

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Überblick

Schätzungsweise 20-50% aller Proteine sind Metalloproteine, d. h. ein oder mehrere Metallionen sind Bestandteil des Proteins. Die Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) stellt eine zunehmend wichtige Methode zur Charakterisierung des Metallzentrums bezüglich der Kernanordnung (Struktur auf atomarer Ebene) und der elektronischen Struktur (Oxidationszustände, Besetzung und Hybridisierung der Orbitale des Metalls) dar. Neben der universellen Einsetzbarkeit (keine Kristalle oder Größenbegrenzung, keine spezifischen Spinzustände oder Isotope sind erforderlich) stellt besonders die Möglichkeit der Untersuchung des Metallzentrums in seinem katalytischen Zyklus einen zentralen Vorteil der Methode dar. Während verschiedene Aspekte der Methode als gut etabliert gelten können (z.B. die EXAFS-Messung und die EXAFS-Analyse für K-Kanten von Metalloprotein-Suspensionen), sind in anderen Bereichen methodische Verbesserungen möglich und wünschenswert. Das generelle Ziel dieser Arbeit war es, derartige Verbesserungen bezüglich der BioXAS-Datenanalyse zu entwickeln, zu implementieren und auf verschiedene Fragestellungen anzuwenden.

(1) Alle in die vorliegende Schrift aufgenommenen Arbeiten beziehen sich auf den Mangankomplex der oxygenen Photosynthese; verschiedene Arbeiten zu anderen Systemen wurden nicht in die Schrift aufgenommen (siehe unten). In dem einleitenden **Kapitel 1** werden die Photosynthese und die BioXAS-Methode kurz vorgestellt. Als Ausgangspunkt für die folgenden Untersuchungen werden in **Kapitel 2** die vorliegenden Informationen zur Struktur des Mangankomplexes in seinem "Ruhezustand", dem sogenannten S_1 -Zustand, erörtert (siehe auch [Dau, Liebisch und Haumann, 2004c]).

(2) Einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Analyse des XANES-Bereiches des Spektrums (XANES, X-ray absorption near-edge structure). Hier galt es unter anderem, grundlegende Fragen zur Beziehung zum Oxidationszustand des absorbierenden Metalls und den Spezifika der Ligandenumgebung zu klären. Diese grundlegenden Überlegungen sind im **Kapitel 3** wiedergegeben (siehe auch [Dau, Liebisch und Haumann, 2003; Liebisch, Müller, Grabolle, Haumann und Dau, 2004]).

(3) In der Vergangenheit wurde der Mangankomplex typischerweise bei tiefen Temperaturen (ca. 20 K) untersucht, wodurch Kryoartefakte nicht ausgeschlossen werden können. Für die Raumtemperatur-Messungen an einem modernen Undulator-Strahlrohr mussten Programme erstellt werden, die auch bei der schnellen Messung zahlreicher Spektren eine effiziente Handhabung der Daten ermöglicht. Da diese methodische Verbesserungen mehr technischer als wissenschaftlicher Natur sind, sind sie alleine im **Anhang A.1** kurz skizziert. Die Raumtemperaturuntersuchungen wurden zusammen mit

Dr. Michael Haumann und Claudia Müller (biochemische Probenpräparation und automatisierter Probenwechsel) durchgeführt; die zentralen wissenschaftlichen Ergebnisse sind im **Kapitel 4** wiedergegeben (siehe auch [Haumann, Müller, Liebisch, Grabolle, Iuzzolino, Dittmer, Neisius, Meyer-Klaucke und Dau, 2005]). Die dort beschriebenen Arbeiten führen zu einem Vorschlag für die Struktur- und Oxidationszustandsänderungen des PSII-Mangankomplexes für die Übergänge zwischen den vier semi-stabilen Zuständen des Funktionszyklus. Die offenen Fragen, die sich insbesondere für den $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang ergeben, werden in einem späteren Kapitel mit XANES-Simulationen bearbeitet.

(4) Als wichtige Modell- und Testsysteme kamen zwei binukleare Mangankomplexe zur Anwendung, bei denen es dem Kooperationspartner (Ann Magnusson, Schwedisches Konsortium für artifizielle Photosynthese) gelang, elektro- und photochemisch jeweils drei verschiedene Oxidationszustände einzustellen. Die Datenanalyse und Interpretation sind in **Kapitel 5** beschrieben (siehe auch [Magnusson, Liebisch, Haumann, Höglblom, Anderlund, Lomoth, Meyer-Klaucke und Dau, 2004]), weitere Testsysteme werden in **Kapitel 6** diskutiert.

(5) Während die in **Kapitel 3** beschriebenen Streu- und MO-Berechnungen zu den XANES-Spektren auf ein grundlegendes qualitatives Verständnis zielten, wird in **Kapitel 7** die Möglichkeit quantitativer Simulationen - auch im Sinne einer Kurvenanpassung - geprüft. Im sich anschließenden Kapitel werden für den PSII-Mangankomplex XANES-Differenzspektren der S-Zustandsübergänge simuliert, was insbesondere für den $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang zu wichtigen Einsichten führt [Dau, Liebisch und Haumann, 2004b], [Liebisch und Dau, 2005, Manuskript in Vorbereitung].

(6) Ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die theoretischen Grundlagen zur Analyse des linearen Dichroismus in den XANES-Spektren partiell orientierter Proteinproben zu schaffen und die Nutzung des XANES-Dichroismus zur Gewinnung von Strukturinformationen zu prüfen. Dies gelang, wie im **Kapitel 8** dargelegt [Liebisch und Dau, 2005, Manuskript in Vorbereitung].

(7) Verschiedene Beiträge zur Untersuchung anderer Systeme mit BioXAS-Methoden sind nicht in die vorliegende Schrift aufgenommen worden. Hier wären zu nennen XAS-Untersuchungen zu Ni-Fe-Hydrogenasen [Haumann, Porthun, Buhrke, Liebisch, Meyer-Klaucke, Friedrich und Dau, 2003; Burgdorf, Löscher, Liebisch, Linden, Galander, Lenzian, Meyer-Klaucke, Albracht, Friedrich, Dau und Haumann, 2005], an Vanadiumhaltigen Bromperoxidasen und diesbezüglichen synthetischen Modellen [Christmann, Dau, Haumann, Kiss, Liebisch, Rehder, Santoni und Schulzke, 2004], zum pH-Einfluss auf die Struktur des Bi-Kupferzentrums des Hämocyanins [Liebisch et al., 2005, Manuskript in Vorbereitung], vom Autor initiierte räumlich aufgelöste Mikrofokus-Messungen zu Manganablagerungen an der Zellwand einer Grünalge [Liebisch, Müller, Plieth, Erko und Dau, 2003b], Messungen zur Komplexbildung von Mn(II)-Ionen in Anwesenheit von Bicarbonat [Liebisch, Barra, Grabolle, Müller, Erko und Dau, 2003a]. In geringem Umfang wurden Beiträge zu Ca-EXAFS am PSII [Müller, Liebisch, Barra, Dau und Haumann, 2005] sowie XAS an synthetischen Manganoxiden [BESSY Jahres-Bericht i.V.] geleistet.

1.2 Photosynthese und Photosystem II

Die Erkenntnis, dass Pflanzen "verbrauchte Luft regenerieren" können, ist inzwischen mehr als 200 Jahre alt, und auch weitere grundlegende Eigenschaften der Photosynthese, die Umwandlung von Wasser und Kohlendioxid unter Einfall von Licht, waren bereits Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt. Von diesen Ursprüngen führte der Weg zum heutigen Stand des Wissens über die Photosynthese über unzählige Experimente zu Fragen der Struktur und der Funktionsweise [Lawlor, 1990; Stryer, 1995; Häder, 1999; Heldt und Heldt, 2004]. Und auch wenn Vieles inzwischen als gesichertes Wissen gelten kann, stehen die Antworten auf viele Fragen noch aus.

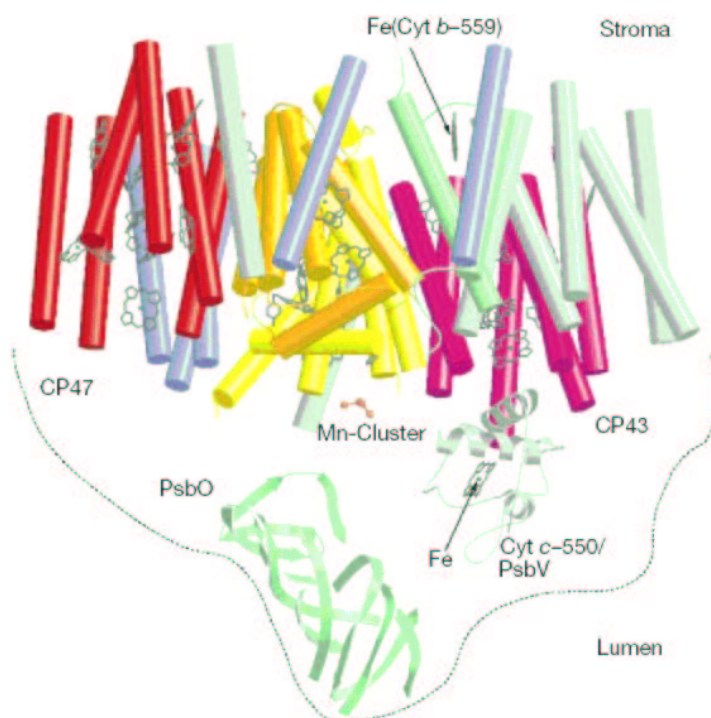


Abbildung 1.1: Strukturmodell des PSII mit der Zuordnung von Protein-Untereinheiten und Kofaktoren aus [Zouni et al., 2001]. Die Blickrichtung ist ungefähr parallel zur Membranebene. Die Chlorophyll-A-Kopfgruppen sowie die Häm-Gruppen sind als schwarze Linien eingezeichnet. Die Stäbe repräsentieren die Transmembran- α -Helizes der Untereinheiten D1 und D2 (gelb), CP47 und CP43 (rot und violett), weiterer kleiner Untereinheiten (blau) sowie sieben nicht zugeordnete α -Helizes. Weiterhin ist im unteren Teil eines der extrinsischen Polypeptide (PsbO) als β -Faltblatt (grün) sowie ein Helix-Modell des Cyt c-550 (grau) dargestellt. Weiterhin sind der Mangankomplex und die Eisen-Zentren markiert.

Photosynthese geht in höheren Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien vor sich. In der Thylakoidmembran befinden sich zwei verschiedene photosynthetische Proteinkomplexe, die sogenannten Photosysteme, deren Zusammenspiel die hocheffiziente Konversion von eingestrahltm Licht in biologisch nutzbare Energie ermöglicht. Während Photosystem I (PSI) für die Bildung des Reduktionsmittels NADH verantwortlich ist, schafft das Photosystem II (PSII) ein starkes Oxidationsmittel, das die Oxidation von Wasser zu molekularem Sauerstoff ermöglicht. Die beiden Photosysteme generieren ferner einen Protonengradienten über die Thylakoidmembran, der über einen weiteren membranständigen Proteinkomplex, die F_0 - F_1 -ATP-Synthase, zur ATP-Bildung genutzt wird.

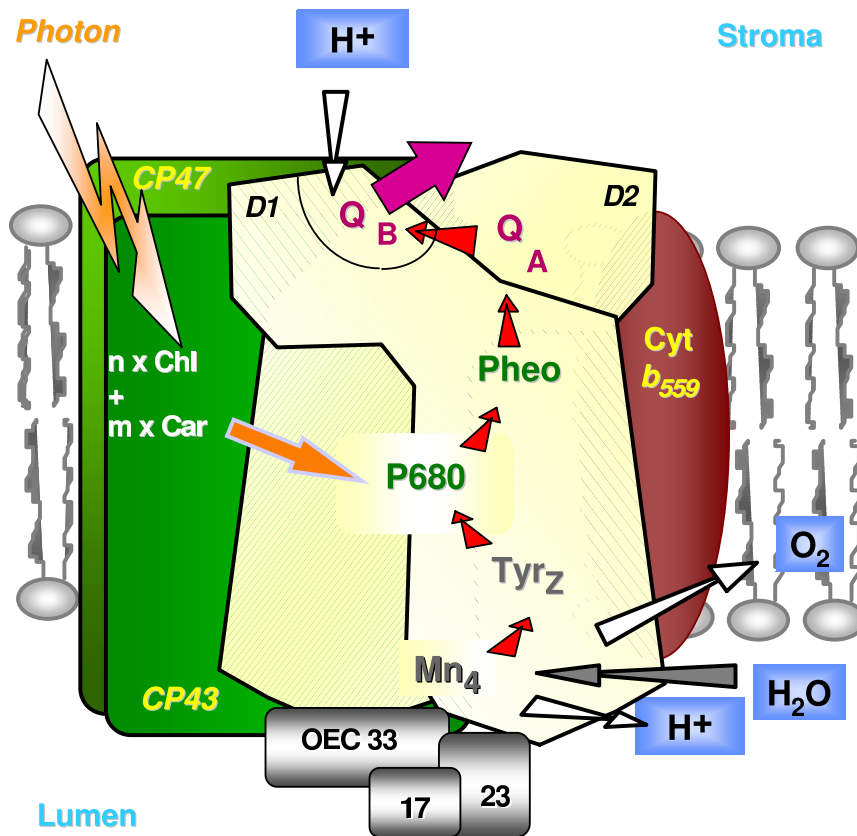


Abbildung 1.2: Schema des Elektronentransports im Kernbereich ("Core complex") des PSII. Schematisch dargestellt sind die Protein-Untereinheiten D1, D2 (gelb), CP43, CP47 (grün) sowie die extrinsischen Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 17, 23 und 33 kDa (grau) und der Cyt- b_{559} -Komplex (braun). Das als OEC 33 bezeichnete Polypeptid ist identisch mit PsbO aus Abb. 1.1. Die Lipid-Doppelschicht der Thylakoidmembran ist grau angedeutet. Entlang der Elektronentransportkette sind der Mangankomplex, das redoxaktive Tyrosin (Tyr_Z), der primäre Donor P680, das Pheophytin (Pheo), das gebundene Chinon (Q_A) sowie das mobile Chinon (Q_B) eingezeichnet. Das Innere der Thylakoide ist mit Lumen, das Äußere mit Stroma bezeichnet. Die Aufnahme bzw. Abgabe von Protonen sowie die Aufnahme von Wasser und die Freisetzung von molekularem Sauerstoff sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Photosystem II ist durch seine Fähigkeit, Wasser als Elektronenquelle zu nutzen und Sauerstoff zu bilden, ursächlich verantwortlich für den Sauerstoffanteil an der Atmosphäre und damit von grundlegender Bedeutung für alles höhere Leben auf der Erde. Im Zentrum dieses ca. 300 kDa großen Proteinkomplexes (Abb. 1.1) steht eine Elektronentransportkette, die durch die Triebkraft der absorbierten Photonen Elektronen vom Wasser zu einem Plastochinon (Q_B) transportiert (Abb. 1.2). In einem assoziierten Antennensystem aus ungefähr 200 Chlorophyllmolekülen (bei Pflanzen) wird ein Lichtquant absorbiert, und der angeregte Zustand wird zu einem speziellen Chlorophyllpaar (P680) geleitet, welches im angeregten Zustand P680* den Ausgangspunkt für eine Reihe schneller Elektronentransferprozesse mit dem Ziel der Ladungstrennung darstellt. Vom P680* erfolgt der Transfer des Elektrons zu einem Pheophytin (Pheo), von dort zu einem permanent gebundenen Chinon, dem Q_A in der D₂-Untereinheit des PSII, und weiter zu einem mobilen Chinon (Q_B) aus einem Chinonvorrat in der Thylakoidmembran (vgl. Abb. 1.1 und 1.2). Das Q_B bindet an einer Bindungsstelle der D₁-Untereinheit in oxidiertem Zustand (Plastochinon)

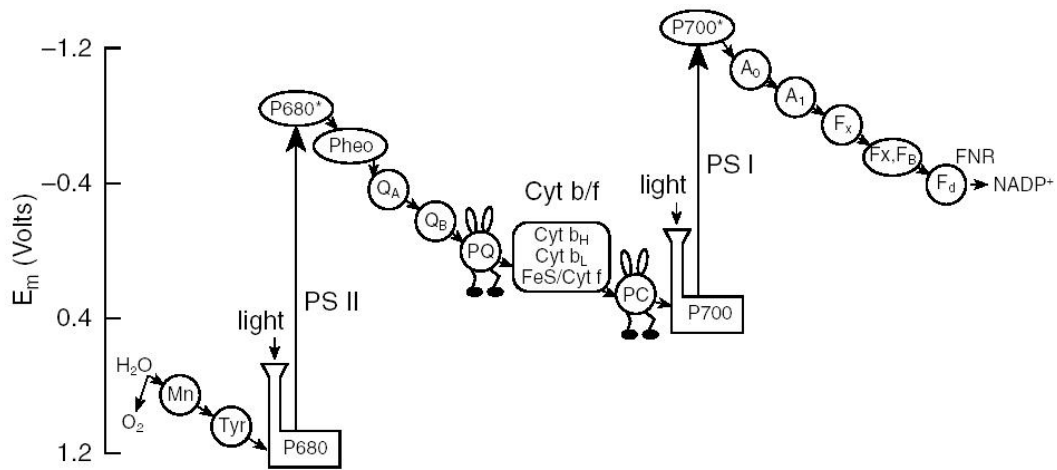


Abbildung 1.3: Z-Schema des Elektronentransports in der lichtgetriebenen Photosynthese aus [Govindjee, 1999]. In der zitierten Arbeit findet sich eine detaillierte Erläuterung der einzelnen Schritte des Elektronentransfers.

und durch die sequentielle Übernahme von zwei Elektronen vom Q_A und zweifache Protonierung wird es zu Plastohydrochinon reduziert, bevor es die Bindungstasche wieder verlässt. Während Abb. 1.1 eine Darstellung der Kristallstruktur enthält, gibt Abb. 1.2 den Gang des Elektronentransfers und die Lokalisation der Kofaktoren schematisch wieder. Die Redoxpotentiale für die wesentlichen Schritte des Elektronentransfers sind in Abb. 1.3 zusammengefasst.

Am anderen Ende der Elektronentransportkette liegt nach der primären Ladungstrennung der positiv geladene primäre Donor als $P680^+$ vor, der ein sehr starkes Oxidationsmittel darstellt und daher in der Lage ist, ein ca. 14 \AA entferntes redoxaktives Tyrosin (Tyr_Z) zu oxidieren. Dieses Tyr_Z geht dadurch seinerseits in Tyr_Z^\bullet über und wird bei einem Redoxpotential von $\sim 1 \text{ V}$ von einem Tetra-Mangan-Komplex rereduziert. Dieser Mangankomplex, auch als "Oxygen-evolving complex" (OEC), "Water-oxidizing complex" (WOC) oder Wasseroxidase bezeichnet, ist das katalytische Zentrum, an dem die in der Ladungstrennung extrahierten positiven Ladungen durch die Spaltung von Wasser gemäß $2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ neutralisiert und dem PSII Elektronen zugeführt werden (siehe Kap. 2). Untersuchungen zu strukturellen und elektronischen Änderungen des PSII-Mangankomplexes mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie stehen im Zentrum dieser Arbeit.

1.3 Röntgenabsorptionsmessungen an biologischen Proben

1.3.1 XAS-Spektroskopie

Der zentrale physikalische Prozess der Röntgenspektroskopie ist die Absorption eines Röntgenphotons durch die Anregung eines Elektrons aus der inneren Schale eines Atoms. Trägt man den Absorptionskoeffizienten gegen die Energie auf (Abb. 1.4 (a)) fallen drei wesentliche Merkmale auf: (1) Insgesamt nimmt die Stärke der Röntgenabsorption mit zunehmender Energie ab. (2) Bei bestimmten Energien treten scharfe Anstiege der Absorption auf, sogenannte Kanten. (3) Oberhalb der Kanten sind oszillatorische Modula-

tionen auf dem abfallenden Verlauf zu erkennen, die als Röntgenabsorptionsfeinstruktur bezeichnet werden. Die Merkmale (2) und (3) sind Gegenstand der Röntgenabsorptionsspektroskopie ("X-ray absorption spectroscopy", XAS). In der Praxis werden dabei zwei überlappende Energiebereiche unterschieden, die sich in ihrem Informationsgehalt ergänzen und in der Auswertung unterschiedlich behandelt werden müssen: Als erweiterte Röntgenabsorptionsfeinstruktur ("**E**xtended **X**-ray **A**bsorption **F**ine **S**tructure", EXAFS) wird die Oszillation des Absorptionskoeffizienten ab ca. 40 eV oberhalb der Absorptionskante bezeichnet. Mit dem Begriff Röntgenabsorptionskantennahstruktur ("**X**-ray **A**bsorption **N**ear **E**dge **S**tructure", XANES) ist der Verlauf des Absorptionskoeffizienten von den niedrigsten energetisch möglichen Übergängen an gemeint, der sich bis in den Beginn des EXAFS-Bereiches erstreckt. Der XANES-Bereich schließt dabei den sogenannten Vorkantenbereich ("**P**re-**E**dge **P**eak", PEP) ein, der durch das Auftreten von nach den Auswahlregeln für Dipolübergänge verbotenen Übergängen entsteht. Die häufig verwendete Bezeichnung Vorkanten-Peak ist darauf zurückzuführen, dass es durch Orbitalmischungseffekte zu einer drastischen Erhöhung der Absorption in diesem Vorkantenbereich kommen kann, was im Spektrum als deutlich abgegrenzte schmale Linie unterhalb der eigentlichen Absorptionskante erscheint.

Der Verlauf der EXAFS-Oszillationen enthält Informationen über die lokale Struktur sowie die elektronischen und vibratorischen Eigenschaften in der Umgebung des elementarspezifisch untersuchten Absorbers. Daher ist EXAFS eine weit verbreitete Methode in so verschiedenen Wissenschaftszweigen wie Biologie, Chemie, Geologie, Metallurgie und Materialwissenschaften. Die in dieser Arbeit besprochenen Experimente fallen, da sie an biologischen (oder biomimetischen) Proben gemessen wurden, in den Bereich der Röntgenabsorptionsspektroskopie an biologischen Materialien, kurz BioXAS, der in den nächsten Abschnitten eingehender erläutert wird.

Während der EXAFS-Bereich theoretisch gut verstanden ist und durch Kurvenanpassung mit Hilfe theoretisch berechneter Phasenfunktionen als Standardmethode eingesetzt werden kann, ist die XANES-Analyse wesentlich komplexer und theoretisch aufwändiger. Aus diesem Grund wurden bis vor nicht allzu langer Zeit Kantenspektren hauptsächlich empirisch im Vergleich mit Referenzmessungen diskutiert. Erst die Fortschritte der Rechnerleistung und die Entwicklung von entsprechenden Theorien und Algorithmen zur Kantenermittlung ermöglichten die Diskussion von XANES-Spektren anhand von *ab-initio* Simulationen.

Im folgenden sollen zunächst die theoretischen Grundlagen der EXAFS-Analyse dargestellt werden. Dann erfolgt die Beschreibung eines typischen BioXAS-Experiments, um anschließend die wesentlichsten Elemente der EXAFS-Auswertung mit Ausrichtung auf Experimente an biologischen Proben mit hohem Probendurchsatz zu besprechen.

1.3.2 Theorie der Röntgenabsorption

In der Röntgenabsorptionsspektroskopie wird die Stärke der Absorption in einem Medium als Funktion der Energie E der Röntgenphotonen gemessen. Der lineare Absorptionskoeffizient μ ist definiert als die relative Schwächung des Photonenflusses I_0 gemäß $\mu(E) = -\ln(I_{trans}/I_0)$. Durch den Absorptionsprozess wird ein Photoelektron erzeugt, dessen kinetische Energie der Differenz zwischen der Energie des Photons $E_{x-ray} = \hbar\omega$ und einer Nullpunktsenergie E_0 entspricht. E_0 ist die minimale, für die Anregung eines Elektrons aus einer inneren Schale notwendige Energie. Das EXAFS-Phänomen lässt sich als kurzreichweitige Streuung der sich ausbreitenden Photoelektronenwelle am Potential der Nachbaratome verstehen (siehe unten). Der Betrag des Wellenzahlvektors des Photo-

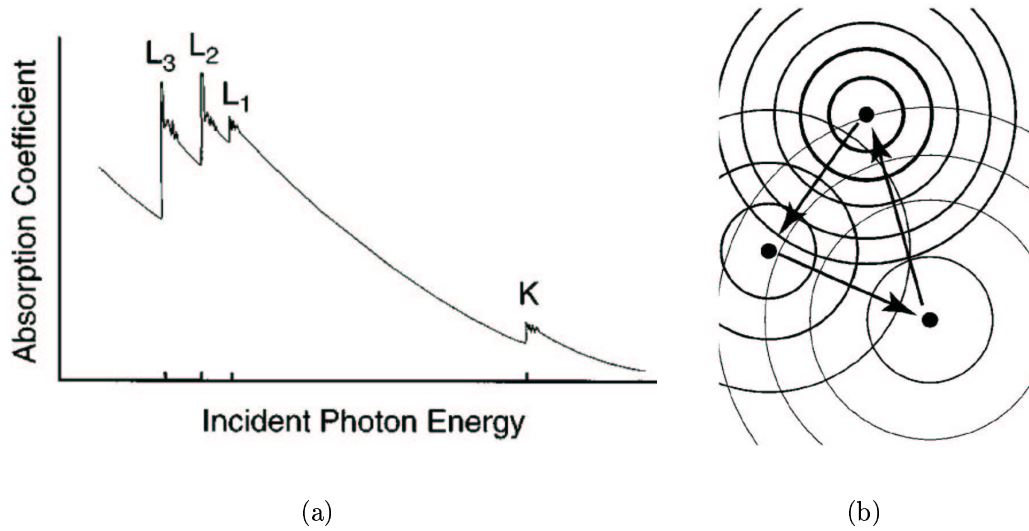


Abbildung 1.4: (a) Schematischer Verlauf des Röntgenabsorptionskoeffizienten als Funktion der Energie. Vier Absorptionskanten (K, L₁, L₂ und L₃; vgl. [Agarwal, 1979]) sind eingezeichnet. (b) Illustration der Mehrfachstreuung einer auslaufenden Photoelektronenwelle an den Potentialen der Nachbaratome (aus [Rehr und Albers, 2000]).

elektrons ist dabei gegeben durch

$$k = \sqrt{\frac{2m}{\hbar} (E - E_0)} \quad (1.1)$$

Durch die normierten Feinstruktur-Oszillationen $\chi(E)$ bzw. $\chi(k)$ lässt sich dann die Beziehung zu strukturellen Parametern herstellen. $\chi(k)$ wird definiert als

$$\chi(k) = \frac{\mu(k) - \mu_0(k)}{\mu_0(k)}, \quad (1.2)$$

worin μ_0 ein langsam-veränderlicher Hintergrund ist, der dem hypothetischen Verlauf der Absorption in Abwesenheit benachbarter Atome entspricht.

Die erste theoretische Beschreibung des EXAFS-Phänomens als Streuung der Photoelektronenwelle an punktförmigen Streuern erfolgte 1971 durch Sayers, Stern und Lytle [Sayers et al., 1971] und eine wichtige Weiterentwicklung durch die Verwendung des "Muffin-tin"-Konzeptes für die Potentiale der Atome 1975 durch Lee und Pendry [Lee und Pendry, 1975]. Eine umfassende Darstellung der geschichtlichen Entwicklung der EXAFS-Theorie ist u.a. in [Agarwal, 1979; Teo, 1986] und [Rehr und Albers, 2000] gegeben.

Die Absorption eines Röntgenphotons durch ein Atom ist ein quantenmechanisches Phänomen, dass im Rahmen zeitabhängiger Störungstheorie in physikalischen Lehrbüchern behandelt wird. Die Wahrscheinlichkeit für die Absorption eines Röntgenphotons wird durch Fermis Goldene Regel beschrieben, nach der für die Übergangswahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit P_{if} vom Ausgangszustand $|i\rangle$ in den Endzustand $|f\rangle$ hervorgerufen durch eine harmonische Störung $V(t) = \bar{V}e^{-i\omega t}$ gilt [Messiah, 1977]:

$$P_{if} = \frac{2\pi}{\hbar} |\langle f | \bar{V} | i \rangle|^2 \rho_f(E) \quad (1.3)$$

$\rho_f(E)$ ist die Dichte der Zustände im Endzustand des Systems. Störungsrechnung in Dipolnäherung für eine ebene linear polarisierte elektromagnetische Welle, deren Polarisationsrichtung in Richtung des Einheitsvektors $\vec{\epsilon}$ weist, führt in Ortsdarstellung auf den Ausdruck [Agarwal, 1979; Stöhr, 1992; Rehr und Albers, 2000]

$$\mu(\vec{\epsilon}) \sim |\langle \psi_i | \vec{\epsilon} \cdot \vec{r} | \psi_f \rangle|^2 \delta(E_f - E_i - \hbar\omega). \quad (1.4)$$

Hier ist \vec{r} der Ortsvektor. $|\psi_i\rangle$ und $|\psi_f\rangle$ sind effektive Ein-Elektron-Eigenzustände des Systems mit der Energie E_i bzw. E_f vor und nach der Absorption des Photons mit der Energie $\hbar\omega$. Im Fall der Absorption durch ein Elektron der K-Schale ist die Ausgangswellenfunktion $|\psi_i\rangle$ die des 1s-Elektrons. $|\psi_f\rangle$ ist die Überlagerung der ausgehenden Welle mit Beiträgen aufgrund von Rückstreuung an den Potentialen der Nachbaratome. Die entstehenden Oszillationen stellen also einen quantenmechanischen Interferenzeffekt zwischen der auslaufenden Photoelektronenwelle und den Rückstreuwellen dar.

Im Fall der Einfachstreuung ("Single scattering") wird nur die Überlagerung der auslaufenden Welle mit den an jeweils einem anderen Potential gestreuten Wellen betrachtet. Im Rahmen der Theorie der Mehrfachstreuung ("Multiple scattering") wird darüber hinaus berücksichtigt, dass das Photoelektron eine Vielzahl sukzessiver Streuprozesse durchlaufen kann, wie es in Abb. 1.4 illustriert ist. Die Pfeilrichtung beschreibt die durch Absorption entstandene auslaufende Photoelektronenwelle, die zunächst im linken unteren Potential gestreut wird. Die so entstandene Streuwelle wird an einem zweiten Atom (unten rechts) gestreut, bevor sie sich als Beitrag von Zweifachstreuung am Ort des Absorbers mit der Ausgangswelle überlagert.

Das Hauptproblem bei der theoretischen Beschreibung der EXAFS-Oszillationen ist die korrekte Beschreibung des Endzustandes $|\psi_f\rangle$. Die Lösung des Problems gelang durch die ursprünglich von [Sayers et al., 1971] hergeleitete Beziehung für Einfachstreuung, die EXAFS als kurzreichweitiges Streuphänomen beschreibt.

$$\chi(k) = \sum_i \frac{N_i}{kR_i^2} S_0^2 e^{-2\sigma_i^2 k^2} e^{-\frac{2R_i}{\lambda(k)}} f_i(k) \sin(2kR_i + \Phi_i(k) + 2\delta^{(c)}(k)) \quad (1.5)$$

Dieser Ausdruck ist der Kern der EXAFS-Auswertung, und er beinhaltet in sehr übersichtlicher Form alle Größen, die zur Beschreibung der EXAFS-Oszillationen in Abhängigkeit von der Wellenzahl des Photoelektrons notwendig sind. Hier bedeuten N_i die Anzahl der Rückstreuer eines Typs bei einer Distanz R_i mit einer Distanzinhomogenität σ_i (Debye-Waller-Faktor); f_i ist der Betrag der Rückstreuamplitude, Φ_i ist die Phasenverschiebung entlang des i-ten Streupfades, $\delta^{(c)}$ ist die Phasenverschiebung im Potential des Absorbers, λ die mittlere freie Weglänge des Photoelektrons und S_0^2 ist der sogenannte Amplitudenreduktionsfaktor, der den Einfluss von Mehrelektronenanregungen berücksichtigt.

Nach der ersten Aufstellung von Gl. 1.5 wurden etliche Erweiterungen eingeführt, die sich als Modifikation bei der Berechnung einzelner Terme betrachten lassen. So wurde die komplexe Rückstreuamplitude ursprünglich in der sogenannten "Small-atom-approximation" beschrieben. Diese beinhaltet, dass die auslaufende Welle als sphärisch angenommen wird, während die durch Streuung an den Nachbaratomen entstehenden Wellen als eben angenommen werden. [Rehr et al., 1991] haben diese Theorie ausgebaut, indem sie die komplexe Rückstreuamplitude f_i , die sich aus dem Betrag f_i und den Phasenverschiebungen in den Potentialen von Absorber ($\delta^{(c)}$) und Streuern (Φ_i) zusammensetzt, durch eine effektive Rückstreuamplitude entlang eines bestimmten Streupfades ersetzen. Dieses sogenannte $f_i^{(eff)}$ berücksichtigt die sphärische Ausbreitung der gestreuten Wellen. Darüberhinaus wird die mittlere freie Weglänge λ_i (endliche Lebensdauer des Photoelektrons

und des Lochzustandes der inneren Schale) durch einen Imaginärteil am Potential erfasst. Weitere Verbesserungen betrafen die Berechnung der Streupotentiale, wo die zunächst verwendeten "Muffin-tin"-Potentiale entsprechend [Mattheiss, 1964] durch selbstkonsistente "Muffin-tin"-Potentiale ersetzt wurden [Ankudinov et al., 1998]. Diese Erweiterung ist vor allem für die Genauigkeit bei niedrigen Energien (XANES) von Bedeutung, nicht jedoch im EXAFS. Für die Berechnung des Amplitudenreduktionsfaktors gibt es zwar ebenfalls theoretische Modelle, in der Praxis wird der Wert für S_0^2 jedoch meist durch Vergleich mit gemessenen Spektren bestimmt.

In den Berechnungen wird EXAFS üblicherweise in Form einer Reihenentwicklung in der Anzahl der Streueignisse pro Pfad behandelt, die bei hohen k -Werten nach wenigen Termen konvergiert, was bedeutet, dass Vielfachstreuung hoher Ordnung im EXAFS-Bereich vernachlässigbar ist. Bei niedrigen Energien ist dies nicht der Fall, und die Reihenentwicklung wird hier durch eine implizite Summation über alle möglichen Streupfade ersetzt. Man spricht in diesem Fall von "Full multiple scattering"- oder kurz FMS-Berechnungen, die ausschließlich für den XANES-Bereich zur Anwendung kommen.

Thermische Bewegung sowie statische Unordnung der streuenden Nachbaratome führen zur Dämpfung der EXAFS-Oszillationen bei hohen k -Werten. Der Beschreibung dieser Unordnung durch einen Debye-Waller-Faktor, liegt die Annahme zugrunde, dass die Streuzentren Gauß-förmig um einen mittleren Abstand \bar{R}_i mit einer mittleren Auslenkung σ_i verteilt sind:

$$P(R_i) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_i^2}} \exp\left(-\frac{(R_i - \bar{R}_i)^2}{2\sigma_i^2}\right) \quad (1.6)$$

Mit $P(R_i)$ wird die Wahrscheinlichkeit dafür bezeichnet, dass ein Streuer sich in einem Abstand R_i vom Absorber befindet. Aus der exponentiellen Dämpfung der Feinstruktur mit zunehmenden Werten von k entsprechend $\exp(-k^2\sigma^2)$ wird offensichtlich, dass der Energiebereich, der für die Auswertung in Frage kommt, begrenzt ist.

Aus der $1/R^2$ Abhängigkeit in Gl. 1.5 geht hingegen hervor, dass EXAFS intrinsisch, also auch ohne die Dämpfung durch die freie Weglänge λ , eine kurzreichweitige Methode ist. Je weiter ein Streuer vom Absorber entfernt ist, desto geringer ist sein Einfluss auf die Modulation der Röntgenabsorption. Die Anzahl der Rückstreuer N_i , ihre Entfernung vom Absorber R_i und ihre mittlere Auslenkung σ_i sind Parameter, die mittels Kurvenanpassung aus dem Experiment abgeleitet werden können, während die komplexen Rückstreuamplituden ($f_i, \Phi_i, \delta^{(c)}$) in der Regel vor einer Kurvenanpassung berechnet oder aber empirisch bestimmt werden.

In der soweit diskutierten Theorie der Röntgenabsorption wurde von isotropen Proben bzw. unpolarisierten Röntgenstrahlen ausgegangen. Durch polarisationsabhängige Messungen können jedoch weitere Strukturinformationen zugänglich gemacht werden. Für den Fall von Einfachstreuung an partiell vektoriell orientierten Proben wurde in [Dittmer und Dau, 1998] eine Theorie des linearen Dichroismus der EXAFS-Oszillationen entwickelt. Dort wird für die Abhängigkeit der EXAFS-Oszillationen $\chi(k)$ vom Winkel zwischen der Vorzugsrichtung im makroskopischen System der Probe und dem elektrischen Feldvektor des Röntgenstrahles Θ_E folgende Beziehung hergeleitet

$$\chi(k, \Theta_E) = \frac{1}{3} (\chi^c(k) + 2\chi^s(k)) + \frac{1}{2} (3\cos^2\Theta_E - 1) I_{ord} (\chi^c(k) - 2\chi^s(k)) (3\cos^2\Theta_R - 1) \quad (1.7)$$

Hierbei ist Θ_R der Winkel zwischen dem Absorber-Rückstreuer-Vektor R_{ab} und der Vorzugsrichtung der mikroskopischen Probe (beispielsweise Membrannormale). χ^c und χ^s sind die Funktionen der EXAFS-Oszillationen für Absorption bei bezüglich R_{ab} paralleler

bzw. senkrechter Polarisationsrichtung. Der Term I_{ord} erfasst die partielle Orientierung der Proben und variiert zwischen $I_{ord} = 0$ (isotrope Probe) und $I_{ord} = 1$ (perfekte Orientierung). Durch diese Methode wurde es möglich, die räumliche Orientierung einzelner Absorber-Rückstreuer-Vektoren aus einem Satz polarisationsabhängiger Daten zu ermitteln. Dieser hier nur skizzierte Ansatz wird in Kap. 8 aufgegriffen und auf den Fall von Mehrfachstreuung beliebig hoher Ordnung erweitert. Dort finden sich auch eine detailliertere Darstellung sowie Illustrationen zur Gl. 1.7.

1.3.3 Experiment

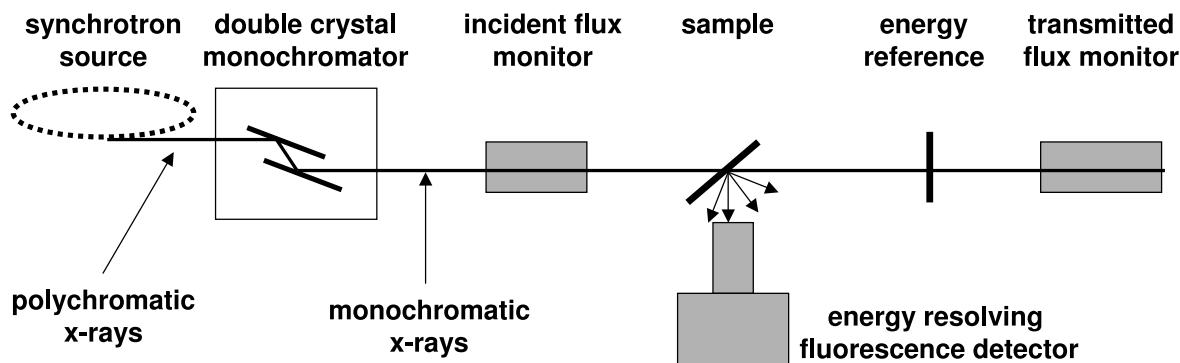


Abbildung 1.5: Schema eines Synchrotronmessplatzes für Röntgenabsorptionsmessungen. Die polychromatische Synchrotronstrahlung wird mittels eines Doppelkristalls monochromatisiert. Durch eine Ionisationskammer wird unmittelbar vor der Probe die Intensität der einfallenden Strahlung I_0 gemessen. Für hochverdünnte biologische Proben wird die Röntgenabsorption im Fluoreszenz-Modus mittels eines energieauflösenden Detektors registriert. Durch einen sogenannten Standard (stärker absorbierende Probe mit bekanntem strukturreichem Spektrum), der sich zwischen der Probe und einer zweiten Ionisationskammer befindet, die die transmittierte Strahlung misst, erhält man eine Energiereferenz zur Kalibration der Daten.

BioXAS-Untersuchungen werden hauptsächlich an den K-Kanten von Übergangsmetallen durchgeführt [Yachandra, 1995; George et al., 1998; Scott, 2000; Dau und Haumann, 2003] oder, seltener, an der K-Kante von Substratomen [Dau et al., 1999; Peariso et al., 2001; Anxolabehere-Mallart et al., 2001; Dey et al., 2004]. Durch die Wahl einer speziellen K-Kante ermöglicht die BioXAS-Methode die element-spezifische Untersuchung der absorbierenden Spezies und ihrer nächsten Umgebung. Da Messungen an biologischen Proben bei niedrigen Röntgenenergien mit kaum lösbaren Problemen verbunden sind (Vakuum im Probenraum, geringe Eindringtiefe), existieren nur wenige Publikationen zu Messungen an L-Kanten in biologischen Proben [George et al., 1990; van Elp et al., 1995; Grush et al., 1996; Wang et al., 1997; Wasinger et al., 2003]. Wenn es jedoch gelingt, die experimentellen Schwierigkeiten zu überwinden, lassen sich durch L-Kanten-Spektroskopie Informationen über die elektronische Struktur der absorbierenden Spezies gewinnen, die jene der K-Kanten ergänzen und erweitern. L-Kanten erlauben aufgrund der Auswahlregeln für Dipolübergänge direkte Rückschlüsse auf die Struktur und Besetzung der s - und vor allem der d -Orbitale. An den biologisch wichtigen Übergangsmetallen sind das gerade die d - also Valenzschale und deren Besetzung, die von besonderem Interesse sind. Generell erlaubt BioXAS die Untersuchung protein-gebundener Metallzentren aller Art unabhängig vom Oxidationszustand sowohl

an Lösungen als auch an partiell oder vollständig geordneten Proben (z.B. "gestapelte" Membranproteine). Seit neuerem sind auch BioXAS-Messungen bei Raumtemperatur unter quasi-physiologischen Bedingungen möglich [Meinke et al., 2000; Haumann et al., 2002b].

Das Verhältnis der Anzahl der Hintergrund-Atome (Protein und Lösemittel) zur Anzahl der zu untersuchenden Atome beträgt üblicherweise 10 000 - 100 000, woraus sich erhebliche Anforderungen an Technik und Aufbau des Experiments ergeben [Ascone et al., 2003]. So werden in den meisten Aufbauten energieauflösende Detektoren zur Messung von Röntgenfluoreszenz-Anregungsspektren genutzt, da dieser Detektionsmodus das Problem der Untergrund-Absorption umgeht bzw. auf das Problem der Unterdrückung von 90°-Streustrahlung reduziert. Die Aufnahme eines Spektrums dauert an einem Ablenkamagneten-Messplatz etwa 30-60 Minuten, insgesamt sind typischerweise 6-24 Stunden für ein "gutes", d.h. rauscharmes, Spektrum erforderlich. Die Nutzung moderner Undulatoren kann den Zeitaufwand für einen einzelnen Scan auf unter 10 s reduzieren, sodass ein komplettes Spektrum in weniger als 20 Minuten zu messen ist. Die Weiterentwicklung der Synchrotronstrahlungsquellen eröffnet somit neue Perspektiven, sowohl was die Anzahl möglicher Messungen angeht als auch im Hinblick auf zeitaufgelöste Messungen.

Das Schema eines typischen EXAFS-Experimentes an biologischen Proben ist in Abb. 1.5 dargestellt. Aus der polychromatischen Strahlung einer Synchrotronquelle wird durch einen Doppelkristallmonochromator Strahlung einheitlicher Wellenlänge selektiert. Der Funktion der Monochromatoren liegt die Bragg-Bedingung $2d \sin \theta = n\lambda$ zugrunde. θ ist dabei der Winkel zwischen dem einfallenden Strahl und der reflektierenden Gitter-Ebene des Kristalls, d der Ebenenabstand, λ die Wellenlänge der reflektierten Strahlung und n die Ordnung der Reflexion. Die Details der Umsetzung sind dabei für die verschiedenen in dieser Arbeit benutzten Messplätze unterschiedlich. Das D2-Strahlrohr des EMBL am DESY (HASYLAB, Hamburg) verwendet einen Si(1,1,1)-Kristall während am ID26-Messplatz des ESRF in Grenoble mit einem Si(2,2,0)-Kristall gearbeitet wird. Durch vorsätzliche Dejustierung der Monochromatorkristalle (auf z.B. 70 % der maximal reflektierten Intensität) lassen sich unerwünschte Reflexionen höherer Ordnung ($n > 1$) unterdrücken, was anhand der in der ersten Ionisationskammer gemessenen Intensität (I_0) durch ein Regelsystem automatisch erfolgt.

Für stark verdünnte Proben wird statt der Röntgenabsorption die Fluoreszenzanregung gemessen, die der Absorption proportional ist. Durch Detektion unter einem Winkel von 90° zum Röntgenstrahl und parallel zum E-Feld-Vektor der Röntgenstrahlung wird die Streustrahlung minimiert. Der Einsatz energieauflösender Detektoren ermöglicht darüberhinaus die Selektion eines speziellen Energiebereichs der detektierten Röntgenstrahlung, beispielsweise des Bereiches der Mn-K $_{\alpha}$ -Fluoreszenz ($E(K_{\alpha 1}) = 5899$ eV, $E(K_{\alpha 2}) = 5888$ eV). Die so gemessenen Spektren sind weitgehend frei von Streubeiträgen, da diese bei der Anregungsenergie auftreten und effizient unterdrückt werden.

In der Praxis ist die Energiekalibrierung durch die Bragg-Bedingung oft nicht genau genug, um kleine oxidationszustandsbedingte Änderungen der Absorptionskanten (Grö-

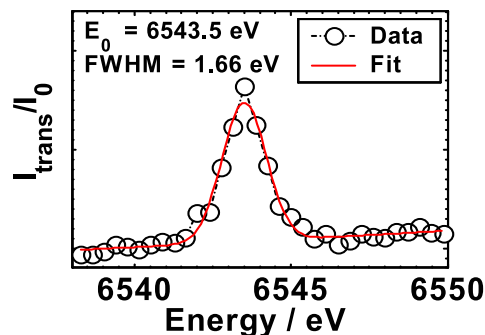


Abbildung 1.6: Kalibrierung auf den Vorkantenpeak eines simultan gemessenen KMnO_4 -Spektrums

ßenordnung 0.5 eV) zu messen. Daher wird die Energiekalibrierung durch Messung einer Referenzprobe vorgenommen. Zwischen die Probe und eine zweite Ionisationskammer wird dabei eine sogenannte Standard-Probe gebracht, deren Spektrum bekannt ist. Anhand der Energie bekannter spektraler Merkmale dieser Standard-Probe, kann dann die Energieachse für die eigentliche Messung kalibriert werden. Kaliumpermanganat eignet sich für die Kalibration von Manganspektren besonders gut, denn das KMnO_4 -Spektrum (vgl. Abb. 6.3) weist unterhalb der eigentlichen Absorptionskante einen prominenten schmalen Vorkanten-Peak auf, dessen Position bei 6543.3 eV liegt. Durch Anpassung einer Gauß-Kurve an diesen Peak (Abb. 1.6) kann die Energieachse mit einer Genauigkeit von etwa 0.1 eV kalibriert werden.

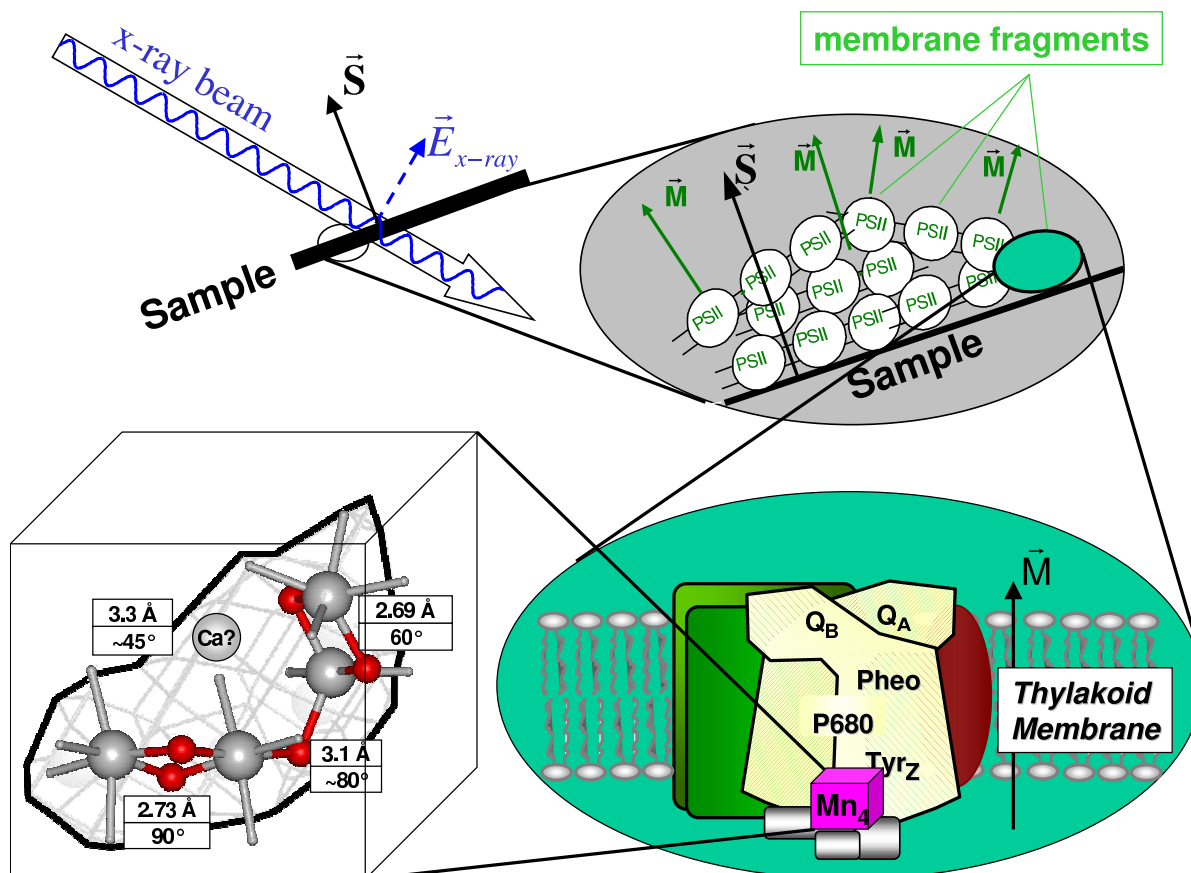


Abbildung 1.7: Schema eines polarisationsabhängigen XAS-Experiments an partiell orientierten Proben. Durch Variation des Winkels $\Theta_E = \angle(\vec{S}, \vec{E})$ werden Winkel zwischen der Membrannormalen \vec{N} und EXAFS-Rückstreuvektoren \vec{R} zugänglich gemacht. Die Teilabbildungen zeigen die makroskopische Orientierung der Probe im Röntgenstrahl (oben links), die partiell orientierten Membranstapel (oben rechts), die Lage des PSII mit einigen Kofaktoren in der Thylakoid-Membran (unten rechts) sowie ein Modell des Mangankomplexes mit EXAFS-bestimmten Distanzen und zugehörigen Winkeln vor dem Hintergrund des dem Mangankomplex zugeordneten Teils der Elektronendichte aus [Zouni et al., 2001].

Soweit wurde der allgemeine Fall von Absorptionsmessungen an isotropen Medien besprochen, aus denen sich die eindimensionale, radiale Verteilung der Rückstreuer im Bezug auf ein absorbierendes Atom bestimmen lässt. Für den Fall, dass die Proben - wie in Kristallen oder partiell orientierten Membranfragmenten - eine Orientierung aufweisen, kann unter Ausnutzung linear polarisierter Synchrotronstrahlung durch Variation des Winkels

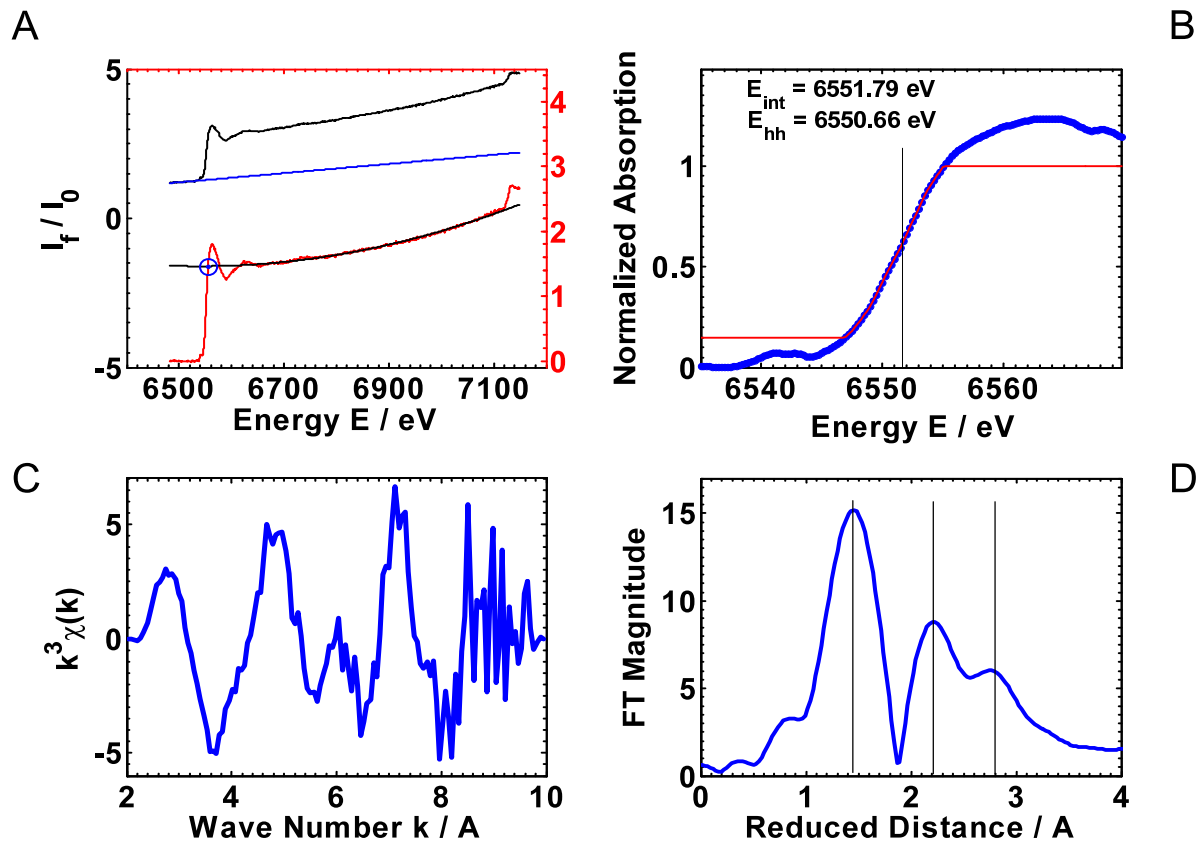


Abbildung 1.8: Schritte der XAS-Datenanalyse. (A) Untergrundsubtraktion und Normierung: gemessene Fluoreszenz-Intensität (obere schwarze Linie), lineare Anpassung im Vorkantenbereich (blaue Linie), Rohspektrum (rote Linie), Normierung durch Polynom 2. Grades (untere schwarze Linie) (B) Kantenpositionsbestimmung mit der Integralmethode; Datenpunkte (blau) und die Hilfsfunktion $\tilde{\mu}(E)$ zur Bestimmung der Kantenposition (rote Linie) (C) Extraktion der EXAFS-Oszillationen ($k^3\chi(k)$); (D) Fourier-Transformation. Nähere Erläuterungen zu den einzelnen Schritten finden sich im Text. Exemplarisch ist hier die Datenanalyse an einem typischen Raumtemperatur-Spektrum demonstriert, das noch signifikante Rauschbeiträge enthält und daher nur bis $k=10 \text{ \AA}^{-1}$ dargestellt ist. Der nutzbare k -Bereich reicht üblicherweise bis zur Eisen-K-Kante ($\sim 7100 \text{ eV}$, $\sim 12 \text{ \AA}^{-1}$). Durch Summation einer Vielzahl solcher Spektren wurden die in Kap. 4 diskutierten Datensätze gewonnen. Die Darstellung demonstriert weiterhin die graphische Ausgabe der in Anhang A.1 dokumentierten Programme zur primären Datenanalyse.

zwischen dem elektrischen Feldvektor des Röntgenstrahles und der Orientierungsrichtung der Probe zusätzliche Strukturinformation zugänglich gemacht werden. Eine ausführliche Besprechung dieser als Linear-Dichroismus-Röntgenspektroskopie (LD-XAS) bezeichneten Methode erfolgt in Kapitel 8. In Abb. 1.7 ist der prinzipielle Aufbau einer solchen polarisationsabhängigen Messung an PSII-angereicherten Membranstapeln dargestellt. Die EXAFS-Ergebnisse solcher Messungen sind beispielsweise in [Schiller et al., 1998; Dau und Haumann, 2003] nachzulesen und entsprechende Absorptionskanten werden in Abb. 8.4 gezeigt.

1.3.4 Datenanalyse

Die Auswertungsschritte, in denen aus den experimentell gemessenen Spektren strukturelle und elektronische Informationen gewonnen werden, sind in Abb. 1.8 an einem Beispiel veranschaulicht. Alle Schritte werden von einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Programm-Paket zur primären Datenanalyse ausgeführt, das in Anhang A.1 dokumentiert ist. Abb. 1.8 illustriert gleichzeitig die graphische Ausgabe von `exafs_analysis_03.m`

1. **Summation I:** Bei der Benutzung eines Mehr-Element-Detektors werden zunächst die Spektren der einzelnen Detektorelemente inspiziert und selektiert. Die registrierten Pulse aller störungsfreien Elemente werden anschließend aufsummiert. Bei Messungen mit einer Photodiode oder Einzelelement-Detektoren entfällt dieser Punkt.
2. **Energiekalibration:** Durch die Bestimmung der Energie eines genau erfassbaren spektralen Merkmals des simultan gemessenen Standardspektrums wird die absolute Energieachse kalibriert. In Absorptionsexperimenten an der Mangankante wurde hierzu durch Anpassung einer Gauß-Funktion an den KMnO_4 -Vorkanten-Peak dessen Position bestimmt (Abb. 1.6). Die erreichbare Genauigkeit dieser Methode beträgt bis zu 0.01 eV [Dittmer, 1999], wenn die Anzahl der Datenpunkte auf der Energieachse groß genug ist. Für die Raumtemperatur-Experimente, in denen in 10 s ein komplettes EXAFS-Spektrum aufgenommen wurde, war dieser Wert nicht immer erreichbar. Ein Genauigkeit von 0.1 eV wurde jedoch auch hier nie unterschritten.
3. **Linearisierung der Energieachse:** Durch Interpolation auf eine sehr dichte temporäre Energieachse und anschließende Bildung eines laufenden Mittelwerts werden alle Spektren auf eine einheitliche Energieachse transformiert.
4. **Summation II:** Alle Einzelspektren werden zu einem Datensatz aufsummiert. Für die Raumtemperaturdaten aus Kap. 4 waren dies 30 bis 100 Einzelspektren. Hierbei wurde eine Gewichtung der einzelnen Spektren vorgenommen ($w = I_c / (I_c + I_{bg})$, I_c - Signal des Kantensprungs, I_{bg} - Signalintensität des Untergrundes bei der Energie der Kante). Zur Durchführung dieser Gewichtung mussten zuvor die folgenden beiden Auswertungsschritte für jedes Einzelspektrum erfolgen.
5. **Subtraktion des Untergrundes (Streustrahlung):** Von der auf das Eingangssignal I_0 bezogenen Fluoreszenz-detektierten Absorption I_f (Abb. 1.8 A, obere schwarze Linie) wird zunächst ein Untergrund abgezogen, der durch einen linearen oder exponentiellen Fit an den Vorkantenbereich bestimmt wird (blaue Linie). Dieser Untergrund kann wahlweise linear (für Messungen mit Photodioden) oder flach exponentiell abfallend bzw. konstant (für Messungen mit energieauflösenden Detektoren) gewählt werden. Das so erzeugte Signal wird im folgenden als μ_{raw} bezeichnet ($\mu_{raw} \sim I_f / I_0$).
6. **Normierung:** Das Absorptionssignal μ_{raw} (Abb. 1.8 A, rote Linie) wird auf einen hypothetischen nur langsam veränderlichen atomaren Hintergrund μ_0 normiert [Teo, 1986; Rehr und Albers, 2000]. Für die Normierung erfolgt die μ_0 -Bestimmung durch die Anpassung eines Polynoms niedriger Ordnung ($\mu_0^{(norm)}$, Abb. 1.8 A untere schwarze Linie)
7. **Bestimmung der Kantenposition:** Aus dem normierten Röntgenabsorptionssignal können Parameter wie die Kantenenergie, die repräsentativ für den Oxidationszustand des Absorbers ist, berechnet werden. Darüber hinaus gewährleistet die

Bestimmung der Kantenposition für jedes Einzelspektrum, dass das Auftreten von Photoreduktion der Probe kontrolliert werden kann. Häufig wird dazu die Methode der halben Kantenhöhe verwendet, die den Energiewert bestimmt, bei dem die normierte Absorption genau 0.5 beträgt. Dieses Verfahren ist intrinsisch anfällig gegen stark strukturierte Kantenverläufe und Spektren, die nicht vollständig rauschfrei sind. Ähnlich verhält es sich mit der sogenannten Wendepunktmethode ("Inflection-point method"), in welcher der erste Nulldurchgang der zweiten Ableitung des Kantenverlaufs als Kantenposition definiert wird. Wie in [Dau et al., 2003] gezeigt wird, hängt das Ergebnis stark vom Maß der Daten-Glättung, die vor der Differentiation vorgenommen wird, ab. Außerdem ist diese Methode prinzipiell ungeeignet für Systeme, in denen mehrere nicht-identische Absorbertypen vorliegen, wie es beispielsweise in gemischtvalenten Systemen der Fall ist. In [Dittmer et al., 1998] wurde als Alternative die sogenannte Integralmethode vorgeschlagen, die auf der Berechnung der Schwerpunktes des Kantenverlaufs beruht. Wenn die Kantenenergie als

$$E^{edge} = \frac{1}{\mu_2 - \mu_1} \int_{\mu_1}^{\mu_2} E(\mu) d\mu \quad (1.8)$$

definiert wird, so kann unter der Annahme eines monotonen Kantenverlaufs derselbe Wert aus der inversen Funktion $\mu(E)$ berechnet werden

$$E^{edge} = E(\mu_1) + \frac{1}{\mu_2 - \mu_1} \int_{E(\mu_1)}^{E(\mu_2)} (\mu_2 - \mu(E)) dE \quad (1.9)$$

Für experimentelle, aufgrund von Rauschbeiträgen nicht immer monotone Spektren, für die die Integrationsgrenzen der inversen Funktion nicht eindeutig definiert sind, wird für die numerische Integration eine Hilfsfunktion $\tilde{\mu}(E)$ definiert als

$$\tilde{\mu}(E) = \begin{cases} \mu_1 & \text{wenn } \mu(E) < \mu_1 \\ \mu_2 & \text{wenn } \mu(E) > \mu_2 \\ \mu(E) & \text{sonst} \end{cases} \quad (1.10)$$

Die resultierende Kantenenergie E^{edge} hängt im allgemeinen nicht von den Energie-Intervallgrenzen ab, wohl aber von der Wahl der Parameter μ_1 und μ_2 , für die die Werte $\mu_1 = 0.15$ und $\mu_2 = 1$ gute Ergebnisse liefern [Dau et al., 2003]. Abb. 1.8 (B) veranschaulicht diese Methode an einem Beispiel.

8. **Extraktion der EXAFS-Oszillationen:** Die Extraktion der EXAFS-Oszillationen $\chi(E)$ (Abb. 1.8 (C)) erfolgt üblicherweise durch Anpassung eines Splines zur Beschreibung des atomaren Hintergrundes $\mu_0^{(bg)}$ und anschließende Division gemäß

$$\mu = \mu_0(1 + \chi) \quad (1.11)$$

bzw.

$$\chi = \frac{\mu}{\mu_0^{(bg)}} - 1 \quad (1.12)$$

Dabei erfolgt die Umrechnung der Energie des absorbierten Röntgenphotons E in den Betrag des Wellenzahlvektors k des Photoelektrons gemäß Gl. 1.1. Um die im Debye-Waller-Faktor beschriebene Dämpfung der Oszillationen $\chi(k)$ bei hohen Wellenzahlen auszugleichen, ist es üblich, die EXAFS-Spektren zu gewichten. Eine annähernd gleiche Amplitude der EXAFS-Oszillationen bei kleinen und großen Wellenzahlen wird durch die Gewichtung $\chi_w(k) = \chi(k) \times k^3$ erreicht. An dieser Stelle wird

offensichtlich, weshalb ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis im hochenergetischen Teil des Spektrums erforderlich ist: bei der Gewichtung der stark gedämpften Oszillationen werden kleine Rauschbeiträge bei hohen k -Werten immens verstärkt.

9. **Fourier-Transformation:** Durch Fourier-Transformation des EXAFS-Spektrum $\chi(k)$ lässt sich die Struktur der EXAFS-Oszillationen visualisieren, weshalb Ergebnisse oft nicht nur anhand der Tabellen mit den Fit-Parametern diskutiert werden, sondern auch anhand der Amplitude der Fourier-Transformierten. Abb. 1.8 zeigt die Fourier-Transformierte eines bei Raumtemperatur gemessenen PSII-Spektrums, in dem mehrere Peaks deutlich zu erkennen sind. Berücksichtigt man, dass die wellenzahlabhängige Phasenverschiebung nicht in die Fourier-Transformation eingeht und zwischen der wirklichen Distanz R_i einerseits sowie der reduzierten Distanz R_{FT} andererseits eine Verschiebung von $\sim 0.5 \text{ \AA}$ bewirkt, so kann man in Abb. 1.8 (D) drei Schalen von Rückstreuern bei ca. 1.9 \AA , 2.7 \AA und 3.3 \AA erkennen, wie sie für PSII-Spektren typisch sind. Um die Auswirkungen der endlichen Wellenzuglänge in der Fourier-Transformation ("Side-loop"-Effekte) zu reduzieren, wird die Funktion $\chi(k)$ vor der Transformation mit einer Fensterfunktion multipliziert. Eine Vielzahl solcher Funktionen ist aus der Signaltheorie bekannt, hier wird ein fraktionales \cos^2 -Fenster verwendet. Das bedeutet, dass die Endbereiche der EXAFS-Funktion bei niedrigen und bei hohen k -Werten (typisch sind 10 % des k -Bereiches) vor der Fourier-Transformation mit einer \cos^2 -Funktion multipliziert werden.
10. **EXAFS-Simulation:** Die eigentliche EXAFS-Analyse erfolgt durch Kurvenanpassung anhand von Gl. 1.5. In der vorliegenden Arbeit wurden die EXAFS-Simulationen mit dem Programm SimX [Dittmer, 1999] durchgeführt, das die numerisch berechneten komplexen Rückstreuamplituden des FEFF-Programms (University of Washington, Seattle, [Mustre de Leon et al., 1991]) verwendet. Diese Rückstreuamplituden werden vor der Simulation anhand von Modellstrukturen berechnet und im Verlauf der Kurvenanpassung nicht verändert. Das bedeutet einerseits, dass das Modell zur Berechnung der Phasenfunktionen hinreichend nah an den realen Verhältnissen sein muss. Andererseits ist aber die Berechnung der Rückstreuamplituden nicht sensitiv für die genaue Form der Modellstruktur. Es ist ausreichend, den Typ der Potentiale eines Streupfades (Element) und den Abstand auf etwa 0.1 \AA genau zu berücksichtigen, um gute Ergebnisse zu erzielen. Kleinere Unterschiede in den Modellstrukturen wirken sich die Ergebnisse der Kurvenanpassung nicht aus. Die maximale Anzahl freier Parameter in einer Kurvenanpassung (Fit) ist nach [Stern, 1993] durch die Beziehung $N_{ind} = 2\Delta R\Delta k/\pi + 1$ gegeben. Der durch SimX minimierte Wert ist die Summe der Fehlerquadrate, also die Summe der quadrierten Abweichungen zwischen Simulation und Experiment. Als Maß für die Güte der Anpassung wird oft der sogenannte R-Wert angegeben

$$R = \sum_i \frac{k_i^n}{\sum_j k_j^n} \left| \chi_i^{(exp)}(k_i) - \chi_i^{(th)}(k_i) \right|. \quad (1.13)$$

Verwendet man statt der ungefilterten Daten die über den interessierenden Bereich ΔR Fourier-gefilterten Spektren, so erhält man einen modifizierten R-Wert, der als R_f bezeichnet wird. Dieser R_f -Wert gibt die Übereinstimmung zwischen Modell-Spektrum und experimentellen Daten frei von Rauschbeiträgen an.