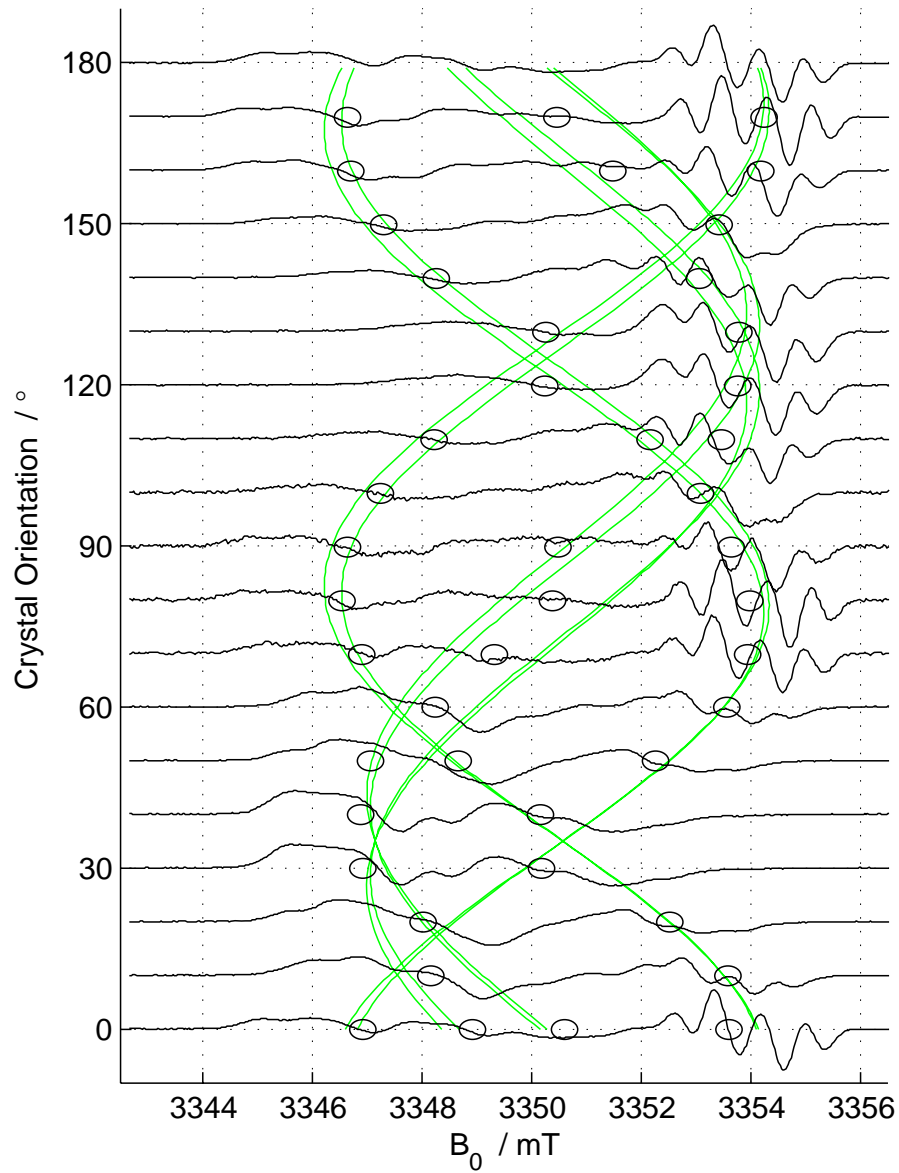


Abbildung 9.4: EPR-Rotationsspektren von Kristall II (vergl. Abb. 9.3) und daraus abgeleitete Feldstellen für die in Abb. 9.5 dargestellten Mims-ENDOR-Messungen. Siehe Haupttext für Details.

Tabelle 9.1: Orientierung des deuterierten Einkristalls

	a_D	b_D	c_D
X	0,573	0,027	0,819
Y	0,818	0,039	-0,573
Z	-0,047	0,999	0,000

Tabelle 9.1: Orientierung des deuterierten Einkristalls, wie sie aus der simulativen Rekonstruktion der Spektren in Abb. 9.3 bestimmt werden konnte. Die Richtungskosinusse beschreiben die Winkel der Kristallachsen zu den Laborachsen. Definition und Abfolge der Transformationen finden sich in Anhang A.1.2.

9.2.1 ^2H -Mims-ENDOR am Einkristall

Die vollständige ENDOR-Studie am deuterierten PSIIcc-Einkristall besteht aus den insgesamt 46 Einzelspektren, die in Anhang C in Gänze und mitsamt Simulation abgedruckt sind. Diese Einzelspektren und ihre Simulation bilden den eigentlichen Kern des Einkristall-Teils dieser ENDOR-Studie. Dazu wird auch hier eine auf das Wesentliche kondensierte und die Orientierungsabhängigkeit der Wechselwirkungen effektiver illustrierende Darstellung eingeführt, in der die verschiedenen an einer Kristallausrichtung aufgenommenen Einzelspektren nach Symmetrisierung der Spektren und Skalierung auf die freie Larmorfrequenz aufeinander addiert wurden. Diese Darstellung findet sich in Abb. 9.5.

Gewichtung der Einzelspektren

Ein Unterschied zur vergleichbaren Darstellung in Abb. 8.4 bzw. 8.5 besteht in der hier eingeführten Gewichtung der Spektren. Wurden für die Protonen-ENDOR-Studie die Einzelspektren lediglich auf ihren Signalinhalt normiert und anschließend addiert, um für jede Kristallausrichtung ein Spektrum zu erhalten, erforderte das Verfahren hier einen Zwischenschritt. Die Normierung auf einen gleichen Signalinhalt setzt genau genommen voraus, dass die Signalinhalte in etwa gleiche Größe aufweisen. Das ist bei dem in Kapitel 8 vorgestellten Protonen-ENDOR auch unproblematisch, zumal auch dort die Additionsspektren nur der Visualisierung dienen. Trotzdem werden durch dieses Verfahren Spektren in der Addition ein zu großes Gewicht zugeordnet, wenn deren physikalischer Signalinhalt

in Wirklichkeit wesentlich geringer ist als der der anderen in das Spektrum einfließenden Einzelspektren. Als Beispiel sei die Verteilung der Feldstellen für die ENDOR-Aufnahme an den Kristallausrichtungen 140° und 150° in Abb. 9.4 genannt. Die untere Feldstelle bei etwa 3347 mT bzw. 3348 mT erfasst die Kopplungen von genau zwei Y_D^\bullet , die bei der höheren Feldstelle dagegen die von sechs Y_D^\bullet . Eine Normierung auf den Signalinhalt würde die ersten ENDOR-Spektren dadurch fast dreimal so hoch skalieren, als es vom reinen Signalinhalt sinnvoll wäre.

Vor allem aber kommt es im Mims-ENDOR an der deuterierten Probe zu den weiter oben bereits beschriebenen Signalunterdrückungseffekten um die freie Deuteronen-Larmorfrequenz. Diese sorgt dafür, dass eine Gewichtung der Spektren anhand der eingehenden Radikalorientierungen nicht ausreicht, um über den Signalinhalt eine Aussage zu treffen. In den Einzelspektren finden sich bei verschiedenen Orientierungen immer wieder Spektren, für die alle Kopplungen lediglich Signale in direkter Nähe der freien Larmorfrequenz hervorriefen. Diese Signale sind in den Spektren weitgehend unterdrückt, und das gesamte Einzelspektrum umfasst so insgesamt einen sehr geringen physikalisch belastbaren Signalgehalt. Experimentell wurde dies durch eine Erhöhung der experimentellen Datenaufnahme an diesen Feldstellen weitgehend ausgeglichen, um an jeder Feldstelle ein, soweit möglich, ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis herzustellen. Die Normierung auf einen einheitlichen Signalgehalt hätte bei solchen Fällen zwei für die Summenspektren nachteilige Effekte: zum einen würden gerade sehr schwache Signale, die vom eigentlichen Signalgehalt unbedeutend sind, künstlich aufgewertet; zum anderen würde dies gerade solche Spektren betreffen, bei denen die eigentliche Signale um die freie Larmorfrequenz und damit unter die primären Signalunterdrückungseffekte fielen. In solchen Spektren wird die eigentliche Spektralform fast ausschließlich durch das Mims-Loch und der Linienverlauf der Simulation fast ausschließlich durch die Modellierung des Mims-Lochs bestimmt. Dass die hier angewandte Modellierung dies nicht leisten kann und dafür auch gar nicht vorgesehen ist, wurde in Abschnitt 9.1.1 schon dargestellt.

Als Lösung wurde hier eine Gewichtung der Spektren nach rekonstruiertem Signalgehalt innerhalb der MATLAB-Programmierungsumgebung geschaffen. Diese simuliert nach Berücksichtigung aller Orientierungs- und Kopplungsparametern von Einkristall und Deuteron-Brückenbindung das entsprechende ENDOR-Spektrum mitsamt der Signalunterdrückung nach dem an der gefrorenen Lösung erprobten Modell. Die daraus resultierende Intensität in der Simulation dient als Gewichtungsfaktor für die Summation der Spektren zum in Abb. 9.5 dargestellten Rotationsspektrum, sodass die Einzelspektren gemäß ihres rekonstruierten Signalinhalts zum Summenspektrum beitragen. Diese Gewichtung wird in der

Summation sowohl für die Mess- wie auch für die simulierten Spektren angewendet.

Ergebnisse

Entsprechend der durch die Einkristall-EPR rekonstruierten Orientierung des Kristalls im Laborsystem ist zwischen 30° und 40° die mit der Kollinearität der kristallographischen a -Achse zum Magnetfeld einhergehende Entartung der ENDOR-Signale zu erwarten. Diese sollte die Kopplung zu einem einzelnen Signalpaar von durch die nicht-kristallographische Dimersymmetrie aufgespaltenen Y_D^\bullet -Orientierungen reduzieren, das dazu wiederum durch die Quadrupolwechselwirkung aufgespalten wird. So sollte sich im Bereich oberhalb wie unterhalb der freien Larmorfrequenz ein Spektrum aus je vier diskreten Signalen ergeben. Experimentell festgestellt werden von diesen vier Signalen nur zwei. Erst nähere Begutachtung der Spektren in diesem Bereich zeigen nicht-verschwindende Signalintensitäten direkt um die Larmorfrequenz, was nahelegt, dass die beiden nicht erscheinenden Signale Kopplungen im Bereich des Mims-Lochs darstellen. Die Simulation bestätigt diese Vermutung, und zwischen 20° und 50° und noch einmal zwischen etwa 110° und 140° befinden sich durchgehende Bereiche, in denen die Signale eines Großteils der wirkenden Kopplungen durch die Signalunterdrückung um die Larmorfrequenz nurmehr angedeutet in den aufgenommenen Spektren erscheint. Dies zeigt sich, etwa bei 120° und 130° , auch in einem deutlichen Abfall des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, da sich der verminderte physikalische Signalinhalt an diesen Kristallorientierungen entsprechend weniger deutlich vom Hintergrund abhebt und sich dieser Effekt nur bedingt durch experimentell erhöhte Akkumulationszahl an Spektren ausgleichen ließ. Entsprechend fällt auch auf, dass die Simulation — wie aufgrund der Erfahrungen an Proben gefrorener Lösung — in Bereichen wenig unterdrückter Signale, in denen die Simulationsgüte demgemäß weniger auf die Modellierung des zentralen Mims-Lochs angewiesen ist, exakter Signalpositionen und Linienformen wiedergibt als in den Bereichen stark unterdrückter Signale. Die Position der Signale oberhalb von 150 kHz ist dabei durch die Simulation in allen Fällen erfolgreich rekonstruiert.

Die höchsten in den Einkristall-Spektren auftretenden Signale verlaufen bei 90° bzw. 160° bis zu etwa 450 kHz, was einer Aufspaltung von etwa 900 kHz entspräche und damit deutlich unter den an gefrorener Lösung um g_y festgestellten Aufspaltungen von etwa 1400 kHz liegt. Dies deutet darauf hin, dass an keiner Stelle des ENDOR-Rotationsspektrums die für die stärksten Signale verantwortliche Parallelkomponente der Hyperfeinkopplung exakt kollinear zum wirkenden Magnetfeld verläuft. Im Falle des dipolaren Kopplungstensors für die Wasserstoff- bzw. Deuteriumsbrückenbindung kommt hier noch verkomplizierend hinzu, dass die Expression der Parallelkomponente in Überlagerung mit einer oder beider

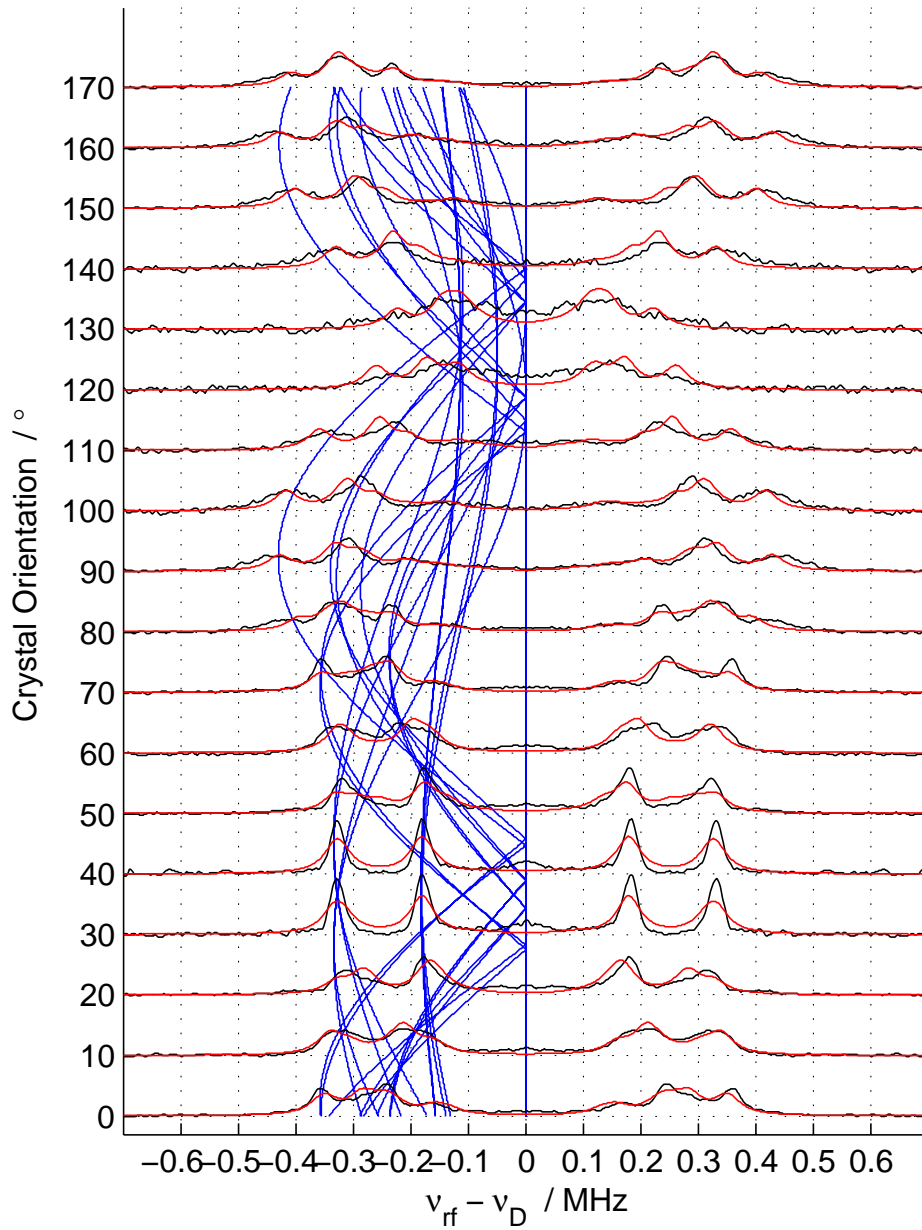


Abbildung 9.5: Einkristall-Mims-ENDOR an deuteriertem PSII von *Th. elongatus* bei 94 GHz Mikrowellenfrequenz. Gezeigt wird die gewichtete Summe der für jede Kristall-Orientierung aufgenommenen Spektren (schwarz) und die entsprechende Summe der Simulation (rot). Die Spektren sind um die freie Deuteronen-Larmorfrequenz symmetrisiert. Zusätzlich wird im niederfrequenten Teil des Spektrums die Orientierungsabhängigkeit der Einzelsignale der acht Deuteronen in der Einheitszelle dargestellt. Die Einzelspektren finden sich Anhang C.

der Senkrechtkomponenten kleine effektive Aufspaltungen bewirkt und die so hervorgerufenen Signale im Bereich unterdrückter Intensitäten um die Larmorfrequenz fallen. Die resultierenden Schwierigkeiten für die Rekonstruktion anisotroper Wechselwirkungen wurden andernorts im Detail diskutiert [72]. Hier führt das Nichtauftreten voll ausgeprägter A_{\parallel} -Signale in den ENDOR-Spektren sowie die Unterdrückung der anteilig von der A_{\parallel} -Komponente verursachten Signale um die freie Larmorfrequenz dazu, weitgehend auf die an Proben gefrorener Lösung gefundenen Daten zurückgreifen zu müssen, um die Hauptwerte der A_{\parallel} - bzw. Q_{\parallel} -Komponente rekonstruieren zu können.

Die in Abb. 9.5 als gewichtete Summation und in den Abb. C.2 bis C.4 im Anhang zu den Einzelspektren wiedergegebene Simulation ist so das Ergebnis einer sukzessiven manuellen Anpassung der eingehenden Parameter an die Messdaten gefrorener Lösung und am Einkristall zugleich. Für den Einsatz eines automatisierten Anpassungsalgorithmus auf Grundlage einer χ^2 -Optimierung stellten sich die komplexe Signalsituation mit variierender Linienbreite und -höhe und die dazu noch die Spektren überlagernder Signalunterdrückung als zu herausfordernd dar. Unter Verwendung der durch das EPR-Rotationsspektrum rekonstruierten Kristallorientierung im Laborsystem und der durch die Protonen-ENDOR-Studie in Kapitel 6 bestätigten Orientierung des Y_D^{\bullet} im Kristall blieben so für \mathbf{A} und \mathbf{Q} noch jeweils die drei Hauptwerte und die Orientierung zum \mathbf{g} -Tensor anzupassen. Die dieser Anpassung und der gezeigten Simulation entsprechende Orientierungsabhängigkeit der 16 unterscheidbaren effektiven Signale ist in Abb. 9.5 auf der niederfrequenten Seite in Form blauer Linien eingezeichnet. Von diesen 16 zeigen zehn einen Nulldurchgang in der Aufspaltung, während die verbleibenden sechs aufgrund ihrer Orientierung im Kristall und ihrer Stellung zur Drehachse hauptsächlich mit Anteilen der Senkrechtkomponenten zum Magnetfeld parallel stehen und in Folge davon ihre Signale von diesen Anteilen dominiert werden. Der orientierungsabhängige Verlauf der höchsten auftretenden Signale zwischen 70° und 110° und zwischen 140° und 170° , der sich in beiden Fällen schon optisch aus den Summationsspektren ablesen lässt, wird dabei genau durch die Simulation wiedergegeben.

Die Bedeutung der Mims-Loch-Modellierung zur korrekten Simulation der Spektren ergibt sich auch anhand Abb. 9.5 durch einen Vergleich zwischen gemessenem und berechnetem Spektrum. Zwischen 120° und 130° fällt der überwiegende Teil der rekonstruierten ENDOR-Übergänge in den Bereich unterhalb 100 kHz um die freie Larmorfrequenz und wird entsprechend stark unterdrückt. Lediglich zwei Übergänge führen zu Signalen oberhalb 200 kHz. Dies verursacht die insgesamt schwach ausgeprägten ENDOR-Intensitäten in diesen Spektren. Demgegenüber werden die stark hervortretenden Signale um etwa 185 kHz und um etwa 320 kHz in den Spektren bei 30° und 40° durch eine Überlagerung von je

sechs bzw. vier Linien verursacht.² Die verbleibenden sechs unterscheidbaren Signale tragen nur Intensität um die freie Larmorfrequenz und, wie zu sehen, zum Gesamtsignalinhalt des Spektrums vernachlässigbar wenig bei.

Der Vergleich zwischen gemessenen und simulierten Signalen anhand der im Anhang wiedergegebenen Einzelspektren zeigt eine ähnlich weitreichende Übereinstimmung wie im Fall der Summenspektren in Abb. 9.5. Erwähnenswerte Unterschiede treten dabei in den vier jeweils an der höchsten Feldstelle aufgenommenen Spektren zwischen 20° und 50° auf, abgedruckt in Abb. C.2. Im Bereich zwischen 200 und 500 kHz finden sich dort breite, unaufgelöste Signale, die durch die Simulation der Messspektren nicht erklärt werden. Hier handelt es sich allerdings um Spektren, in denen zur Aufwertung des herrschenden Signal-zu-Rausch-Verhältnisses eine drastische Erhöhung der Spektren-Akkumulationszahl vorgenommen wurde. So stellen etwa die Hochfeldspektren bei 30° oder 40° den Durchschnitt aus etwa zehn mal mehr aufgenommenen Pulsmessungen dar als die Niederfeldspektren bei gleicher Kristallausrichtung. Unterschiedliche Akkumulationszahl und tatsächlich festgestellte Signalintensität innerhalb der Einzelspektren hatten dabei aber keinen Einfluss auf die Darstellung im Anhang, in der jedes Einzelspektrum auf dieselbe Gesamtintensität skaliert wurde. Dies führt hier zu einer drastischen Hervorhebung der Hochfeldspektren, zu denen weniger Signale beitragen — im Falle von 20° und 50° — und deren Signale in den Bereich des zentralen Mims-Lochs fallen, wie am Summenspektrum 9.5 und anhand der Signalpositionen der simulierten Spektren in den Einzelspektren erkannt werden kann. Die experimentell festgestellte und um unterschiedliche Akkumulationszahlen und elektronische Verstärkung bereinigte Signalintensität liegt ihrer Höhe nach im Falle der Hochfeldspektren nur bei etwa 10% der entsprechenden Niederfeldspektren. In der Summation, die diese Effekte bereits berücksichtigt und die tatsächlich festgestellte Intensität zu rekonstruieren versucht, erscheinen die Signale der Hochfeldspektren entsprechend gering und sind kaum auszumachen gegenüber den bestimmenden Signalen aus den Niederfeldspektren.

Tabelle 9.2 beschreibt die aus der Simulation der Messungen hergeleiteten Kopplungstensoren für die Hyperfeinwechselwirkung **A** und die Quadrupolaufspaltung **Q**. Beide Tensoren sind dabei spurlos, zeigen aber eine nachweisbare Nicht-Axialität. Die angegebenen Winkel sind Euler-Winkel gemäß der in Anhang A.1.1 geschilderten Definition und setzen die Hauptwerte zu den Achsen des **g**-Tensors und damit zur Geometrie des Moleküls in Beziehung.

²Zwei der sechs Linien, die zu den Signalen bei 185 kHz beitragen, überlagern sich über ihre gesamte orientierungsabhängigen Verlauf zwischen den Spektren derart, dass sie in graphischer Darstellung schwierig zu trennen sind; ihr größter Abstand voneinander beträgt etwa 5 kHz.

Tabelle 9.2: Hyperfein- und Quadrupol-Aufspaltungstensor an der deuterierten Brückenbindung

	x	y	z	$\angle(z)$	$\angle(x')$	$\angle(z'')$
A	-510	1100	-590	-26	16	-9
Q	-190	300	-110	-48	30	29

Tabelle 9.2: Hauptachsenwerte des Hyperfeintensors **A** und des Quadrupol-Aufspaltungstensors **Q** des ausgetauschten Deuteriums und die Orientierung beider Tensoren zum **g**-Tensor-Achsensystem des Y_D^\bullet . Die Hauptwerte sind angegeben in kHz, die Orientierung in Eulerwinkeln. Die Genauigkeit der Angaben beträgt 50 kHz für die Hyperfeinkopplungsstärken, 30 kHz für die der Quadrupol-Aufspaltung und 10° für die resultierende Orientierung beider. Für einen Vergleich liegen nur vereinzelt berichtete Hauptwerte in der Literatur vor, auf die im Haupttext eingegangen wird.

Tabelle 9.3: Orientierung der Wasserstoff-Brückenbindung

	A_x	A_y	A_z	O–N	O–H(N)
<i>a</i>	-0,026	0,523	0,852	0,634	0,644
<i>b</i>	-0,018	-0,856	0,522	-0,774	-0,737
<i>c</i>	0,9962	0,015	0,031	0,017	0,205

Tabelle 9.3: Die Orientierung der gemessenen und als Deuteronen-Brückenbindung interpretierte Hyperfeinwechselwirkung als Richtungskosinusse relativ zur Orientierung des **g**-Tensors (zu dessen Orientierung im Kristall siehe Tab. 7.3). Die Verbindungsachse verläuft — vergl. Tab. 9.2 — entlang der *y*-Hauptachse des Tensors. Als Referenz dienen der Röntgenstruktur entnommene geometrische Achsen zwischen dem Tyrosin-Sauerstoff und dem τ -Stickstoff des Histidins (O–N) sowie die zwischen dem Sauerstoff und einem in Standardgeometrie an das Stickstoff gebundene Wasserstoff-Atom (O–H). Siehe dazu auch die Abb. 9.6.

9.3 His189 als Bindungspartner

Die anhand von Proben gefrorener Lösung und insbesondere am Einkristall gewonnenen Daten liefern einen klaren Beleg für die Existenz lediglich einer unter $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Pufferaustausch deuterierten Protonen-Bindungsstelle in der Umgebung des Y_D^\bullet . Dies lässt auf die Existenz einer einzelnen signifikanten und wohlgeordneten Wasserstoff-Brückenbindung schließen, die Y_D^\bullet mit einem lösemittelzugänglichen Proton eingeht. Dieses umfasst sowohl azidische Protonen an benachbarten Aminosäuren wie auch mögliche Wasser-Moleküle in der Umgebung. Ein in der Literatur diskutiertes Modell eines wohlgeordneten Netzwerks starker Wasserstoff-Brückenbindungen von mehreren Wasser-Molekülen mit Y_D^\bullet [176] kann aufgrund der ENDOR-Daten ausgeschlossen werden. Grundsätzlich möglich ist das Vorkommen zusätzlicher schwacher und ungeordneter Wasserstoff-Brückenbindungen.

Die hier rekonstruierten Parameter für die Hyperfeinkopplung eines Deuteriums in Brückenbindung mit dem Sauerstoff des Y_D^\bullet ist in Relation zu sehen mit bereits veröffentlichten Berichten über die Natur der Wasserstoff-Brückenbindung. Force *et al.* [74] ordneten der Brückenbindungs-Kopplung in Spinat-Proben einen spurlosen Tensor zu. Der dort berichtete Hauptwert von 570 kHz für die Senkrechtkomponente einer rein dipolaren Deuterium-Hyperfeinkopplung entspricht in etwa den durchschnittlich 550 kHz, die sich als Mittel der zwei Senkrechtkomponenten des hier gefundenen leicht nicht-axialen Tensors ergeben. Der verbleibende Unterschied von 20 kHz könnte, wollte man ihm physikalische Signifikanz zuweisen, sowohl auf die Verwendung einer mangan-verarmten PSII-Probe im Gegensatz zu vollständiger PSIIcc-Präparation wie auch auf einen biologischen Unterschied zwischen Spinat und dem hier verwendeten *Th. elongatus* zurückgehen. Dabei konnten Force *et al.* keine merkliche Veränderung in der Natur der Brückenbindung unter Deuterierung feststellen. Die gefundene Bindung des Protons entsprach in ihrer Stärke dem Verhältnis der gyromagnetischen Momente zwischen Wasserstoff- und Deuteriumskernen — $g_N(^1\text{H})/g_N(^2\text{H})$. Dies ist auch verträglich mit den Ergebnissen von Tang *et al.* [63], die an PSIIcc-Präparationen von *Synechocystis* eine 3,5-MHz-Komponente einer Protonen-Hyperfeinkopplung bestimmen konnten, die sowohl unter D_2O -Pufferaustausch wie auch bei Entfernung des naheliegenden Histidin-189 verschwand. Der Wert von 3,5 MHz entspricht dabei einer durchschnittlichen Senkrechtkomponente von 550 kHz im Falle der Deuterierung der Bindung. Demgegenüber entspricht die von Force *et al.* an deuterierter und Mn-verarmter *Synechocystis*-Präparation bestimmte ^2H -Hyperfeinkopplung mit kleinem isotropen Anteil von 50 kHz und einem senkrechten dipolaren Beitrag von 470 kHz nicht den hier rekonstruierten Werten. Allerdings beruhen diese Werte auf einer Spektren-

simulation, die keinerlei Modellierung von Signalunterdrückung enthält, die von zentraler Bedeutung für die Aussagekraft einer Kopplungsrekonstruktion in solchen Messungen ist, wie ausgiebig hier und andernorts [72] nachgewiesen wurde. Ein detaillierter, abwägender Vergleich ist aufgrund der berichteten Daten allein [74] aber kaum durchzuführen.

Dagegen verträgt sich die Beobachtung einer 7,0-MHz-Protonen-Hyperfeinkopplung durch Mino *et al.* [174] an Spinat-PSII wiederum mit der hier bestimmten 1,1-MHz-Parallelkomponente, die für Protonen umgerechnet einer Kopplungskonstante von 7,2 MHz entspräche. Zusammengenommen liefern diese Ergebnisse deutliche Hinweise auf bestehende Ähnlichkeiten und eine grundsätzliche Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Organismen hinsichtlich der Natur der Wasserstoff-Brückenbindung; zudem scheint eine Deuterierung dieser Bindung nicht zu einer signifikanten Veränderung der Bindungssituation zu führen.

Für die Orientierung der Kopplung vermuteten Un *et al.* [152] basierend auf von 245-GHz-EPR-Spektroskopie und Molekülorbital-Kalkulationen einen Winkel von etwa 140° zwischen der C–O-Bindung am Y_D und der Wasserstoff-Brückenbindung sowie einen 35° -Dihedralwinkel für diese Kopplung in Bezug zur Ringebene. Die hier bestimmte Kopplungsorientierung, in Form von Richtungskosinussen zusammengefasst in Tab. 9.3, bildet dabei einen Winkel von 143° im Sauerstoff in sehr genauer Übereinstimmung mit der Vorhersage von Un *et al.* Der resultierende Dihedralwinkel beträgt hier allerdings nur 17° , die bestimmte Kopplung befindet sich damit deutlich mehr in der Ringebene.

Da die geometrischen Achsen des Y_D^\bullet -Moleküls mit den Achsen des \mathbf{g} -Tensors entsprechend Abb. 6.1 übereinstimmen [146] — mit g_x entlang der C–O-Bindung, g_y in der Ringebene senkrecht dazu und g_z kollinear zur Ringnormalen — und, wie in Kapitel 6 gezeigt, diese Übereinstimmung auch für die in der Röntgenstruktur 3BZ1/3BZ2 [22] gegebene Ringorientierung gilt, lässt sich über die hier bestimmte Orientierung der Hyperfeinkopplung in Relation zum \mathbf{g} -Tensor ein direkter räumlicher Bezug zwischen Position und Orientierung des Y_D^\bullet und dem Verlauf der Wasserstoff-Brückenbindung herstellen. Verfolgt man die Orientierung der hervorgehobenen Achse des dipolaren Kopplungstensors, A_y , vom Ursprung der Wasserstoff-Brückenbindung am Sauerstoff des Y_D^\bullet , ergibt sich ein Vektor mit Ausrichtung auf das in der Nähe liegende His189. In Abb. 9.6 ist dieser Zusammenhang anhand der Lage und Ringorientierung des D2-Tyr160 sowie des D2-His189 in 3BZ1 und der Orientierung der hier rekonstruierten Kopplung grafisch dargestellt. Der die Kopplung definierende Vektor schneidet dabei die vom Histidin-Ring aufgespannte Ebene in der Nähe des τ -Stickstoffatoms, das zuvor bereits als wahrscheinlichster Donator für die Wasserstoffbrücke des Y_D^\bullet identifiziert worden ist [175].

Zusätzlich ist in Abb. 9.6 ein in Standardgeometrie für eine sp^2 -Hybridisierung an den Stickstoff des Histidins gebundenes Proton eingezeichnet. Ein Vektor, der dieses Proton mit dem Sauerstoff des Y_D verbände, bildete in der Röntgenstruktur 3BZ1 einen Winkel von 14° mit der hier festgestellten Hauptachse der Hyperfeinkopplung für die Deuterium-Brückenbindung. Dieser Winkel befindet sich grundsätzlich in der Größenordnung der abgeschätzten Unsicherheit für die Rekonstruktion des Winkels. Zudem ist nicht gegeben, dass die Position des Wasserstoffs tatsächlich der Standardgeometrie für das N_τ -protonierte Histidin gehorcht.

Durch die Verwendung bekannter Werte für die Spindichte am Tyrosyl-Sauerstoff ist es dazu möglich, den Abstand zwischen Sauerstoff und verbrücktem Wasserstoff-Atom zu rekonstruieren. Gemäß $A_{\text{dip}} = \rho_0 g_e g_N \beta_e \beta_N / r^3$ — wobei ρ_0 die ungepaarte Spindichte am Sauerstoff repräsentiert, die von Alia *et al.* [169] mit 0,28 angegeben wird — ergibt sich für den radialen Abstand eine Länge von $1,84 \text{ \AA}$ zwischen Sauerstoff und dem an das Histidin gebundene Proton. Fügt man diese Entfernung zu der rekonstruierten Kopplungsorientierung, liegt der Endpunkt dieses Vektors in einem Abstand von $1,1 \text{ \AA}$ vom τ -Stickstoff des D2-His189 entfernt. Diese Bestimmung verortet das Proton in einer Bindung, die effektiv eine 26° -Verdrehung der Bindungsachse zwischen Proton und τ -Stickstoff von der Standard-Bindungsgeometrie bedeuten würde. Die sich ergebenden geometrischen Zusammenhänge finden sich vollständig in Abb. 9.6. Hier repräsentiert der Pfeil in seiner Orientierung die gefundene Orientierung der der Wasserstoff-Brückenbindung zuzuordnenden Hyperfeinkopplung und in seiner Länge den Abstand zwischen Tyr160-Sauerstoff und dem verbrückten Proton. Die Spitze des Pfeils gibt damit die per EPR-Methodik rekonstruierte Position des Deuteriums an, unweit des in die Struktur eingefügten Protons, wie es in Standardgeometrie an D2-His189 binden würde.

Zusammen bilden die hier vorgestellten Ergebnisse einen direkten per EPR-Methodik erbrachten Beleg für eine Wasserstoff-Brückenbindung zwischen $\text{Y}_\text{D}^\bullet$ und D2-His189. Dies bestätigt an einer ohne Modifikation der Aminosäuren-Zusammensetzung erstellten Präparation entsprechende durch Mutagenese von PSII erzielte Ergebnisse.

9.4 Die Wasserstoff-Bindung im ^1H -Davies-ENDOR

In Kapitel 6 war hinsichtlich der Rekonstruktion der schwachen Hyperfeinkopplungen am $\text{Y}_\text{D}^\bullet$ das Auftreten bislang nicht zuordenbarer Intensitäten unterhalb von 3 MHz bereits Teil der Betrachtung. Als Teil dieser Signale wurde auch die Hyperfeinkopplung der Wasserstoff-Brückenbindung angenommen, wenn auch aufgrund der komplexen spektralen Situation in

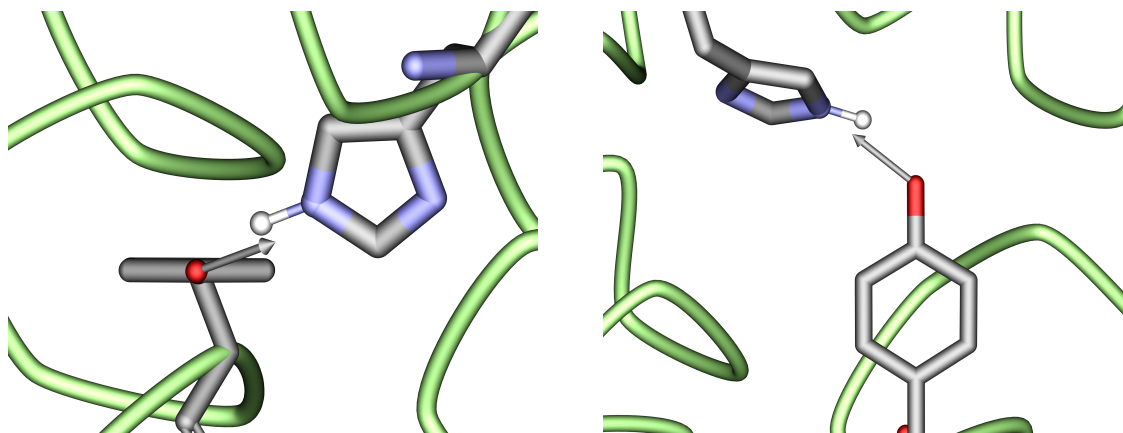


Abbildung 9.6: Tyr160 und His189 innerhalb ihrer Proteinumgebung im PSII, entnommen der Röntgenstruktur 3BZ1 [22]. Die ausgezeichnete Parallelkomponente der als zur Wasserstoff-Brückenbindung gehörend identifizierten Wechselwirkung wurde von der Position des Tyrosin-Sauerstoffs ausgehend eingezeichnet. Die Pfeillänge gibt die Bindungslänge an, wie sie aufgrund der Stärke der Wechselwirkung bestimmt wurde. Damit beschreibt die Pfeilspitze die aus der Messung abgeleitete Position des verbrückenden Protons in augenfälliger Übereinstimmung mit der Röntgenstruktur.

diesem Signalbereich und der kaum auszumachenden Orientierungsabhängigkeiten identifizierbarer Einzelsignale eine systematische Analyse anhand der ^1H -ENDOR-Daten nicht gelingen konnte. Die Aufklärung der Kopplungssituation im Fall der Deuterierung dieser Bindung erlaubt nun die Überprüfung der gefundenen Werte in den bestehenden Datensätzen am protonierten PSII. Anders als im Fall des Deuteriums mit nicht-verschwindendem Quadrupolmoment erscheint die Hyperfeinkopplung des Protons in den zugehörigen Spektren als einfach um die freie Larmorfrequenz aufgespaltenes Signal. Unter der Annahme, dass sich an der Bindungssituation durch den $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Pufferaustausch keine signifikanten Änderungen ergeben, Bindungslänge und -orientierung also erhalten bleiben, errechnet sich der Tensor der Hyperfeinkopplung entsprechend dem Verhältnis der gyromagnetischen Momente von Wasserstoff und Deuterium. Die entsprechend skalierten Hauptwerte finden sich in Tab. 10.2. Aus dem so hergeleiteten Kopplungstensor für die ^1H -Hyperfeinkopplung der Wasserstoff-Brückenbindung wurden die hinzukommenden Signale für die orientierungselektiven ENDOR-Spektren an gefrorener Lösung (bisher Abb. 8.2) sowie am Einkristall (bisher Abb. 8.5) kalkuliert. In einem weiteren Schritt, um möglicherweise Unterschiede zwischen Wasserstoff- und Deuteriums-Bindung quantifizieren zu können, wurde erneut eine Anpassung des gefundenen Kopplungstensors an die Messdaten versucht: dabei blieb es bei den Hauptwerten, die schon in der Deuteriums-Studie gefunden und hier nur ska-

liert wurden; die Orientierung der Kopplung ergab sich leicht verschoben, ohne signifikant unterschiedliche Ergebnisse zu liefern. Die sich ergebenden Simulationen einschließlich der Signale der Wasserstoff-Brückenbindung finden sich in Abb. 9.7 für die gefrorene Lösung und in Abb. 9.8 für die Summation der Einkristall-Spektren. Zudem wurden die neuen Signalanteile auch in die Simulation der einzelnen Einkristallspektren in Anhang B aufgenommen und dort grafisch hervorgehoben, um die Anteile der Wasserstoff-Brückenbindung von denen der ursprünglich im ^1H -ENDOR untersuchten Protonen unterscheiden zu können.

Die Skalierung des Hyperfein-Kopplungstensors auf das Protonen-ENDOR verdeutlicht nochmals, warum eine Rekonstruktion der Kopplung allein aufgrund der ursprünglichen ENDOR-Daten nicht möglich und der hier gewählte separate experimentelle Ansatz über $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Pufferaustausch geboten war. Der bestimmende Hauptwert der Parallelkomponente A_y , skaliert 7,2 MHz, liegt von der Kopplungsstärke genau zwischen den y -Komponenten der schwach koppelnden α -Protonen H2 und H6, 7,1 MHz und 7,4 MHz. Die beiden orthogonalen Komponenten der Hyperfeinkopplung, skaliert 3,3 MHz und 3,9 MHz, entsprechen dagegen praktisch denselben Komponenten des schwächer koppelnden β -Protons H7b mit 3,4 MHz und 4,0 MHz. Dazu stellt sich der Kopplungstensor der Wasserstoff-Brückenbindung aufgrund seiner Dipolarität als breites Signal um die freie Larmorfrequenz dar, dessen Hauptwerte auch in den an gefrorener Lösung ermittelten Spektren weniger ausgeprägt erscheinen und das auf seiner gesamten Breite von weiteren Signalen überlagert wird, die sich weder den bisherigen sechs Protonen am $\text{Y}_\text{D}^\bullet$ noch dem am His189 gebundenen, wasserstoffverbrückten Proton zuordnen lassen.

^1H -ENDOR an Proben gefrorener Lösung

Sowohl die Breite des Signals wie auch die noch nicht zuordenbaren Beiträge anderer Protonen und die daraus resultierenden Schwierigkeiten, zu einer abschließenden Rekonstruktion der Wasserstoff-Brückenbindung zu kommen, lassen sich sehr gut am Davies-ENDOR an gefrorener Lösung in Abb. 9.7 ablesen. In grün erscheint dort die bisherigen Simulation in einer Vergrößerung des für die Kopplung relevanten Frequenzbereichs, vergl. Abb. 8.2; rot stellt die Simulation mitsamt der Wasserstoff-Brückenbindung dar, und der Vergleich beider Linien erlaubt so die Bestimmung neu hinzugekommener Signalanteile. Insgesamt reicht die Datenlage aufgrund dieser Lösungsspektren allein kaum dazu aus, die Gültigkeit der Rekonstruktion abschließend zu beurteilen. Erscheinen in manchen Spektren um die g_y -Feldposition (etwa bei 3349,0 mT oder 3350,7 mT) die Simulationen bisher wenig widergespiegelte spektrale Details deutlicher hervorzuheben, so zeigen sich in den Spektren

durchweg nicht zuordenbare Intensitäten und nicht wiedergegebene spektrale Details um und unterhalb von 1,5 MHz. Der nicht aufgelöste Matrixbereich unterhalb von 1 MHz ist mit Ausnahme eines den beiden hinteren Ringprotonen H2 und H6 zuzuordnenden Signals in den Spektren an der g_z -Position von der Simulation überhaupt nicht erfasst. So auch aus den hier gezeigten Spektren keine eindeutig positiven Hinweise auf die Richtigkeit der dargestellten Hyperfeinkopplung gewonnen werden können, bleibt doch zu vermerken, dass die aus der Skalierung der Deuteronen-Kopplung resultierenden Signale in keinem Spektrum im Widerspruch zur spektralen Situation stehen, was für die Einführung einer zusätzlichen Kopplung in eine bereits bestehende und erfolgreiche Simulation einer Spektrenfolge keineswegs zu erwarten ist.

Summenspektrum des ^1H -Einkristall-ENDOR

Diese von nicht wiedergegebenen Intensitäten und der Überlagerung der Hauptwerte der Wasserstoff-Brückenbindung mit den Hauptwerten von am Y_D^\bullet direkt gebundenen Protonen ausgehenden Schwierigkeiten für die Dateninterpretation zeigt sich auch deutlich bei der Betrachtung der summierten Einkristallspektren in Abb. 9.8. Die rekonstruierte und skalierte Hyperfeinkopplung der Brückenbindung wurde entsprechend in die Simulation aufgenommen, und die korrespondierenden schwarzen Rotationslinien verdeutlichen die Orientierungsabhängigkeit der acht magnetisch unterscheidbaren Kopplungen. Cyanfarben erscheinen die schon in Abb. 8.5 dargestellten 24 Orientierungsabhängigkeiten der drei zuvor rekonstruierten Protonenkopplungen H2, H6 und H7b. Wie zu ersehen, hinterlässt die Wasserstoff-Brückenbindung in den analysierten Kristallorientierungen kaum Signale oberhalb von 2 MHz; an den Kristallausrichtungen, in denen die A_{\parallel} -Komponente genügende Übereinstimmung mit der Magnetfeldrichtung aufweist und der Signalverlauf entsprechend über 2 MHz wandert — primär in den Kristallorientierungen zwischen 80° und 120° sowie auch zwischen 0° und 30° — überlagert das Signal mit Signalen anderer Protonen, sodass an keiner Stelle der Spektren ein einzelnes Signal ungestört über einen Teil der Kristallrotation verfolgt werden kann. Im Aufspaltungsbereich zwischen 1 MHz und 2 MHz um die freie Larmorfrequenz kommt es zu massiven Überlagerungen von Signalen, da in diesem Bereich alle am Y_D^\bullet gebundenen schwach koppelnden Protonen Signale verursachen, wie auch alle drei Hauptachsenwerte der ^1H -Brückenbindung in diesen Bereich fallen. Abgesehen von einer möglichen, letztlich nicht zwingend erscheinenden Häufung von Signalen der untersuchten Hyperfeinkopplung bei etwa 1,7 MHz in der Kristallausrichtung 0° bzw. 180° lässt sich auch hier kein einzelnes, direkt auf die Wasserstoff-Brückenbindung zurückzuführendes Signal finden. Aufgrund des Nulldurchgangs, den die dipolare Kopplung für

entsprechende Rotationen in Bezug zum Magnetfeld unterlaufen kann, finden sich auch unter 1 MHz eine entsprechende Fülle von Signalen, die in diesem Bereich auch nicht mehr von Signalen der anderen schwach koppelnden Protonen überlagert werden. Auch in den Einkristallspektren verläuft hier aber der experimentell nicht aufgelöste Matrixbereich, und eine Interpretation der sich aus der Simulation ergebenden Signale anhand der spektralen Situation ist aufgrund der Summenspektren in Abb. 9.8 allein ebenfalls nicht möglich.

Einzelspektren des ^1H -Einkristall-ENDOR

Auch in den in Anhang B wiedergegebenen Einzelspektren, Abb. B.2 bis B.4, fallen entsprechend ein guter Teil der für die Wasserstoff-Brückenbindung errechneten Signale in den Bereich der experimentell nicht aufgelösten Matrix um die freie Larmorfrequenz. Und auch hier kommt es natürlich zu Überlagerungen zwischen Signalen der Wasserstoffbrücke und denen der drei schwach koppelnden, direkt am $\text{Y}_\text{D}^\bullet$ gebundenen Protonen H2, H6 und H7b. Gerade diese Überlagerungen sind in ihrem Effekt in den Einzelspektren aufgrund der herrschenden Orientierungsselektion aber deutlich abgemildert: anstelle der gesamten 24 magnetisch unterscheidbaren Kopplungen dieser Protonen im Einkristall teilen sich Signale der Wasserstoff-Brückenbindung die Spektren mit teilweise nur sechs anderen Signalen. Entsprechend verringert sind die Überlagerungen mit anderen Signalen, und entsprechend erhöht wäre die Wahrscheinlichkeit für eine falsch rekonstruierte Hyperfeinkopplung, Signale in den simulierten Spektren zu verursachen, die in keinem Zusammenhang zu den experimentell gewonnenen Daten stehen.

In den Abb. B.2 bis B.4 gibt die rote Simulation die in Kapitel 6 gefundene Rekonstruktion der drei am $\text{Y}_\text{D}^\bullet$ gebundenen Protonen wieder. In grün erscheinen addiert auf dieses Signal die neu hinzukommenden Signalanteile der Wasserstoff-Brückenbindung. Eine die einzelnen Spektren durchgehende Besprechung der sich ergebenden Simulationen erscheint hier wenig zielführend. Bei Durchsicht der 58 Einzelspektren ist zunächst vor aller weiterer Interpretation zu vermerken, dass die errechneten Signale an keiner Stelle in einem offensichtlichen Widerspruch zu den Messspektren stehen, sondern dass sie sich zu den Messdaten verträglich in die schon bestehende Simulation fügt, wie es aufgrund der hohen Anzahl eingehender Parameter in zwei Einkristall-ENDOR-Studien und die mit der Rekonstruktion der Kopplung verbundenen experimentellen Ungenauigkeit eigentlich nicht zu erwarten wäre. Aufgrund der Überlagerung mit anderen Protonensignalen und der um die Larmorfrequenz begrenzten spektralen Auflösung lassen sich für viele der Einzelspektren keine definitiven Aussagen über die Gültigkeit der Simulation treffen. Bemerkenswert erscheinen aber die Spektren, in denen die aus dem D_2O -Austausch gewonnenen, skalierten

Daten die simulierten Spektren um die bisher fehlenden spektralen Intensitäten ergänzen (z.B. in den Kristallausrichtungen 150° bis 170° , da gerade in den ersten Spektren niedriger Feldstärke). Durch die Spektren hindurch reflektieren die hinzugekommenen simulierten Signale der Brückenkopplung auch immer wieder die Position scharf-definierter Signale der experimentellen Spektren, etwa im gesamten Spektrensatz bei den Kristallausrichtungen von 10° und 20° . Diese Übereinstimmungen deuten auf die grundsätzliche Richtigkeit der gefundenen Hyperfeinkopplung der Wasserstoff-Brückenbindung hin und bestätigen damit auch die Annahme, dass der $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Pufferaustausch jenseits der Deuterierung der betreffenden Bindungsstelle keine weiter reichenden Auswirkungen auf die Bindungssituation um die Wasserstoff-Brückenbindung verursacht.

Anhand der Einzelspektren wurde eine weitere Optimierung der gefundenen Kopplungsrekonstruktion versucht, die zu einer leicht verschoben Orientierung der Kopplung zwischen Protonen- und Deuteronen-Brückenbindung führte, wie dies in Tab. 10.2 aufgeführt ist. Die Abweichung in der resultierenden Ausrichtung der physikalisch interessanten Parallelkomponente beträgt dabei nur etwa 1° , hat weitgehend kosmetische Auswirkungen auf die Simulation der Spektren und liegt deutlich unter der angenommenen Genauigkeit der rekonstruierten Kopplung. Von physikalischer Signifikanz ist diese Änderung weit entfernt, und eine Interpretation als möglicher Unterschied zwischen den Bindungssituationen von Protonen und Deuteronen in der Position der Brückenbindung zum $\text{Y}_\text{D}^\bullet$ erübrigt sich.

Die hier gefundenen Entsprechungen zwischen Simulation einer im ^2H -Mims-ENDOR rekonstruierten Hyperfeinkopplung und der Messung im ^1H -Davies-ENDOR, insbesondere aber das Fehlen nachweisbarer Diskrepanzen können hier als Indiz verstanden werden für die Gültigkeit der gefundenen Kopplung der Wasserstoff-Brückenbindung. Dazu verdeutlicht sie aber auch die Notwendigkeit des in diesem Kapitel beschriebenen Ansatzes über Deuterierung einer PSIIcc-Präparation anhand der experimentell kaum aufzuklärenden Situation im ^1H -ENDOR allein. Nicht zuletzt belegt dies neben den ausführlich dargestellten Vorteilen und Möglichkeiten der Methode von orientierungsselektiven ENDOR-Messungen am Einkristall, sondern auch ihre Grenzen: die Rekonstruktion weiterer beitragender Kopplungen, um bisher nicht zuordenbare Intensitäten in der Simulation reflektieren zu können, muss scheitern an der immer noch zu hohen spektralen Komplexität im Bereich um die freie Larmorfrequenz.

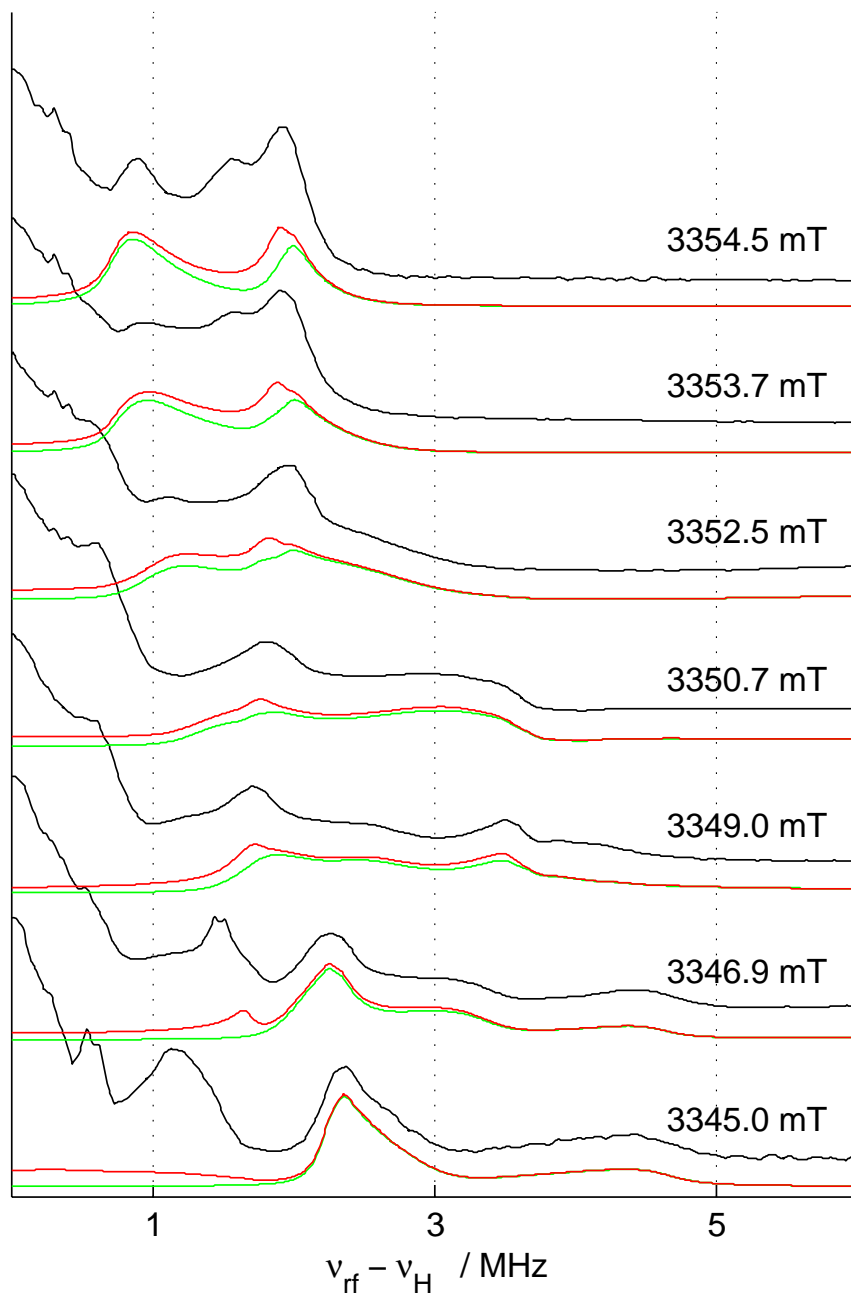


Abbildung 9.7: 94-GHz-Davies-ENDOR an gefrorener PSIIcc-Lösungs-Präparation. Die Simulation in grün entspricht der schon in Abb. 8.2 gezeigten, bestehend aus der Simulation aller sechs α - bzw. β -Protonen. Die in rot gezeigte Simulation enthält zusätzlich die skalierte und leicht angepasste Protonenwechselwirkung, passend zur im Mims-ENDOR an deuterierten Proben bestimmten Deuteriums-Brückenbindung. Messparameter und -details siehe Abb. 8.2.

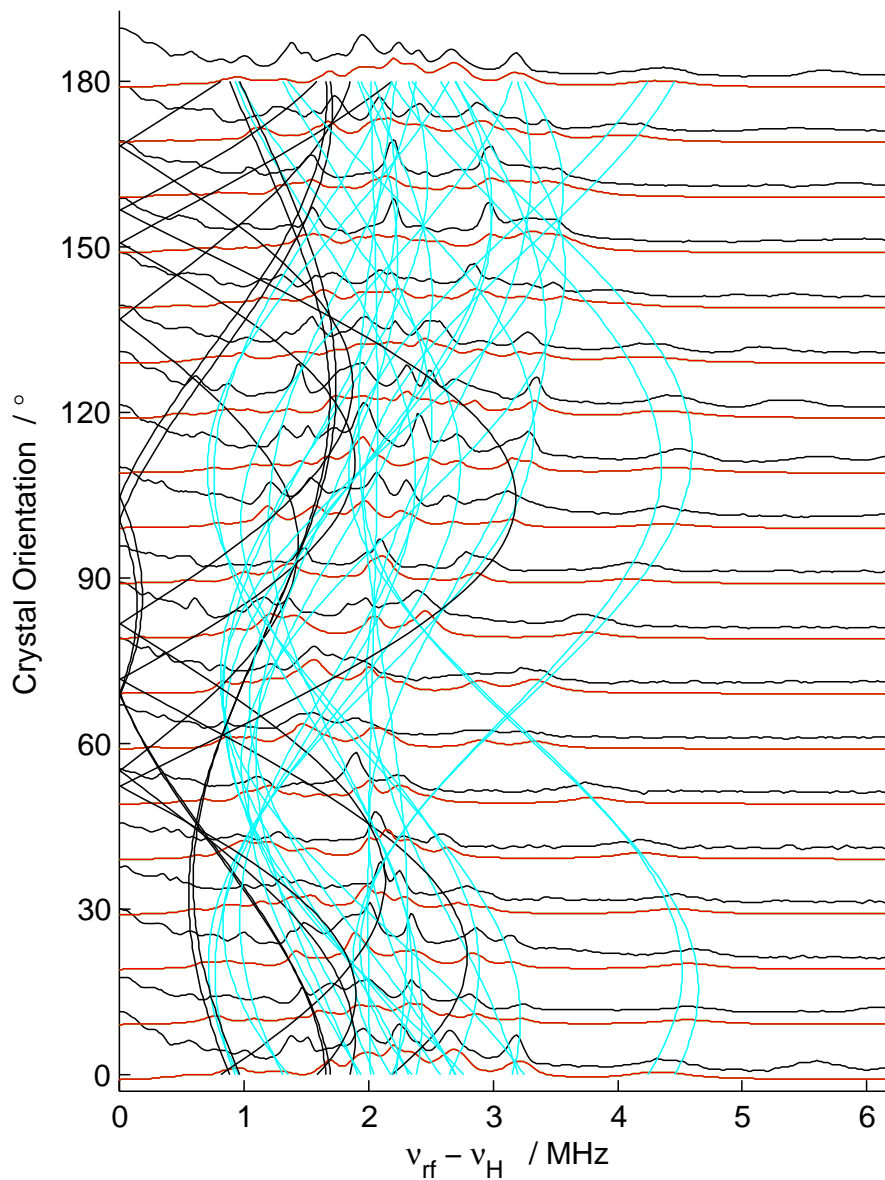


Abbildung 9.8: Simulation des Davies-ENDOR bei 94 GHz am Einkristall, vergl. Abb. 8.5. Die Simulation (rot) enthält das in Abb. 9.7 gezeigte Proton der Wasserstoff-Brückenbindung. In schwarz über die eigentlichen Spektren gelegt, findet sich der Winkelverlauf der acht Einzelwechselwirkungen der Kristall-Einheit zelle. Hellblau werden die Wechselwirkungen der zwei hinteren Ringprotonen, H2 und H6, sowie das schwächere der β -Protonen, H7b, gezeigt; vergl. hierzu und für Einzelheiten der Messung Abb. 8.5.

Kapitel 10

Y_D^\bullet , ein Fazit

Der hier vorgestellte Ansatz bringt die Methodik fortgeschrittener Puls-EPR, die instrumentell-technische Realisierbarkeit von Hochfeldbedingungen im W-Band und die Verfügbarkeit von PSIIcc-Einkristall-Präparationen zusammen, um in einem konzertierten Vorgehen vollständige Hyperfein-Kopplungstensoren \mathbf{A} mitsamt ihrer Orientierung zum molekularen \mathbf{g} -Tensor zu bestimmen. Auf diese Art entsteht ein weitgehend vollständiges Bild der elektronischen Struktur um die Protonenbindungen an einem einzelnen Aminosäureradikal im Photosystem II von *Th. elongatus*. Dies illustriert die Machbarkeit solcher Studien an komplexen biologischen Systemen und erlaubt die Ableitung detaillierter Informationen über die Bindungssituation, die chemisch-physikalischen Wechselwirkungen und die geometrische Konfiguration eines in einem Protein biophysikalisch funktional gebundenen Moleküls.

Durch direkte Vermessung der wirkenden Protonen-Wechselwirkungen mittels ^1H -Davies-ENDOR an Proben gefrorener Lösung und entlang der 180° -Rotation eines Einkristalls in Bezug zum Magnetfeld und unter Berücksichtigung der bei 94 GHz Mikrowellenfrequenz wirksamen Orientierungsselektion auf die ENDOR-Signale des Y_D^\bullet konnten in Kapitel 6 die Hyperfeinkopplungen aller am Tyrosinring gebundenen Protonen H2, H3, H5 und H6 rekonstruiert werden und ihr Bindungswinkel am jeweiligen C-Atom festgestellt werden. Dabei ergab sich eine durch die Proteinumgebung induzierte Asymmetrie in Bindungsstärke und -orientierung mit einer erhöhten Spindichteverteilung entlang der Diagonalen C2–C5 und einer größeren Verdrehung der Protonen-Kopplung aus der erwarteten Molekülsymmetrie verglichen mit den im freien Radikal äquivalent erscheinenden Symmetriepartnern C6 und C3.

Aufgrund der Symmetriebedingungen in der Einheitszelle des in $P2_12_12_1$ -Symmetrie vorliegenden Einkristalls, im Besonderen der nicht-kristallographischen Symmetrieachse zwi-

schen den zwei Y_D[•] des Dimers in der Einheitszelle des Kristalls, konnte die in Lösungsproben immer herrschende Ununterscheidbarkeit zwischen diesen Symmetriepartnern H3/H5 und H2/H6 überwunden und die in den Spektren festgestellten Hauptwerte den ungleich am Ring gebundenen Protonen zugeordnet werden.

Am hinter dem Ring befindlichen β -Kohlenstoffatom konnten die Hyperfeinkopplungen beider gebundener Protonen, H7a und H7b, unabhängig voneinander rekonstruiert werden. Dies beinhaltet erstmals auch die physikalisch wirksame Orientierung zum molekularen \mathbf{g} -Tensor. Anhand ihrer Stärke konnte der Dihedralwinkel der β -Protonen über die Heller-McConnell-Beziehung bestimmt werden und fügte sich nahtlos in die von der Kristallstruktur 3BZ1 behauptete Bindungsgeometrie am Kohlenstoff. Schon zuvor konnten über die Bestimmung der EPR-Rotationsabhängigkeiten am Einkristall ältere Ergebnisse über die Orientierung des Tyrosinrings im Molekül bestätigt und zu inzwischen diesen entsprechenden Resultaten in der Kristallstruktur in Bezug gesetzt werden.

Zur Aufklärung der Frage nach Wasserstoff-Brückenbindungen am Y_D[•] erwies sich ein H₂O/D₂O-Pufferaustausch als zielführend. Das so an das Y_D[•] koppelnde Proton konnte selektiv durch ein Deuterium ersetzt werden. Die unterschiedliche freie Larmorfrequenz für das Deuteron ermöglichte die selektive Vermessung der zwischen Deuterium und Y_D[•] herrschenden Kopplung in gefrorener Lösung und am Einkristall mittels ²H-Mims-ENDOR und dadurch die Rekonstruktion der Hyperfeinkopplung und der sie überlagernden Quadrupolwechselwirkung der Deuterium-Brückenbindung. Über die Orientierung dieser Kopplung konnte das in der Nähe befindliche His189 der D2-Untereinheit des PSII als Brückenbindungspartner identifiziert werden. Bezüglich Thesen über komplizierte Bindungsnetzwerke am Y_D[•] unter Einbeziehung von Wasseratomen oder anderen an Aminosäuren gebundenen Protonen konnten keine Hinweise festgestellt werden¹.

Die Übertragung der an deuterierten Proben ermittelten Wechselwirkung für die Brückenbindung auf die Situation der protonierten Präparation ergänzte die durch Simulation der im Davies-ENDOR gewonnenen Daten um die Rekonstruktion der Hyperfeinkopplung der Wasserstoff-Brückenbindung. Die durch Skalierung um das unterschiedliche gyromagnetische Moment zwischen Proton und Deuteron gewonnenen Kopplungsparameter ließen sich in den ¹H-ENDOR-Spektren zum Teil bestätigen und lieferten ansonsten zu den spektralen Informationen verträgliche Ergebnisse. Dies legt eine grundsätzliche Übereinstimmung

¹Die derweil von Umena *et al.* publizierte Kristallstruktur [24] legt die Existenz eines wasserstoffverbrückten Wassermoleküls nahe; es handelt sich aber auch um ein nur in einem der beiden modellierten Monomere auftauchendes Motiv, sodass nicht geklärt ist, inwiefern es sich um eine geordnete Brückenbindung mit reproduzierbar auftretender Geometrie und Kopplung handelt und in welchem Anteil der Zentren dieses vorkommt.

Tabelle 10.1: Der hier bestimmte **g**-Tensor des Tyrosin-D

g_x	g_y	g_z	Δg_n
2,00767	2,00435	2,00215	$\pm 0,00003$

zwischen ^1H - und ^2H -Bindungssituation nahe.

Gleichzeitig illustrieren die Schwierigkeiten mit der Rekonstruktion der Wasserstoff-Brückenbindung im ^1H -ENDOR die Grenzen des gewählten Ansatzes für Bereiche, in denen eine Vielzahl niedriger Kopplungen gleichzeitig wirken und ihre Signale überlagern. Das Zuordnen aller im ^1H -ENDOR festgestellten Intensität, insbesondere im experimentell unzulänglich aufgelösten Matrixbereich aber bis zu einer Kopplungsfrequenz von 2 MHz erweist sich auch unter dem Einsatz von Einkristallen und Orientierungsselektion bei Feldstärken um 3,3 T als zu aufwendig und unpraktikabel. Versuche, die hier in Gänze darzustellen nicht zielführend wäre, diese Intensitäten durch die Einführung von ein oder zwei zusätzlichen Protonenkopplungen zu erfassen, scheiterten letztendlich an der spektral zu komplexen und unübersichtlichen Situation, welche für die Rekonstruktion weiterer Kopplungen zu unbestimmt ist.

Die in dieser Arbeit vollständig rekonstruierten Hyperfeinkopplungen finden sich hier in Gänze in Tabelle 10.2. Für die Wasserstoff-Brückenbindung sind sowohl Hyperfein- wie Quadrupolaufspaltungs-Werte des Deuterons als auch die skalierte (und in der Simulation leicht verdrehte) Hyperfeinkopplung des Protons aufgeführt. Die angegebenen Winkel sind Euler-Winkel der in Abschnitt A.1.1 im Anhang erläuterten Art. Abschließend grafisch aufbereitet in Abb. 10.1 erscheinen die Protonen-Hyperfeinkopplungen als Beträge zum schon in Abb. 8.1 dargestellten ENDOR-Lösungsspektrum im X-Band. Dies soll das Entstehen des wohlbekannten X-Band-ENDOR-Signals noch einmal beleuchten und die dem eigentlichen Signal unterliegenden Überlagerungen sieben unterschiedlicher Hyperfeinkopplungen darstellen, die sich im resultierenden Spektrum wie im Messspektrum an verschiedenen Frequenzstellen in lokal eigener Einsichtigkeit darstellen.

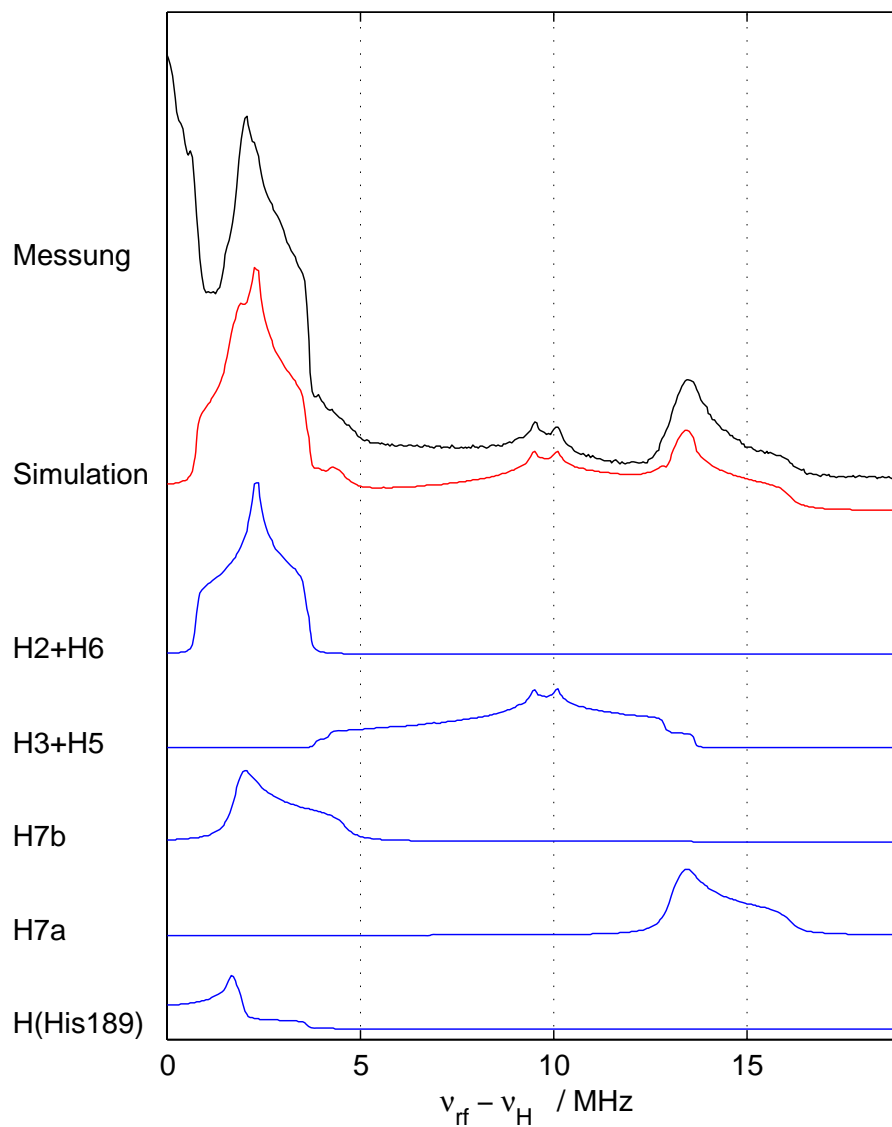


Abbildung 10.1: Das schon in Abb. 8.1 gezeigte X-Band-Davies-ENDOR an gefrorener Lösung mit Aufschlüsselung der in die Simulation eingehenden Wechselwirkungen. Die vermeintlich einfache Struktur des X-Band-Signals entsteht erst aus der Superposition aller eingehenden Signale. Die für die Simulation verwandten Werte sind Tab. 10.2 entnommen und wurden an die gezeigte X-Band-Messung nicht weiter angepasst. Eine weitergehende Berücksichtigung von Linienbreiteneffekten und rudimentärer Orientierungsselektion im X-Band mag die Simulation optisch weiter verbessern.

Tabelle 10.2: Die in dieser Arbeit bestimmten Protonen-Hyperfeinkopplungen am Tyrosin-D

Proton	A_x	A_y	A_z	ΔA_n	φ	ϑ	ψ	$\Delta(\varphi, \vartheta, \psi)$
$\alpha 2$	4,7	7,4	1,5	$\pm 0,2$	22	0	0	± 2
$\alpha 3$	-25,7	-7,6	-19,0	$\pm 0,1$	-23,8	0	0	± 1
$\alpha 5$	-27,3	-8,4	-20,2	$\pm 0,1$	21,3	0	0	± 1
$\alpha 6$	4,5	7,1	1,4	$\pm 0,2$	-24	0	0	± 2
$\beta 7a$	32,2	26,8	26,0	$\pm 0,2$	-64	12	37	± 5
$\beta 7b$	9,3	3,4	4,0	$\pm 0,2$	8	-24	15	± 5
H(His189)	-3,3	7,2	-3,9	$\pm 0,3$	-30	15	-5	± 10
D(His189)	-0,51	1,10	-0,59	$\pm 0,05$	-26	16	-9	± 10
$Q_{D(\text{His189})}$	-0,19	0,30	-0,11	$\pm 0,03$	-48	30	29	± 10

Tabelle 10.2: Charakterisierung der Hyperfeinkopplungs-Wechselwirkungen am Y_D^\bullet des Photosystems II. Die Hauptwerte sind angegeben in MHz, die relative Orientierung zum \mathbf{g} -Tensor als Eulerwinkel nach der in Anhang A.1.1 dargelegten Definition. Die zu den Hauptwerten angegebene Ungenauigkeit bezieht sich auf die einzelnen Komponenten des Tensor; die der Eulerwinkel bezieht sich auf die effektive Orientierung, nicht auf die einzelnen, voneinander (per Definition der Euler-Winkel) nicht unabhängigen Winkel. D bezieht sich auf die deuterierte Wasserstoff-Brückenbindung, Q auf deren Quadrupol-Aufspaltung.

Teil IV

Anhang

Anhang A

EPR-Simulationen unter MATLAB

Soweit nicht anders angegeben, wurden die gezeigten Simulationen der EPR- und ENDOR-Messungen unter MATLAB anhand selbstgeschriebener Makros vorgenommen. MATLAB stellt hierzu eine der Programmiersprache C ähnliche Umgebung und schon implementierte umfangreiche Funktionssätze für die mathematische und grafische Datenverarbeitung und -analyse zur Verfügung.

A.1 Molekulare Orientierungen

A.1.1 Definition der Euler-Winkel

Eine beliebige Orientierung oder Rotation im dreidimensionalen Raum benötigt für ihre mathematische Charakterisierung drei voneinander unabhängige Parameter. In dieser Arbeit wurde der traditionelle Weg der Beschreibung durch Euler-Winkel benutzt, welche eine Rotation auf eine festgelegte Drehung um drei Achsen zurückführt. Dabei kann die Wahl der Drehachsen beliebig geschehen, und vor allem in der internationalen Literatur werden durchaus verschiedene Definitionen benutzt. Die in dieser Arbeit angewendete Definition richtet sich nach Goldstein [178] und beschreibt eine Rotation ψ um die z -Achse, darauf folgend eine Rotation θ um die so entstandene x' -Achse und zuletzt eine Drehung ϕ um die neue z'' -Achse:

$$\mathbf{R}(\phi, \theta, \psi) = \mathbf{R}(\phi) * \mathbf{R}(\theta) * \mathbf{R}(\psi)$$

Die Realisierung in MATLAB erfolgt durch folgende Funktion:

```
% Euler-Drehmatrix als Funktion
```

```
function drehmatrix = euler(am,bm,cm)
```

```

e_phi = [cos(a), -sin(a), 0; sin(a), cos(a), 0; 0, 0, 1];
e_theta = [1,0,0;0,cos(b),-sin(b);0,sin(b),cos(b)];
e_psi=[cos(c),-sin(c),0;sin(c),cos(c),0;0,0,1];

drehmatrix = e_phi*e_theta*e_psi;

```

Die Funktion antwortet mit der zu den drei (in Radiant) angegebenen Winkeln gehörenden Rotationsmatrix \mathbf{R} , mit der man den \mathbf{g} -Tensor aus dem Molekülachsensystem in das Laborsystem transformieren kann gemäß

$$\mathbf{g}' = \mathbf{R} \mathbf{g} \mathbf{R}^T.$$

A.1.2 Orientierung der \mathbf{g} - und Hyperfeinkopplungs-Tensoren

Im konkreten Fall geschieht dies konsekutiv: Auf den im Molekülachsensystem ruhenden \mathbf{g} -Tensor wirkt die Rotationsmatrix \mathbf{R}_g , die ihn in seine Orientierung innerhalb des Monomers bzw. des Dimers dreht. Auf die zwei Y_D^\bullet des Dimers wirken Rotationsmatrizen \mathbf{R}_l , die den drei Symmetrieeoperationen innerhalb des Einkristalls entsprechen; als Ergebnis erhält man die acht Tyrosin-D-Orientierungen des Einkristalls. Die Orientierung des Kristalls im Laborsystem, das durch die Richtung des Magnetfeldvektors \mathbf{B}_0 gegeben ist, erfolgt schließlich durch eine Transformation \mathbf{R}_0 — für den Beginn eines Rotationsexperiments sei dies definiert als die zu Beginn eingestellte 0° -Ausrichtung. Die Rotation innerhalb des Experiments ergibt sich dann aus einer Drehung um die z -Achse des Laborsystems, welche hier mit \mathbf{R} bezeichnet sei. Der resultierende und nun orientierte Tensor \mathbf{g}_{eff} bestimmt sich somit aus

$$\mathbf{g}_{\text{eff}} = \mathbf{R} \mathbf{R}_0 \mathbf{R}_l \mathbf{R}_g \mathbf{g} \mathbf{R}_g^T \mathbf{R}_l^T \mathbf{R}_0^T \mathbf{R}^T.$$

Die Hyperfeinkopplungs-Tensoren weisen eine feste Orientierung zu den Molekülachsen bzw. dem \mathbf{g} -Tensor auf, werden den gleichen Transformationen unterworfen. Es kommt zu Beginn lediglich eine weitere Rotation \mathbf{R}_k hinzu, welche die Ausrichtung des Hyperfeinkopplungs-Tensors \mathbf{A} bezüglich des \mathbf{g} -Tensors definiert. Damit bestimmt sich die Orientierung der resultierenden Hyperfeinkopplung aus

$$\mathbf{A}_{\text{eff}} = \mathbf{R} \mathbf{R}_0 \mathbf{R}_l \mathbf{R}_g \mathbf{R}_k \mathbf{A} \mathbf{R}_k^T \mathbf{R}_g^T \mathbf{R}_l^T \mathbf{R}_0^T \mathbf{R}^T.$$

Für die Orientierung der Quadrupolaufspaltung gelten die gleichen Bedingungen wie für die Hyperfeinkopplung, über die Bestimmung der relativen Orientierung zum \mathbf{g} -Tensor werden

die im Kristall verwirklichten Orientierungen schließlich auf das Laborsystem bzw. auf ihre Orientierung zur Magnetfeldrichtung zurückgeführt.

Die experimentelle Einstellung des Drehwinkels \mathbf{R} während der Aufnahme der Rotationspektren wird, wie in Kap. 3.6.3 dargestellt, mittels für die Spektrometer angefertigter Goniometer durchgeführt.

A.2 Simulation von Kristallspektren

Ein Kristall-Rotationsspektrum besteht aus 19 einzelnen EPR-Messungen, die über eine Transformation der Tyrosin-Orientierungen um jeweils 10° senkrecht zum Magnetfeld miteinander verbunden sind. Die Anpassung der Simulationsparameter an die Messdaten erfolgt dabei automatisch durch ein in MATLAB programmiertes Makro. Alle beschriebenen Rotationen werden automatisch für alle acht Y_D^\bullet in der Einheitszelle bestimmt; das Spektrum wird errechnet über die Bestimmung der Resonanzpositionen der so entstehenden einzelnen Y_D^\bullet -Orientierungen und ihre anschließende Superposition und Faltung. Dabei gehen hier auch die effektiven Hyperfein- und gegebenenfalls Quadrupolterme ein.

Für die Berechnung der ENDOR-Spektren werden die effektiven Hyperfeinaufspaltungen berechnet (im Falle der ^2H -Spektren zusätzlich noch die effektive Quadrupolaufspaltung); vor der Superposition erfolgt eine Wichtung der Signale als Näherung an die Orientierungsselektion im Hochfeld (s. u.) bzw. für die ^2H -Spektren eine Berücksichtigung der Detektionslöcher im Mims-ENDOR.

Die Aufnahme einer vollständigen 180° -Drehung umfasst dabei alle für eine bestimmte Montierung des Kristalls im Probenröhrchen herstellbaren Orientierungen zur Magnetfeldrichtung. Da die Wechselwirkungen für \mathbf{g} , \mathbf{A} und \mathbf{Q} invariant gegenüber einer 180° -Verdrehung sind, wiederholen sich ab $(180+n)^\circ$ somit die Spektren von $(0+n)^\circ$. Das zuletzt im Rotationsspektrum bestimmte 180° -Spektrum sollte entsprechend dem 0° -Spektrum identisch sein und liefert so ein Maß dafür, dass die Rotation exakt durchgeführt wurde.

A.3 Simulation der Orientierungsselektion bei 94 GHz

Zur Illustration der methodischen wie theoretischen Ausführungen im Methodenteil dieser Arbeit, Abschnitt 3.3.6, findet sich nachfolgend die programmtechnische Umsetzung der Orientierungsselektion, wie sie in allen Makros zur Simulation von Hochfeld-ENDOR-Spektren in den Kapiteln 8 und 9 zur Anwendung kam. Die Simulation von Orientierungsselektionseffekten beruht dabei auf einer Modulation der Intensität eines simulierten Signals; maßgebend dafür, wie stark ein Signal aufgrund Orientierungsselektion gedämpft erscheint,

ist die Resonanzposition des effektiven **g**-Tensors bzw. ihre Differenz zur Magnetfeldstärke, bei der das tatsächliche Messspektrum aufgenommen wurde — die experimentellen Werte sind in der Matrix **gFeld** abgespeichert (bzw. zuvor aus dem Ergebnis der Feldmessung, der bestimmten experimentellen Feldverschiebung und der Mikrowellenfrequenz berechnet):

```
dev = KoplFld(ann,et) - gFeld(ann,vi);
aS35(ette35a,ann,vi) = aS35(ette35a,ann,vi)+Gauss(dev,gbreit);
```

Die so aufgerufene Funktion **Gauss.m** berechnet ausgehend von diesen beiden Größen den Modulationsfaktor und übergibt diesen als Antwort des Funktionsaufrufs:

```
% Gauss-Verteilung zur orientierungsselektiven Gewichtung
function ggw = Gauss(abstand,breite)
    enum = 2.71828;
    ggw = 1/(breite*sqrt(2*pi)) * enum^(-(abstand^2/(2*breite^2)));
end
```

Die Matrix **aS35** zur Beschreibung einer ENDOR-Kopplung im Einkristall besteht hier aus drei Dimensionen, erläuterbar anhand der einfließenden Variablen: **ette35a** beschreibt die Position auf der Frequenzskala, also die Übertragung der simulierten Kopplungsfrequenz auf ein diskretes Frequenzspektrum; **ann** ist der Index, der die Ausrichtung des Einkristalls zwischen 0° und 180° angibt, also von 1 bis 19 läuft; **vi** indiziert die Feldstelle, an der das Messspektrum aufgenommen wurde, läuft also von 1 bis 4 im Falle von vier aufgenommenen Spektren bei einer gegebenen Einkristallausrichtung — mit diesem Programmteil werden also z. B. die Kopplungen in den Abb. B.2 bis B.5 hier im Anhang abgedruckten Einzelspektren errechnet. Der Parameter **breite** kann über die Simulation der Spektren semi-empirisch angepasst werden, um die Kurvenformen in Spektren an gefrorener Lösung oder das Auftreten einzelner, noch gedämpft nachweisbarer Signallinien in Spektren an Einkristallen exakt wiederzugeben. Für die in dieser Arbeit gezeigten ENDOR-Spektren beträgt der so angepasste Wert von **breite** jeweils 1,0 mT.

Um auf die Berücksichtigung der Orientierungsabhängigkeit zu verzichten, müsste man lediglich die Variable **dev** konsequent auf 0 setzen oder den gesamten **Gauss**-Ausdruck durch 1 ersetzen. Die resultierenden Simulationsspektren zeigten dann aber auch keine Orientierungsselektivität, und für die Spektren, die sich nur durch unterschiedliche Wahl der Feldposition unterschieden (also etwa in Abb. B.2 oder Abb. 8.2), wären in allen Belangen die berechneten Simulationen identisch.

A.4 Simulation der Mims-Löcher

Die Simulation der Mims-Löcher erfolgt nach einem der Effektivität des Simulationsprogramms zuträglichen vereinfachten Verfahren, in welchem die Signalhöhe der simulierten Kopplungen mittels einer \sin^2 -Funktion moduliert werden. Die Modulationsfunktion erhält als eingehende Parameter dabei die effektive Frequenzdifferenz zwischen freier Larmorfrequenz des Deuterons und der allein durch die Hyperfeinaufspaltung verursachten Resonanzfrequenz des simulierten Signals und bestimmt die daraus resultierende Signalintensität — das Signal selbst wird nach Berücksichtigung der Quadrupolaufspaltung an den entsprechenden Stellen des ENDOR-Spektrums auf das bisherige simulierte Signal addiert. Die spektrale Form ergibt sich dabei aus der Orientierungsabhängigkeit von Hyperfein- und Quadrupolkopplung. Das Simulationsspektrum wird abschließend per Faltung mit einer Lorentzfunktion aus dem entstandenen Strichspektrum berechnet.

Das folgende Programmfragment zeigt die iterative Addition des Strichspektrums unter Berücksichtigung des Mimslochs am Beispiel der Messung an gefrorener Lösung, die sich in der Simulation mit bzw. ohne Mims-Loch-Simulation in den Abb. 9.1 und 9.2 finden:

```
% Einsortieren der Kopplungen in SimSpektrum

for mssp=1:7
    dev = abs(Bpos-FldPos(mssp));

for sort = 1:4
    eintrag = round((qkopl(sort)-min_frq)/finc +1);
    if sort < 3          % hfc für Mimsloch-Korrektur
        hfcpos = hfkopl(1);
    else
        hfcpos = hfkopl(2);
    end
    SimSpektrum(mssp,eintrag) = SimSpektrum(mssp,eintrag)
        + (gauss(dev,gbreit)*(1-(cos(pi*hfcpos/4.0323))^2));
    %SimSpektrum(mssp,eintrag) = SimSpektrum(mssp,eintrag)
        + (gauss(dev,gbreit));
end
end
```

Da die orientierungsselektiven Messspektren an sieben Feldpositionen aufgenommen wur-

den, bezieht das Makro zuerst die zuvor berechnete, von der Ausrichtung des jeweiligen Y_D^\bullet abhängige Signal-Feldposition, um diese anschließend für die an selber Stelle stattfindende Simulation der Orientierungsselektion zu verwenden. Die vier für jede Orientierung simulierten Kopplungen (zwei auf der höher-, zwei auf der niederfrequenten Seite der freien Larmorfrequenz) werden auf die Frequenzskala der Spektren übertragen. Diese Information erlaubt die Simulation der Kopplung in jedes der sieben zu simulierenden Spektren **SimSpektrum** mit den Variablen **mssp** für die Nummer des Spektrums und damit die Feldposition (vergl. Abb. 9.1) und **eintrag** für die entsprechende Frequenzposition des Signals: Die sieben Matrizeninhalte **SimSpektrum** werden sodann an der der Frequenzposition entsprechenden Stelle hochgezählt.

Verzichtet man auf die Modulation des Signals durch die \sin^2 -Funktion (wie in der auskommentierten Zeile), erhält man nach Faltung und Normierung die Spektren aus Abb. 9.2, in denen allein die Orientierungsselektion auf die berechneten Kopplungen angewandt wurde.

Anhang B

Davies-ENDOR am PSII-Einkristall

Die volle ^1H -Davies-ENDOR-Studie an PSIIcc-Einkristallen aus *Th. elongatus* besteht aus den hier in Abb. B.2 bis B.5 wiedergegebenen Einzelmessungen. Entlang einer 180° -Rotation des Einkristalls im Resonator wurden alle 10° ENDOR-Messspektren entlang des vollen EPR-Signals aufgenommen. Die Ermittlung der Anzahl und Feldstellen der Messungen wurde geleitet vom Bemühen, die Kopplungen aller acht magnetisch unabhängig zu den Spektren beitragenden Y_D^\bullet -Orientierungen in jeder Kristallausrichtung zu erfassen, um so eine vollständige Rekonstruktion der wirkenden Hyperfeinkopplungen gewährleisten zu können. Die so gewählten Messstellen lassen sich hier, identisch zu Abb. 8.3 in Kapitel 8, in Abb. B.1 ablesen. Die Position der Ellipsen in Abb. B.1 korrespondiert dabei mit der Anordnung der Messspektren in den Abb. B.2 bis B.5; so finden sich die vier entlang des EPR-Signals bei einer Kristallausrichtung von 0° aufgenommenen Davies-ENDOR-Spektren in Abb. B.2, 0° , aufsteigend von der Messung im Bereich g_x bei etwa 3346,5 mT links bis zur Messung im Bereich g_z bei etwa 3353 mT rechts. Aufgrund der unterschiedlichen Aufspaltungen der effektiven \mathbf{g} -Resonanzen in Abhängigkeit von der Orientierung des Einkristalls ergaben sich dadurch unterschiedliche Anzahlen von benötigten ENDOR-Messungen; diese variieren zwischen vier und zwei. Ebenso variieren die in einem Spektrum auftretenden Signale je nach Anzahl der so erfassten Y_D -Radikalorientierungen. Die Darstellung in den Abb. B.2 bis B.5 berücksichtigt dies nicht, sondern zeigt alle Spektren nach Symmetrisierung und Skalierung auf die freie Protonen-Larmorfrequenz normiert auf denselben Gesamtsignalinhalt.

Anhand der hier gezeigten Spektren erfolgte die eigentliche Anpassung der Simulationsparameter an die Messdaten, die zu den in Tab. 10.2 zusammengefassten Kopplungsparametern für die vier Ringprotonen H2 bis H6 und die an den C7-Kohlenstoff gebundenen Protonen H7a und H7b führt. Ausschlaggebend für die Beurteilung der Simulationsquali-

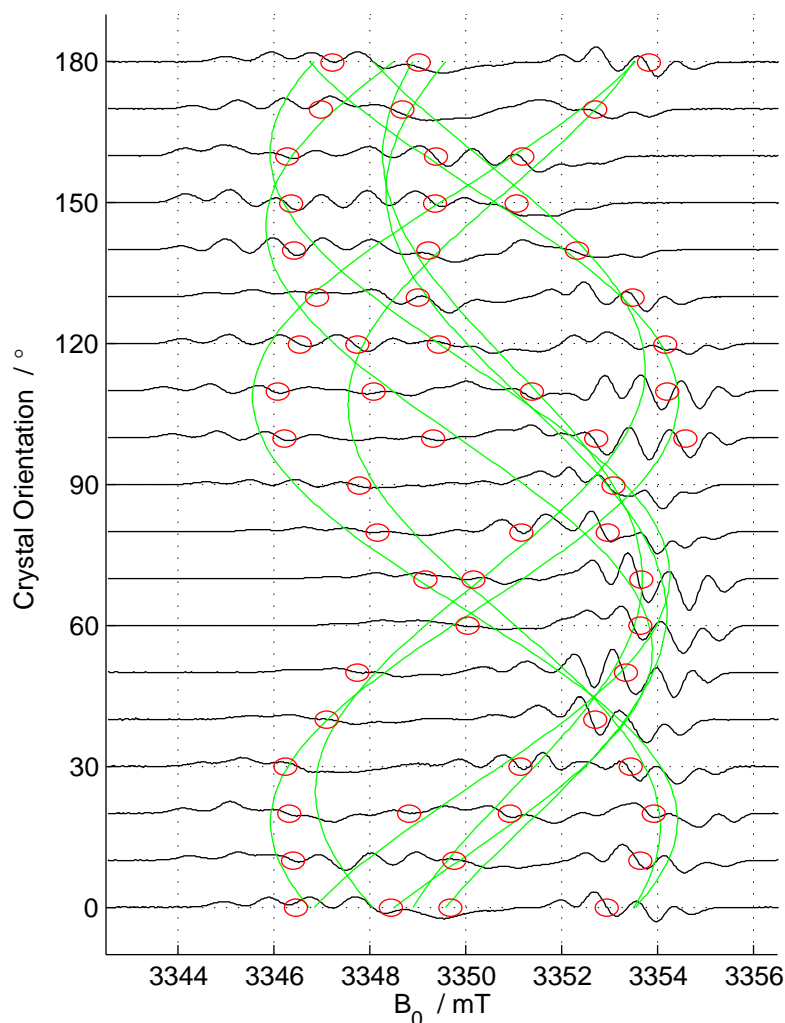


Abbildung B.1: EPR-Rotationsspektren von Kristall I (vgl. Abb. 7.2) und daraus abgeleitete Feldstellen für die in Abb. 8.4 und 8.5 dargestellten ENDOR-Messungen. Siehe Haupttext für Details und Abb. 7.2 für Messparameter.

tät ist jeweils Übereinstimmung bzw. Abweichung in der Position der simulierten mit der gemessenen Kopplung. Dies wird für weite Teile der Spektren dadurch erschwert, dass es selbst in der Messung diskreter Signale am Einkristall aufgrund der Zahl von bis zu sechs eingehenden Radikalorientierungen pro ENDOR-Messung und der großen Anzahl eingehender Einzelkopplungen zu erheblichen Signalüberlagerungen kommt. Abgesehen von bei der Anzahl der eingehenden Simulationsparametern unvermeidlichen Abweichungen zwischen simulierter und gemessener Signalposition ist somit für die Richtigkeit der simulativen Rekonstruktion entscheidend, dass in den Messspektren keine grundsätzlich in der Simulation unberücksichtigte Signale auftauchen und entsprechend nicht die Simulation Intensitäten

aufweist, die keiner gemessenen entspricht. Dies gilt für schwache Aufspaltungen bis etwa 3 MHz nur bedingt, da unterhalb dieses Bereichs bereits in den an Proben gefrorener Lösung gewonnenen Spektren zusätzliche, nicht den hier untersuchten Protonen zuordenbare Intensitäten nachgewiesen werden konnten.

Zusätzlich zu den so gewonnenen Erkenntnissen über die Protonen H2 bis H6 sowie H7a und H7b wurden in der Simulation der Einzelspektren hier noch die ENDOR-Intensitäten eines wasserstoffverbrückten Protons, wie sie anhand der ^2H -Mims-ENDOR-Studie rekonstruiert werden konnte, vermerkt. Die ursprünglichen Simulationsspektren erscheinen unterhalb der Messspektren in den Abb. B.2 bis B.5 in rot; in grün erscheinen darauf die zusätzlichen Signale der simulativ rekonstruierten Wasserstoff-Brückenbindung. Die Details zur Rechtfertigung dieser Darstellung finden sich in Abschnitt 9.4, die Parameter der Kopplung in Tab. 10.2 und die Mims-ENDOR-Einzelspektren in Anhang C. Die Zusammenfassung der hier gezeigten Einzelspektren in eine summierte Darstellung, aus der die Orientierungsabhängigkeit der einzelnen Hyperfeinkopplungen entlang der 180° -Kristallrotation ersichtlich wird, führt zu den Abb. 8.4 und 8.5.

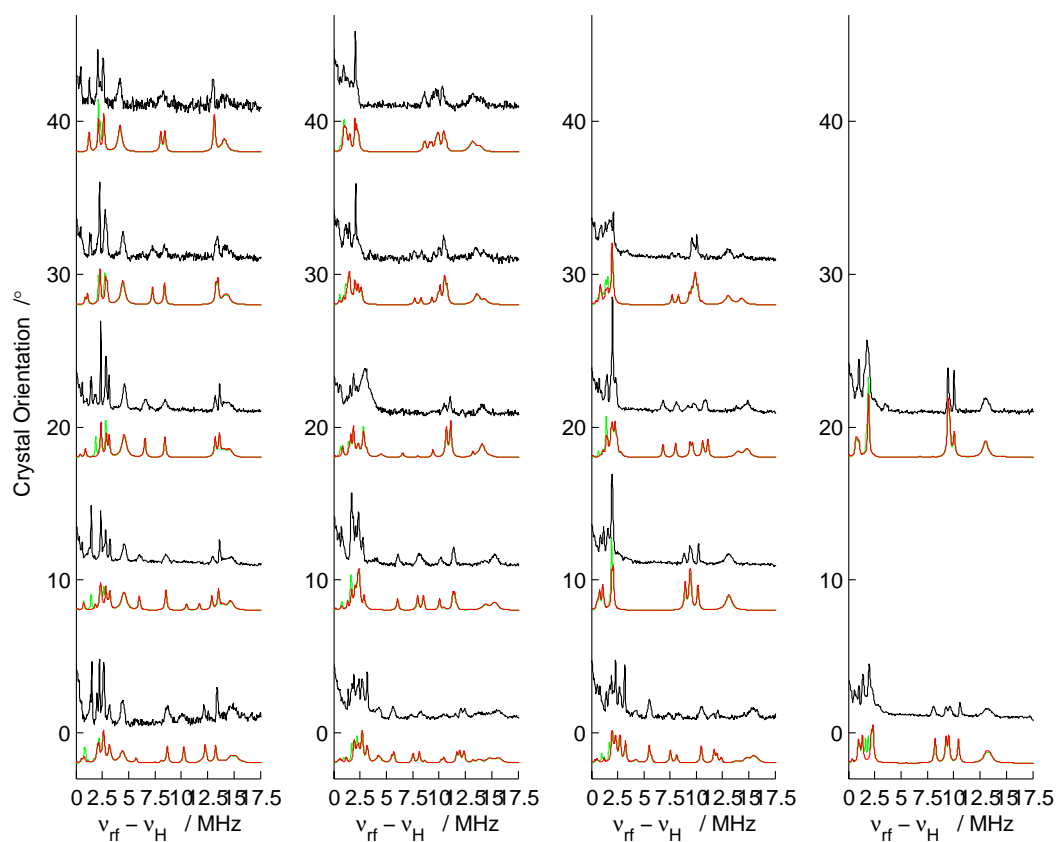


Abbildung B.2: Voller Spektrensatz für die in Kapitel 8 besprochenen ENDOR-Daten an deuteriertem Y_D^\bullet , Bereich von 0° bis 40° . Gezeigt werden die Messung (schwarz) und zwei Simulationen: rot wiedergegeben ist die originale Simulation [143] der vier Ring- und zwei β -Protonen; grün ist die durch das per Wasserstoff-Brückenbindung an das Y_D^\bullet koppelnde Proton am His189 zusätzlich hinzukommende Intensität eingezeichnet.

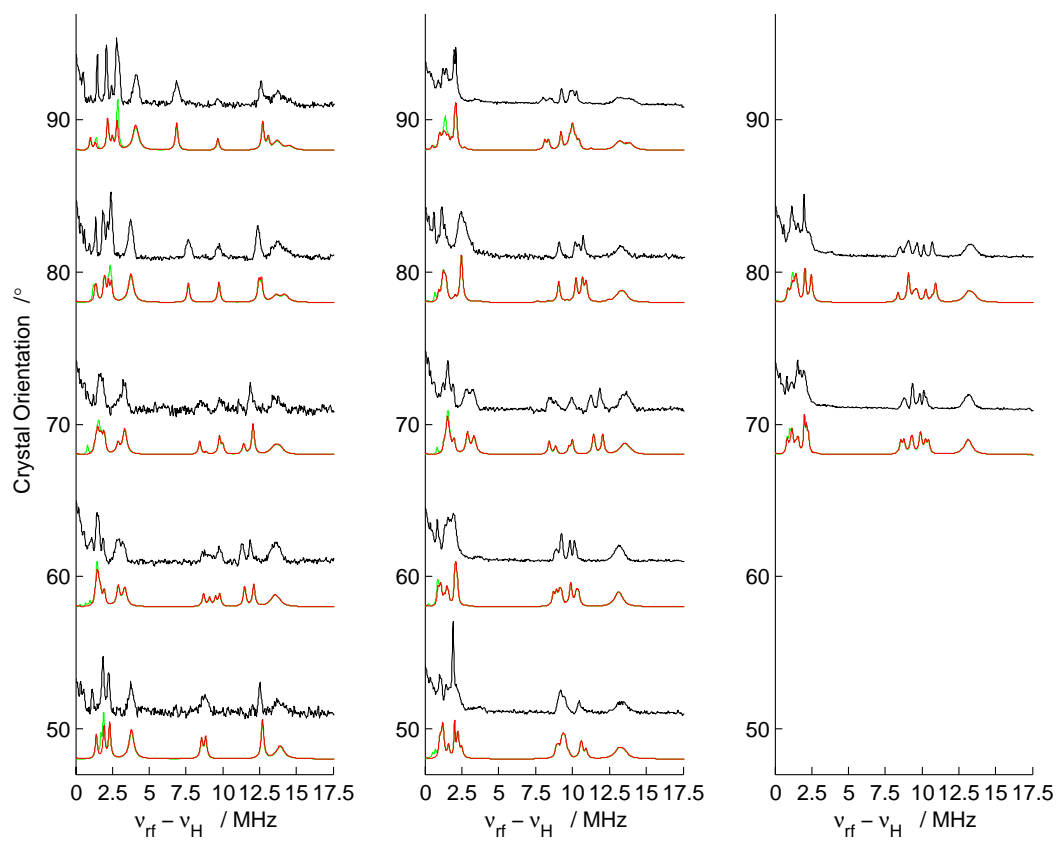


Abbildung B.3: Voller Spektrensatz für die in Kapitel 8 besprochenen ENDOR-Daten an deuteriertem Y_D^\bullet , Bereich von 50° bis 90° . Details siehe dort und im Haupttext hier.

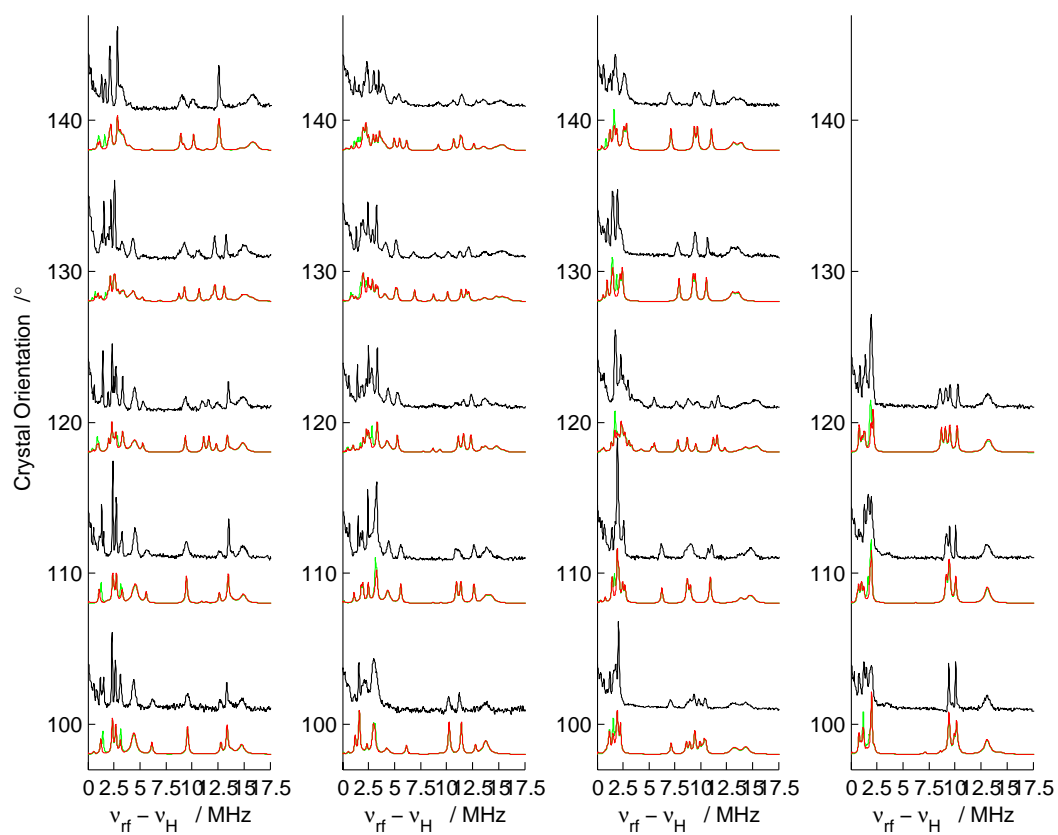


Abbildung B.4: Voller Spektrensatz für die in Kapitel 8 besprochenen ENDOR-Daten an deuteriertem Y_D^\bullet , Bereich von 100° bis 140° . Details siehe dort und im Haupttext hier.

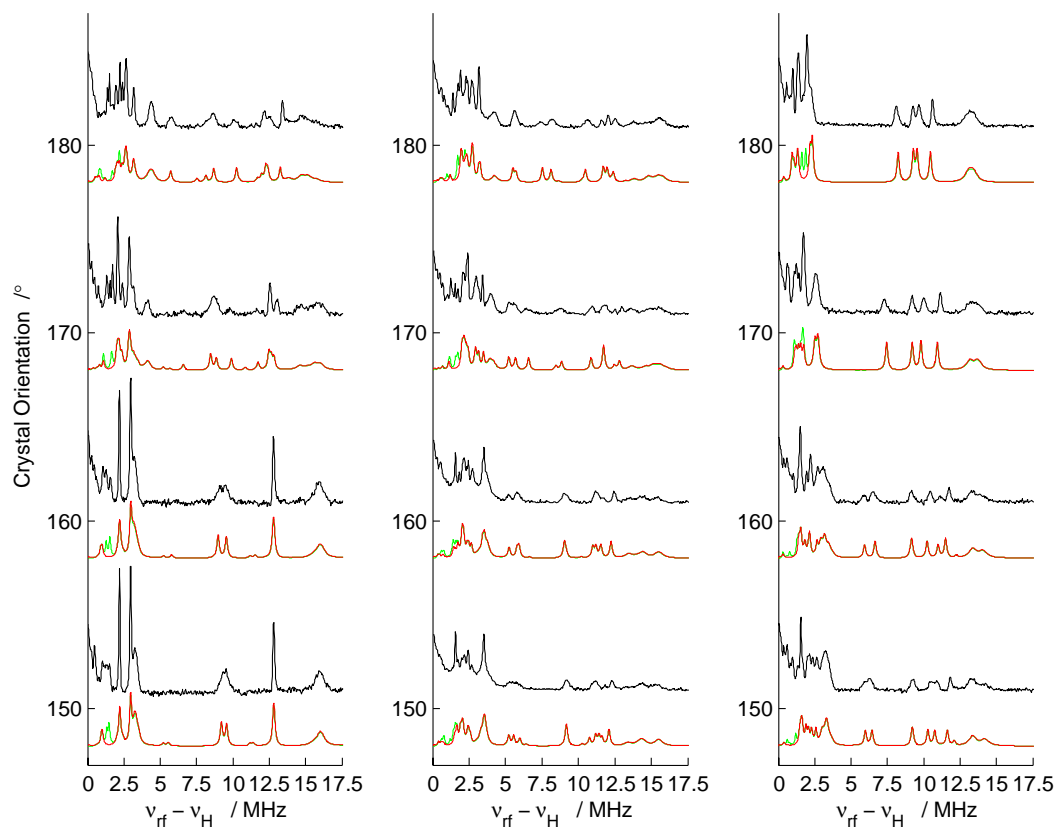


Abbildung B.5: Voller Spektrensatz für die in Kapitel 8 besprochenen ENDOR-Daten an deuteriertem Y_D^\bullet , Bereich von 150° bis 180° . Details siehe dort und im Haupttext hier.

Anhang C

Mims-ENDOR am deuterierten PSIIcc-Einkristall

Die insgesamt 46 Einzelspektren der ^2H -ENDOR-Studie am deuterierten PSIIcc-Einkristall aus *Th. elongatus* werden hier in den Abb. C.2 bis C.4 wiedergegeben. Experimentelle Methode und Art der Darstellung entsprechen in weiten Teilen derer der in Anhang B besprochenen ^1H -ENDOR-Studie. Zur Aufnahme der im Vergleich zu Protonen- aber wesentlich schwächer ausgeprägten Deuteronen-Hyperfeinaufspaltungen wurde für die Messung die auf Mims zurückgehende ENDOR-Pulsfolge verwandt (vergl. dazu Abschnitt 3.3.5).

Die Darstellung der Einzelspektren erfolgt auch hier basierend auf ihrer Position entlang der in Abb. C.1 nochmals dargestellten Kristalldrehung im Resonator. ENDOR-Spektren wurden für 18 Orientierungen zwischen 0° und 170° aufgenommen, die Exaktheit der 180° -Rotation wurde mittels gleichzeitig aufgenommener EPR-Spektren bis 180° überprüft. Nach der Normierung auf die magnetfeldstärken-abhängige freie Larmorfrequenz des Deuterons und Symmetrisierung der Signale wurden die Einzelspektren auf ihren Gesamtsignalinhalt normiert. Die sich dadurch ergebenden Unausgewogenheiten zwischen experimentell signalstarken und -schwachen Spektren wurden bereits in Abschnitt 9.2.1 besprochen. Die dort besprochenen Diskrepanzen betreffen fast ausschließlich die Hochfeldspektren bei den Kristallausrichtungen von 20° bis 60° und erscheinen in der Einordnung im summierten Spektrum in Abb. 9.5 vernachlässigbar. Ob die dort auftauchenden Signale zurückzuführen sind auf eine Variation im Wasserstoff-Brückenbindungs-Schema des $\text{Y}_\text{D}^\bullet$, ein teilweise zusätzlich ausgetauschtes Proton, einen von außerhalb des $\text{Y}_\text{D}^\bullet$ herrührenden Beitrag oder eine Kristallunreinheit bzw. das Abbrechen eines Teil des Kristalls, der somit in leicht abweichender Ausrichtung zum eigentlichen Einkristall liegt und entsprechend abweichende Kopplungssignale aufweist, oder ob es sich um ein sonstiges experimentelles Artefakt

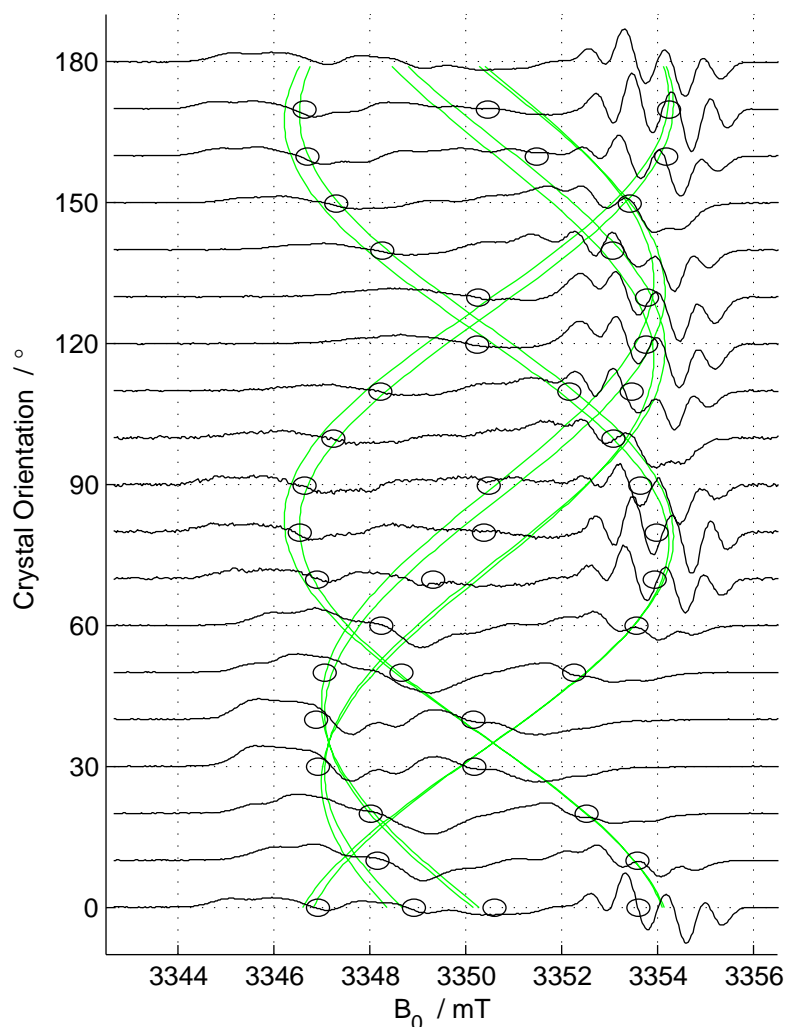


Abbildung C.1: EPR-Rotationsspektren von Kristall II (vergl. Abb. 9.3) und daraus abgeleitete Feldstellen für die in Abb. 9.5 dargestellten Mims-ENDOR-Messungen. Siehe Haupttext für Details und Abb. 9.3 für Messparameter.

handelt, lässt sich anhand der Spektren allein nicht klären. Aufgrund der sehr geringen Signalintensität dieser abweichenden Signale, die erst in entsprechender experimenteller Vergrößerung sichtbar werden und dort nur aufgrund des Verschwindens der Hauptintensitäten durch die Mims-Signalunterdrückung um die freie Larmorfrequenz, lässt sich aber feststellen, dass es sich um einen Effekt handelt, der maximal eine kleine Minderheit der erfassten Reaktionszentren betrifft und die Rekonstruktion der hier ermittelten Kopplungsparameter im Weiteren nicht in Frage stellt.

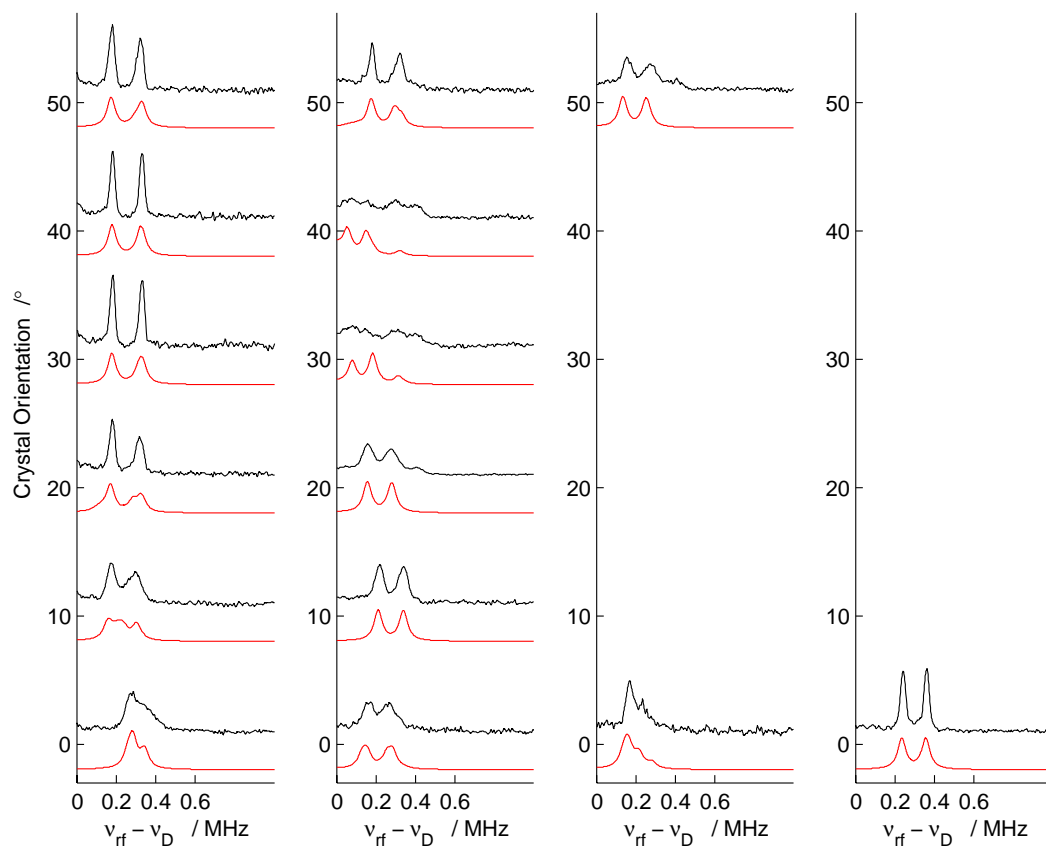


Abbildung C.2: Voller Spektrensatz für die in Kapitel 9 besprochenen ENDOR-Daten an deuteriertem Y_D^\bullet , Bereich von 0° bis 50° . Details siehe dort und im Haupttext hier.

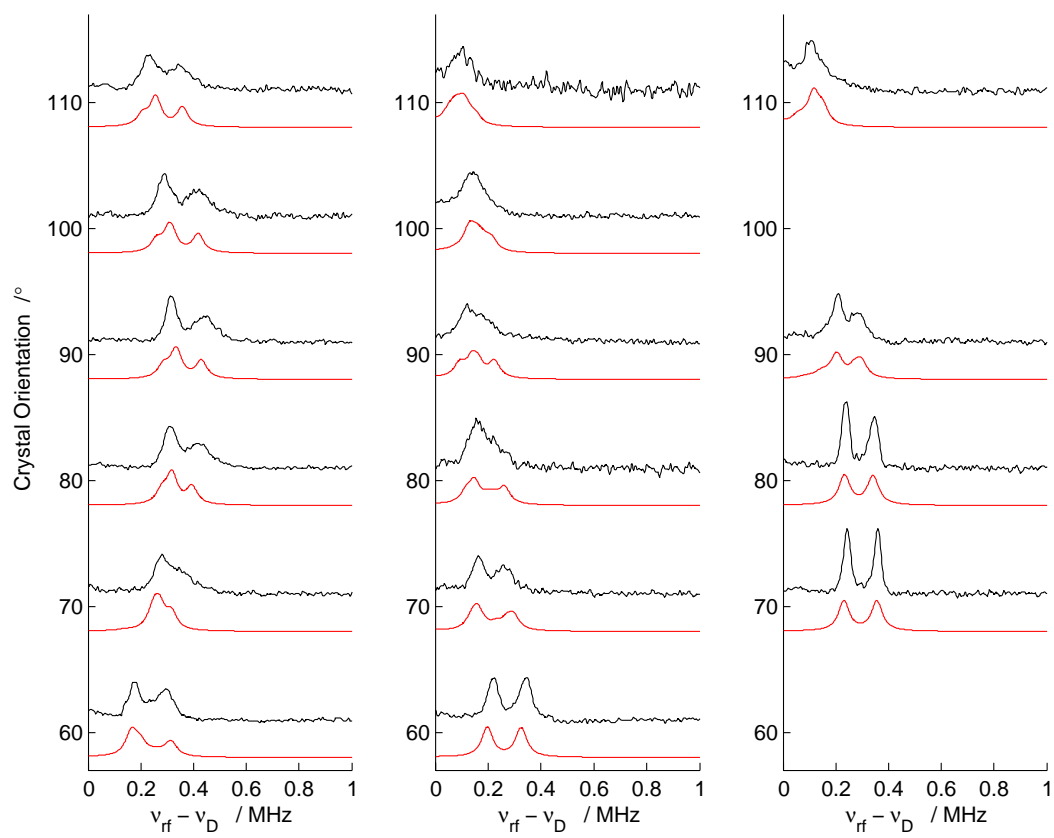


Abbildung C.3: Voller Spektrensatz für die in Kapitel 9 besprochenen ENDOR-Daten an deuteriertem Y_D^\bullet , Bereich von 60° bis 110° . Details siehe dort und im Haupttext hier.

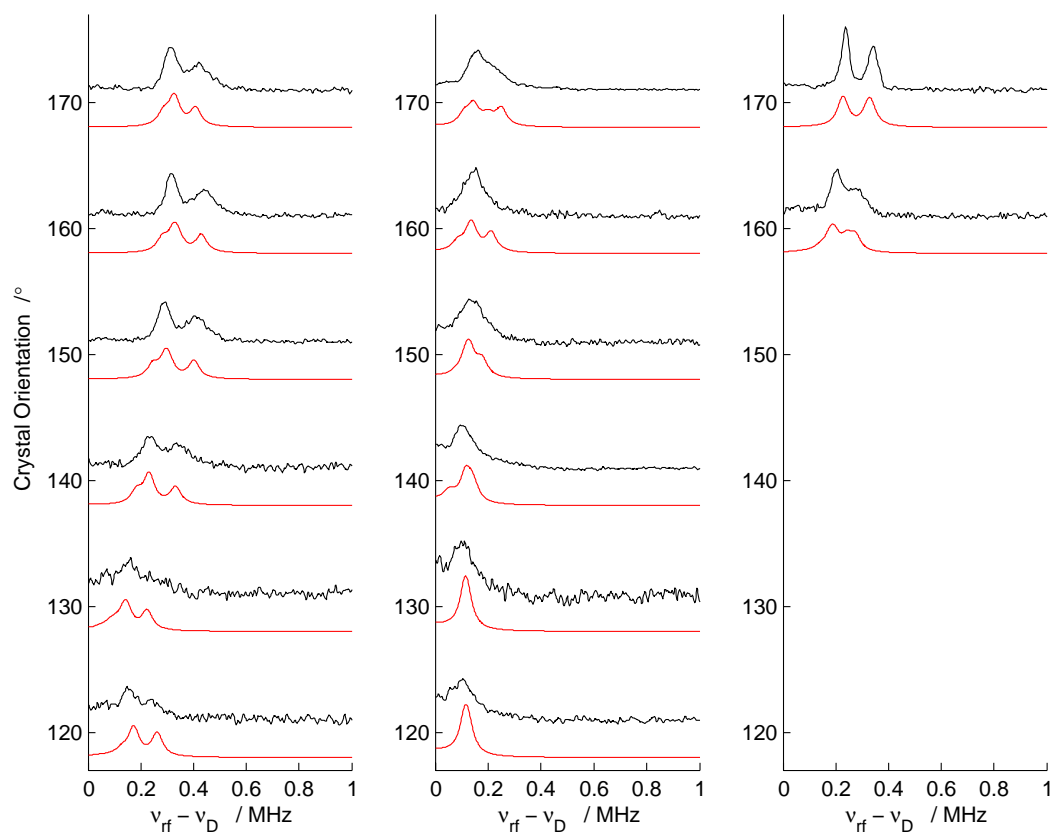


Abbildung C.4: Voller Spektrensatz für die in Kapitel 9 besprochenen ENDOR-Daten an deuteriertem Y_D^\bullet , Bereich von 120° bis 170° . Details siehe dort und im Haupttext hier.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Z-Schema der Lichtreaktionen oxygener Photosynthese	24
2.2	Lichtreaktionen in der Thylakoidmembran	25
2.3	Röntgenstruktur des PSII	27
2.4	Elektronen-Transportkette im PSII	28
2.5	Aufbau des wasseroxidierenden Mangankomplexes	29
2.6	Photozyklus nach Kok und Joliot, 1970	30
2.7	D1/D2-Heterodimer im PSII	31
3.1	Energieniveau-Schema für $I=1/2$ -Systeme	43
3.2	Energieniveau-Schema für $I=1$ -Systeme	44
3.3	EPR-Übergänge in Abhängigkeit von der Mikrowelleneinstrahlung	46
3.4	Pulssequenzen für Hahn-Echo, Davies- und Mims-ENDOR	47
3.5	Symmetrien im PSII-Einkristall	55
3.6	Goniometer für X/Q- und W-Band-Spektrometer	60
4.1	Photozyklus nach Dau und Haumann, 2007	67
4.2	$g=4,1$ - und <i>Multiline</i> -Signal, X-Band	70
5.1	Dunkel- und S_2 -Multilinesignal, gefr. Lösung, W-Band	75
5.2	S_2 -Multilinesignal, gefr. Lösung, W-Band, Simulation	76
5.3	EPR-Kristallrotation des S_2 -Mangankomplexes, FSE	79
5.4	EPR-Kristallrotation des S_2 -Mangankomplexes, pseudomoduliert	80
5.5	Vergleich S_2 -Zustand und Referenzparametersätze	81
6.1	Struktur des Tyrosin-D	90
7.1	EPR-Spektrum des Y_D^\bullet in PSIIcc-Präparation, gefrorene Lösung	95
7.2	EPR-Rotationsspektren von Y_D^\bullet , Kristall I	98
7.3	EPR-Rotationsspektren von Y_D^\bullet , Kristall II	99

7.4	Ringorientierung in 2AXT und EPR	101
7.5	Ringorientierung in 3BZ1 und EPR	101
8.1	X-Band-Davies-ENDOR an gefrorener Lösung	105
8.2	Orientierungsselektives Davies-ENDOR an gefr. Lösung	106
8.3	Winkelabhängigkeit der EPR-Signale und ENDOR-Feldstellen	111
8.4	Davies-ENDOR-Rotationsspektren von Y_D^\bullet , äußerer Teil	112
8.5	Davies-ENDOR-Rotationsspektren von Y_D^\bullet , innerer Teil	113
8.6	Kopplungsorientierung der Ringprotonen	122
8.7	Kopplungsorientierung der β -Protonen H7a und H7b	123
8.8	Newman-Projektion der Protonenbindung am β -Kohlenstoffatom	124
9.1	Orientierungsselektives Mims-ENDOR an deuterierter gefrorener Lösung	128
9.2	Signalunterdrückungseffekte im Mims-ENDOR	132
9.3	EPR-Rotationsspektren von deuteriertem Y_D^\bullet	134
9.4	Winkelabhängigkeit der EPR-Signale und ENDOR-Feldstellen an deuteriertem PSII	135
9.5	Mims-ENDOR-Rotationsspektren von deuteriertem Y_D^\bullet	139
9.6	Tyrosin-160 und Histidin-189 in ihrer Proteinumgebung	146
9.7	Wasserstoff-Brückenbindung im Davies-ENDOR an gefrorener Lösung	151
9.8	Wasserstoff-Brückenbindung im Davies-ENDOR am Einkristall	152
10.1	Die Protonenwechselwirkungen in der X-Band-Überlagerung	156
B.1	Winkelabhängigkeit der EPR-Signale und ENDOR-Feldstellen	168
B.2	Davies-ENDOR an Y_D^\bullet , 0° bis 40°	170
B.3	Davies-ENDOR an Y_D^\bullet , 50° bis 90°	171
B.4	Davies-ENDOR an Y_D^\bullet , 100° bis 140°	172
B.5	Davies-ENDOR an Y_D^\bullet , 150° bis 180°	173
C.1	Winkelabhängigkeit der EPR-Signale und ENDOR-Feldstellen an deuteriertem PSII	176
C.2	Mims-ENDOR an deuteriertem Y_D^\bullet , 0° bis 50°	177
C.3	Mims-ENDOR an deuteriertem Y_D^\bullet , 60° bis 110°	178
C.4	Mims-ENDOR an deuteriertem Y_D^\bullet , 120° bis 170°	179

Tabellenverzeichnis

5.1	g -Tensor-Hauptwerte (S_2 -Mn-Komplex)	74
5.2	Parametersätze von Hauptwerten der ^{55}Mn -Hyperfeinkopplungen	78
6.1	Methodik und verwendete Präparationen der Referenzpublikationen	91
7.1	g -Tensor-Hauptwerte (Tyr-D)	96
7.2	Orientierung der Einkristalle I und II	97
7.3	Orientierung des g -Tensors im Kristall	102
8.1	Vergleich der α -Protonen-Hyperfeinkopplungen	119
8.2	Vergleich der β -Protonen-Hyperfeinkopplungen	120
9.1	Orientierung des deuterierten Einkristalls	136
9.2	Hyperfeinkopplungs und Quadrupol-Aufspaltung an der deuterierten Brückenbindung	142
9.3	Orientierung der Wasserstoff-Brückenbindung	142
10.1	g -Tensor des $\text{Y}_\text{D}^\bullet$	155
10.2	Protonen-Hyperfeinkopplungen am $\text{Y}_\text{D}^\bullet$	157

Literaturverzeichnis

- [1] R. E. Blankenship; *Photosynth. Res.* 33; 91 (1992)
- [2] J. Xiong, C. E. Bauer; *Annu. Rev. Plant Biol.* 53; 503 (2002)
- [3] M. F. Hohmann-Marriott, R. E. Blankenship; *Annu. Rev. Plant Biol.* 62; 515 (2011)
- [4] A. W. Rutherford, P. Faller; *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358; 245 (2003)
- [5] J. Raymond, R. E. Blankenship; *Coord. Chem. Rev.* 252; 377 (2008)
- [6] H. Dau, I. Zaharieva; *Acc. Chem. Res.* 42; 1861 (2009)
- [7] R. E. Blankenship, D. M. Tiede, J. Barber, G. W. Brudvig, G. Fleming, M. Ghirardi, M. R. Gunner, W. Junge, D. M. Kramer, A. Melis, T. A. Moore, C. G. Moser, D. G. Nocera, A. J. Nozik, D. R. Ort, W. W. Parson, R. C. Prince, R. T. Sayre; *Science* 332; 805 (2011)
- [8] R. E. Blankenship; *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*; Oxford: Blackwell Science, 2002
- [9] D. O. Hall, K. K. Rao; *Photosynthesis*; 6. Aufl.; Studies in Biology; Cambridge University Press, 1999
- [10] F. D. MacDonald, B. B. Buchanan; in: *Photosynthesis* (J. Amesz, Hrsg.); S. 175–197; Elsevier, 1987
- [11] L. Stryer; *Biochemistry*; 4. Aufl.; New York: W. H. Freeman and Company, 1995
- [12] J. Amesz (Hrsg.); *Photosynthesis*; Bd. 15 von *New Comprehensive Biochemistry*; Amsterdam: Elsevier, 1987
- [13] R. Emerson, R. Chalmers, C. Cederstrand; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43; 133 (1957)
- [14] R. Hill, F. Bendall; *Nature* 186; 136 (1960)

- [15] L. M. N. Duysens, J. Amesz, B. M. Kamp; *Nature* 190; 510 (1961)
- [16] L. Orr, Govindjee; *Photosynth. Res.* 105; 167 (2010)
- [17] R. W. Bauman; *Microbiology with Diseases by Body System with The Microbiology Place Website*; 2. Aufl.; San Francisco: Benjamin Cummings, 2009
- [18] A. Zouni, H. T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger, P. Orth; *Nature* 409; 739 (2001)
- [19] K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, S. Iwata; *Science* 303; 1831 (2004)
- [20] J. Biesiadka, B. Loll, J. Kern, K.-D. Irrgang, A. Zouni; *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6; 4733 (2004)
- [21] B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, J. Biesiadka; *Nature* 438; 1040 (2005)
- [22] A. Guskov, J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni, W. Saenger; *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16; 334 (2009)
- [23] N. Kamiya, J.-R. Shen; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100; 98 (2003)
- [24] Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya; *Nature* 473; 55 (2011)
- [25] M. Broser, A. Gabdulkhakov, J. Kern, A. Guskov, F. Müh, W. Saenger, A. Zouni; *J. Biol. Chem.* 285; 26255 (2010)
- [26] J. Kern, B. Loll, C. Lüneberg, D. DiFiore, J. Biesiadka, K.-D. Irrgang, A. Zouni; *Biochim. Biophys. Acta* 1706; 147 (2005)
- [27] M. Watanabe, M. Iwai, R. Narikawa, M. Ikeuchi; *Plant Cell Physiol.* 50; 1674 (2009)
- [28] N. Nelson, A. Ben-Shem; *Nature Rev.* 5; 971 (2004)
- [29] J. McEvoy, G. W. Brudvig; *Chem. Rev.* 106; 4455 (2006)
- [30] P. Joliot; *Photosynth. Res.* 76; 65 (2003)
- [31] P. Joliot, G. Barbieri, R. Chabaud; *Photochem. Photobiol.* 10; 309 (1969)
- [32] B. Kok, B. Forbush, M. McGloin; *Photochem. Photobiol.* 11; 457 (1970)
- [33] S. Styring, J. Sjöholm, F. Mamedov; *Biochim. Biophys. Acta* In Press, Corrected Proof; DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.03.016 (2011)

- [34] R. J. Debus; *Biochim. Biophys. Acta* 1503; 164 (2001)
- [35] I. Pujols-Ayala, B. A. Barry; *Biochim. Biophys. Acta* 1655; 205 (2004)
- [36] J. H. A. Nugent, R. J. Ball, M. C. W. Evans; *Biochim. Biophys. Acta* 1655; 217 (2004)
- [37] A. W. Rutherford, A. Boussac, P. Faller; *Biochim. Biophys. Acta* 1655; 222 (2004)
- [38] B. A. Diner, R. D. Britt; in: *Photosystem II; The Light-Driven Water:Plastiquinone Oxidoreductase* (T. Wydrzynski, K. Satoh, Hrsg.); Bd. 22 von *Advances in Photosynthesis and Respiration*; S. 207–233; Dordrecht: Springer, 2005
- [39] B. A. Barry; *J. Photochem. Photobiol. B.: Biol.* In Press, Corrected Proof; DOI: 10.1016/j.photobiol.2011.01.026 (2011)
- [40] B. Commoner, J. J. Heise, J. Townsend; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42; 710 (1956)
- [41] G. T. Babcock, K. Sauer; *Biochim. Biophys. Acta* 325; 483 (1973)
- [42] Y. Takahashi, S. Styring; *FEBS Lett.* 223; 371 (1987)
- [43] B. A. Barry, G. T. Babcock; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84; 7099 (1987)
- [44] C. W. Hoganson, G. T. Babcock; *Biochemistry* 27; 5848 (1988)
- [45] A.-F. Miller, G. W. Brudvig; *Biochim. Biophys. Acta* 1056; 1 (1991)
- [46] D. Koulougliotis, X.-S. Tang, B. A. Diner, G. W. Brudvig; *Biochemistry* 34; 2850 (1995)
- [47] B. A. Diner, D. A. Force, D. W. Randall, R. D. Britt; *Biochemistry* 37; 17931 (1998)
- [48] A.-M. A. Hays, I. R. Vassiliev, J. H. Golbeck, R. J. Debus; *Biochemistry* 37; 11352 (1998)
- [49] F. Mamedov, R. T. Sayre, S. Styring; *Biochemistry* S. 14245–14256 (1998)
- [50] C. Tommos, G. T. Babcock; *Biochim. Biophys. Acta* 1458; 199 (2000)
- [51] H.-A. Chu, A. P. Nguyen, R. J. Debus; *Biochemistry* 34; 5839 (1995)
- [52] H. Matsuoka, J.-R. Shen, A. Kawamori, K. Nishiyama, Y. Ohba, S. Yamauchi; *J. Am. Chem. Soc.* 133; 4655 (2011)

- [53] R. J. Debus, B. A. Barry, G. T. Babcock, L. McIntosh; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85; 427 (1988)
- [54] W. F. J. Vermaas, A. W. Rutherford, Ö. Hansson; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85; 8477 (1988)
- [55] W. F. J. Vermaas, G. Renger, G. Dohnt; *Biochim. Biophys. Acta* 764; 194 (1984)
- [56] S. Styring, A. W. Rutherford; *Biochemistry* 26; 2401 (1987)
- [57] J. Messinger, G. Renger; *Biochemistry* 32; 9379 (1993)
- [58] Z. Deá, I. Vass, S. Styring; *Biochim. Biophys. Acta* 1185; 65 (1994)
- [59] C. A. Buser, L. K. Thompson, B. A. Diner, G. W. Brudvig; *Biochemistry* 29; 8977 (1990)
- [60] D. L. Kirilovsky, A. G. P. Boussac, F. J. E. van Mieghem, J.-M. R. C. Ducruet, P. R. Setif, J. Yu, W. F. J. Vermaas, A. W. Rutherford; *Biochemistry* 31; 2099 (1992)
- [61] M. Rova, F. Mamedov, A. Magnuson, P.-O. Fredriksson, S. Styring; *Biochemistry* 37; 11039 (1998)
- [62] G. M. Anayev, I. Sakiyan, B. A. Diner, G. C. Dismukes; *Biochemistry* 41; 974 (2002)
- [63] X.-S. Tang, D. A. Chisholm, G. C. Dismukes, G. W. Brudvig, B. A. Diner; *Biochemistry* 32; 13742 (1993)
- [64] B. I. Kochelaev, Y. V. Yablokov; *The Beginning of Paramagnetic Resonance*; Singapore: World Scientific, 1995
- [65] K. Salikhov; in: *Electron Paramagnetic Resonance: From Fundamental Research to Pioneering Applications & Zavoisky Award*; S. 23; The Treasures of Eureka; Wellington, 2009
- [66] C. P. Poole; *Electron Spin Resonance: A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques*; New York: Interscience Publishers, 1967
- [67] A. Carrington, A. D. McLachlan; *Introduction to Magnetic Resonance: With Applications to Chemistry and Chemical Physics*; Harper & Row and John Weathermill, Inc., 1967
- [68] C. P. Poole, H. A. Farach; *The Theory of Magnetic Resonance*; New York: Wiley-Interscience, 1972

- [69] A. Schweiger, G. Jeschke; *Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance*; Oxford University Press, 2001
- [70] T. Prisner, M. Rohrer, F. MacMillan; *Annu. Rev. Phys. Chem.* 52; 279 (2001)
- [71] B. Odom, D. Hanneke, B. D'Urso, G. Gabrielse; *Phys. Rev. Lett.* 97; 030801 (2006)
- [72] P. E. Doan, N. S. Lees, M. Shanmugan, B. M. Hoffman; *Appl. Magn. Reson.* 37; 763 (2010)
- [73] M. Grathwohl; *Physik in unserer Zeit* 3; 17 (1972)
- [74] D. A. Force, D. W. Randall, R. D. Britt, X.-S. Tang, B. A. Diner; *J. Am. Chem. Soc.* 117; 12643 (1995)
- [75] A. Bencini, Gatteschi; *EPR of Exchange Coupled Systems*; Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1990
- [76] J. M. Peloquin, R. D. Britt; *Biochim. Biophys. Acta* 1503; 96 (2001)
- [77] W. R. Hagen, D. O. Hearshen, R. H. Sands, W. R. Dunham; *J. Magn. Reson.* 61; 220 (1985)
- [78] W. R. Dunham, R. H. Sands; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312; 255 (2003)
- [79] A. Abragam; *The Principles of Nuclear Magnetism*; The International Series of Monographs on Physics; Oxford: Clarendon Press, 1961
- [80] C. P. Keijzers, E. J. Reijerse, J. H. Schmidt; *Pulsed EPR: A new field of applications*; North Holland, Amsterdam: Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, 1989
- [81] E. L. Hahn; *Phys. Rev.* 80; 580 (1950)
- [82] H. Y. Carr, E. M. Purcell; *Phys. Rev.* 94; 630 (1954)
- [83] A. Schweiger; *Angew. Chem.* 103; 223 (1991)
- [84] E. R. Davies; *Phys. Lett. A* 47; 1 (1974)
- [85] W. B. Mims; *Proc. R. Soc. London A* 283; 452 (1965)
- [86] R. D. Britt; in: *Biophysical Techniques in Photosynthesis* (J. Amesz, A. J. Hoff, Hrsg.); Bd. 3 von *Advances in Photosynthesis and Respiration*; S. 235–253; Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996

- [87] W. Hofbauer, A. Zouni, R. Bittl, J. Kern, P. Orth, F. Lendzian, P. Fromme, H. T. Witt, L. W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98; 6623 (2001)
- [88] M. Kammel, J. Kern, W. Lubitz, R. Bittl; *Biochim. Biophys. Acta* 18; 47 (2003)
- [89] J. Yano, J. Kern, K. D. Irrgang, M. J. Latimer, U. Bergmann, P. Glatzel, J. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, K. Sauer, J. Messinger, A. Zouni, V. K. Yachandra; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102; 12047 (2005)
- [90] J. Yano, Y. Pushkar, P. Glatzel, A. Lewis, K. Sauer, J. Messinger, U. Bergmann, V. Yachandra; *J. Am. Chem. Soc.* 127; 14974 (2005)
- [91] J. Yano, J. Kern, K. Sauer, M. J. Latimer, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, W. Saenger, J. Messinger, A. Zouni, V. K. Yachandra; *Science* 314; 821 (2006)
- [92] J. Kern, B. Loll, A. Zouni, W. Saenger, K.-D. Irrgang, J. Biesiadka; *Photosynth. Res* 84; 153 (2005)
- [93] J. Kern, J. Biesiadka, B. Loll, W. Saenger, A. Zouni; *Photosynth. Res.* 92; 389 (2007)
- [94] J. P. Dekker, E. J. Boekema, H. T. Witt, M. Rögner; *Biochim. Biophys. Acta* 936; 307 (1988)
- [95] A. Zouni, L. Lüneberg, P. Fromme, M. D. Schubert, W. Saenger, H. T. Witt; in: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (G. Garab, Hrsg.); Bd. 2; S. 925–928; Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998
- [96] A. Zouni, R. Jordan, E. Schlodder, P. Fromme, H. T. Witt; *Biochim. Biophys. Acta* 1457; 103 (2000)
- [97] J. Kern; *Structural and functional investigations of Photosystem II from Thermosynechococcus elongatus*; Dissertation; Technische Universität Berlin (2005)
- [98] W. T. Hofbauer; *Electron Paramagnetic Resonance at 94 GHz: Methodological Developments and Studies of Photosynthetic Reaction Centers*; Dissertation; Technische Universität Berlin (2001)
- [99] D. A. Berthold, G. T. Babcock, C. F. Yocum; *FEBS Lett.* 134; 231 (1981)
- [100] L. Iuzzolino, J. Dittmer, W. Dörner, W. Meyer-Klaucke, H. Dau; *Biochemistry* 37; 17112 (1998)
- [101] H. Schiller, H. Dau; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 55; 138 (2000)

- [102] J. Clausen, W. Junge; *Nature* 430; 480 (2004)
- [103] H. Dau, M. Haumann; *Biochim. Biophys. Acta* 1767; 472 (2007)
- [104] H. Dau, M. Haumann; *Photosynth. Res.* 92; 327 (2007)
- [105] H. Dau, M. Haumann; *Coord. Chem. Rev.* 252; 273 (2008)
- [106] M. Grabolle; *Die Donorseite des Photosystem II der Pflanzen: Rekombinationsfluoreszenz- und Röntgenabsorptionsstudien*; Dissertation; Freie Universität Berlin (2005)
- [107] M. Grabolle, M. Haumann, C. Müller, P. Liebisch, H. Dau; *J. Biol. Chem.* 281; 4580 (2006)
- [108] W. Hillier, J. Messinger; in: *Photosystem II: The Light-Driven Water:Plastoquinone Oxidoreductase* (T. J. Wydrzynski, K. Satoh, Hrsg.); Bd. 22 von *Advances in Photosynthesis and Respiration*; S. 567–608; Dordrecht: Springer, 2005
- [109] G. C. Dismukes, Y. Siderer; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78; 247 (1981)
- [110] J. L. Casey, K. Sauer; *Biochim. Biophys. Acta* 767; 21 (1984)
- [111] J. C. de Paula, J. B. Innes, G. W. Brudvig; *Biochemistry* 24; 8114 (1985)
- [112] J.-L. Zimmermann, A. W. Rutherford; *Biochim. Biophys. Acta* 767; 160 (1984)
- [113] J.-L. Zimmermann, A. W. Rutherford; *Biochemistry* 25; 4609 (1986)
- [114] A. Haddy, W. R. Dunham, R. H. Sands, R. Aasa; *Biochim. Biophys. Acta* 1099; 25 (1992)
- [115] A. V. Astashkin, Y. Kodera, A. Kawamori; *J. Magn. Reson.* 105; 113 (1994)
- [116] A. Boussac, J.-J. Girerd, A. W. Rutherford; *Biochemistry* 35; 6984 (1996)
- [117] A. Boussac, A. W. Rutherford; *Biochim. Biophys. Acta* 1457; 145 (2000)
- [118] V. K. Yachandra; in: *Photosystem II: The Light-Driven Water:Plastoquinone Oxidoreductase* (T. J. Wydrzynski, K. Satoh, Hrsg.); Bd. 22 von *Advances in Photosynthesis and Respiration*; S. 235–260; Dordrecht: Springer, 2005
- [119] P. J. Smith, R. J. Pace; *Biochim. Biophys. Acta* 1275; 213 (1996)
- [120] A. Boussac, S. Un, O. Horner, A. W. Rutherford; *Biochemistry* 37; 4001 (1998)

- [121] A. Boussac, H. Kul, S. Un, M. Rögner, A. W. Rutherford; *Biochemistry* 37; 8995 (1998)
- [122] K. V. Lakshmi, M. J. Reifler, D. A. Chisholm, J. Y. Wang, B. A. Diner, G. W. Brudvig; *Photosynth. Res.* 72; 175 (2002)
- [123] A. Haddy, K. V. Lakshmi, G. W. Brudvig, H. A. Frank; *Biophys. J.* 87; 2885 (2004)
- [124] Ö. Hansson, R. Aasa, T. Vänngård; *Biophys. J.* 51; 825 (1987)
- [125] K. A. Åhrling, R. Pace; *Biophys. J.* 68; 2081 (1995)
- [126] M. Zheng, G. C. Dismukes; *Inorg. Chem.* 35; 3307 (1996)
- [127] K. Hasegawa, M. Kusunoki, Y. Inoue, T. Ono; *Biochemistry* 37; 9457 (1998)
- [128] J. M. Peloquin, K. A. Campbell, D. W. Randall, M. A. Evanchik, V. L. Pecoraro, W. H. Armstrong, R. D. Britt; *J. Am. Chem. Soc.* 122; 10926 (2000)
- [129] L. V. Kulik, B. Epel, W. Lubitz, J. Messinger; *J. Am. Chem. Soc.* 127; 2392 (2005)
- [130] L. Kulik, B. Epel, J. Messinger, W. Lubitz; *Photosynth. Res.* 84; 347 (2005)
- [131] L. V. Kulik, B. Epel, W. Lubitz, J. Messinger; *J. Am. Chem. Soc.* 129; 13421 (2007)
- [132] K.-O. Schäfer; *Exchange Coupled Manganese Complexes: Model Systems for the Active Centres of Redoxproteins Investigated with EPR Techniques*; Dissertation; Technische Universität Berlin (2002)
- [133] K.-O. Schäfer, R. Bittl, F. Lendzian, V. Barynin, T. Weyhermüller, K. Wieghardt, W. Lubitz; *J. Phys. Chem. B* 107; 1242 (2003)
- [134] C. Teutloff, K.-O. Schäfer, S. Sinnecker, V. Barynin, R. Bittl, K. Wieghardt, F. Lendzian, W. Lubitz; *Magn. Reson. Chem.* 43; 51 (2005)
- [135] A. Kawamori, J.-R. Shen, H. Mino, K. Furukawa, H. Matsuoka, T. Kato; in: *Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives; Proceedings of the 13th International Congress of Photosynthesis* (A. van der Est, D. Bruce, Hrsg.); S. 406–408; International Society of Photosynthesis; Allen Press Inc., 2005
- [136] H. Matsuoka, K. Furukawa, T. Kato, H. Mino, J.-R. Shen, A. Kawamori; *J. Phys. Chem. B* 110; 13242 (2006)

- [137] M. Rohrer, O. Brüggemann, B. Kinzer, T. F. Prisner; *Appl. Magn. Reson.* 21; 257 (2001)
- [138] W. Hofbauer, R. Bittl; *J. Magn. Reson.* 147; 226 (2000)
- [139] M.-F. Charlot, A. Boussac, G. Blondin; *Biochim. Biophys. Acta* 1708; 120 (2005)
- [140] C. Policar, M. Knüpling, Y.-M. Frapart, S. Un; *J. Phys. Chem. B* 102; 10391 (1998)
- [141] G. A. Lorigan, R. D. Britt; *Biochemistry* 33; 12072 (1994)
- [142] L. V. Kulik, L. W., J. Messinger; *Biochemistry* 44; 9368 (2005)
- [143] C. Teutloff, S. Pudollek, S. Keßen, M. Broser, A. Zouni, R. Bittl; *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11; 6715 (2009)
- [144] M. Brok, F. C. Ebskamp, A. J. Hoff; *Biochim. Biophys. Acta* 809; 421 (1985)
- [145] B. A. Barry, G. T. Babcock; *Chem. Scr.* 28A; 117 (1988)
- [146] E. L. Fasanella, W. Gordy; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62; 299 (1969)
- [147] B. A. Barry, M. K. El-Deeb, P. O. Sandusky, G. T. Babcock; *J. Biol. Chem.* 265; 20139 (1990)
- [148] C. W. Hoganson, G. T. Babcock; *Biochemistry* 31; 11874 (1992)
- [149] S. E. J. Rigby, J. H. A. Nugent, P. J. O'Malley; *Biochemistry* 33; 1734 (1994)
- [150] K. Warncke, G. T. Babcock, J. McCracken; *J. Am. Chem. Soc.* 116; 7332 (1994)
- [151] J. Gilchrist, M. Lane, J. A. Ball, D. W. Randall, R. D. Britt; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92; 9545 (1995)
- [152] S. Un, M. Atta, M. Fontecave, A. W. Rutherford; *J. Am. Chem. Soc.* 117; 10713 (1995)
- [153] S. Un, X.-S. Tang, B. A. Diner; *Biochemistry* 35; 679 (1996)
- [154] C. T. Farrar, G. J. Gerfen, R. G. Griffin; *J. Phys. Chem. B* 101; 6634 (1997)
- [155] P. Dorlet, A. W. Rutherford, S. Un; *Biochemistry* 39; 7826 (2000)
- [156] M. Kammel; *Cofactors on the Donor Side of Photosystem II Investigated with EPR Techniques*; Dissertation; Technische Universität Berlin (2003)

- [157] R. G. Evelo, A. J. Hoff, S. A. Dikanov, A. M. Tyryshkin; *Chem. Phys. Lett.* 161; 479 (1989)
- [158] S. Nakazawa, A. Ishii, J. Minagawa, T.-a. Ono; *Chem. Phys. Lett.* 405; 318 (2005)
- [159] M. Högbom, M. Galander, M. Anderson, M. Kolberg, W. Hofbauer, G. Lassmann, P. Nordlund, F. Lenzian; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100; 3209 (2003)
- [160] M. Galander, M. Uppsten, U. Uhlin, F. Lenzian; *J. Biol. Chem.* 281; 31743 (2006)
- [161] A. Stesmans, G. van Gorp; *Rev. Sci. Instrum.* 60; 2949 (1989)
- [162] S. Un, L.-C. Brunel, T. M. Brill, J.-L. Zimmermann, A. W. Rutherford; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91; 5262 (1994)
- [163] V. I. Gulina, S. A. Dikanov, Y. D. Tsvetkov, R. G. Evelo, A. J. Hoff; *Pure Appl. Chem.* 64; 903 (1992)
- [164] P. O'Malley, D. Ellson; *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1320; 65 (1997)
- [165] M. Rohrer, F. MacMillan, T. Prisner, A. Gardiner, K. Möbius, W. Lubitz; *J. Phys. Chem. B* 102; 4648 (1998)
- [166] M. Bennati, C. T. Farrar, J. A. Bryant, S. J. Inati, V. Weis, G. J. Gerfen, P. Riggs-Gelasco, J. Stubbe, R. G. Griffin; *J. Magn. Res.* 138; 232 (1999)
- [167] F. Himo, A. Gräslund, L. A. Eriksson; *Biophys. J.* 72; 1556 (1997)
- [168] S. Un; *Reson. Chem.* 43; S229 (2005)
- [169] Alia, B. Hulsebosch, H. van Gorkom, J. Raap, J. Lugtenburg, J. Matysik, H. de Groot, P. Gast; *Chem. Phys. S.* 459–469 (2003)
- [170] S. Kim, J. Liang, B. A. Barry; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94; 14406 (1997)
- [171] B. Svensson, I. Vass, E. Cedergren, S. Styring; *EMBO J.* 9; 2051 (1990)
- [172] S. V. Ruffle, D. Donnelly, T. L. Blundell, J. H. A. Nugent; *Photosynth. Res.* 34; 287 (1992)
- [173] R. G. Evelo, S. Styring, A. W. Rutherford, A. J. Hoff; *Biochim. Biophys. Acta* 973; 428 (1989)
- [174] H. Mino, J.-i. Satoh, A. Kawamori, K. Toriyama, J.-L. Zimmermann; *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1144; 426 (1993)

- [175] K. A. Campbell, J. M. Peloquin, B. A. Diner, X.-S. Tang, D. A. Chisholm, R. D. Britt; *J. Am. Chem. Soc.* 119; 4787 (1997)
- [176] R. Takahashi, M. Sugiura, T. Noguchi; *Biochemistry* 46; 14245 (2007)
- [177] R. Hienerwadel, B. A. Diner, C. Berthomieu; *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1777; 525 (2008)
- [178] H. Goldstein; *Klassische Mechanik*; Akademische Verlagsgesellschaft Wiesbaden, 1983

Danksagung

Dem Initiator und Betreuer dieser Arbeit, Prof. Dr. Robert Bittl, sei an dieser Stelle zuvorderst gedankt, nicht allein für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe verfassen zu können, sondern auch für die lang währende und gut meinende Begutachtung der Fortschritte und Umwege, welche die vorliegende Arbeit im Laufe der Zeit so nahm.

Dankenswerterweise erklärte sich Prof. Dr. Holger Dau als mit dem PSII bestens vertrauter Kooperationspartner im Sfb-498 zur Zweitbegutachtung dieser Arbeit bereit.

Ohne die stets bereitwillige und zuvorkommende Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Athina Zouni und Dr. Jan Kern wäre die vorliegende Arbeit schlicht nicht möglich gewesen. Die unbürokratische und oft genug kurzfristig organisierte Versorgung mit PSII-Lösungsproben und vor allem Einkristallen eröffnete immer wieder neue Möglichkeiten.

Die direkte, unkonventionelle, manchmal eigenwillige Betreuung übernahm in sehr kollegialer Weise Dr. Christian Teutloff, dem ich zu tiefem Dank verpflichtet bin und ohne den die Arbeit in dieser Form auch nicht vorläge. Zur PSII-Untergruppe stieß schließlich noch Susanne Pudollek, die sich nun den von mir (und fünfzig Jahren EPR am PSII) nicht beantworteten Fragen widmet. Einen herzlichen Dank auch an alle derzeitigen und ehemaligen Arbeitsgruppenkollegen und -kolleginnen für die unkomplizierte Zusammenarbeit und stets entspannte Atmosphäre. Eingeschlossen seien hier auch gerade die nicht-akademischen, aber allzeit hilfsbereiten Mitarbeiter am Institut, die nicht zu vergessende Roswitha Brunn, Angelika Pasanec und die Mitarbeiter des Tieftemperaturlabors und der Feinwerktechnik.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester danken, die in steter Anteilnahme, zeitweiliger Besorgnis und umfassender Ermunterung den Verlauf der Arbeit verfolgten und begleiteten. In ihnen hatte ich einen Rückhalt, dem nicht nur diese Arbeit zu viel zu verdanken hat.

In diesem Sinne ein allgemeines: Glück auf!

Lebenslauf

— Aus Gründen des Datenschutzes enthält die online veröffentlichte
Version dieser Dissertation keinen Lebenslauf —

