

# Kapitel 4

## Strukturänderungen im Kok-Zyklus: Vergleichende XAS-Messungen bei Raumtemperatur

**Zusammenfassung:** Die Änderungen von Struktur und Oxidationszustand des  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplexes des PSII sind von herausragendem Interesse für die Photosyntheseforschung. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse von XAS-Messungen bei Raumtemperatur für die Übergänge zwischen allen vier semi-stabilen Zuständen des S-Zyklus ( $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$ ,  $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ ,  $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$  sowie  $\text{S}_{3,4} \Rightarrow \text{S}_0$ ) vorgestellt und mit Tieftemperaturdaten verglichen. Die Analyse der kompletten EXAFS- und XANES-Datensätze führt zu den folgenden Ergebnissen: (i) Die wesentlichen strukturellen und elektronischen Merkmale der S-Zustände sind identisch bei Raum- und Tieftemperatur. Es finden sich keine Anzeichen für relevante Unterschiede in Struktur, Protonierungszustand oder Ladungslokalisation. (ii) Eine Mangan-zentrierte Oxidation in jedem Übergang vom  $\text{S}_0$  zum  $\text{S}_3$  erscheint wahrscheinlich, die spezifischen Änderungen der XANES-Spektren beim  $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ -Übergang erfordern jedoch eine Erklärung. (iii) In den Übergängen  $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$  und  $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$  treten größere strukturelle Änderungen auf, die als Änderungen der Mangan-Brückenstruktur identifiziert werden können. Für den Übergang  $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$  wird die Bildung einer weiteren  $\text{Mn}-(\mu - \text{O})_2\text{-Mn}$ -Struktur postuliert, während im  $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$  die Deprotonierung einer  $\mu$ -oxo-Brücke stattzufinden scheint. Unter Einbeziehung dieser Ergebnisse wird ein Mechanismus für die Akkumulation von vier Oxidationsäquivalenten im PSII-Mangankomplex vorgestellt, und es werden die Beziehung zu Protonenbewegungen sowie mögliche Implikationen für die Ausbildung einer O-O-Bindung diskutiert.

### 4.1 Einleitung

Zur Aufklärung von Struktur und Funktion von proteingebundenen Metallzentren werden XAS-Messungen seit langem auf die verschiedensten Systeme angewendet, so auch am Mangankomplex des PSII. In den allermeisten Fällen werden die Messungen bei tiefen Temperaturen an gefrorenen Proben durchgeführt, was das Risiko von Veränderungen durch unphysiologische Bedingungen in sich birgt. So sind Redoxgleichgewichte temperaturabhängig und auch pH-Werte sind bei tiefen Temperaturen nicht mehr gut definiert. Weiterhin ist festzustellen, dass alle strukturellen Untersuchungen, beispielsweise durch EXAFS und EPR, bei tiefen Temperaturen durchgeführt wurden, während kinetische Daten (natürlich) bei höheren Temperaturen gemessen wurden. In diesem Zusammen-

hang wurde beispielsweise in [Renger, 1993] vorgeschlagen, dass Redoxäquilibrien bei der photosynthetischen Wasserspaltung eine entscheidende Rolle spielen, was eben zu einer Temperaturabhängigkeit führen könnte. Gerade auch im Hinblick auf umstrittene Ergebnisse zur Oxidationszustandsänderung im  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang ist es also wichtig, mögliche Temperaturabhängigkeiten zu untersuchen [Meinke et al., 2000; Haumann et al., 2002a].

Ein weiterer Vorteil von Messungen bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes oder bei Raumtemperatur ist die Option kinetischer Messungen. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit konnte dazu beigetragen werden, erste erfolgreiche zeitaufgelöste XAS-Messungen an intakten PSII-Proben unter quasi-nativen Bedingungen durchzuführen, ein Ansatz, der gerade für Intermediatzustände wie den  $S_4$ -Zustand sehr interessant ist [Haumann et al., 2002b]. Hingewiesen sei in diesem Zusammenhang auch auf die Bedeutung der Absorptionskanten (und damit von Kantensimulationen) für Raumtemperaturmessungen generell und speziell für zeitaufgelöste Messungen. Da die EXAFS-Oszillationen, wie bereits erwähnt, bei höheren  $k$ -Werten stark gedämpft sind, besteht (vorerst) nur für Energien in der Röntgenabsorptionskante eine Chance, wirkliche Zeitauflösung mit hinreichend gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Wie vor allem in den Kapiteln 3, 6, 7 und 8 dargelegt wird, enthält die Kantenstruktur eine Vielzahl von Informationen über die geometrische und elektronische Struktur des Absorbers und seiner Umgebung, die man u.a. durch Simulationsansätze extrahieren kann. Dieses Zusammenspiel von Simulation und Experiment macht die Interpretation zeitaufgelöster Messungen und damit die Bestimmung der Kinetik struktureller Änderungen erst möglich [George et al., 1998; Kleinfeld et al., 2003; Penner-Hahn, 2003].

Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten XAS-Messungen an PSII-Membranpartikeln bei Raumtemperatur durch die sogenannte "Flash-and-rapid-scan" Methode. Zum Vergleich werden in der Diskussion am Ende dieses Kapitels sowie auch in späteren Abschnitten der Arbeit analoge Messungen bei tiefen Temperaturen herangezogen und besprochen. Diese Tieftemperaturdaten stammen aus früheren Messzeiten und wurden maßgeblich durch Dr. L. Iuzzolino und Dr. J. Dittmer gesammelt [Dittmer, 1999; Iuzzolino, 1999; Dau et al., 2001]. Die in diesem Kapitel ebenfalls diskutierten "Point-by-point"-Spektren, zu deren Messung der Autor beigetragen hat, werden lediglich als Ergebnis vorgestellt; zu Details sei auf [C. Müller, Doktorarbeit] sowie [Haumann et al., 2005] verwiesen.

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Probenpräparation und S-Zustandseinstellung

Die Präparationsvorschrift zur Herstellung von Membranpartikeln mit hohem PSII-Anteil wurde 1981 in einer Arbeit von Berthold, Babcock und Yocum veröffentlicht [Berthold et al., 1981], weshalb die Abkürzung BBY für diese Sorte PSII-Proben üblich ist. Zusätzlich wurde in allen verwendeten Medien Glycin-Betain als Stabilisator zugesetzt [Iuzzolino et al., 1998; Schiller und Dau, 2000]. Die Prozedur zur Präparation von BBY-Proben von frischem Marktspinat bestand aus drei wesentlichen Schritten: erstens dem Zellaufbruch, zweitens dem Aufbruch der Chloroplasten und der Abtrennung von Photosystem I (PSI) sowie drittens dem "Waschen" durch wiederholte Zentrifugationsschritte und Aufbewahren. Die anschließende Lagerung der BBY-Proben erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ . Die Rate der Sauerstoffentwicklung der so gewonnenen Proben bei  $28^\circ\text{C}$  unter sättigendem weißen Licht betrug  $1200 - 1400 \mu\text{mol O}_2 / (\text{mg Chl.} \times \text{h})$  bei  $28^\circ\text{C}$ .

Zur Herstellung orientierter PSII-Membranfragment-Schichten wurde eine zweite Präparation angeschlossen [Iuzzolino et al., 1998; Iuzzolino, 1999]: Die BBY-Partikel wurden in einem Puffer mit 15 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM Betain, 10 % v/v Glycerol und 25 mM MES aufgenommen. Ziel der Glycerolzugabe war es, in den S<sub>2</sub>-Zentren die Intensität des S<sub>2</sub>-"Multiline"-EPR-Signals auf Kosten des  $g = 4$  Signals zu erhöhen [Dismukes und Siderer, 1981; Schiller und Dau, 2000]. Die Endkonzentration des zugegebenen Elektronenakzeptors PPBQ wurde in einer Messreihe optimiert: Der Standardwert betrug 200  $\mu$ M, die Oszillation des S<sub>2</sub>-"Multiline" ist maximal bei 100  $\mu$ M. Anschließend wurde entsprechend der ebenfalls in [Iuzzolino et al., 1998] beschriebenen Vorgehensweise die Lösung auf dünne Kaptonfolie zentrifugiert. Die so erhaltenen Proben wurden für zwei Stunden im Dunklen unter leichtem Unterdruck (400 mbar) bei 4 °C getrocknet. Zur Homogenisierung der S-Zustandsverteilung wurden die Proben direkt nach der Präparation mit einer Xenon-Blitz-Lampe (Pulslänge:  $\sim 5 \mu$ s FWHM, Wellenlänge  $\lambda > 400$  nm) mit einem sättigenden Lichtpuls belichtet. Hierdurch wurde erreicht, dass alle Zentren um einen Zustand im Kok-Zyklus fortschritten. Da bei normal dunkeladaptierten Proben nach der Präparation eine Mischung aus 25 % S<sub>0</sub>-Zentren und 75 % S<sub>1</sub>-Zentren vorliegt, entsteht durch diesen "Vorblitz" eine S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>-Mischpopulation. Weil aber der S<sub>1</sub>-Zustand dunkelstabil ist, während der S<sub>2</sub>-Zustand mit einer Zeitkonstante im Minutenbereich zu S<sub>1</sub> relaxiert [Messinger et al., 1993; Messinger und Renger, 1994], liegen im Anschluss an die Trocknung die allermeisten Zentren im S<sub>1</sub>-Zustand vor.

In den "Flash-and-rapid-scan"-XAS-Experimenten wurden die höheren S-Zustände durch Laser-Blitze direkt vor dem Beginn eines EXAFS-Scans populiert [Dau und Haumann, 2003; Haumann et al., 2002a,b]. Der Abstand der Blitze betrug 400 ms, und der letzte Blitz erfolgte ca. 200 ms vor dem Beginn des EXAFS-Scans. Zur Optimierung des "Patterns" wurden ausgiebige Vorversuche unternommen, im Rahmen derer die Effizienz der S-Zustandsübergänge anhand der Intensität des S<sub>2</sub>-Zustandes bestimmt wurde.

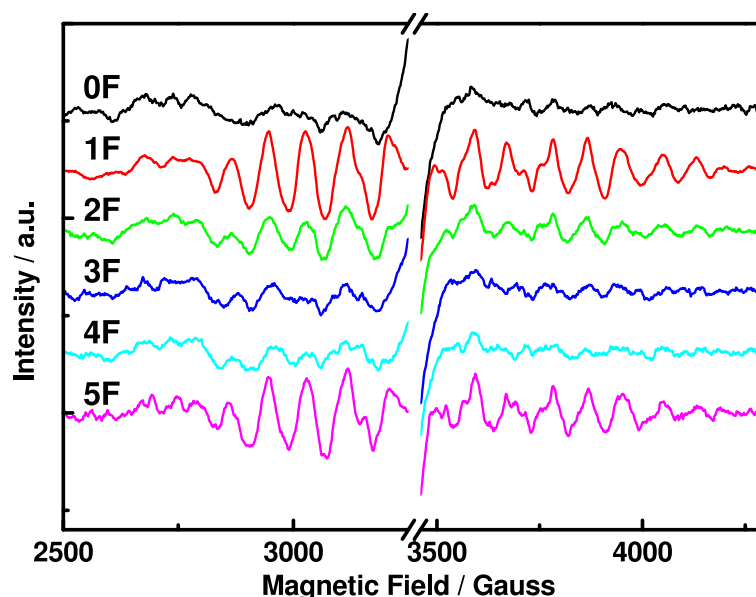
### 4.2.2 Probencharakterisierung durch EPR

Im S<sub>2</sub>-Zustand des Kok-Zyklus wird im EPR ein "Multiline"-Signal detektiert [Dismukes und Siderer, 1981] das aus mindestens 16 Linien besteht und dessen Entstehung bisher noch nicht voll verstanden ist. Die Intensität dieses Signals wurde bereits in etlichen Arbeiten zur Quantifizierung der Population der S-Zustandsverteilung verwendet [Dau et al., 2001; Messinger et al., 2001]. Für die hier besprochenen Messungen am PSII wurden Messungen durchgeführt mit dem Ziel,

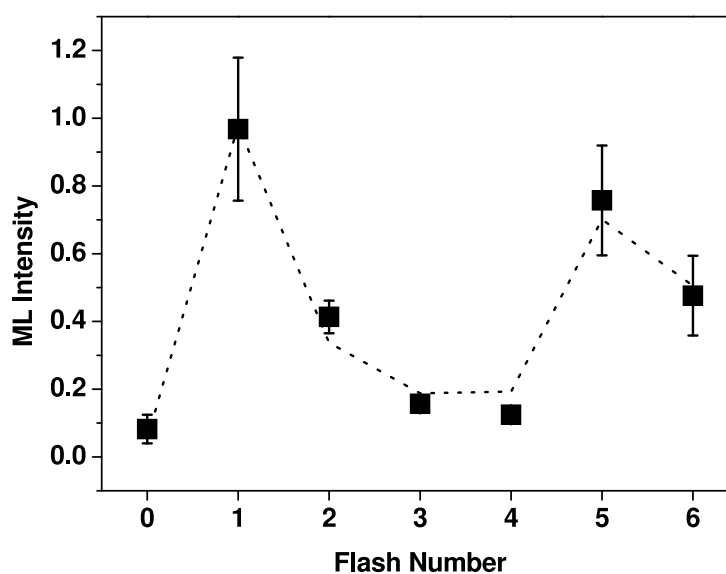
1. die Zustandskomposition unabhängig von den XAS-Messungen zu bestimmen und
2. die Parameter der Beblitzung, der Probendicke und der Elektronenakzeptorzugabe zu optimieren.

Gemessen wurde im Labor von Dr. F. Lenzian (Technische Universität Berlin) in Zusammenarbeit mit Dr. M. Kammel und M. Galander mit einem Bruker ESP-300E Spektrometer mit Heliumkryostatsystem (Oxford, GB) bei 8 K. Die weiteren Parameter der Messungen waren einheitlich  $P_A = 10$  mW Mikrowellenleistung,  $f = 9.56973$  GHz Mikrowellenfrequenz, 20 G Modulationsamplitude und 100 kHz Modulationsfrequenz.

Die Quantifizierung des Multiline-Signals beinhaltete folgende Schritte: (1) Normierung der unter gleichen Bedingungen gewonnenen EPR-Spektren von aus der gleichen Ausgangspräparation hergestellten Proben auf das "Junk-iron"-Signal bei  $g = 4$  durch



**Abbildung 4.1:** Amplitude des  $S_2$ -"Multiline"-EPR-Signals in PSII-Proben, die mit ns-Laserblitzen belichtet wurden. Dargestellt ist die aus jeweils 5 Proben gemittelte Intensität für 0 bis 5 Blitze. Die Proben befanden sich während der EPR-Messungen auf XAS-tauglichen PMMA-Haltern, die eine verschieden starke, breite Struktur im Bereich von 2700 bis etwa 4000 G zeigten. Daher wurde ein Untergrundsignal subtrahiert. Deutlich zu erkennen ist die Oszillation des "Multiline"-Signals mit der Periode vier, welches als Oszillationsmuster oder "Pattern" des S-Zyklus bezeichnet wird. Zu den Messparametern siehe Text.



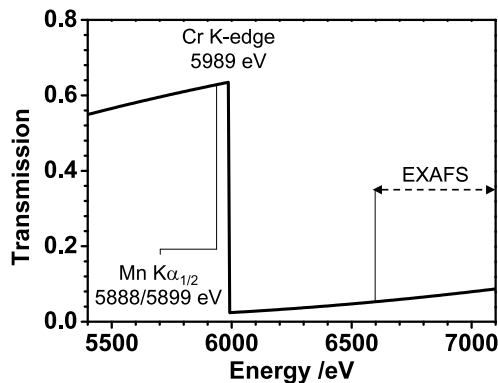
**Abbildung 4.2:** Ergebnis der Quantifizierung des  $S_2$ -"Multiline"-Signals in ns-Laserblitzbelichteten PSII-Proben. Gezeigt ist die Amplitude des  $S_2$ -"Multiline"-Signals nach 0 bis 6 Blitzen für das optimierte S-Zustands-Oszillationsmuster ("Pattern") für die ESRF-Messzeit im Nov. 2003. Die Fehlerangaben wurden als Standardabweichung aus Messungen an 8 bis 14 verschiedenen Proben berechnet. Die durch Kurvenanpassung bestimmten Parameter sind: "Mises", 10.8 %; "non- $Q_b$ -Zentren", 14 %;  $S_2$ -Dunkelpopulation, 4.8 %.

Minimierung der quadratischen Differenz zwischen den einzelnen Spektren und einem ausgewählten Standard-Spektrum zwischen  $B = 1550 - 1650$  G. (2) Subtraktion eines glatten Untergrundbeitrages (Fit eines Glättungssplines) im Bereich des Multiline-Signals, da durch differierende Untergrundbeiträge eine Differenzbildung nicht anwendbar war. (3) Fourier-Filterung der EPR-Spektren über einen Bereich von  $B = 2800-3300$  G ("Low-field" Anteil) und  $B = 3500-4300$  G ("High-field" Anteil) sowie Bildung der Korrelationsfunktion zwischen einer durch Dauerbelichtung bei 200 K erzeugten Standardprobe und der zu messenden Probe

$$ML = \frac{\int I_{std}(H)I_{sample}(H) dH}{(\int I_{std}(H) dH)^2} \quad (4.1)$$

Das Verfahren, das ursprünglich in [Dittmer, 1999] beschrieben wurde, erweist sich als relativ robust gegen Rauschbeiträge und ist damit geeignet für die Auswertung von Daten von sehr dünnen Proben (geringe Probenmenge  $\sim 1$  nmol) mit signifikanten Untergrundbeiträgen aufgrund der XAS-tauglichen Probenhalter. Es wurde in geringer Abwandlung neu implementiert in dem Programm *s2\_multiline.m*.

### 4.2.3 Datenakquisition



**Abbildung 4.3:** Transmission eines  $10 \mu\text{m}$ -Chromfilters. Während Streustrahlung bei EXAFS-Energien effizient unterdrückt wird (Transmission  $< 15\%$ ), wird  $70\%$  der  $K_\alpha$ -Fluoreszenz transmittiert.

Aufgrund der erforderlichen Geschwindigkeit der Datenaufnahme erfolgte die Detektion mittels einer großflächigen PIN-Photodiode ( $A = 3.8 \text{ cm}^2$ , Canberra Eurisys, Lingolsheim, Frankreich). Zur Unterdrückung der gestreuten Röntgenphotonen sowie des sichtbaren Lichtes wurden ein  $10 \mu\text{m}$ -Chromfilter sowie ein  $10 \mu\text{m}$ -Aluminiumfilter vor der Photodiode montiert. Das Prinzip eines solchen Z-1-Filters ist in Abb. 4.3 dargestellt. Während die Streustrahlung im Bereich der Anregungsenergie (EXAFS) effizient unterdrückt wird, wird der größte Teil der  $K_\alpha$ -Fluoreszenz transmittiert. Die Temperatur im Messstand betrug  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ .

In den "Flash-and-rapid-scan" XAS-Messungen kamen im Monochromator Si(220)-Kristalle zum Einsatz, die zur Unterdrückung von Reflexionen höherer Ordnung gegenüber der maximal erreichbaren Strahlintensität auf  $70\%$  verstimmt waren. Der Energiebereich für einen EXAFS-Scan betrug  $6500 \text{ eV}-7100 \text{ eV}$ , die Dimensionen des Röntgenstrahles am Ort der Probe waren  $1 \times 1 \text{ mm}$ .

Bei Messungen an dunkeladaptierten Proben wurde an jeder Messposition ein Scan von  $12 \text{ s}$  Dauer aufgenommen. Dabei waren pro Probe ca.  $12$  nicht überlappende Messpo-

Die Röntgenabsorptionsmessungen an PSII-Membranfragmenten bei Raumtemperatur wurden während drei Messkampagnen am ID26-Strahlrohr an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble (Frankreich) durchgeführt. Die ID26 ist ein Undulator-Messplatz mit der Option einer schnellen synchronen Bewegung von Monochromator und Undulator-Spalt [Sole et al., 1999]. Die Röntgenabsorptionsspektren wurden im Fluoreszenz-Modus gemessen, d.h. senkrecht zum Röntgenstrahl wurde die Überlagerung von durch K-Schalenabsorption angeregter  $\text{Mn } K_\alpha$ -Fluoreszenz und  $90^\circ$ -Streustrahlung detektiert.

sitionen möglich. Auf den Proben, in denen durch Laserblitze die "höheren" S-Zustände eingestellt wurden, konnte nur eine Messposition benutzt werden, ohne Zustandsdurchmischung durch Relaxation zu riskieren. Der Photonenfluss musste zur Vermeidung von Strahlenschäden im Verlauf einer Messung durch Kapton- und Aluminiumfilter um einen Faktor von ca. 25-30 abgeschwächt werden. Die Filterstärke wurde durch sogenannte "Time scans", das sind Zeitverlaufmessungen bei einer festen Anregungsenergie, optimiert. Die Intensität wurde so gewählt, dass die anhand der Kantenpositionsverschiebung detektierte Reduktion der Probe über den Zeitraum einer Messung 15 % des Wertes für einen Übergang im S-Zustandzyklus ( $\sim 0.7$  eV) nicht überschritt (vgl. Abb. 2.7).

Das Prinzip der "Sampling-XAS" Messungen ist in [Haumann et al., 2002b] beschrieben worden, und Details zu den hier als Vergleich diskutierten Messungen finden sich in [Haumann et al., 2005]. Das Prinzip dieser Messungen beruht darauf, dass der Zeitverlauf der Röntgenfluoreszenzintensität bei fester Anregungsenergie mit einem schnellen Detektor (Photodiode) mit hoher Abtastrate (20 ms) detektiert wird. Während der Messung eines solchen Zeitverlaufes wurden im Abstand von 400 ms sättigende ns-Laserblitze appliziert, und diese Prozedur wurde für 100 verschiedene Anregungsenergien wiederholt.

#### 4.2.4 Datenanalyse

Für das Raumtemperaturspektrum eines S-Zustandes wurden zwischen 50 und 100 "Flash-and-rapid-scan" Spektren gemittelt. Für jedes dieser Spektren war die Energiekalibrierung durchzuführen, die Interpolation auf eine gemeinsame Energieachse zu berechnen sowie die "visuelle" Inspektion zu ermöglichen, d.h. die komplette EXAFS-Aufbereitung für jeden einzelnen Scan durchzuführen. Das damit entstandene Datenvolumen ließ sich mit der für einzelne Scans konzipierten Standardsoftware nicht bewältigen. Daher wurde ein matlab-Programmpaket entwickelt, das speziell auf "High-throughput"-XAS Methoden zugeschnitten wurde. Durch eine Listendatei wird ein Datensatz (eine Anzahl von einzelnen Scans) definiert, der analysiert und von dem eine Auswahl summiert werden soll. Eine Parameterdatei steuert die Kalibration und die Datenaufbereitung (Hintergrundsubtraktion, Normierung, Fouriertransformation; vgl. Kap. 1.3.4, Abb. 1.8). Dies ermöglicht sowohl die interaktive Selektion als auch die Selektion anhand kritischer Parameter (Kantenposition, Signal-zu-Rauschverhältnis, relative Höhe der Eisenkante). Weiterhin wurde durch die listenförmige Ausgabe eine Übersicht über die Datenqualität wie auch eine Summation nach statistischer Wichtung (Kantensprung zu Untergrund) möglich. Eine detailliertere Dokumentation ist im Anhang A.1 gegeben.

Im Rahmen dieses Vorgehens wurde die Energieachse für jedes Spektrum anhand des simultan gemessenen  $\text{KMnO}_4$ -Absorptionsspektrums durch die Anpassung einer Gaußverteilung an den Vorkanten-Peak kalibriert. Der Mittelwert der Gaußkurve wurde auf 6543.3 eV gesetzt, und die erreichte Genauigkeit betrug  $\pm 0.1$  eV, ein Wert der auch von [Iuzzolino et al., 1998] sowie [Meinke et al., 2000] gefunden wurde. Anschließend wurden alle störungsfreien Messungen nach Interpolation auf eine gemeinsame Energieachse gewichtet und summiert. Die Gewichtung erfolgte gemäß  $w = I_c / (I_c + I_{bg})$ , d.h. ein untergrundfreies Spektrum wird mit  $w = 1$  gewichtet, während ein Spektrum mit sehr kleinem Signal mit einem Faktor nahe  $w = 0$  unterdrückt wurde ( $I_c$ - Höhe des Kantensprungs,  $I_{bg}$  - Untergrund im Bereich der Kante). Diese Herangehensweise berücksichtigt Unterschiede in der Probendicke und der Stärke des Streuuntergrundes. Die Untergrundsubtraktion, Normalisierung und EXAFS-Extraktion erfolgte mit dem im Anhang beschriebenen Programm *exafs\_analysis\_03.m* bzw. entsprechenden Programmen der DESY-Software. Für den Übergang von der Energie- auf die Wellenzahlachse (Gl. 1.1) wurde eine Nullpunkts-

energie von  $E_0 = 6540$  eV gewählt, und die Anzahl der Datenpunkte wurde auf 200 auf der k-Achse äquidistante Werte reduziert ( $\Delta k \approx 0.06$  Å). Für die Fouriertransformationen wurde ein fraktionales  $\cos^2$ -Fenster über 10 % des k-Bereiches links und rechts verwendet.

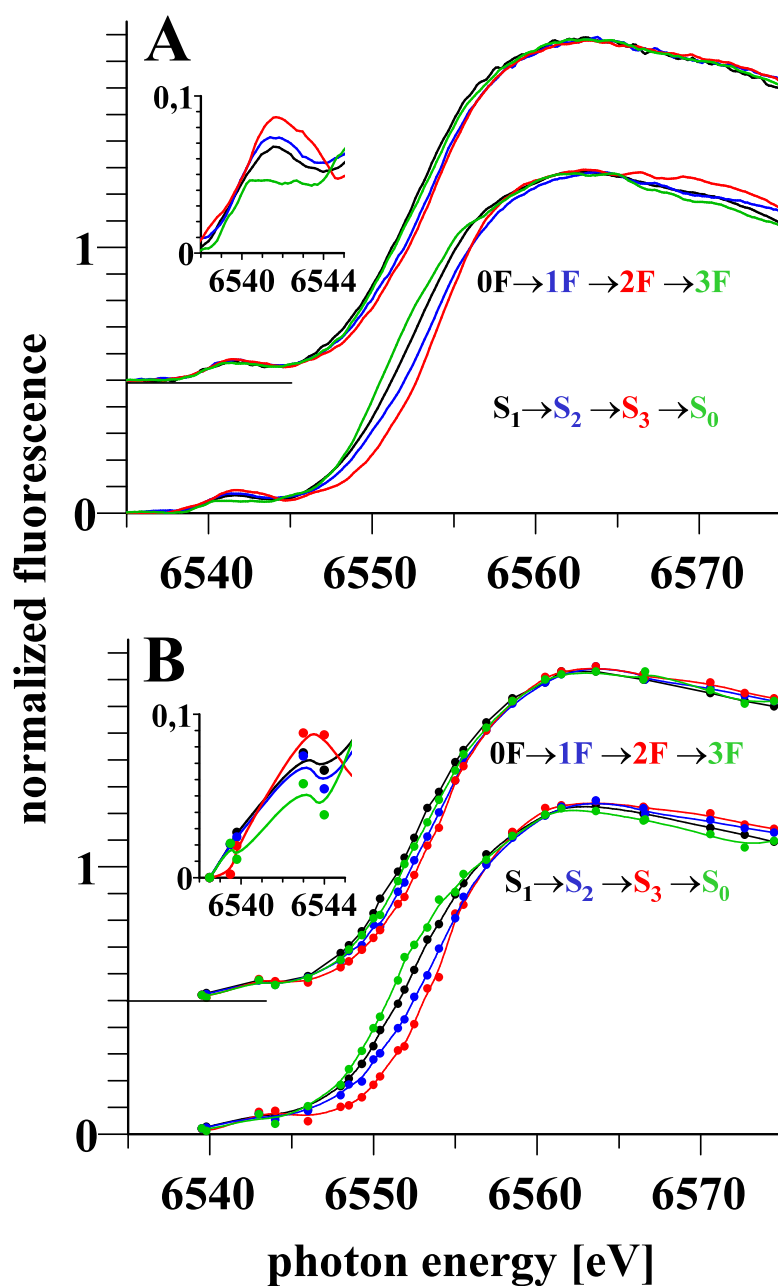
Die Simulation der EXAFS-Spektren durch Minimierung der Summe der Fehlerquadrate wurde mit dem Programm SimX [Dittmer, 1999] durchgeführt. Die Berechnung der komplexen Phasenfunktionen erfolgte mit dem *ab-initio* Code FEFF (Version 7, [Rehr et al., 1991]) auf der Basis eines einfachen Modells zweier  $\mu_2$ -oxo-verbrückter Mangandimere, die über eine mono- $\mu$ -oxo-Brücke verbunden sind. Der Amplitudenreduktionsfaktor betrug  $S_0^2 = 0.85$  und die Nullpunktenergie für die Simulationen  $E_0 = 6547$  eV. Die Qualität der Kurvenanpassung wurde durch eine aus den Fourier-gefilterten Spektren berechnete Fehlersumme  $R_f$  erfasst, deren genaue Form in [Dittmer, 1999] bzw. [Meinke et al., 2000] beschrieben ist.

## 4.3 Vergleich von Raumtemperaturspektren mit 20 K-Daten

Photoreduktion durch die intensive Synchrotronstrahlung kann selbst bei tiefen Temperaturen zu einer erheblichen Schädigung des Mangankomplexes im PSII im Verlauf einer Messung führen. In XAS-Messungen bei Raumtemperatur geht diese Strahlenschädigung um ein Vielfaches schneller vonstatten [Meinke et al., 2000; Haumann et al., 2002b; Dau und Haumann, 2003]. Um Modifikationen der Spektren im Verlauf der Messung auszuschließen, wurde sowohl bei 20 K als auch bei Raumtemperatur die Anfangsrate der Photoreduktion für die verschiedenen S-Zustände bestimmt und die Strahlintensität so angepasst, dass nach dem Ende eines Scans mehr als 90 % der Zentren in ihrem ursprünglichen Zustand vorlagen (siehe [Haumann et al., 2005], Supporting Information).

### 4.3.1 Die Kantenspektren des Mangankomplexes in den vier S-Zuständen

Die Kantenspektren des Mangankomplexes in Abb. 4.4 wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden gemessen: (1.) Der sogenannte "Flash-freeze"-Ansatz, der darin besteht, die Proben unmittelbar nach der Belichtung (innerhalb 1 s) einzufrieren und bis zur Messung bei Flüssig-Stickstoff-Temperaturen zu lagern. Dieser wurde bei den 20 K-Daten verfolgt. (2.) Die Raumtemperaturspektren wurden mit der "Sampling-XAS" Methode gewonnen, d.h. es wurden Laserblitze appliziert, während der Zeitverlauf der Röntgenfluoreszenz für ausgewählte Energien aufgezeichnet wurde. Die jeweils oberen Kurven in Abb. 4.4 (A) und (B) zeigen die bei 20 K (A) bzw. bei Raumtemperatur (B) gemessenen Kantenspektren von dunkeladaptierten Proben sowie die Kantenspektren von Proben nach der Belichtung mit 1, 2 und 3 Blitzen. Die Spektren der reinen S-Zustände (Abb. 4.4 (A) und (B), jeweils untere Kurvenschar) werden aus diesen Spektren durch eine Entfaltungszprozedur gewonnen, die die Zustandsmischung durch unvollständiges Fortschreiten im katalytischen Zyklus korrigiert. Die Parameter für diese Entfaltung wurden durch Simulation der Oszillation des  $S_2$ - "Multiline"-Signals bestimmt (vgl. Kap. 4.2.2 sowie [Iuzzolino et al., 1998; Haumann et al., 2005]). Berücksichtigt wurden dabei folgende Parameter: der Prozentsatz der Zentren, die bei einem Blitz keinen Übergang in den nächsten Zustand vollziehen ("Misses"); Zentren in denen durch Schädigung der Akzeptorseite der Elektronentransferkette nur ein Übergang möglich ist und die danach im  $S_2$ -Zustand verbleiben ("blocked" bzw. "non- $Q_B$ "-Zentren [Melis, 1985]); die Wahrscheinlichkeit, dass



**Abbildung 4.4:** Kantenspektren des PSII-Mangankomplexes in den verschiedenen S-Zuständen. (A) Ergebnisse von "Freeze-Quench"-Proben gemessen bei 20 K nach null (0F, schwarz), einem (1F, blau), zwei (2F, rot) bzw. drei (3F, grün) Blitzen (obere Kurvenschar) sowie Ergebnisse für die reinen S-Zustände nach Entfaltung. (B) Ergebnisse wie in (A), jedoch aus Zeitverlaufsmessungen an dunkeladaptierten Proben bei Belichtung mit sättigenden Laserblitzen im Abstand von 400 ms. Die Punkte entsprechen hier den Datenpunkten, und die durchgezogenen Linien sind illustrierende Verbindungen der Datenpunkte gemäß berechneter "Spline-Polynome". Die Unterabbildungen stellen jeweils einen vergrößerten Ausschnitt des Vorkanten-Peaks dar.



	$E^{\text{edge}} / \text{eV}$	$\Delta E^{\text{edge}} / \text{eV}$			
	$S_1$	$S_0 \rightarrow S_1$	$S_1 \rightarrow S_2$	$S_2 \rightarrow S_3$	$S_3 \rightarrow S_0$
20 K	6551.62	0.58	0.76	0.71	-2.05
295 K	6551.79	0.57	0.79	0.70	-2.06

**Tabelle 4.1:** Änderungen der Kantenenergie der Mangankomplexspektren in den S-Zustandsübergängen. Die angegebenen Energien resultieren aus entfalteten Spektren für reine S-Zustände, die bei 20 K bzw. bei Raumtemperatur gemessen wurden. Die Kantenpositionsbestimmung erfolgte mit Hilfe der Integralmethode an auf eins normierten Spektren, und die Parameter der Kantenbestimmung betragen  $\mu_1 = 0.15$  und  $\mu_2 = 1$ .

ein Zentrum durch einen Blitz zu zwei Übergängen angeregt wird ("Double hits", nur für  $\mu\text{s}$ -Blitzlampenpulse relevant, nicht jedoch für ns-Laserblitze); Anteil der Zentren die nach der Dunkeladaption im  $S_2$ -Zustand vorliegen (Dunkelpopulation).

In den entfalteten Spektren treten die Effekte, die bereits in den Rohspektren zu erkennen sind, deutlicher hervor, wobei festzustellen ist, dass die mit unterschiedlichen Methoden gemessenen Spektren große Ähnlichkeit aufweisen. Diese Aussage wird durch den Vergleich der Differenzspektren, die in einem späteren Kapitel separat besprochen werden, bestärkt (vgl. Kap. 7.2, Abb. 7.7). Betrachtet man die Unterschiede zwischen den Spektren von verschiedenen S-Zuständen, so lässt sich eine Kantenverschiebung ungefähr gleicher Größe für alle "Aufwärts"-Übergänge feststellen. Im Übergang  $S_{3,4} \Rightarrow S_0$  kehrt sich die Kantenverschiebung zu höheren Energien notwendigerweise um. Die mit der Integralmethode bestimmten Änderungen der Kantenpositionen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. An dieser Stelle erweist es sich als bedeutender Vorteil der "Sampling-XAS"-Methode, dass direkt die Änderungen der Kantenenergien gemessen werden können, wodurch der in anders gemessenen XANES- Spektren kritische Punkt der Normierung entfällt. In diesem Sinne können die "Sampling-XAS"-Daten auch als Bestätigung der verwendeten Normierungsprozedur betrachtet werden.

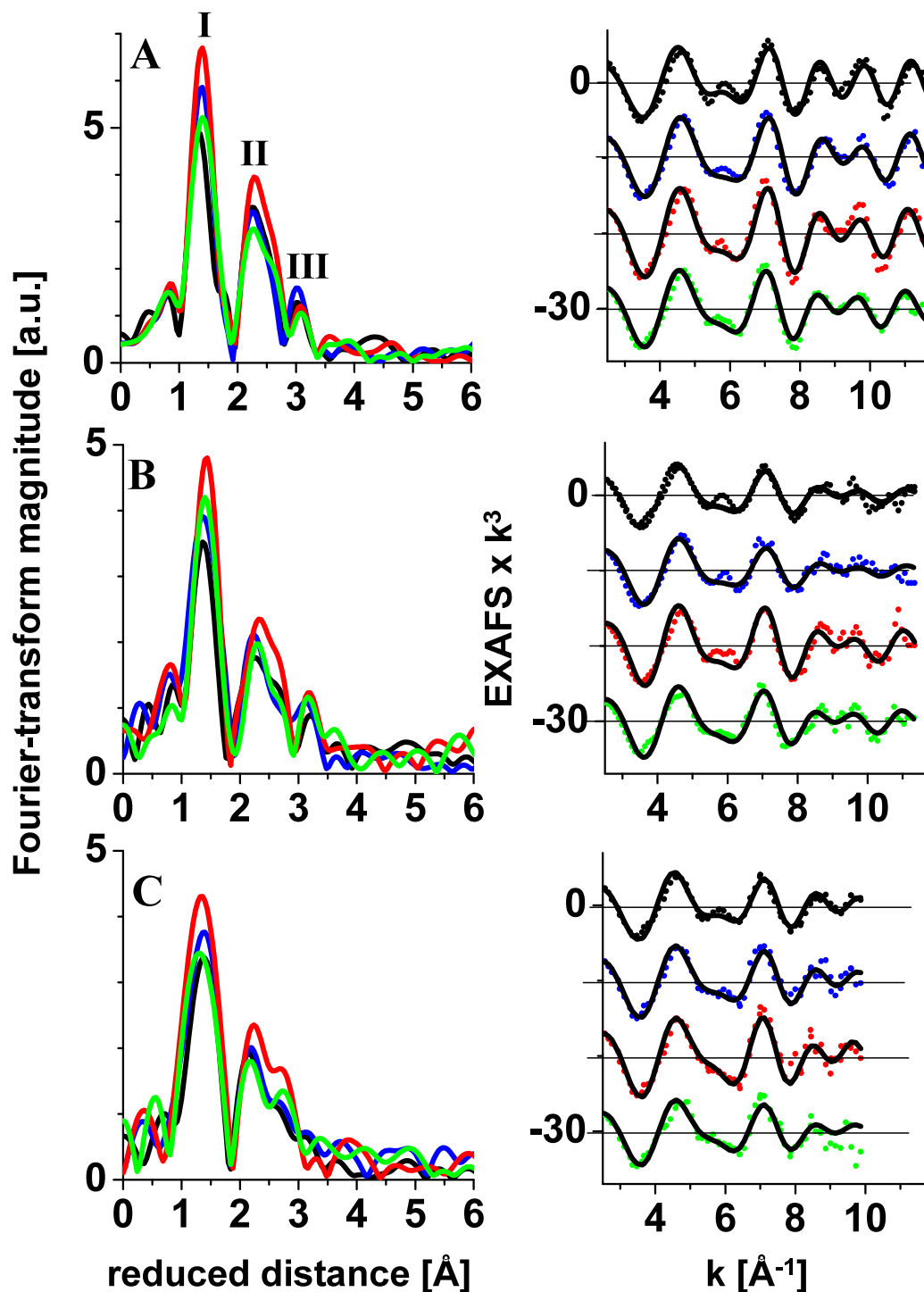
Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich die in Messungen bei 20 K beobachteten Kantenverschiebungen von jeweils etwa 0.7 eV pro S-Zustandsübergang durch Messungen bei Raumtemperatur unter quasi-physiologischen Bedingungen wiederfinden lassen. Die Größe der Verschiebung befindet sich in Übereinstimmung mit der Annahme, dass in jedem Übergang ein Manganion oxidiert wird. Die Änderungen der Röntgenabsorptionskanten vom PSII-Mangankomplex in den einzelnen S-Zustandsübergängen wird in Kapitel 7 anhand von *ab-initio* Simulationen der Differenzspektren genauer untersucht.

### 4.3.2 EXAFS-Ergebnisse von beblitzten Proben

Abbildung 4.5 zeigt die Fourier-Transformierten und die k-Bereichs-EXAFS-Spektren von drei Datensätzen für mit jeweils 0, 1, 2 und 3 Blitzen belichtete Proben: (A) Die Proben wurden nach dem "Freeze-quench"-Prinzip mit  $\mu\text{s}$ -Pulsen aus Xenon-Blitzlampen belichtet und bei 20 K vermessen. (B) Die Belichtung erfolgte bei Raumtemperatur mit ns-Laserpulsen unmittelbar vor einem schnellen EXAFS-Scan. (C) Über einen verkürzten Wellenzahlbereich wurden die EXAFS-Spektren aus Zeitverlaufsmessungen bei etwa 100 verschiedenen Energien zusammengesetzt.

Durch visuelle Inspektion lassen sich zwei wesentliche Ergebnisse erhalten:

1. Abgesehen davon, dass im Vergleich der 20 K-Spektren mit den Raumtemperaturdaten die mit I und II bezeichneten Peaks in den Fourier-Transformierten bei tiefen



**Abbildung 4.5:** EXAFS-Spektren an mit kurzen Lichtpulsen belichteten PSII-Proben; (A) "Freeze-Quench"-Messungen (20 K), (B) "Flash-and-rapid-scan"-Messungen (Raumtemperatur), Punkt-für-Punkt-Messungen (Raumtemperatur). Rechte Spalte: EXAFS-Oszillationen nach 0 (schwarz), 1 (blau), 2 (rot) und 3 (grün) Blitzen (jeweils unterbrochene Linie) sowie Simulationen mit einem Zwei-Schalen-Fitansatz (schwarze durchgezogene Linie). Linke Spalte: Amplitude der Fourier-Transformation der EXAFS Daten in der rechten Spalte (gleicher Farbcode)

Temperaturen deutlich schmaler und höher sind, sind die mit den S-Zustandsübergängen verbundenen Änderungen der EXAFS-Spektren bei beiden Temperaturen ähnlich.

- Die Amplitude der EXAFS-Oszillationen oberhalb etwa  $7 \text{ \AA}$  ist für den  $S_1$ - und den  $S_2$ -Zustand (dunkeladaptierte Proben und Ein-Blitz-Proben) ungefähr gleich. In mit zwei Blitzen belichteten Proben, in denen sich die Mehrzahl der Zentren im  $S_3$ -Zustand befindet, nimmt die Stärke dieser Oszillationen deutlich zu und nach dem dritten Blitz (mehrheitlich  $S_0$ ) wieder ab. In dem mit II bezeichneten Peak in den Fouriertransformierten ist beim Übergang von  $S_1$  nach  $S_2$  (schwarze bzw. blaue Linie) fast keine Änderung zu beobachten, während der  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang eine sichtbare Zunahme und der Übergang von  $S_3$  nach  $S_0$  eine Abnahme des Peaks zeigt. Diese Änderungen finden sich in allen drei Datensätzen wieder!

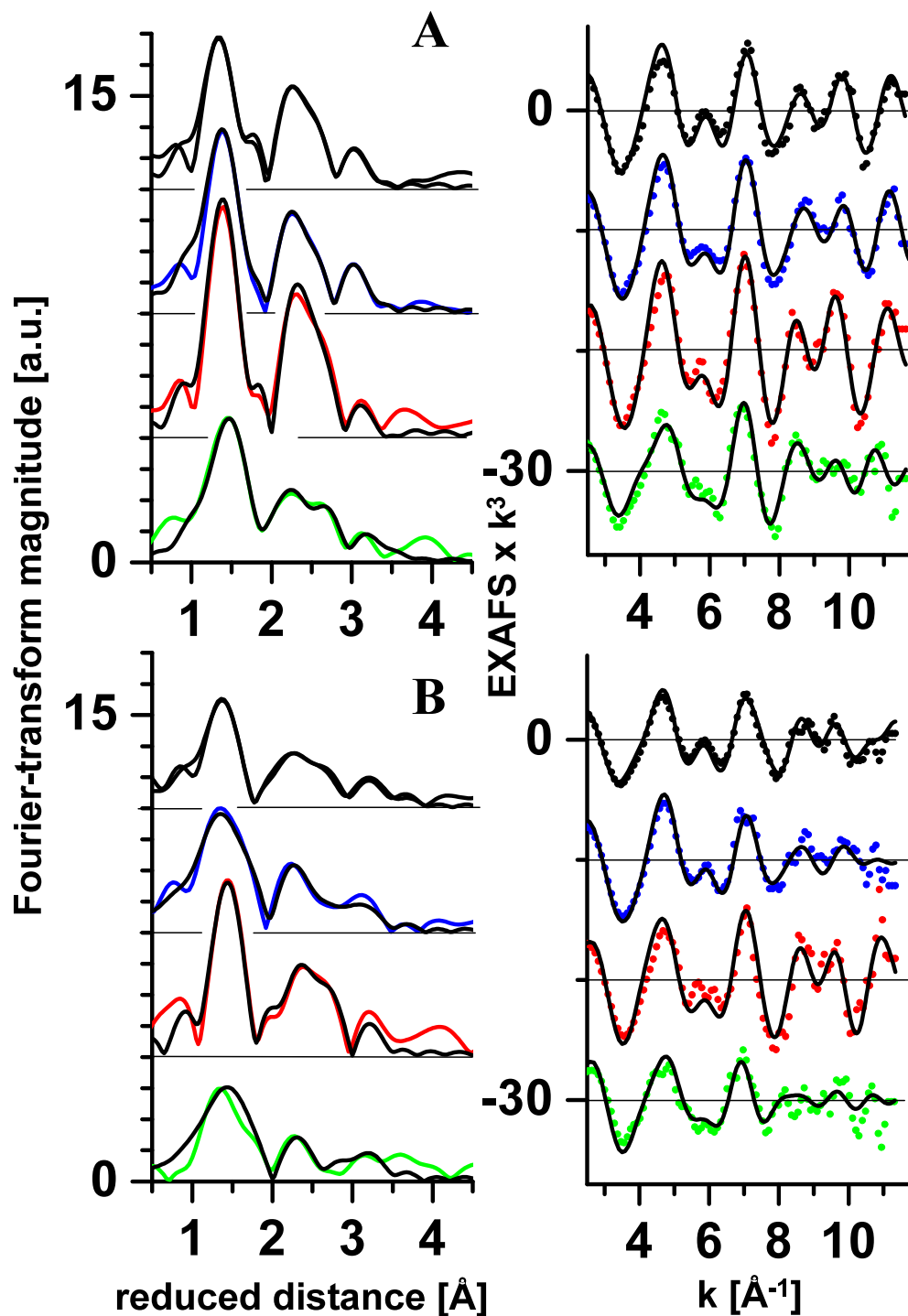
### 4.3.3 Simulationsergebnisse von PSII EXAFS-Spektren

Wie bereits für die Kantenspektren in Kap. 4.3.1 beschrieben, wurden auch die EXAFS-Spektren entfaltet und reine Spektren für die vier S-Zustände erzeugt. Im Anschluss werden nun die Ergebnisse für die Tieftemperatur- und Raumtemperaturmessungen vorgestellt. Die Ergebnisse der Zeitverlaufsmessungen werden hier wegen des kurzen k-Bereiches nicht näher diskutiert. Die Ergebnisse von EXAFS-Simulationen an den verbleibenden beiden Datensätzen sind in Tab. 4.2 aufgelistet. Unter (A-20K) wurde ein besonders einfacher Zwei-Schalen-Fitansatz zur Modellierung der 20 K-Daten gewählt, der keine weitergehenden Annahmen zur Struktur beinhaltet. Die Ergebnisse zeigen, dass es für die Übergänge  $S_0$  nach  $S_1$  sowie  $S_1$  nach  $S_2$  zu einer Verkürzung der mittleren Distanz der ersten Ligandenschale kommt. Beim Übergang von  $S_2$  nach  $S_3$  bleibt dieser Wert fast konstant, während die aus dem EXAFS bestimmte Koordinationszahl leicht zunimmt. Gleichzeitig ändern sich die Debye-Waller-Faktoren von fast identischen Werten in  $S_0$  und  $S_1$  zu einem kleineren Wert im  $S_2$ -Zustand und einem nochmals kleineren Wert im  $S_3$ -Zustand. Eine Verkürzung der mittleren Distanzen ist zu erwarten, wenn Mangan oxidiert wird, ohne seine Koordinationsgeometrie zu ändern. Ein Anstieg der Koordinationszahl kann als Hinweis auf eine Änderung der Anzahl der Manganliganden interpretiert werden, auch wenn bei dieser Bewertung die generelle Ungenauigkeit der Koordinationszahlbestimmung zu bedenken ist. Eine Abnahme des Debye-Waller-Parameters bedeutet eine weniger breite radiale Rückstreuerverteilung, also eine Homogenisierung der Distanzverteilung.

Für die zweite Schale findet man aus den 20 K-Daten eine Koordinationszahl von 1 für einen Mangan-Mangan-Vektor von  $\sim 2.7 \text{ \AA}$  für die Zustände  $S_0$ ,  $S_1$  und  $S_2$ . Für den  $S_3$ -Zustand erhöht sich diese Koordinationszahl auf ca. 1.5. Eine Koordinationszahl von 1 bedeutet in einem Ensemble von vier Manganionen das Vorliegen von zwei  $2.7 \text{ \AA}$ -Paaren, während sich für die Koordinationszahl 1.5 für drei solcher Paare ergibt. Die Mn-Mn-Distanzen sind im  $S_1$ - und  $S_2$ -Zustand fast gleich mit  $2.71 \text{ \AA}$ , etwas länger im  $S_3$ -Zustand ( $2.74 \text{ \AA}$ ) und deutlich länger im  $S_0$ -Zustand ( $2.76 - 2.77 \text{ \AA}$ ).

Die Simulation der Raumtemperatur-EXAFS-Spektren mit diesem Zwei-Schalen-Fitansatz führt zu weitgehend identischen Ergebnissen für die Koordinationszahlen und Distanzen und reproduziert die Trends in der ersten Koordinationssphäre. Wie zu erwarten war, ist der Debye-Waller-Parameter  $\sigma$  allerdings aufgrund der verstärkten thermischen Unordnung bei den Raumtemperaturdaten erhöht.

Die Fits in Abschnitt B der Tabelle 4.2 repräsentieren das Ergebnis erweiterter Fitansätze, in die zusätzliches Wissen über die Strukturelemente des Mangankomplexes ein-



**Abbildung 4.6:** EXAFS-Spektren der reinen S-Zustände nach der Entfaltung. (A) "Flash-freeze"-Messungen bei 20 K, (B) "Flash-and-rapid-scan" bei Raumtemperatur; Rechte Spalte: EXAFS-Daten (unterbrochene Linien) für den S<sub>1</sub>- (schwarz), S<sub>2</sub>- (blau), S<sub>3</sub>- (rot) und S<sub>0</sub>-Zustand (grün) sowie Simulation mit dem Fitansatz aus Tab. 4.2 (B); Linke Spalte: Amplitude der entsprechenden Fourier-Transformierten (gleicher Farbcode, zu den Parametern der Fourier-Transformierten s.h. Text)

	Mn-O,N	Mn-O,N	Mn-Mn	Mn-Mn,Ca	Mn-O,N,C	
	$N_i/R_i/\sigma_i$					$R_f/\%$
<b>A - 20 K</b>						
S <sub>1</sub>	4.49/1.85/0.110		1.16/2.712/0.041			26.5
S <sub>2</sub>	4.48/1.849/0.091		0.96/2.711/0.033			21.1
S <sub>3</sub>	4.82/1.844/0.082		1.59/2.742/0.043			23.9
S <sub>0</sub>	4.65/1.872/0.103		1.09/2.763/0.072			37.9
<b>A - 295 K</b>						
S <sub>1</sub>	4.13/1.85/0.113		1.08/2.715/0.087			36.6
S <sub>2</sub>	4.33/1.840/0.111		1.12/2.705/0.083			38.5
S <sub>3</sub>	4.80/1.849/0.078		1.62/2.735/0.061			38.4
S <sub>0</sub>	4.25/1.855/0.125		1.10/2.776/0.100			44.0
<b>B - 20 K</b>						
S <sub>1</sub>	2.75 <sup>#</sup> /1.812/0.074	2.75 <sup>#</sup> /1.978/0.098	0.96/2.716/0.028	1.00 <sup>#</sup> /3.218/0.105	2.50 <sup>#</sup> /3.663/0.076	12.9
S <sub>2</sub>	2.75 <sup>#</sup> /1.813/0.081	2.75 <sup>#</sup> /1.919/0.094	0.93/2.714/0.031	1.00 <sup>#</sup> /3.256/0.093	2.50 <sup>#</sup> /3.628/0.085	13.8
S <sub>3</sub>	2.75 <sup>#</sup> /1.803/0.031	2.75 <sup>#</sup> /1.938/0.058	1.49/2.744/0.039	1.00 <sup>#</sup> /3.156/0.104	2.50 <sup>#</sup> /3.711/0.087	12.7
S <sub>0</sub>	4.50 <sup>#</sup> /1.872/0.104	1.00 <sup>#</sup> /2.297/0.039	0.90/2.774/0.064	1.00 <sup>#</sup> /3.112/0.089	2.50 <sup>#</sup> /3.653/0.073	17.2
<b>B - 295 K</b>						
S <sub>1</sub>	2.75 <sup>#</sup> /1.833/0.091	2.75 <sup>#</sup> /2.017/0.154	1.04/2.711/0.088	1.00 <sup>#</sup> /3.135/0.105 <sup>#</sup>	2.50 <sup>#</sup> /3.693/0.082 <sup>#</sup>	18.3
S <sub>2</sub>	2.75 <sup>#</sup> /1.801/0.114	2.75 <sup>#</sup> /1.909/0.108	0.93/2.702/0.078	1.00 <sup>#</sup> /3.171/0.105 <sup>#</sup>	2.50 <sup>#</sup> /3.650/0.082 <sup>#</sup>	21.1
S <sub>3</sub>	2.75 <sup>#</sup> /1.797/0.155	2.75 <sup>#</sup> /1.865/0.047	1.53/2.741/0.071	1.00 <sup>#</sup> /3.076/0.105 <sup>#</sup>	2.50 <sup>#</sup> /3.674/0.082 <sup>#</sup>	19.9
S <sub>0</sub>	4.50 <sup>#</sup> /1.853/0.118	1.00 <sup>b</sup> /2.375/0.055	1.02/2.762/0.102	1.00 <sup>#</sup> /3.198/0.105 <sup>#</sup>	2.50 <sup>#</sup> /3.673/0.082 <sup>#</sup>	24.5

**Tabelle 4.2:** Simulationsergebnisse für die entfalteten Spektren der vier S-Zustände (übernommen aus [Haumann et al., 2005]).  $N_i$  bezeichnet die Anzahl der Rückstreuer pro Mangan,  $R_i$  den mittleren Abstand dieser Rückstreuer vom Mangan und  $\sigma_i$  den zugehörigen Debye-Waller-Parameter.  $R_f$  ist der Fourier-gefilterte Fehler, der über einen Bereich von 1 – 3.5 Å berechnet wurde. Gefittet wurden die  $k^3$ -gewichteten Spektren aus Abb. 4.6 (A, B). Mit <sup>#</sup> gekennzeichnete Parameter wurden in den Fits nicht variiert. Die Simulationen wurden für zwei Datensätze durchgeführt: Bei 20 K gemessen an "Freeze-quick"-Proben und bei Raumtemperatur (295 K) gemessen an "Flash-and-rapid-scan"-Proben. (A) stellt einen einfachen Zwei-Schalen-Fitansatz dar, (B) einen Fünf-Schalen-Fitansatz, wie er in Kap. 2 erläutert ist.

bezogen wurde. Diese Ansätze sind in [Meinke et al., 2000; Pospisil et al., 2003; Dau et al., 2003] detailliert erklärt und wurden in Kap. 2 erläutert.

Die erweiterten wissenschaftlichen Fit-Ansätze in Tab. 4.2 (B) ergeben im Vergleich zu (A) deutlich verbesserte Simulationen. Hinsichtlich der Mn-Mn-Vektoren bei  $\sim 2.7$  Å bleiben die wesentlichen Schlussfolgerungen jedoch unverändert. Sowohl die Tief- als auch die Raumtemperaturmessungen ergeben zwei solche Vektoren für den S<sub>0</sub>-, S<sub>1</sub>- und S<sub>2</sub>-Zustand. Im Unterschied zu diesen drei S-Zuständen und im Unterschied zu den Ergebnissen in [Liang et al., 2000; Robblee et al., 2001] ergeben sich jedoch drei Mn-Mn-Vektoren bei 2.7 Å im S<sub>3</sub>-Zustand. Im S<sub>0</sub> ist der Mittelwert der Distanz der Mn-Mn-Rückstreuer verlängert, und die Verteilung ist verbreitert (reflektiert von einem erhöhten Debye-Waller-Parameter). Eine ausführliche Diskussion der Signifikanz der Ergebnisse und der Korrelationen der einzelnen Parameter findet sich in [Haumann et al., 2005].

### 4.3.4 Vergleich der Ergebnisse von XAS-Messungen bei Raum- und Tieftemperatur

Die in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten Ergebnisse erlauben zum ersten Mal die Beurteilung des Einflusses temperaturabhängiger Redoxäquilibria auf die Röntgenabsorptionskanten in allen S-Zuständen. Im Vergleich sind die XANES-Datensätze, die bei Raumtemperatur bzw. bei 20 K gemessen worden sind, im Rahmen der Messgenauigkeit identisch, d.h. in allen S-Zuständen scheint die Lokalisation der Oxidationsäquivalente temperaturunabhängig zu sein. Darüber hinaus zeigen die Raum- und Tieftemperaturdaten dieselben spektralen Merkmale hinsichtlich der Koordinationszahl- und der Geometrie der Manganionen. Wie zu erwarten war, unterscheiden sich die bei verschiedenen Temperaturen gemessenen EXAFS-Spektren deutlich und zwar aufgrund thermisch aktivierter Unordnung (siehe auch [Meinke et al., 2000]). Die Simulationen ergeben jedoch nur unbedeutende Unterschiede in den Mangan-Ligand-Distanzen. Temperaturabhängige Änderungen des Protonierungszustandes der di- $\mu$ -oxo-Brücken können demnach ausgeschlossen werden.

## 4.4 Diskussion der Oxidationszustandsänderungen im Kok-Zyklus

Aus synthetischen Mangan-Modellkomplexen ist bekannt, dass eine Einelektronenoxidation eines Mangan-Ions eine Verschiebung der Kantenenergie des Röntgenabsorptionsspektrums um 1.6-4.8 eV hin zu höheren Energien bewirkt [Kirby et al., 1981a; Sauer et al., 1992; Bossek et al., 1996; Penner-Hahn, 1998; Visser et al., 2001; Gilbert et al., 2003]. Im Folgenden werden alle Kantenverschiebungen aus Gründen der Vergleichbarkeit auf die Änderung eines von vier Absorbern bezogen. Bezogen auf die Oxidation eines von vier Manganzentren bedeutet das also eine Verschiebung im Bereich von 0.4-1.2 eV. Für die S-Zustandsübergänge im PSII wurden in Abschnitt 4.3.1 Werte von 0.6-0.8 eV ermittelt, was die Interpretation als Einelektronenoxidation eines Manganions für die Übergänge  $S_0 \rightarrow S_1$ ,  $S_1 \rightarrow S_2$  und  $S_2 \rightarrow S_3$  nahelegt.

Diese Mangan-Oxidation im  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang ist in der Literatur umstritten [Ono et al., 1992; Roelofs et al., 1996; Iuzzolino et al., 1998; Messinger et al., 2001]. In [Iuzzolino et al., 1998] wurden Kantenverschiebungen zwischen 0.6 und 1.3 eV für die hier besprochenen S-Zustandsübergänge ermittelt, was als Resultat der Entfaltungszurückführung und der Methode zur Kantenpositionsbestimmung kritisiert wurde. Dabei wurde vor allem diskutiert, dass die relativ starke Kantenverschiebung für den  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang auf das Fehlen der im  $S_2$ -Zustand blockierten Zentren in der Entfaltung zurückzuführen sei. Diese wurde in den Ergebnissen in Tab. 4.1 (s.h. Kap. 4.2.2) explizit berücksichtigt. Die hieraus resultierende Kantenverschiebung von 0.7 eV deutet nichtsdestotrotz auf eine Manganoxidation hin.

In Abb. 7.7 (Kap. 7.2) sind zum Vergleich die Kantendifferenzspektren aus [Dau et al., 2001; Messinger et al., 2001] sowie [Haumann et al., 2005] gezeigt. Es wird deutlich, dass in allen drei Referenzen im Wesentlichen die selben Änderungen der Absorptionskantenstruktur beobachtet werden. Der Unterschied in der Interpretation kann zum großen Teil auf die unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der Kantenposition zurückgeführt werden. [Messinger et al., 2001] bestimmen mit der Methode der Nullstelle der zweiten Ableitung ("Inflection-point"-Methode) Werte von 2.1 eV ( $S_0 \rightarrow S_1$ ), 1.1 eV ( $S_1 \rightarrow S_2$ ) und 0.3 eV ( $S_2 \rightarrow S_3$ ). Wie in Kap. 3.2 sowie [Dau et al., 2003] ausführlich

erörtert wird, ist die Eignung dieser Methode für gemischtvalente Komplexe prinzipiell fraglich. Ebendort ist auch die Abhängigkeit der Ableitungsmethode von den Parametern der Kantenglättung demonstriert.

Da die Reduzierung der in den Absorptionskanten enthaltenen Informationen auf einen einzigen Parameter sehr von der verwendeten Methode abhängig ist, wurde der Versuch unternommen, detaillierteres Verständnis über die Ursachen der Kantenverschiebungen und der Änderungen der Kantenform aus *ab-initio* Simulationen zu gewinnen. Diese Herangehensweise ist ausführlich in Kapitel 7 beschrieben und findet sich in Teilen auch in [Dau, Liebisch und Haumann, 2003, 2004a] wieder. Mit Hilfe dieser Simulationen kann gezeigt werden, dass die Änderungen der Kantenstruktur im  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang mit einem Übergang eines fünffach koordinierten  $Mn^{III}$ -Ions zu einem sechsfach koordinierten  $Mn^{IV}$ -Ion erklärt werden kann.

Eine Besonderheit des  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergangs ist die auffällig starke Abnahme der Absorption bei etwa 6550 eV und die Zunahme der Absorption bei 6558 eV. Im Bild von Molekülorbitalen findet man für ein  $Mn^{III}L_5$  in quadratisch-pyramidaler Geometrie eine starke Mischung der Mn 4s -Orbitale, die ca. 5-10 eV oberhalb der 3d-Niveaus liegen, mit 4p-Orbitalen (Kap. 3.3 und [Dau et al., 2004a]). Das bewirkt eine Zunahme der ansonsten Dipol-verbotenen  $1s \rightarrow 4s$  Übergänge im  $Mn^{III}L_5$ -Komplex. Im Übergang  $Mn^{III}L_5 \rightarrow Mn^{IV}L_6$  kommt es somit zu einer drastischen Abnahme der Absorption im Bereich von 6550 eV, d.h.  $\sim 7$  eV oberhalb der  $1s \rightarrow 3d$  Übergänge, die für den Vorkantenpeak bei ca. 6543 eV verantwortlich sind. Diese qualitative Betrachtung kann mit Hilfe von Simulationen (Kap. 7) mit dem Programm FEFF 8.2 [Ankudinov et al., 1998] quantitativ bestätigt werden.

Die Annahme der Umwandlung eines  $Mn^{III}L_5$  in ein  $Mn^{IV}L_6$  befindet sich in Übereinstimmung mit den EXAFS-Ergebnissen, die im Gegensatz zu den anderen Übergängen für den  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang keine Verkürzung der mittleren Mangan-Ligand-Distanz aufweisen.

## 4.5 Änderungen der Brückenstrukturen im Kok-Zyklus

Der Abstand zweier über verbrückende Liganden verbundener Manganionen ist eng mit der Struktur dieser Brücken verbunden. Aufbauend auf der einschlägigen Literatur und auf Recherchen in der Cambridge Structural Data Base (CSD, [Allen, 2002]) lassen sich für die Interpretation der hier vorgestellten EXAFS-Ergebnisse die folgenden Schlussfolgerungen ziehen:

1. Mn-Mn Distanzen von 2.65-2.75 Å finden sich nur bei mit unprotonierten di- $\mu$ -oxo-Brücken verbundenen Manganionen, meist in der Form  $Mn-(\mu_2-O)_2-Mn$  aber auch als  $Mn-(\mu_2-O)(\mu_3-O)-Mn$  [Hagen et al., 1989b; Dau et al., 2004c].
2. Für die Protonierung eines brückenden Sauerstoffatoms wird eine Verlängerung der Mn-Mn-Distanz um etwa 0.1 Å erwartet. In einer  $Mn - (\mu - O)(\mu - OH) - Mn$ -Einheit bedeutet dies einen Abstand von 2.8-2.9 Å [Baldwin et al., 1994], ein Wert der jedoch auch in anderen strukturellen Motiven vorkommt.
3. Eine mono- $\mu$ -oxo-Brücke führt zu Abständen von 2.9-4.0 Å, auch in Gegenwart zusätzlicher eventuell mehratomiger Brückenliganden.

4. Änderungen der Mn-Mn-Abstände von mehr als 0.05 Å lassen sich nicht durch eine einfache Oxidation eines Manganions erklären, sondern weisen auf eine Änderung des Verbrückungsmodus hin.

Für den PSII-Mangankomplex ergibt sich daraus, dass die für zwei Übergänge im Kok-Zyklus (nämlich dem  $S_0 \rightarrow S_1$  sowie dem  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang) gemessene, ausgeprägte Änderung der Mn-Mn-Distanzen, als Änderung der Struktur der Brücken zwischen den Mangan-Ionen zu interpretieren ist.

Abbildung 4.7 gibt einen Überblick über die nachfolgend diskutierten Änderungen im S-Zyklus und die vermutete Beziehung zum Protonierungszustand der Mn-Liganden, die sich aus dem Vergleich von EXAFS- und XANES-Daten einerseits mit Modellkomplexen und den Ergebnissen anderer Untersuchungen andererseits ableiten lassen.

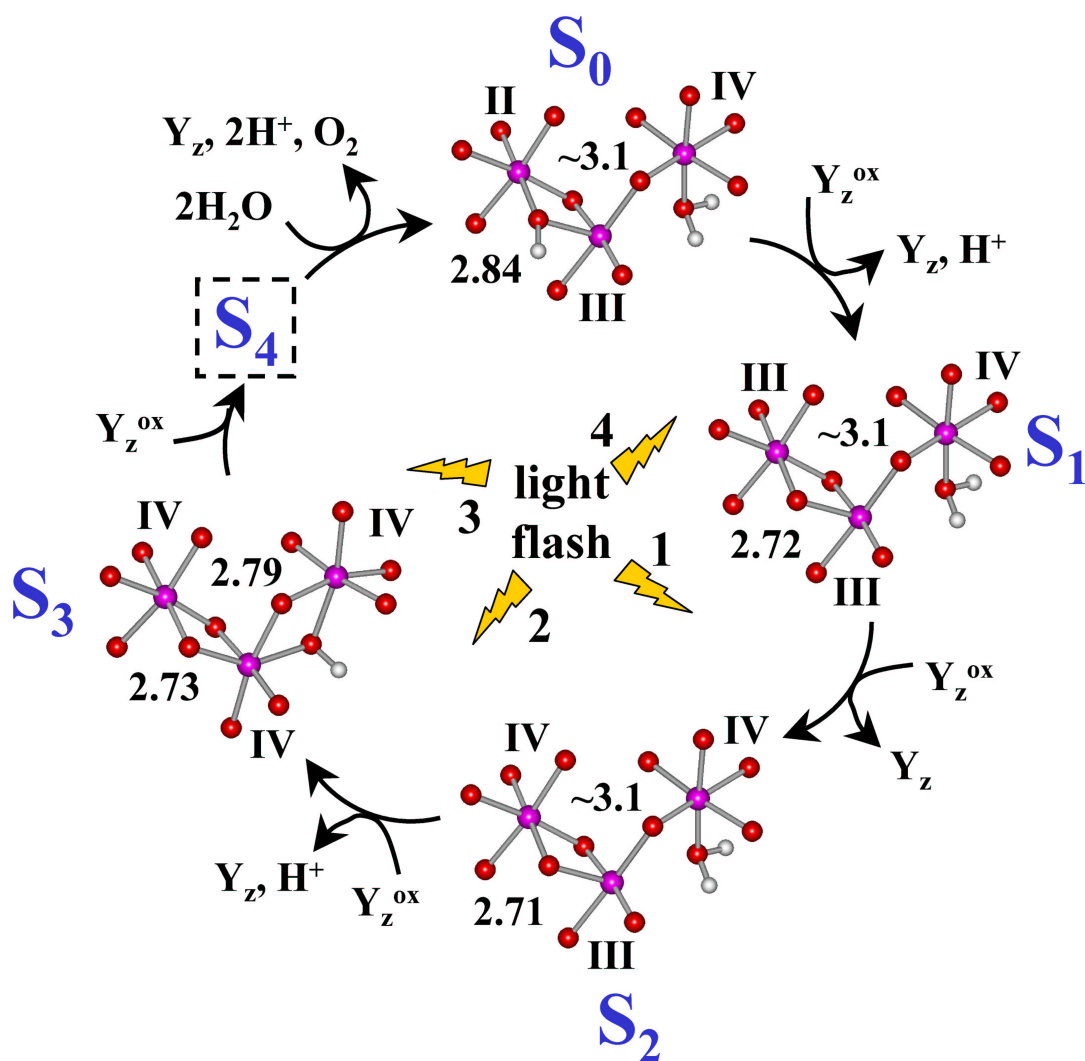
Die detaillierte Analyse der EXAFS-Daten im  $S_0$ -Zustand [Haumann et al., 2005] ergibt zwei Mn-Mn-Vektoren unterschiedlicher Länge: einen bei 2.7 Å, den anderen bei etwas mehr als 2.84 Å. Die ebenfalls mögliche Interpretation, dass ein einfacher Mn-Mn-Vektor von 2.75 Å vorliegt, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, ist aber weniger wahrscheinlich. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass im  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang eine  $Mn_2-(\mu-O)_2$ -Mn-Struktur durch die Deprotonierung einer  $Mn-(\mu-O)(\mu-OH)$ -Mn-Struktur entsteht.

Das vorgeschlagene gemeinsame Auftreten der Deprotonierung eines Brückensauerstoffatoms und einer Manganoxidation im  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang impliziert, dass der Oxidationsschritt insgesamt elektroneutral ist, sich also die Ladung des  $Mn_4$ -Komplexes nicht ändert. Diese Elektroneutralität wurde bereits zuvor anhand der Ergebnisse anderer Methoden postuliert: Einerseits wurden in Elektrochromiemessungen keine Bandenverschiebungen gefunden, die auf eine Ladungsakkumulation hindeuten und andererseits ist die Abgabe von ungefähr einem Proton pro PSII ins Medium (fast) pH-unabhängig (siehe [Lavergne und Junge, 1993; Junge et al., 2002]).

Für  $S_1 \rightarrow S_2$  wird durch die EXAFS-Ergebnisse, die eine deutliche Veränderung Mn-Mn-Distanz ausschließen, eine solche größere Strukturänderung ausgeschlossen. Bezüglich der Deprotonierung eines nicht-brückenden Liganden können aus diesen Messungen jedoch keine Aussagen getroffen werden. Allerdings wurde für diesen Übergang durch die erwähnten Elektrochromie-Experimente eine Zunahme positiver Ladung bestimmt, was gegen das gleichzeitige Auftreten einer Mangan-Oxidation und einer Deprotonierung eines Liganden spricht. Darüber hinaus vollzieht sich der  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang ohne nennenswerte Protonenfreisetzung, seine Effizienz scheint vollkommen pH-Unabhängig zu sein [Bernat et al., 2002], er geht auch bei tiefen Temperaturen vor sich [De Paula et al., 1985] und seine Aktivierungsenergie ist ungewöhnlich gering [Renger und Hanssum, 1992]. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse kann manzusammenfassend feststellen, dass im  $S_1 \rightarrow S_2$ -Übergang ein  $Mn^{III} \rightarrow Mn^{IV}$  Ein-Elektronen-Oxidationsschritt des Mangankomplexes stattfindet, der weder mit Deprotonierungen noch Änderungen der Brückenstruktur verbunden ist.

Die Auswertung kristallographisch charakterisierter Mangan-Modellkomplexe (vgl. Kap. 7.1.1) ergibt, dass der mittlere Mn-Ligand-Abstand sich für einen  $Mn^{III}O_6 \rightarrow Mn^{IV}O_6$  um 0.11 Å verkürzt. Für einen  $Mn^{III}O_5 \rightarrow Mn^{IV}O_6$ -Übergang hingegen beträgt diese Verkürzung mit 0.04 Å fast nur ein Drittel dessen. Der Übergang von fünffach koordiniertem  $Mn^{III}$  zu sechsfach koordiniertem  $Mn^{IV}$ , der aus der Analyse der XANES-Daten geschlossen werden kann (Kap. 7), ist daher im Vergleich zum Übergang ohne Koordinationszahländerung deutlich besser mit den EXAFS-Ergebnissen in Übereinstimmung, die für den  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang nahezu keine Distanzverkürzung für die erste Koordinati-





**Abbildung 4.7:** Schema der Änderungen des Mangankomplexes im Kok-Zyklus. Zur Vereinfachung sind nur drei der vier Manganionen des  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ -Komplexes dargestellt, die ausreichen um die strukturellen Änderungen zu demonstrieren (rot: Sauerstoff, violett: Mangan). Das fehlende Manganion befindet sich im  $\text{Mn}^{\text{IV}}$ -Zustand und ist mit einer  $\text{di-}\mu\text{-oxo}$ -Brücke an eins der dargestellten Manganionen gebunden. Das Kalziumion (nicht gezeichnet) ist wahrscheinlich über zwei bis vier brückende Sauerstoffe an den Komplex gebunden. Ebenfalls als Vereinfachung sind alle Mangan-Liganden als Sauerstoffatome angenommen, obwohl einige Stickstoff sein sollten. Nur die für die Diskussion relevanten Protonen sind dargestellt. Alternativ zum  $\text{Mn}(\mu_2\text{-O})_2\text{Mn}(\mu_2\text{-O})\text{Mn}$ -Motiv im  $\text{S}_1$ -Zustand ist auch ein  $\text{Mn}_3(\mu_2\text{-O})(\mu_3\text{-O})$ -Motiv denkbar, das im  $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ -Übergang in eine  $\text{Mn}_3(\mu_2\text{-O})_2(\mu_3\text{-O})$ -Struktur transformiert wird. Zur Diskussion der Strukturänderungen siehe Text.

onsschale ergeben. Die beobachtete Zunahme der Anzahl von  $2.7$  Å-Vektoren von zwei im  $\text{S}_2$  auf drei im  $\text{S}_3$  ist ein deutlicher Hinweis auf die Ausbildung eines weiteren  $\text{di-}\mu\text{-oxo}$ -verbrückten  $\text{Mn-Mn}$ -Motivs. Diese neue Struktur wird wahrscheinlich aus einem  $\text{mono-}\mu\text{-oxo}$ -Vorgänger gebildet, da dann nur ein zusätzliches Sauerstoffatom zur Brückenbildung benötigt wird. Zusammen mit dem Übergang von fünffacher zu sechsfacher Geometrie ergibt das folgendes Bild: Der terminale Sauerstoffligand eines sechsfach koordinierten  $\text{Mn}^{\text{IV}}$  besetzt die freie Bindungsstelle eines zuvor fünffach koordinierten  $\text{Mn}^{\text{III}}$  unter Aus-

bildung einer weiteren  $\mu$ -oxo-Brücke in einem zuvor über eine mono- $\mu$ -oxo-Brücke verbundenen Mn-Paar. Dieser Mechanismus erfordert nur minimale Reorganisation der Kernkoordinaten, da kein Ligandenaustausch erforderlich ist und der brückenbildende Sauerstoff schon vor dem Übergang nahe an der zukünftigen Bindungsstelle positioniert sein kann. Der Wechsel der Koordinationszahl bei der Oxidation eines fünffach koordinierten  $\text{Mn}^{\text{III}}$  erfordert oder begünstigt diese strukturellen Änderungen wahrscheinlich, da fünffache Koordination in oktaedrischer Geometrie für  $\text{Mn}^{\text{IV}}$  energetisch deutlich ungünstiger ist als sechsfache.

Die im EXAFS beobachtete Verlängerung der Mn-Mn-Distanzen von  $\sim 2.72 \text{ \AA}$  im  $\text{S}_2$  auf  $\sim 2.74 \text{ \AA}$  im  $\text{S}_3$  ist auf drei verschiedene Arten erklärlich: (1) Die Bildung einer zusätzlichen  $\mu$ -oxo-Brücke im  $\text{Mn}_4$ -Komplex könnte durch Trans-Effekte der verkürzten  $\mu$ -oxo-Sauerstoffatome eine Verlängerung bewirken (Beispiel: lineares Trimer). (2) Die Entstehung eines  $\text{Mn}_3(\mu_2\text{-O})_2(\mu_3\text{-O})$ -Motivs aus einer  $\text{Mn}_2(\mu_2\text{-O})_2$ -Vorgängerstruktur im  $\text{S}_2$  ließe ebenfalls eine Verlängerung der Mn-Mn-Distanzen erwarten. (3) Auch möglich ist die Bildung einer  $\text{Mn}_2(\mu_2\text{-O})_2(\mu_2\text{-OH})$ -Struktur im  $\text{S}_3$ , da anhand der EXAFS-Daten das Vorhandensein einer Distanz von etwa  $2.8 \text{ \AA}$  nicht ausgeschlossen werden kann. In Abb. 4.7 wurde angenommen, dass die Ausbildung der zusätzlichen Brücke durch die Deprotonierung eines terminalen Wasser- oder Hydroxoliganden erfolgt, der in eine  $\mu$ -brückende Position übergeht. Die für diesen Übergang experimentell gefundene Protonenfreisetzung und sein elektroneutraler Charakter (siehe oben) untermauern die Ladungserhaltung durch Protonenabgabe.

## 4.6 Schlussfolgerungen für den Mechanismus der Wasseroxidation

In den oxidierenden S-Zustandsübergängen,  $\text{S}_0\text{-S}_3$ , werden dem Mangankomplex durch das oxidierte Tyrosin  $\text{Y}_z^{\text{ox}}$  in sukzessiven Ein-Elektronen-Oxidationen Ladungen entzogen. Die freie Energiedifferenz für diese Übergänge beträgt etwa  $100 \text{ meV}$  [Vos et al., 1991] was bedeutet, dass das Redoxpotential für die semi-stabilen S-Zustände  $\text{S}_1\text{...S}_3$  des Mangankomplexes nur  $100 \text{ mV}$  unter dem des  $\text{Y}_z^{\text{ox}}$  ( $\sim 1 \text{ V}$ , [Vos et al., 1991; Vass und Styring, 1991; Geijer et al., 2001]) liegt. Für den  $\text{S}_0$ -Zustand beträgt die Potentialdifferenz  $\sim 250 \text{ mV}$  [Renger und Hanssum, 1992]. In einem aus stark gekoppelten Mangan-Ionen bestehenden Komplex würde jede "reine" Manganoxidation zu einem Anstieg des Redoxpotentials für den nächsten Oxidationsschritt führen. In Modellkomplexen liegt dieser Anstieg im Bereich von  $0.5 \text{ V}$  bis  $1 \text{ V}$  [Goodson et al., 1990; Mandal und Armstrong, 1995]. Wie in Kap. 5 ausführlich diskutiert wird, können Strukturänderungen wie beispielsweise die Änderung des Verbrückungsmodus oder die Deprotonierung von Liganden der Manganionen [Manchanda et al., 1991; Tanase und Lippard, 1995; Baldwin und Pecoraro, 1996; Lal und Mukherjee, 1998; Boelrijk et al., 2000] diesen Potentialanstieg verhindern.

Es tut sich also die Frage auf, wie diese relativ kleine Potentialdifferenz zum  $\text{Y}_z^{\text{ox}}$  im Mangankomplex des PSII aufrecht erhalten wird. Auf der Basis der oben diskutierten EXAFS-Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass im  $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$ -Übergang die Deprotonierung eines brückenden Hydroxids einen Potentialanstieg verhindert. Der  $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ -Übergang scheint als einziger S-Zustandsübergang eine reine Mangan-Oxidation zu beinhalten, d.h. dass in diesem Schritt keine Potential-verniedernden Strukturänderungen auftreten. Daher ist das Redoxpotential, das im  $\text{S}_2$  vorliegt, zu hoch, um eine Oxidation des Mangankomplexes durch das  $\text{Y}_z^{\text{ox}}$  in einem einfachen Elektronentransferschritt zu ermög-

lichen. Die EXAFS-Ergebnisse sowie die Resultate der in Kap. 7 dargestellten XANES-Analysen führen zu dem Vorschlag, dass der  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang sich unter Ausbildung einer zusätzlichen  $\mu$ -oxo-Brücke, verbunden mit der Deprotonierung eines Mangan-Liganden, vollzieht und dass diese Strukturänderungen vor dem Elektronentransfer stattfinden bzw. parallel zu ihm (protonengekoppelter Elektronentransfer). Diese Interpretation wird durch Experimente bestätigt, die zeigen, dass nur für den  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang die Rate des Elektronentransfers durch die Protonenfreisetzung und nicht durch die Aktivierungs- und Reorganisationsenergie bestimmt wird [Haumann et al., 1997; Hundelt et al., 1997; Renger et al., 1998].

Wie der  $S_3 \rightarrow S_4$ -Übergang vonstatten geht, kann zu diesem Zeitpunkt nicht gesagt werden. Die  $\mu$ -oxo-Brücken, die im  $S_0 \rightarrow S_1$  und im  $S_2 \rightarrow S_3$  gebildet werden, sind möglicherweise jedoch auch für den  $S_3 \rightarrow S_4 \rightleftharpoons S_0$ -Übergang, also den Sauerstoff-entwickelnden Schritt selbst, von Bedeutung. Wie in Abb. 4.7 angedeutet ist, könnten die Brücken-Sauerstoffe als intrinsische Basen dienen und die während der Wasseroxidation freierwerden Protonen aufnehmen, um so in den Ausgangszustand des Zyklus zurückzukehren. Dieser Mechanismus ist ausführlich in [Dau et al., 2001] beschrieben und würde erklären, warum die Protonen, die in der Wasserspaltung frei werden, nicht direkt ins Medium abgegeben werden [Haumann et al., 1994].

Abschließend ist anzumerken, dass der hier besprochene Mechanismus des  $Mn^{III}O_5$ - $Mn^{IV}O_6$ -Übergangs unter Ausbildung einer zusätzlichen  $\mu$ -oxo-Brücke im  $S_2 \rightarrow S_3$ -Übergang in einer DFT-Studie zu den S-Zustandsübergängen, die während der Endphase dieser Arbeit erschien, als Möglichkeit diskutiert wurde [Lundberg und Siegbahn, 2004]. Die Autoren betonen dort noch die Vorläufigkeit ihres Ergebnisses. Im Zusammenhang mit den in Kap. 7 dargelegten Argumenten gegen den von den gleichen Autoren zuvor untersuchten Mechanismus der Oxyl-Radikal-Bildung [Siegbahn und Crabtree, 1999; Siegbahn, 2000], lässt dies für die Zukunft hoffen, dass auch weitere theoretische Studien detailliertere Einsicht in die Details dieser Prozesse bringen werden.