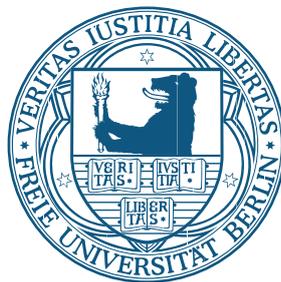


# Multifrequenz-EPR- und ENDOR-Spektroskopie am $S_2$ -Zustand des Mangankomplexes im Photosystem II

Im Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin eingereichte Dissertation

vorgelegt von  
Susanne Pudollek



Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin  
2012



Erster Gutachter: Prof. Dr. Robert Bittl  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Holger Dau  
Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2012



Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

Susanne Pudollek, Friedhelm Lenzian, Robert Bittl.  **$^{55}\text{Mn}$ -ENDOR of the  $\text{S}_2$ -state multiline signal of Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus*.** *Biochem. Soc. Trans.* 36; 1001 – 1004 (2008)

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



## Zusammenfassung

Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien nutzen die oxygene Photosynthese, um Lichtenergie in chemische Energie umzuwandeln. Der dabei aus Wasser freigesetzte Sauerstoff bildet die Grundlage des tierischen und menschlichen Lebens. Die katalytische Wasserspaltung findet im Photosystem II (PSII), einem großen Proteinkomplex, in einer zyklischen Reaktion statt. Das Zentrum der katalytischen Aktivität ist der wasseroxidierende Komplex (WOC), ein Metallkomplex aus vier Manganionen und einem Kalziumion. Der eigentliche Reaktionsmechanismus ist bisher nicht verstanden. Für die Entwicklung von Modellen ist eine genaue Kenntnis der Struktur und der Eigenschaften des WOC in den einzelnen Schritten des Zyklus unerlässlich.

Elektron-Paramagnetische-Resonanz (EPR) und verwandte Methoden nutzen die Wechselwirkung ungepaarter Elektronen mit einem Magnetfeld. Über die Messung der Energieaufspaltung der Spinzustände kann man Informationen über die Eigenschaften des paramagnetischen Zentrums und seiner unmittelbaren Umgebung gewinnen. Damit eignet sich diese Methode ideal zur selektiven Untersuchung des WOC im PSII im paramagnetischen  $S_2$ -Zustand.

Zunächst wurden Vorteile und Möglichkeiten von Multifrequenz-EPR- und -ENDOR-Methoden an einem zweikernigen Mn-Modellsystem, Mn-Katalase, demonstriert. Dabei wurden Eigenschaften und magnetische Parameter mehrkerniger Mn-Komplexe untersucht.

Diese Methoden wurden dann auf den  $S_2$ -Zustand des WOC in nativem PSII aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* und in Sr-Medium gewachsenes PSII aus *Thermosynechococcus elongatus* übertragen. Dabei stellt Strontium den einzigen bekannten funktionalen Ersatz für Kalzium dar. Der  $S_2$ -Zustand in PSII-Sr zeigt veränderte EPR- und ENDOR-Spektren im Vergleich zum nativen PSII, ist bisher aber nur unzureichend spektroskopisch charakterisiert. Mit Multifrequenz-EPR- und -ENDOR-Untersuchungen in Lösung konnten die magnetischen Parameter beider Systeme bestimmt werden. Mittels Q-Band-EPR und  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektroskopie am PSII-Einkristall konnten neben den Hauptwerten der  $^{55}\text{Mn}$ -Hyperfeinkopplungen auch deren Orientierungen im Kristallsystem bestimmt werden. Durch die Übertragung von Strukturmotiven der zweikernigen Modellkomplexe auf den WOC konnte eine Korrelation zwischen magnetischen Parametern und der geometrischen Struktur gefunden werden.

Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektroskopie des  $S_2$ -Zustands in Lösung und am PSII-Einkristall ermöglichte darüber hinaus die Charakterisierung der an den Mn-Komplex koppelnden Protonen, wobei für die drei größten Kopplungen auch deren Orientierungen im Kristallsystem gefunden wurden. Unter Verwendung theoretischer Strukturmodelle des WOC im  $S_2$ -Zustand wurde eine Zuordnung zwischen Hyperfeinkopplung und geometrischer Position für ausgewählte, den WOC ligandierende, Protonen postuliert.



## Abstract

Plants, green algae and cyanobacteria alike use oxygenic photosynthesis to transform harvested light into chemical energy. The oxygen which is released from oxidised water molecules forms the basis of animal and human life. The reaction cycle of catalytic dissociation of the water molecules takes place within a large protein complex called Photosystem II (PSII). Its catalytic center is the WaterOxidizing Complex (WOC) comprising four manganese and a calcium ion. The underlying reaction mechanism is not yet understood. The requisite for the development of appropriate models to explain its behavior is an accurate knowledge of its structure and physical/chemical properties in every step of the catalytic cycle.

Electron Paramagnetic Resonance (EPR) and related methods employ the interaction between unpaired electrons in an external magnetic field by measurement of their spin state's energy splitting. The observed energy differences carry information about the paramagnetic center and its immediate surrounding. Hence, this method is perfectly suited to selectively investigate the paramagnetic  $S_2$ -state of the WOC within PSII.

Initially, the capabilities and benefits of multi-frequency EPR and ENDOR were demonstrated on a di-manganese model system, Mn-Catalase, studying its characteristics and magnetic parameters.

These methods then were transferred onto the WOC  $S_2$ -state in native PSII from cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* and onto the same system, but grown in nutrient containing strontium exclusively, which is the only known functional replacement for calcium. In comparison to native PSII, the  $S_2$ -state of PSII-Sr exhibits changes in its EPR and ENDOR spectra. To date, these are insufficiently characterized. By means of multi-frequency EPR and ENDOR investigation of both systems in solution, their properties could be determined. Q-band EPR and  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR spectroscopy on native PSII crystals allowed for an assignment not only of the fundamental components of the  $^{55}\text{Mn}$  hyperfine couplings, but also of their orientations within the crystal frame. In analogy to structural motives from said di-manganese model systems, correlations between magnetic parameters and local structural characteristics could be found.

Q-band  $^1\text{H}$ -ENDOR spectroscopy on  $S_2$ -state in solution and in crystal permitted the characterization of nearby protons coupled to the WOC, where the three largest couplings could be oriented within the crystal frame. With the aid of theoretical structure models of the WOC in its  $S_2$ -state, an assignment of selected  $^1\text{H}$  hyperfine couplings to actual WOC ligating protons was postulated.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Photosystem II</b>	<b>17</b>
2.1	Photosynthese . . . . .	17
2.2	Der wasseroxidierende Komplex . . . . .	19
2.3	Der S <sub>2</sub> -Zustand . . . . .	25
<b>3</b>	<b>Elektron-Paramagnetische-Resonanz</b>	<b>27</b>
3.1	Der Spin-Hamiltonoperator . . . . .	27
3.2	Stark austauschgekoppelte Systeme . . . . .	30
3.3	Theorie der EPR-Spektroskopie . . . . .	31
3.4	Theorie der ENDOR-Spektroskopie . . . . .	34
3.4.1	Analyse von <sup>1</sup> H-ENDOR-Spektren . . . . .	35
3.4.2	Analyse von <sup>55</sup> Mn-ENDOR-Spektren . . . . .	37
3.5	Relaxation . . . . .	38
3.6	Methoden der Puls-EPR . . . . .	40
3.6.1	Hahn-Echo-Experiment . . . . .	41
3.6.2	Davies-ENDOR . . . . .	42
3.6.3	Mims-ENDOR . . . . .	45
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>47</b>
4.1	Probenpräparation . . . . .	47
4.2	EPR- und ENDOR-Experimente . . . . .	48
4.3	Simulationen . . . . .	50
<b>5</b>	<b>EPR- und <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektroskopie des Mn(III)Mn(IV)-Zustands der Mn-Katalase</b>	<b>53</b>
5.1	Einführung . . . . .	53
5.2	Multifrequenz-EPR am Modellsystem . . . . .	56
5.3	Multifrequenz- <sup>55</sup> Mn-ENDOR am Modellsystem . . . . .	58

5.4	Zusammenfassung . . . . .	67
<b>6</b>	<b>EPR- und <math>^{55}\text{Mn}</math>-ENDOR-Spektroskopie des <math>\text{S}_2</math>-Zustands in PSII</b>	<b>69</b>
6.1	Multifrequenz-EPR des $\text{S}_2$ -Zustands in PSII . . . . .	70
6.2	Multifrequenz- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR des $\text{S}_2$ -Zustands in PSII . . . . .	75
6.3	Q-Band-EPR- und $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR am PSII-Einkristall . . . . .	91
6.4	Diskussion . . . . .	113
<b>7</b>	<b>Multifrequenz-EPR- und <math>^{55}\text{Mn}</math>-ENDOR-Spektroskopie des <math>\text{S}_2</math>-Zustands in PSII-Sr</b>	<b>117</b>
7.1	Multifrequenz-EPR des $\text{S}_2$ -Zustands in PSII-Sr . . . . .	118
7.2	Multifrequenz- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR des $\text{S}_2$ -Zustands in PSII-Sr . . . . .	123
7.3	Diskussion . . . . .	129
<b>8</b>	<b><math>^1\text{H}</math>-ENDOR-Spektroskopie des <math>\text{S}_2</math>-Zustands in PSII</b>	<b>133</b>
8.1	Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR in PSII . . . . .	135
8.2	Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR an PSII-Sr . . . . .	148
8.3	Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR am PSII-Einkristall . . . . .	150
8.4	Diskussion . . . . .	159
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>165</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>167</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>169</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien nutzen Lichtenergie zum Aufbau von Biomasse und produzieren dabei Sauerstoff. Damit bildet diese sogenannte oxygene Photosynthese die Grundlage des tierischen und menschlichen Lebens auf der Erde.

Während der Photosynthese werden Wasser und Kohlenstoffdioxid unter Ausnutzung der Lichtenergie in Kohlenhydrate und Sauerstoff umgewandelt. Der primäre Prozeß findet in einem großen Proteinkomplex der Thylakoidmembran, dem Photosystem II (PSII), statt. Dabei wird Lichtenergie zur Ladungstrennung genutzt und Reduktionspotential aufgebaut. Elektronen werden von einem Metallkomplex aus vier Manganionen und einem Kalziumion bereitgestellt. Dieser Komplex katalysiert die Spaltung von Wasser in Sauerstoff, Protonen und Elektronen.

Die Wasserspaltung findet in einem Zyklus über fünf sogenannte S-Zustände  $S_{0-4}$  statt. In den Zuständen wird der wasseroxidierende Komplex (WOC) schrittweise oxidiert, im postulierten  $S_4$ -Zustand wird spontan Sauerstoff freigesetzt.

Für ein genaues Verständnis der einzelnen Reaktionsschritte während der Wasserspaltung und die Entwicklung eines Modells sind Kenntnisse der Eigenschaften und der Struktur des WOC in jedem der S-Zustände Voraussetzung.

Zwar konnte kürzlich die Struktur des WOC mittels Röntgenkristallographie bestimmt werden [1], die Röntgenkristallstruktur stellt dabei jedoch nur eine Momentaufnahme des WOC dar. Für ein Verständnis des Reaktionsmechanismus ist jedoch die Kenntnis über Umstrukturierungen des WOC im Laufe des Reaktionszyklus notwendig. Die in der Röntgenkristallographie verwendeten experimentellen Bedingungen führen zudem insbesondere im Bereich des WOC zu Strahlenschäden [2]. Dabei werden die Manganionen zu  $Mn^{2+}$  reduziert, was eine Umordnung des WOC und Störungen der Ligandensphäre nach sich ziehen kann. Die Charakterisierung der Eigenschaften und Struktur des WOC in den verschiedenen S-Zuständen muß daher durch andere spektroskopische Methoden

erfolgen.

Methoden der Elektron-Paramagnetischen-Resonanz (EPR) sind, anders als beispielsweise optische Spektroskopie, nur auf das paramagnetische Zentrum und dessen unmittelbare Umgebung empfindlich. Dadurch sind sie ideal geeignet, den WOC in seinen paramagnetischen Zuständen zu untersuchen. EPR ist eine Magnetresonanzspektroskopie, die Übergangsenergien paramagnetischer Zentren in einem äußeren Magnetfeld detektiert. Darüber können Informationen über Zusammensetzung, Oxidationszustände und Umgebung des paramagnetischen Zentrums gewonnen werden. Verwandte Methoden wie Elektron-Kern-Doppelresonanz-Spektroskopie (ENDOR) ermöglichen die direkte Detektion der Wechselwirkungen umliegender Kernspins mit dem paramagnetischen Zentrum. Diese erlauben weitere Rückschlüsse auf die Umgebungsgeometrie des Zentrums.

Der  $S_2$ -Zustand des WOC mit einem effektiven Spin  $S = 1/2$  kann experimentell einfach und in hoher Konzentration präpariert werden. Der  $S_2$ -Zustand wurde in zahlreichen EPR- und ENDOR-Studien untersucht. Dabei ist eine Interpretation der experimentellen Daten aufgrund der Komplexität des Systems schwierig. In bisherigen Arbeiten konnten insbesondere die Oxidationszustände der Manganionen des WOC im  $S_2$ -Zustand bestimmt werden. Eine weitergehende Korrelation zwischen elektronischer und geometrischer Struktur, z. B. die Identifikation der einzelnen Manganionen in der Struktur, war bisher nur auf der Basis theoretischer Modellstrukturen möglich. Eine anhaltende Diskussion der Ligandensphäre des WOC, die aus den Röntgenkristallstrukturen nicht selektiv für einzelne S-Zustände ermittelt werden kann, erschwert dabei die Entwicklung und Bewertung der Modelle ebenso wie die Vielzahl der veröffentlichten magnetischen Parametersätze für den  $S_2$ -Zustand des WOC. Darüber hinaus ist die Mehrzahl der Studien sind an pflanzlichem PSII durchgeführt. Es ist seit längerem bekannt, daß sich die EPR-Spektren des  $S_2$ -Zustands in pflanzlichem und cyanobakteriellem PSII unterscheiden [3]. Da Röntgenkristallstrukturen nur für cyanobakterielles PSII existieren, ist eine Charakterisierung dieser Systeme besonders wichtig, da nur in diesen eine direkte Korrelation der magnetischen Parameter zur Struktur möglich ist.

Nach einer kurzen Einführung zum wasseroxidierenden Komplex und insbesondere dem  $S_2$ -Zustand werden die in dieser Arbeit verwendeten EPR- und ENDOR-Methoden vorgestellt. Das Potenzial dieser Methoden wird in einem Multifrequenzansatz an einem zweikernigen Mn-Modellsystem demonstriert. Zusätzlich werden die magnetischen Parameter des Modellsystems bestimmt und Korrelationen zwischen elektronischer und geometrischer Struktur hergestellt. Insbesondere durch orientierungsselektive Multifrequenz-ENDOR-Messungen konnten die Orientierungen der Hyperfein- und Quadrupolkopplun-

gen der Manganionen des Systems bestimmt werden, die zum Teil deutlich von bisherigen vereinfachenden Annahmen abweichen.

Diese Methoden werden danach auf den  $S_2$ -Zustand des WOC in PSII übertragen. Multifrequenz-EPR- und insbesondere -ENDOR-Messungen am  $S_2$ -Zustand stellen aufgrund der großen spektralen Breite der Signale und dem damit einhergehenden beschränkten Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/R) große Anforderungen an Empfindlichkeit und Stabilität der experimentellen Aufbauten. Neben der belastbaren Bestimmung von Hyperfeinparametern der Manganionen des WOC im  $S_2$ -Zustand konnten mittels  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektroskopie am PSII-Einkristall auch Orientierungen der Hyperfeinkopplungen im Kristallsystem gefunden werden. Aus diesen experimentellen Ergebnissen konnte über Vergleiche mit zweikernigen Modellsystemen eine Zuordnung der magnetischen Parameter zur Struktur erfolgen.

Kalzium ist ein essentieller Kofaktor des WOC, da die Entfernung des Kalziumions den Verlust der katalytischen Aktivität zur Folge hat. Dabei ist die Funktion des Kalziumions im WOC bei der Wasserspaltung bisher nicht verstanden. Der einzige bekannte funktionale Ersatz für Kalzium ist Strontium. Der  $S_2$ -Zustand des WOC von in Sr-Medium gezogenem PSII zeigt unter anderem gegenüber dem nativen System veränderte EPR- und  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren. Die hier erstmalig durchgeführten W-Band-EPR- und W-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Untersuchungen an in Sr-Medium gezogenem PSII (PSII-Sr) aus *Thermosynechococcus elongatus* ermöglichten zusammen mit dem Multifrequenzansatz eine belastbare Charakterisierung der magnetischen Parameter.

Das letzte Kapitel beschäftigt sich mit der Untersuchung der Protonenumgebung des Mn-Komplexes mittels gepulster  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektroskopie. In dieser Arbeit wird diese Methode erstmals auf PSII aus *Thermosynechococcus elongatus* angewendet. Die Bestimmung der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen des WOC im  $S_2$ -Zustand und insbesondere die Bestimmung der Orientierung der drei größten  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen mittels  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektroskopie am PSII-Einkristall bieten weitere Möglichkeiten zur Überprüfung von theoretischen Modellstrukturen und damit die Basis für die Entwicklung eines Modells des Reaktionsmechanismus.



# Kapitel 2

## Photosystem II

### 2.1 Photosynthese

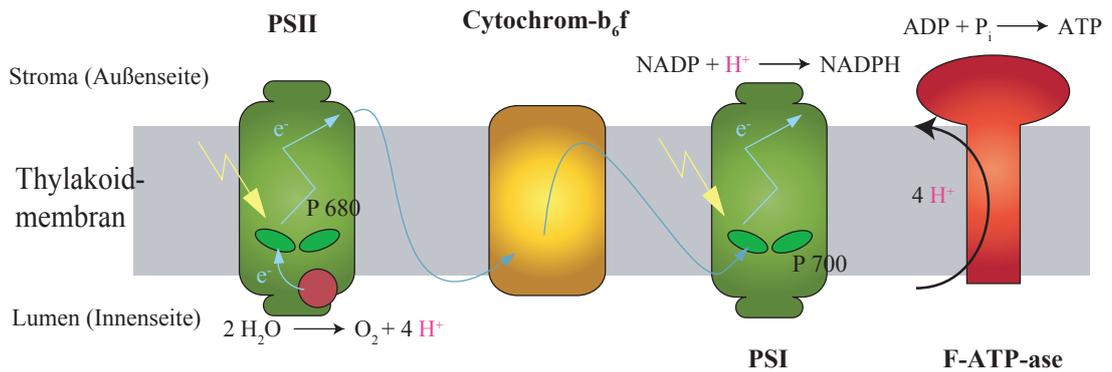
#### Allgemeine Grundlagen

Cyanobakterien, Grünalgen und Pflanzen wandeln Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) in Kohlenhydrate um, aus denen sie ihre Biomasse aufbauen. Dabei wird Sauerstoff freigesetzt. Die oxygene Photosynthese, die dies ermöglicht, stellt damit die Grundlage für tierisches Leben auf der Erde dar. Energie für die Bildung neuer Biomasse kommt aus dem Licht.

Die Umwandlung der elektromagnetischen Energie des Lichts in chemische Energie wird als Primärreaktion bezeichnet, die Bildung der Kohlenhydrate findet lichtunabhängig während der Dunkelreaktion statt [4].

Die Primärreaktion findet in der Thylakoidmembran statt. In Pflanzen und Grünalgen befindet sich diese Membran vielfach aufgeschichtet in den Chloroplasten [5]. In Cyanobakterien sitzen diese Membranen paarweise konzentrisch angeordnet im Zellinneren [6]. Der Zwischenraum dieser Membranpaare stellt den Innenraum, das Lumen, dar, außerhalb liegt das Cytoplasma. Mehrere große Proteinkomplexe, die an der Primärreaktion beteiligt sind, sind in die Thylakoidmembran eingebettet und in Abb. 2.1 schematisch skizziert: PSII, Cytochrom- $\text{bf}_6$ , PSI und F-ATP-ase. Für eine effiziente Lichtabsorption der Photosysteme sorgen zusätzliche Lichtsammelkomplexe, sogenannte Phycobilisome, die im Cytoplasma an die Photosysteme binden.

In einem ersten Schritt der Primärreaktion wird absorbierte Lichtenergie im PSII zur Ladungstrennung genutzt [7]. Auf der Lumenseite wird Wasser gespalten, die Elektronen werden über die Membran zu Plastochinon, das als mobiler Elektronentransporter fungiert, transportiert, während die Protonen in das Lumen abgegeben werden. Plasto-



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung der an der Photosynthese beteiligten Proteine in der Thylakoidmembran.

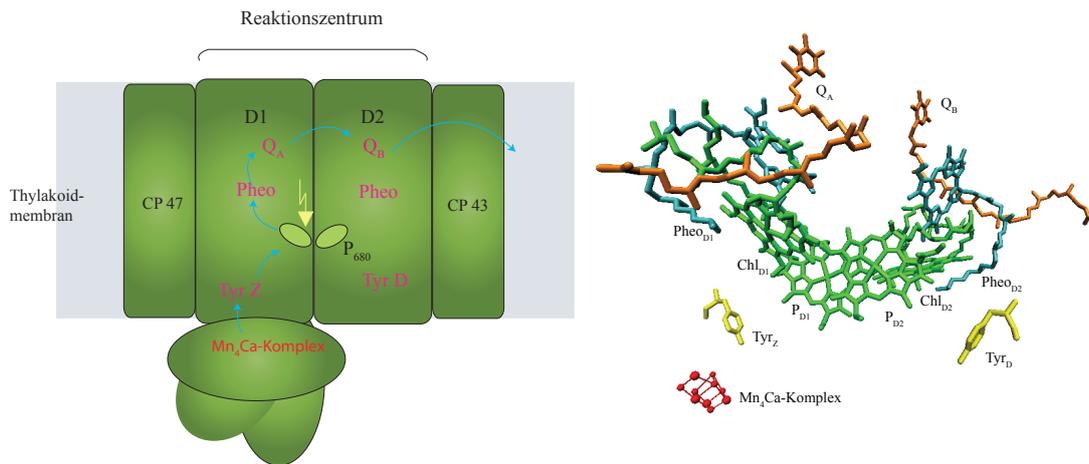
chinon transportiert die Elektronen über den Cytochrom- $b_6f$ -Komplex zum PSI. Auch dieses Protein nutzt Lichtenergie zur Ladungstrennung über die Membran. Hier reduzieren die Elektronen Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat ( $\text{NADP}^+$ ) zu NADPH. Der durch diese Prozesse über die Membran aufgebaute Protonengradient wird vom F-ATP-ase Komplex zur Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) genutzt. In den folgenden Dunkelreaktionen dienen NADPH und ATP zur Reduktion von  $\text{CO}_2$  und dem Aufbau von Kohlenhydraten im Rahmen des Calvinzyklus.

## Photosystem II

Photosystem II ist das einzige Protein, welches Wasser spalten kann und bildet damit das Zentrum der oxygenen Photosynthese. Das Protein liegt in der Thylakoidmembran als Homodimer vor und besteht aus 19 Untereinheiten [1, 7]. Das eigentliche Reaktionszentrum (siehe Abb. 2.2), in dem Ladungstrennung und Wasserspaltung stattfinden, findet sich in den Untereinheiten D1 und D2, die quasi symmetrisch aufgebaut sind.

Das Zentrum der Elektronentransferkette stellt der primäre Elektronendonator  $\text{P}_{680}$  dar, der von vier Chlorophyllen gebildet wird. Das Elektron wird nach Lichtanregung über ein Pheophytin zu einem gebundenen Chinonkofaktor  $\text{Q}_A$  weitergeleitet. Das schwach gebundene Plastochinon  $\text{Q}_B$  verläßt nach einer Reduktion durch zwei Elektronen als  $\text{Q}_B\text{H}_2$  die Bindungstasche des PSII.

Der Donorteil der Elektronentransportkette des PSII reduziert den primären Donor



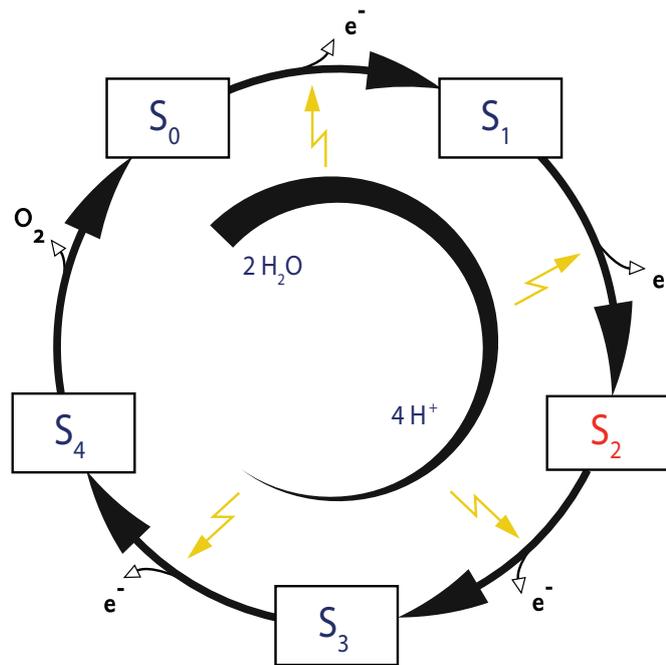
**Abbildung 2.2:** Links: Schematische Darstellung der Elektronentransferkette im PSII. Rechts: Strukturbild der am Elektronentransfer beteiligten Kofaktoren nach [1].

$P_{680}^+$  über ein redoxaktives Tyrosin  $Y_Z$ . Dieses wiederum bildet das Bindeglied zum wasseroxidierenden Komplex (WOC), der über die Spaltung von Wasser Sauerstoff und Elektronen produziert.

Pflanzliches und cyanobakterielles PSII zeigen große Ähnlichkeiten, insbesondere das Reaktionszentrum ist über alle Spezies sehr homolog und die Positionen und Orientierungen der Kofaktoren der Elektronentransferkette sind sehr vergleichbar [8]. Dennoch gibt es bedeutsame Unterschiede, z.B. sind zwei der extrinsischen, den WOC stabilisierenden Untereinheiten nicht gleich [8,9]. Auch spektroskopisch wurden kleine Unterschiede in der elektronischen Struktur des WOC zwischen PSII-Präparationen aus Spinat und aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* gefunden [3]. Kristalle und damit hochaufgelöste Strukturinformationen konnten bisher nur für PSII aus thermophilen Cyanobakterien gewonnen werden. Um direkt spektroskopische Daten mit der Kristallstruktur vergleichen zu können, wurden in dieser Arbeit alle Untersuchungen an PSII-Präparationen aus *Thermosynechococcus elongatus* durchgeführt.

## 2.2 Der wasseroxidierende Komplex

Der wasseroxidierende Komplex (WOC) ist das eigentliche Herzstück des PSII. Dieser Komplex katalysiert die Wasserspaltung in Protonen und Sauerstoff. Erste Untersuchungen der Sauerstoffproduktion von Chloroplasten [10] zeigten, daß die Produktion von



**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung des Kok-Zyklus. Der postulierte, transiente Zustand  $S_4$  geht spontan unter Freisetzung von einem Molekül Sauerstoff in den  $S_0$ -Zustand über. Im Verlauf des Kok-Zyklus binden zwei Wassermoleküle, der genaue Bindungszeitpunkt wird debattiert, ebenso die Abgabe der vier Protonen.

Sauerstoff abhängig von der Zahl der Lichtblitze ist und die Reaktion über mehrere Schritte läuft. Kok *et al.* stellten das Modell der S-Zustände vor, das heute als Kok-Zyklus bekannt ist und in Abb. 2.3 gezeigt ist. Mit der aufeinanderfolgenden Absorption von vier Photonen gelangt der WOC vom Ausgangszustand  $S_0$  über  $S_{1-3}$  zum transienten Zustand  $S_4$ , wo die Wasserspaltung und Freisetzung von Sauerstoff erfolgen soll. Die metastabilen S-Zustände  $S_{0-3}$  können präpariert werden, der transiente Reaktionsschritt  $S_4$  konnte bisher nicht beobachtet werden. Dabei ist  $S_1$  der dunkelstabile Zustand, in den alle anderen Zustände mit unterschiedlichen Raten relaxieren. Der  $S_2$ -Zustand kann einfach und in praktisch allen Zentren durch Beleuchtung der Probe mit weißem Licht bei etwa 200 K präpariert werden [11], da bei dieser Temperatur der Elektronentransfer von  $Q_A$  zum  $Q_B$  blockiert ist [12, 13].

Im Lauf der PSII-Forschung gelang es erst recht spät, Kristalle zu züchten und per Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen. Bisher sind nur aus thermophilen Bakterien, insbesondere von *Thermosynechococcus elongatus* Kristalle entstanden. Die erste vollständige Röntgenstruktur mit 3,7 Å Auflösung aus dem Jahr 2001 [14] erlaubte die Untersuchung des genauen Aufbaus der verschiedenen Untereinheiten und zeigte die Hauptkomponenten der Elektronentransportkette. Dabei bestätigten sich strukturelle Motive der Kofaktoren, die bereits aufgrund von verschiedensten spektroskopischen Untersuchungen und aus Analogien zu bakteriellen Reaktionszentren vorhergesagt wurden [15, 16]. Bis auf die neueste Struktur von 2011 [1] war die Auflösung aber stets zu gering, um Aussagen zum genauen Aufbau des Mn-Komplexes und seiner Proteinumgebung treffen zu können.

In Abb. 2.4 ist der WOC, also der  $Mn_4$ -Ca-Komplex mit umliegender Proteinumgebung nach [1] gezeigt. Diese ist die erste Röntgenstruktur, die mit einer Auflösung von 1,9 Å eine Abbildung der Struktur des Mn-Komplexes inklusive verbrückender Sauerstoffkerne und eine Identifizierung möglicher Liganden erlaubt.

Der Mn-Komplex ist ein verzerrtes Kuban, das von drei Manganionen Mn1-Mn3, dem Kalziumion sowie vier Sauerstoffionen O1-O3 und O5 gebildet wird. Das vierte Manganion Mn4 ist über das Sauerstoffion O5 des Kuban und ein weiteres außerhalb dessen (O4) verbrückt, so daß alle Mn-Ionen durch di- $\mu$ -oxo Brücken verbunden sind. Das Kalziumion ist durch seine Eckposition im Kuban über oxo-Brücken mit allen vier Manganionen verbunden. Umliegend sind die nächsten Aminosäuren sowie das  $Y_2^\bullet$  gezeigt. Zusätzlich wurden in der Struktur vier, am Komplex koordinierte Wassermoleküle W1-W4 gefunden, deren Protonierungszustände allerdings unbekannt sind, da Protonen nicht aufgelöst werden können.

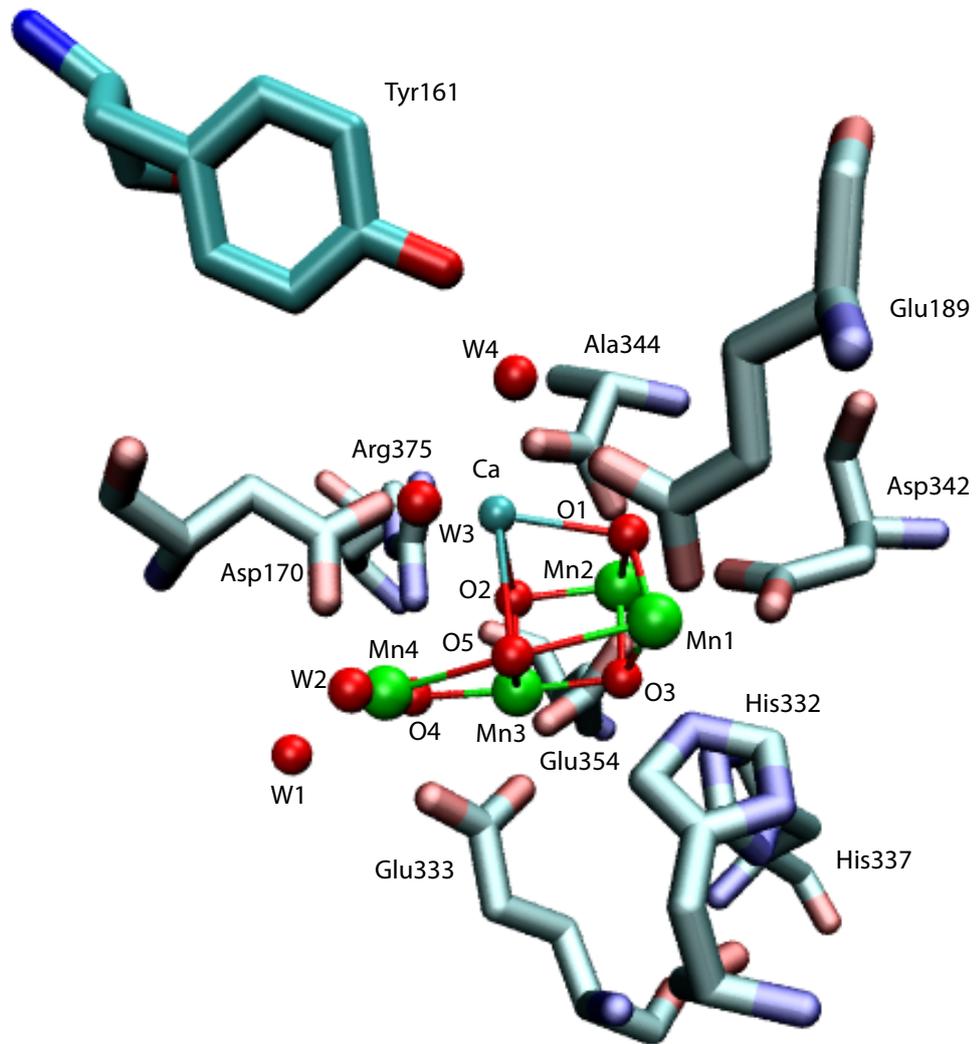


Abbildung 2.4: Strukturbild des Mn-Komplexes mit umliegenden Liganden nach [1].

Der Mechanismus der Wasserspaltung ist trotz intensiver Forschung nicht geklärt und verstanden. Eine möglichst detaillierte Charakterisierung der einzelnen S-Zustände ist für theoretische Modelle des Mechanismus daher unerlässlich. Die Röntgenkristallographie zeigt nur eine Momentaufnahme des Komplexes. Zusätzlich ist der Komplex durch auftretende Strahlenschäden [2] in einem unbekanntem Oxidationszustand, da insbesondere die Manganionen durch die Röntgenstrahlung zu Mn(II) reduziert werden. Daher ist die spektroskopische Charakterisierung des Mn-Komplexes in seinen einzelnen Zuständen ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der katalytischen Wasserspaltung.

Mit Röntgenspektroskopiemethoden wie EXAFS und XANES wurde insbesondere die detaillierte Geometrie des Mn-Komplexes im Verlauf des Kok-Zyklus untersucht [17–19] und aus Simulationen mögliche Strukturmodelle entwickelt. Dabei wurden spektrale Unterschiede der einzelnen Zustände mehrheitlich auf strukturelle Umordnungen des Mn-Komplexes während des Kok-Zyklus zurückgeführt.

Im Fokus zahlreicher FTIR-Untersuchungen stand die Ligandenstruktur des Mn-Komplexes [20, 21]. Über die Mutation verschiedener Aminosäuren im Umkreis des WOC wurden mögliche Liganden und Umstrukturierungen der Bindungen in den einzelnen Zuständen identifiziert. Dabei beruhen diese Schlußfolgerungen auf der Annahme, daß die Änderungen der Oxidationszustände einzelner Manganionen im Verlauf des Kok-Zyklus eine Änderung der Schwingungsmoden der direkten Liganden nach sich zieht. Die starke Kopplung des Mn-Komplexes mit delokalisierten Ladungszuständen könnte aber zu einer Unempfindlichkeit auf die lokalen Oxidationszustandsänderungen der FTIR Messungen führen. Diese Überlegungen erklären möglicherweise die zum Teil widersprüchlichen Ligandenvorschläge und abgeleitete Oxidationsmuster für den Mn-Komplex in den S-Zuständen.

EPR ist durch die selektive Empfindlichkeit für die Umgebung eines paramagnetischen Zentrums eine ideale Methode zur Untersuchung des WOC. Alle metastabilen Zustände des Mn-Komplexes wurden mit EPR und verwandten Methoden charakterisiert [22–24]. Dabei sind die Zustände  $S_2$  und  $S_0$  mit einem Spin  $S = 1/2$  besonders eingehend studiert. Auf Grundlage der experimentellen Befunde mit EPR und verwandten Methoden wurden die Oxidationszustände der Manganionen im  $S_2$ -Zustand zu Mn(III)Mn(IV)<sub>3</sub> bestimmt, über die Oxidationsstufen im  $S_0$ -Zustand hat sich noch kein Konsens auf Basis experimenteller Ergebnisse herausgebildet [25].

Einen großen Einfluß auf die Entwicklung detaillierter Strukturmodelle der einzelnen S-Zustände sowie von Modellen des Reaktionsmechanismus der katalytischen Wasserspaltung auf Basis der zahlreichen experimentellen Befunde zum WOC haben theore-

tische Studien [26–29]. Es sind verschiedene Reaktionsmechanismen der Bildung der O<sub>2</sub>-Bindung auf Basis verschiedener experimenteller Daten sowie den verschiedenen Kristallstrukturen vorgeschlagen worden. Darunter sind Mechanismen auf Basis einer Kopplung zweier Oxyradikale, eine Reaktion über Mn-gebundene Oxo-Liganden oder die Reaktion terminal gebundenen Wassers mit einer terminalen Mn(V)-O Form [29].

Für die Beurteilung dieser möglichen Modelle des Wasserspaltungsmechanismus sind insbesondere Untersuchungen zu Fragen der Substrattransportpfade, des Zeitpunktes sowie Ortes der Substratbindung wichtig. Verschiedene Studien an PSII-Mutanten [21] und Untersuchungen zum Einfluß kleiner Moleküle wie Ethanol, Acetat u.a. [30] zeigen die Bedeutung des Wasserstoffbrückennetzwerks in der Umgebung des WOC und der Substratkanäle für die Funktionsfähigkeit der katalytischen Wasserspaltung. Der Frage der Substratkanäle widmen sich unter anderem theoretische Modellierungen auf Basis der Kristallstruktur [31]. Ein ganzes Kanalsystem mit mehreren Seitenarmen wurde in den Kristallstrukturen identifiziert, wobei die jeweilige Spezifität für die verschiedenen Reaktionsprodukte wie O<sub>2</sub> oder Protonen intensiv debattiert wird. Daneben beschäftigen sich zahlreiche spektroskopische Untersuchungen mit der Substratbindung [25]. Über zeitaufgelöste Massenspektroskopie wurden zwei in ihrer Zeitkonstante deutlich unterschiedliche Substratbindungsstellen gefunden. Ein Substratwasser bindet dabei bereits im S<sub>0</sub>-Zustand, über den Bindungszeitpunkt des zweiten Substratwassers wird derzeit noch debattiert. EPR- und FTIR-Studien [24, 25] zeigten einen solvatisierten Mn-Komplex und auch die neueste Röntgenstruktur fand mehrere Wasser in der Umgebung des Mn-Komplexes. Dabei ist jedoch der Protonierungsgrad dieser Wasser in der Struktur sowie die Zuordnung zu den Substratwassern unbekannt.

Im Rahmen dieser Fragestellung wurde auch der Einfluß kleiner Moleküle wie Ethanol, Acetat und anderen sowie die Rolle des Kalziumions auf Struktur und Funktion des WOC intensiv untersucht [24, 30, 32]. Die Substitution des Kalziumions durch verschiedene andere Elemente, unter denen nur bei Strontiumsubstitution die Funktionsfähigkeit erhalten bzw. wiederhergestellt wird, weist auf eine mögliche Substratbindungsstelle am Kalziumion bzw. auf dessen Rolle beim effektiven Abtransport von Protonen zur Aufrechterhaltung des Kok-Zyklus hin.

Die Frage nach dem Reaktionsmechanismus der Wasserspaltung ist über theoretische Rechnungen und Modelle eng mit einer möglichst genauen Kenntnis der elektronischen und geometrischen Struktur des WOC in den einzelnen S-Zuständen verknüpft.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher EPR-Methoden zur Untersuchung des WOC im S<sub>2</sub>-Zustand durchgeführt, um Fragestellungen nach den Oxidationsstufen der Mangan-

ionen und möglicher Substratbindungsstellen zu beantworten. Der S<sub>2</sub>-Zustand wird im Folgenden insbesondere im Hinblick auf frühere Untersuchungen mit EPR-Spektroskopie kurz vorgestellt.

## 2.3 Der S<sub>2</sub>-Zustand

Der erste Nachweis eines mit dem Mn-Komplex im S<sub>2</sub>-Zustand verknüpften EPR-Signals erfolgte 1980 durch Dismukes *et al.* [33] in pflanzlichem PSII. Das Signal um  $g = 2$  mit etwa 20 aufgelösten Linien im cw-EPR-Spektrum wurde S<sub>2</sub>-Multiline-Signal (S<sub>2</sub>-MLS) genannt. Das Signal stammt von einem System im Grundzustand mit Spin  $S = 1/2$  [34]. Neben dem S<sub>2</sub>-MLS wurden mehrere weitere mit dem Mn-Komplex im S<sub>2</sub>-Zustand verknüpfte Signale gefunden, deren Auftreten und Intensität zum Teil von der PSII-Präparation abhängt und die durch Belichtung mit Infrarotlicht (IR) bei tiefen Temperaturen erzeugt werden können [35–38].

Zahlreiche Versuche, das S<sub>2</sub>-MLS zu simulieren führten zu verschiedenen Parametersätzen und Kopplungsmodellen des Mn-Komplexes im S<sub>2</sub>-Zustand. Dabei gab es neben dem Vorschlag eines Dimer-Modells [39] insbesondere Diskussionen über die Oxidationsstufen der Manganionen in einem gekoppelten Mn-Tetramer als Ursprung des S<sub>2</sub>-MLS [40–42]. Mit der Untersuchung des S<sub>2</sub>-MLS mit <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektroskopie bildete sich ein Konsens über den Ursprung des S<sub>2</sub>-MLS in einem Mn-Tetramer und über die Oxidationsstufen der Manganionen im S<sub>2</sub>-Zustand von Mn(III)Mn(IV)<sub>3</sub> [43–45].

Einige Studien beschäftigten sich mit dem Vergleich der S<sub>2</sub>-Zustände in pflanzlichem und cyanobakteriellem PSII. Dabei gibt es neben Unterschieden in den magnetischen Parametern des S<sub>2</sub>-MLS [46–48] in den Spezies unterschiedliche weitere mit dem S<sub>2</sub>-Zustand verknüpfte Signale [49–51]. Röntgenkristallstrukturen existieren nur von cyanobakteriellem PSII aus *Thermosynechococcus elongatus* existieren. Studien an diesem System sind also besonders wichtig, da nur in Systemen aus *Thermosynechococcus elongatus* eine direkte Vergleichbarkeit spektroskopischer Ergebnisse mit Strukturdaten gegeben ist.

Die Funktion des Kalziumions und seine Bedeutung für die Funktionsweise des WOC ist in Studien an Präparationen ohne Kalzium bzw. mit verschiedenen Substituten untersucht worden [3, 52]. Der einzige funktionale Ersatz für Kalzium ist Strontium. Dabei zeigt sich in Sr-ausgetauschtem PSII ein verändertes S<sub>2</sub>-MLS, das kürzlich im Vergleich zum S<sub>2</sub>-MLS aus nativem PSII aus *Thermosynechococcus elongatus* mittels X- und Q-Band-EPR sowie Q-Band-ENDOR-Spektroskopie charakterisiert wurde [53].

Die Auswirkungen einer Reihe von Zusätzen wie kleine Alkohole, Acetat u.a. auf den

Mn-Komplex im  $S_2$ -Zustand wurde von vielen Gruppen neben der Beeinflussung der magnetischen Parameter [54, 55] des Komplexes insbesondere im Hinblick auf die Bindung dieser Moleküle am WOC untersucht. Für praktisch alle der untersuchten kleinen Moleküle wurde eine Bindung nahe dem Mn-Komplex gefunden [56–60], davon ausgehend wurden mögliche Bindungsstellen von Substratwasser diskutiert. Daneben wurde die Bindung von Substratwasser mit verschiedenen EPR-Methoden in nativem PSII bzw. mit  $D_2O$  oder  $H_2^{17}O$  ausgetauschten Proben untersucht [61–66]. Diese Studien fanden zum Teil sehr unterschiedliche Anzahlen der an den WOC gebundenen Protonen und verschiedene Hyperfeinkopplungen. Untersuchungen zu möglichen Liganden des Mn-Komplexes konzentrierten sich insbesondere auf die Bindung von Histidin an den Mn-Komplex. Dabei wurde His332 als Ligand eines Manganions gefunden [67–71]. Weitere Liganden sind über Studien an PSII-Mutanten vorgeschlagen [71–75], die spektroskopischen Ergebnisse werden aber zum Teil widersprüchlich diskutiert.

Diese umfangreichen Untersuchungen des  $S_2$ -Zustandes des Mn-Komplexes zeigen das große Wissen, das bereits zu diesem S-Zustand zusammengetragen wurde. Aufgrund der Komplexität des Systems sind aber die Interpretationen der zahlreichen spektroskopischen Befunde in Hinblick auf Struktur und Funktion im Kok-Zyklus nicht eindeutig. Weitere spektroskopische Untersuchungen sind daher für eine Verfeinerung der Modelle des Mn-Komplexes unerlässlich. Im Rahmen dieser Arbeit wird insbesondere nur mit PSII aus *Thermosynechococcus elongatus* gearbeitet, da für dieses System eine hochaufgelöste Kristallstruktur existiert, mit der spektroskopische Daten korreliert werden können. EPR und verwandte Methoden sind dabei ideal, den paramagnetischen  $S_2$ -Zustand mit seinem Spin  $S = 1/2$  zu untersuchen. Diese Methoden bieten sowohl einen Zugang zur magnetischen und damit elektronischen Struktur des Mn-Komplexes als auch Informationen über dessen Ligandierung.

# Kapitel 3

## Elektron-Paramagnetische-Resonanz

EPR und verwandte Methoden wie bspw. ENDOR (Elektron-Kern-Doppelresonanz) ermöglichen die spektroskopische Untersuchung von Zentren mit ungepaarten Elektronen. Im folgenden werden die für die vorliegende Arbeit notwendigen theoretischen und methodischen Aspekte kurz vorgestellt. Ausführliche Darstellungen von Theorie, Methodik und Technik der EPR finden sich in der Literatur [76–78].

### 3.1 Der Spin-Hamiltonoperator

Die Energie eines quantenmechanischen Systems wird durch den zugehörigen Hamiltonoperator beschrieben. Für die Beschreibung der EPR-Spektren ist nur der spinabhängige Anteil entscheidend. Folgende Terme des Spin-Hamiltonoperators  $\mathcal{H}_S$  müssen zur Beschreibung der in dieser Arbeit untersuchten mehrkernigen Mn-Komplexe berücksichtigt werden:

$$\mathcal{H}_S = \mathcal{H}_{EZ} + \mathcal{H}_{NZ} + \mathcal{H}_{HF} + \mathcal{H}_Q + \mathcal{H}_{EX} + \mathcal{H}_{ZF} \quad (3.1)$$

Die aufgeführten Terme sind Elektron-Zeeman- ( $\mathcal{H}_{EZ}$ ), Kern-Zeeman- ( $\mathcal{H}_{NZ}$ ), Hyperfein- ( $\mathcal{H}_{HF}$ ), Quadrupol- ( $\mathcal{H}_Q$ ), Austausch- ( $\mathcal{H}_{EX}$ ) und Nullfeld-Wechselwirkung ( $\mathcal{H}_{ZF}$ ).

#### **Zeeman-Wechselwirkung**

Die Wechselwirkung eines Spins (Elektron-  $\vec{S}$  oder Kernspin  $\vec{I}$ ) mit dem äußeren Magnetfeld  $\vec{B}_0$  wird Zeeman-Wechselwirkung genannt und beschrieben durch

$$\mathcal{H}_{EZ} = \mu_B \vec{S} \mathbf{g} \vec{B}_0 \quad (3.2)$$

$$\mathcal{H}_{NZ} = \mu_N \vec{I} g_N \vec{B}_0 \quad (3.3)$$

mit dem Bohr- bzw. Kernmagneton  $\mu_B$  bzw.  $\mu_N$ .

Die Elektron-Zeeman-Wechselwirkungsmatrix  $\mathbf{g}$  wird als  $g$ -Faktor bzw.  $\mathbf{g}$ -Matrix bezeichnet. Der  $g$ -Wert des freien Elektrons ist isotrop, durch die Wechselwirkung des Elektronenspins mit dem Bahnmoment wird der  $g$ -Faktor in Atomen und Molekülen anisotrop.

Analoges gilt für die Kern-Zeeman-Wechselwirkung. Da das Kern-Magneton etwa 1800-fach kleiner als das Bohr-Magneton ist, skaliert die Anisotropie des Kern- $g$ -Faktors entsprechend und kann in der EPR nicht aufgelöst werden. Es ist ausreichend, nur den skalaren Kern- $g$ -Faktor zu berücksichtigen.

### Hyperfein-Wechselwirkung

Die Hyperfeinkopplung zwischen Elektron- und Kernspin wird durch den Term

$$\mathcal{H}_{HF} = \vec{S} \mathbf{A} \vec{I} \quad (3.4)$$

beschrieben. Die Hyperfeinkopplung  $\mathbf{A}$  kann in einer Multipolentwicklung dargestellt werden, die ersten beiden Terme sind:

$$\mathbf{A} = \frac{8\pi}{3} \mu_B \mu_N g_e g_N \vec{S} \vec{I} \delta(r) + \mu_B \mu_N g_e g_N \left( \frac{3(\vec{S} \vec{r})(\vec{I} \vec{r})}{r^5} - \frac{\vec{S} \vec{I}}{r^3} \right) \quad (3.5)$$

wobei der erste Term der isotrope Anteil ist, der nur für Elektronen in einem Orbital mit  $s$ -Charakter einen Wert ungleich Null annimmt. Der zweite Term beschreibt die winkelabhängige Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den beiden Spins.

### Kern-Quadrupol-Wechselwirkung

Kerne mit einem Kernspin  $I > 1/2$  besitzen ein Quadrupolmoment  $Q$ , das durch nicht-sphärische Ladungsverteilungen um den Kern hervorgerufen wird. Die Quadrupolwechselwirkung wird beschrieben durch:

$$\mathcal{H}_Q = \vec{I} \mathbf{P} \vec{I} \quad (3.6)$$

Die Quadrupolkopplung  $\mathbf{P}$  ist spurlos und wird üblicherweise folgendermaßen dargestellt:

$$\mathbf{P} = \frac{e^2 Qq/h}{4I(2I+1)} \begin{pmatrix} -(1-\eta) & 0 & 0 \\ 0 & -(1+\eta) & 0 \\ 0 & 0 & 2 \end{pmatrix} \quad (3.7)$$

Die größte Komponente der Kopplung ist bestimmt durch die Richtung und Stärke des elektrischen Feldgradienten  $eq$  am Kernort, der Asymmetrieparameter  $\eta$  beschreibt den Feldgradienten senkrecht zur Hauptachse.

### Nullfeld-Wechselwirkung

Analog der Quadrupolwechselwirkung tritt für Systeme mit einem Elektronenspin  $\vec{S} > 1/2$  die Nullfeldaufspaltung auf.

$$\mathcal{H}_{ZF} = \vec{S} \mathbf{D} \vec{S} \quad (3.8)$$

Die in dieser Arbeit untersuchten Systeme weisen alle einen effektiven Grundzustand  $S = 1/2$  auf, so daß keine Nullfeldwechselwirkung beobachtet wird. Die an den gekoppelten Systemen beteiligten Mn-Kerne liegen in den Oxidationsstufen (III) und (IV) im Hochspinzustand vor und tragen damit intrinsische Spins mit  $S > 1/2$ . Bei der Beschreibung der intrinsischen (isolierten) Systeme muß die Nullfeldwechselwirkung berücksichtigt werden.

### Austauschwechselwirkung

Die Austauschwechselwirkung in Systemen mit mehr als einem paramagnetischen Zentrum bzw. Elektronenspin wird durch das Pauli-Prinzip begründet. Die Wechselwirkung beschreibt sowohl den direkten Austausch durch die Überlagerung der Orbitale paramagnetischer Zentren als auch den indirekten Austausch über Ligandenorbitale. Für viele austauschgekoppelte Metallsysteme genügt eine isotrope Kopplung zur Beschreibung der Systeme. Ein häufig genutzter Operator zur Beschreibung der Wechselwirkung lautet:

$$\mathcal{H}_{EX} = -2J\vec{S}_1\vec{S}_2 \quad (3.9)$$

Für  $J < 0$  ist der Austausch anti-ferromagnetisch, d.h. im Grundzustand ist der Gesamtspin minimal, für  $J > 0$  entsprechend ferromagnetisch.

## 3.2 Stark austauschgekoppelte Systeme

Die in dieser Arbeit untersuchten paramagnetischen Zentren bilden stark austauschgekoppelte Systeme aus zwei Spinzentren in zweikernigen Modellkomplexen bzw. vier Zentren im Fall des WOC. Der für solche Systeme entwickelte Formalismus wird hier kurz vorgestellt. Eine ausführliche Darstellung findet sich in [78].

Im Grenzfall starker Austauschkopplung können alle Anteile des Hamiltonoperators als Störung des Austauschterms betrachtet werden. Für zwei gekoppelte Zentren  $\vec{S}_1, \vec{S}_2$  nimmt der Gesamtspin Werte zwischen  $|S_1 - S_2| \leq S \leq S_1 + S_2$  an. Der Energieunterschied zwischen benachbarten Zuständen ist durch:

$$E(S) - E(S - 1) = SJ \quad (3.10)$$

gegeben.

Dieser Energieunterschied ist im angenommenen Grenzfall groß gegen alle anderen Wechselwirkungen. Dann können in einem EPR-Experiment nur Übergänge innerhalb einer Spin-Mannigfaltigkeit beobachtet werden und das System kann phänomenologisch für jeden Spinzustand von  $\vec{S}_{\text{eff}}$  durch einen effektiven Spin-Hamiltonoperator

$$\mathcal{H}_{\text{eff}} = \mu_B \vec{B}_0 \mathbf{g}_{\text{eff}} \vec{S}_{\text{eff}} + \sum_{1,2} \vec{I}^{1,2} \mathbf{A}_{\text{eff}}^{1,2} \vec{S}_{\text{eff}} + \vec{S}_{\text{eff}} \mathbf{D}_{\text{eff}} \vec{S}_{\text{eff}} + \mathcal{H}_{NZ} + \mathcal{H}_Q \quad (3.11)$$

beschrieben werden.

Dabei fällt der Beitrag der Nullfeldwechselwirkung für die in dieser Arbeit betrachteten Systeme mit  $S_{\text{eff}} = 1/2$  fort.

Die effektiven Parameter des gekoppelten Systems sind über sogenannte Spinprojektionsfaktoren mit den intrinsischen Parametern der einzelnen Zentren verbunden.

$$\mathbf{g}_{\text{eff}} = c_1 \mathbf{g}_1 + c_2 \mathbf{g}_2 \quad (3.12)$$

$$\mathbf{A}_{\text{eff}}^{1,2} = c_{1,2} \mathbf{A}_{1,2} \quad (3.13)$$

Dabei hängen die Projektionsfaktoren nur von den Spins der beiden Zentren  $\vec{S}_{1,2}$  und dem effektiven Gesamtspin  $\vec{S}_{\text{eff}}$  ab. Für ein zweikerniges System sind die Projektionsfaktoren:

$$c_{1,2} = \frac{S_{1,2}(S_{1,2} + 1) - S_{2,1}(S_{2,1} + 1) + S_{\text{eff}}(S_{\text{eff}} + 1)}{2S_{\text{eff}}(S_{\text{eff}} + 1)} \quad (3.14)$$

Für mehrkernige Systeme sind die Projektionsfaktoren abhängig vom gewählten Kopplungsschema zwischen den Zentren. Es sind dabei alle Kopplungsmöglichkeiten zum gewählten effektiven Spin  $\vec{S}_{\text{eff}}$  zu berücksichtigen.

Falls die intrinsische Nullfeldwechselwirkung nicht gegen die Austauschwechselwirkung  $J$  vernachlässigt werden kann, muß der obige Formalismus erweitert werden, indem die Nullfeldwechselwirkung als Störung der Austauschwechselwirkung berücksichtigt wird. Dann sind die Projektionsfaktoren im Allgemeinen keine skalaren Größen mehr, sondern sind zusätzlich von  $\mathbf{D}$  und  $J$  abhängig [78]:

$$\mathbf{c}_k = \mathbf{c}_k(\vec{S}_k, J_{i,k}, \mathbf{D}_k, \vec{S}_{\text{eff}}) \quad (3.15)$$

Eine nicht zu vernachlässigende intrinsische Nullfeldwechselwirkung beeinflusst also die effektiven Parameter. Der Einfluß intrinsischer Nullfeldwechselwirkung kann dabei zu einem sogenannten Transfer von Hyperfeinanisotropie führen. Dabei wird die effektive Hyperfeinkopplung einer intrinsisch rein isotropen Kopplung durch Beimischung von Anisotropie des gekoppelten Partners ebenfalls anisotrop. Zusätzlich kann es zu einer Reorientierung der effektiven Hyperfeinkopplungen kommen, d. h. das effektive und das intrinsische Hauptachsensystem sind nicht länger kollinear.

### 3.3 Theorie der EPR-Spektroskopie

In der EPR-Spektroskopie werden Übergänge zwischen den spinabhängigen Energieniveaus des betrachteten Systems durch Einstrahlung von Mikrowellen angeregt. Im Allgemeinen werden dabei nur Übergänge zwischen Niveaus mit  $\Delta m_S = \pm 1$  angeregt, die Energieniveaus werden durch die in Kap. 3.1 beschriebenen Wechselwirkungen charakterisiert.

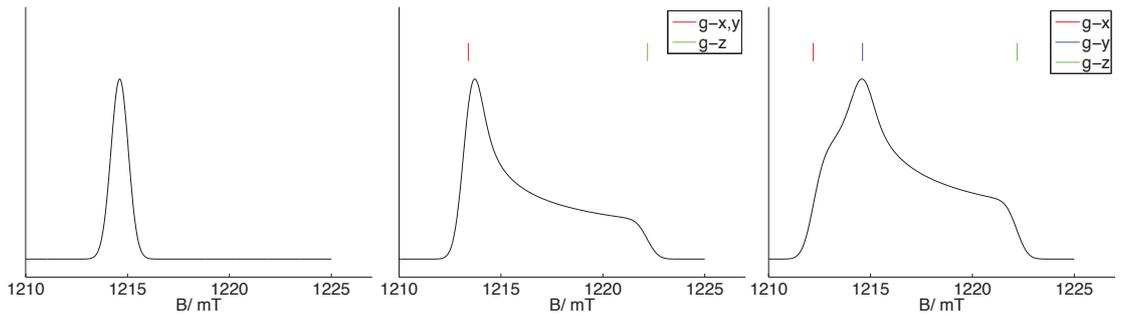
Im folgenden werden die grundlegenden Eigenschaften von EPR-Spektren kurz vorgestellt. Das einfachste System ist das freie Elektron. Im äußeren Magnetfeld  $\vec{B}_0$ , welches entlang der  $z$ -Achse angelegt wird, lautet der Hamiltonoperator:

$$\mathcal{H}_{EZ} = \mu_B g_e B_0 S_z \quad (3.16)$$

Die Energieniveaus des freien Elektrons liegen dann bei:

$$E_{EZ} = \mu_B g_e B_0 m_S \quad (3.17)$$

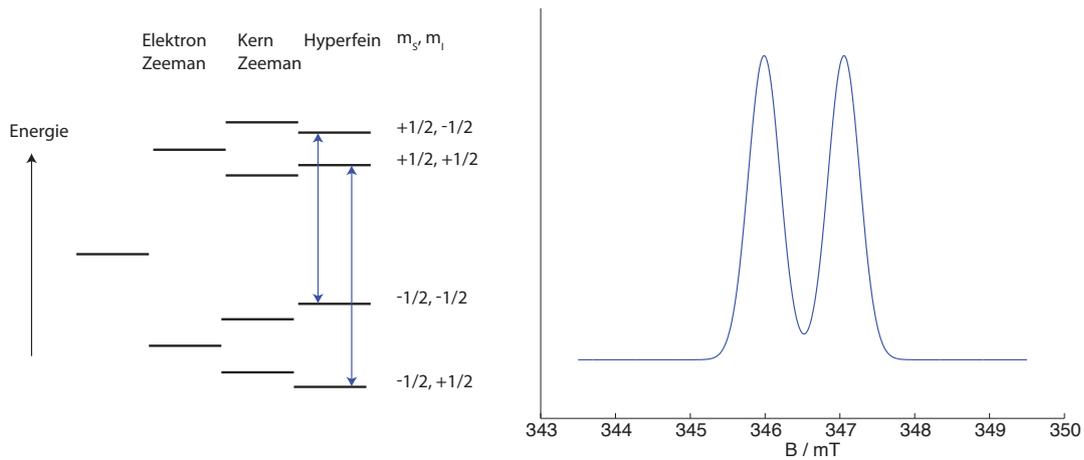
Das EPR-Spektrum des freien Elektrons sowie von Systemen mit isotropem  $g$ -Wert ist also eine einzige Linie, die durch inhomogene Verbreiterung die Form einer Gauß-Kurve hat (siehe Abb. 3.1, links). Wie in Kap. 3.1 angesprochen, kommt es in Molekülen in aller Regel durch Spin-Bahn-Kopplung zu einer Beimischung von Bahnmoment zum Spin, so daß die  $\mathbf{g}$ -Matrix anisotrop wird. In Abb. 3.1 sind Pulverspektren einer isotropen, axialen und rhombischen  $\mathbf{g}$ -Matrix gezeigt. Je größer das äußere Feld  $B_0$  ist, desto größer wird die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung und die Aufspaltung der einzelnen  $g$ -Komponenten nimmt zu. Für eine genaue Bestimmung der  $\mathbf{g}$ -Matrix eignen sich durch die höhere Auflösung also höhere Frequenzbänder.



**Abbildung 3.1:** EPR-Spektrum für eine isotrope (links), axiale (Mitte) und rhombische (rechts)  $\mathbf{g}$ -Matrix. Im axialen und rhombischen Fall ist die Lage der Hauptwerte eingezeichnet.

In Abb. 3.2 sind für ein System mit  $S = 1/2, I = 1/2$  die Energieniveaus und relevanten Wechselwirkungen schematisch skizziert. Die Kern-Zeeman-Wechselwirkung spaltet zwar die Energieniveaus nach den  $m_I$ -Level auf, führt aber zu keiner Verschiebung der EPR-Linie. Diese wird durch die Hyperfeinwechselwirkung aufgespalten.

Die Übergangsenergien lassen sich entweder durch Matrixdiagonalisierung oder per Störungstheorie (ST) berechnen. In der Hochfeldnäherung, das heißt unter der Annahme, daß  $\mathcal{H}_{EZ} \gg \mathcal{H}_{HF}$  gilt, werden alle Beiträge des Hamiltonoperators als Störung von  $\mathcal{H}_{EZ}$  betrachtet. Eine Herleitung der Terme bis 3. Ordnung für ein allgemeines System findet



**Abbildung 3.2:** Links: Energieniveauschema für  $S = 1/2, I = 1/2$ . Rechts: Zugehöriges simuliertes EPR-Spektrum. Die EPR-Übergänge sind links durch blaue Pfeile gekennzeichnet.

sich in [79]. Für ein isotropes System mit  $S = 1/2$  sind die EPR-Übergangsenergien gegeben durch:

$$\Delta E = \mu_B g B + A m_I + \frac{A^2}{2\mu_B g B} [I(I+1) \pm 2m_I] \quad (3.18)$$

Die Quadrupolwechselwirkung wurde hierbei vernachlässigt, da deren Beiträge zum EPR-Spektrum im Allgemeinen nicht berücksichtigt werden müssen.

Die Anzahl  $N$  der Zustände eines System mit  $S = 1/2$  und  $k$  Kernen ist:

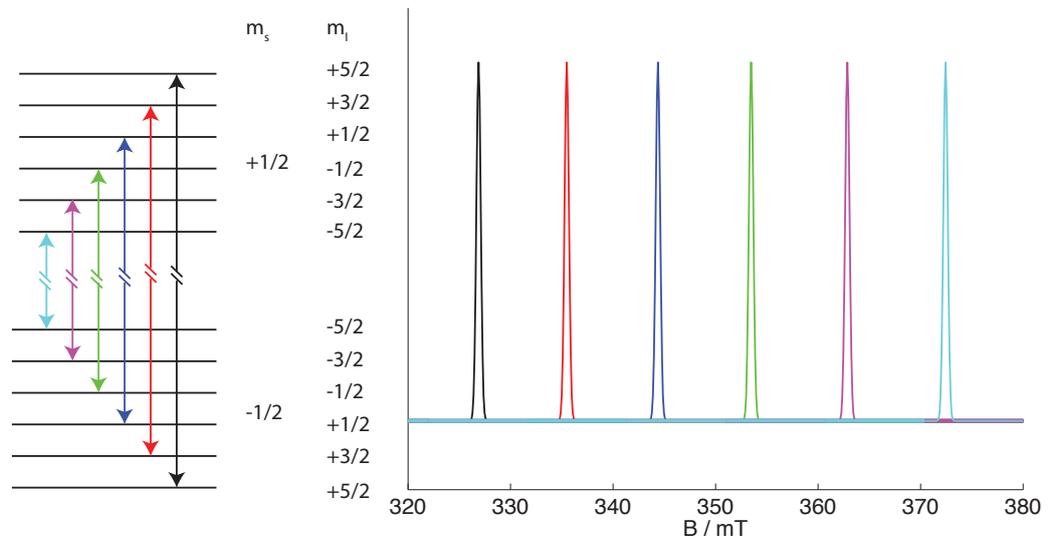
$$N = 2 \prod_k (2I_k + 1) \quad (3.19)$$

Daraus ergibt sich die Zahl der erlaubten EPR-Übergänge zu:

$$n_{\text{EPR}} = \prod_k (2I_k + 1) \quad (3.20)$$

$^{55}\text{Mn}$  hat einen Kernspin  $I = 5/2$ , das EPR-Spektrum eines  $S = 1/2, I = 5/2$  Systems zeigt also 6 Linien, wobei jede EPR-Linie mit einem  $m_I$ -Niveau korreliert ist. Dieser Zusammenhang ist in Abb. 3.3 gezeigt.

In Mn-Dimeren mit 72 Zuständen gibt es 36 erlaubte Übergänge, im WOC mit vier



**Abbildung 3.3:** Links: Energieniveaus des Systems  $S = 1/2, I = 5/2$ . Rechts: Simuliertes EPR-Spektrum. Die EPR-Linien sind entsprechend der  $m_I$ -Niveaus farbkodiert. Parameter:  $g = 1,96$ ,  $A = -250$  MHz,  $f = 9,6$  GHz.

gekoppelten Kernen sind es 1296 erlaubte Übergänge. Dieses System ist also über eine Matrix der Größe  $2592 \times 2592$  beschrieben. Die Diagonalisierung eines solchen Systems dauert sehr lang. Eine Spektrensimulation per Matrixdiagonalisierung ist nicht praktikabel durchführbar. Stattdessen wird für die Simulation eines solchen Systems 2. Ordnung Störungstheorie (ST) benutzt.

Diese Vielzahl der erlaubten Übergänge in einem System mit einem Spin  $S = 1/2$  und vier gekoppelten Mn-Kernen mit Kernspin  $I = 5/2$  ist nicht mehr im EPR-Spektrum aufgelöst. Direkten Zugriff auf Hyperfein- und Quadrupolkopplungen bietet hier ENDOR-Spektroskopie.

### 3.4 Theorie der ENDOR-Spektroskopie

Die Elektron-Kern-Doppelresonanzspektroskopie untersucht Übergänge zwischen Kernniveaus mit der Auswahlregel  $\Delta m_I = \pm 1$ . Dabei reduziert sich die Zahl erlaubter Übergänge für ein System mit  $S = 1/2$  und  $k$  Kernen zu:

$$n_{\text{ENDOR}} = 4 \sum_k I_k \quad (3.21)$$

Das bedeutet im Fall des WOC, daß es statt 1296 erlaubter Übergänge im EPR-Spektrum nur 40 erlaubte ENDOR-Übergänge gibt.

Im ENDOR müssen im Gegensatz zur EPR im Allgemeinen Einflüsse der Quadrupolkopplung bei der Spektrenanalyse berücksichtigt werden. Im Geltungsbereich der ST gilt für die Quadrupolkopplung zusätzlich die Bedingung  $E_Q \leq E_{NZ} + E_{HF}$ . Die Übergangsennergien des ENDOR-Spektrums für ein isotropes System mit  $S = 1/2$  lauten in zweiter Ordnung ST:

$$\Delta E = \frac{A}{2} \pm \mu_N g_N B_0 \pm \frac{A^2}{2\mu_B g B_0} - \frac{A^2}{4\mu_B g B_0} (2m_I + 1) \mp \frac{P}{2} (2m_I + 1) \quad (3.22)$$

In erster Ordnung sind die ENDOR-Übergänge um die halbe Kopplung mit der doppelten Kernlarmorfrequenz aufgespalten. Falls die Kernlarmorfrequenz größer als die Hyperfeinkopplung ist, wie z.B. bei Protonen, findet sich das umgekehrte Bild mit einer Aufspaltung von  $A$  um die freie Kernfrequenz.

Im Folgenden werden zunächst Besonderheiten bei der Interpretation von  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektren an gekoppelten Metallzentren vorgestellt. Im darauf folgenden Abschnitt werden dann Effekte zweiter Ordnung ST auf ENDOR-Spektren für große Hyperfeinkopplungen diskutiert.

### 3.4.1 Analyse von $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektren

Die Wechselwirkung eines Protons mit einem Elektronenspin ist in Gl. 3.4 beschrieben. In der Punkt-Dipol-Näherung lautet der dipolare Term  $A_{dip}$  der Wechselwirkung:

$$A_{dip} = \begin{pmatrix} -T & 0 & 0 \\ 0 & -T & 0 \\ 0 & 0 & 2T \end{pmatrix} \quad (3.23)$$

mit

$$T = \frac{\mu_0 g_e g_N \mu_B \mu_N}{2hr^3} \quad (3.24)$$

und beschreibt eine axiale Hyperfeinkopplung, wobei die ausgezeichnete Achse der Kopplung entlang des Verbindungsvektors  $\vec{r}$  zwischen Proton und Elektron liegt. In der

Punkt-Dipol-Näherung kann also über die dipolare Kopplung der Abstand zwischen Elektronenspin und Proton abgeschätzt werden.

Eine vergleichsweise kleine dipolare Kopplung  $A_{dip} = 1$  MHz entspricht damit einem Proton im Abstand von etwa  $7,9 \text{ \AA}$  zum Ort des Elektronenspins. Die Ausdehnung des Mn-Komplexes im PSII mit einem größten Mn-Mn-Abstand von  $5,4 \text{ \AA}$  ist dazu vergleichbar. Die Kopplung des Protons an den effektiven Elektronenspin des WOC kann damit nicht in der Punkt-Dipol-Näherung beschrieben werden.

Eine Erweiterung des Modells wurde von Fiege *et al.* [62] vorgestellt. Dabei wird die dipolare Wechselwirkung des Protons mit jedem der  $k$  Manganionen nach:

$$A_{dip}^{\text{eff}} = \sum_k c_k A_{dip}^k \quad (3.25)$$

berücksichtigt. Die  $c_k$  sind die Spinprojektionsfaktoren der einzelnen Manganionen. Die einzelnen dipolaren Kopplungen  $A_{dip}^k$  sind im Allgemeinen nicht im gleichen Koordinatensystem diagonal. Als Konsequenz ist die effektive Hyperfeinkopplung eines Protons dann nicht mehr axial und läßt sich unter Berücksichtigung eventueller isotroper Anteile allgemein als

$$A_{\text{eff}} = A_{\text{iso}} \begin{pmatrix} -T - \eta & 0 & 0 \\ 0 & -T + \eta & 0 \\ 0 & 0 & 2T \end{pmatrix} \quad (3.26)$$

mit dem Rhombizitätsparameter  $\eta$  formulieren. Die Orientierung dieser effektiven Hyperfeinkopplung ist somit nicht mehr einfach geometrisch interpretierbar.

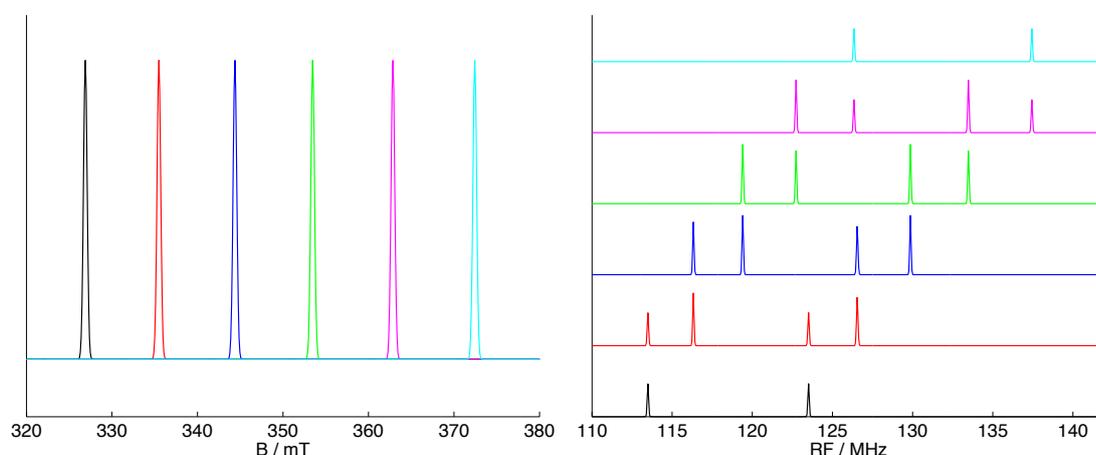
Für den Fall  $k = 2$ , wie er in zweikernigen Mn-Modellsystemen auftritt, läßt sich ein geschlossener Ausdruck für  $A_{\text{eff}}$  in Abhängigkeit des Abstands der beiden Mn-Kerne und des jeweiligen Protonen-Abstandes finden [62]. Im Fall  $k = 4$  ist dies nicht mehr möglich. Bei Formulierung der dipolaren Wechselwirkung  $A_{dip}$  in kartesischen Koordinaten [77]

$$A_{dip}^k = -\frac{\mu_0 g_e g_N \mu_B \mu_N}{2hr_k^5} \begin{pmatrix} r_k^2 - 3x^2 & -3xy & -3xz \\ -3xy & r_k^2 - 3y^2 & -3yz \\ -3xz & -3yz & r_k^2 - 3z^2 \end{pmatrix} \quad (3.27)$$

läßt sich die effektive Hyperfeinkopplung  $A_{\text{eff}}$  jedoch für beliebige Geometrien der Mangankerne mit Koordinaten  $(x,y,z)_{Mn}^k$  und eines Protons mit Koordinaten  $(x,y,z)$  berechnen, wobei der Abstand  $r_k$  der Abstand zwischen dem Proton und dem Manganion  $k$  ist.

### 3.4.2 Analyse von $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren

Am Beispiel eines  $S = 1/2, I = 5/2$  Systems sind die Effekte zweiter Ordnung aus Gl. 3.22, die bei großen Kopplungen und für Kernspins  $I > 1/2$  wichtiger werden in Abb. 3.4 verdeutlicht. Der Schwerpunkt des Linienpaars ist in zweiter Ordnung  $m_I$ -abhängig (vgl.  $m_I = \pm 5/2$ , schwarz und hellblau in Abb 3.4), die Aufspaltung ist allerdings für alle Übergänge gleich.



**Abbildung 3.4:** Links: EPR-Spektrum eines  $S = 1/2, I = 5/2$  Systems, die Übergänge sind entsprechend ihres  $m_I$ -Levels farbkodiert. Rechts: Simulierte ENDOR-Spektren, die Farben entsprechen der jeweiligen Position im EPR-Spektrum. Parameter:  $g = 1,96$ ,  $A = -250$  MHz,  $f = 9,6$  GHz.

Da die ENDOR-Übergänge  $m_I$ -abhängig sind, unterscheiden sich an verschiedenen Feldpositionen gemessene Spektren, da nur Übergänge in einem schmalen Bereich um die gewählte Feldposition angeregt werden. Auf den Randlinien des EPR-Spektrums (schwarz und cyan) gibt es nur einen möglichen Kernübergang in beiden  $m_S$ -Mannigfaltigkeiten, für die zentralen Linien jeweils zwei. Über die Feldposition ist also eine  $m_I$ -Selektion möglich. Dominiert in einem rhombischen System die  $g$ -Anisotropie, so findet über die Feldposition zusätzlich auch eine Orientierungsselektion der Hyperfeinkomponente entlang einer bestimmten  $\mathbf{g}$ -Orientierung statt.

Da die  $m_I$ -abhängige Aufspaltung ein Effekt zweiter Ordnung ist, nimmt die Aufspaltung mit steigender MW-Frequenz deutlich ab. Falls keine Orientierungsselektion einzelner Kernübergänge erfolgt, unterscheiden sich die ENDOR-Spektren in den verschiedenen Frequenzbändern daher stark. In Abb. 3.5 ist für eine isotrope  $^{55}\text{Mn}$ -Hyperfeinkopplung das ENDOR-Spektrum in X-, Q- und W-Band gezeigt.

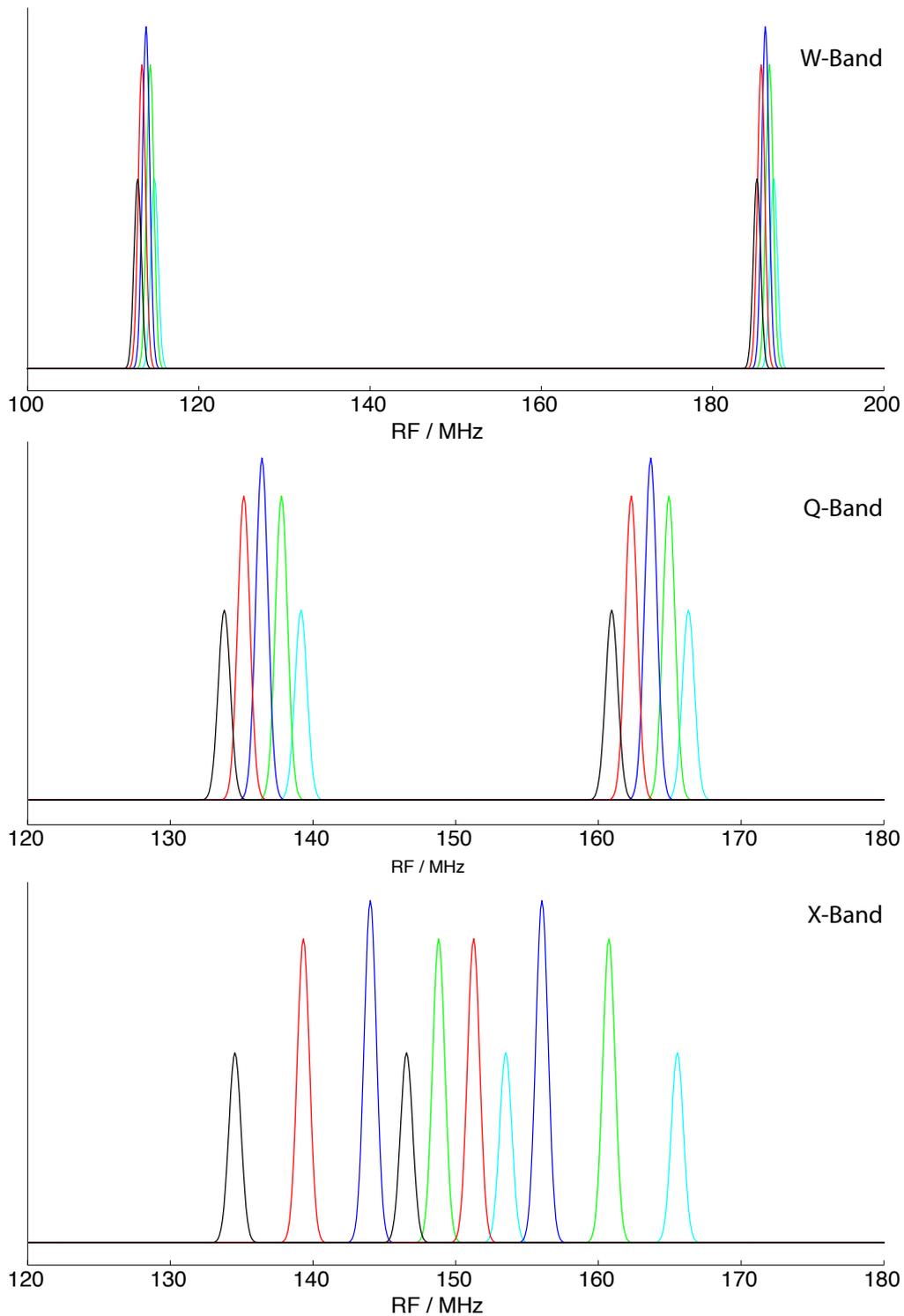
Im X-Band ist die  $m_I$ -abhängige Verschiebung der Linienpärchen mit 19 MHz größer als die Aufspaltung der Linien innerhalb des Pärchens durch die doppelte Kernlarmofrequenz von etwa 7 MHz. Im Q- und W-Band ist die doppelte Kernlarmofrequenz mit 26 MHz bzw. 72 MHz größer. Die  $m_I$ -abhängige Aufspaltung wird mit steigender Mikrowellenfrequenz signifikant kleiner (etwa 7 MHz im Q-Band, 2 MHz im W-Band), so daß die ENDOR-Übergänge der beiden  $m_S$ -Mannigfaltigkeiten deutlich getrennt sind.

Die Berücksichtigung der Quadrupolwechselwirkung führt zu einer zusätzlichen  $m_I$ -abhängigen Verschiebung, die in Abb. 3.6 im Vergleich ohne Quadrupolwechselwirkung gezeigt ist. Da die Quadrupolkopplung immer mindestens axial ist, zeigen die Linien eine entsprechende Kopplungsform. Da bei beschränktem Signal-zu-Rausch (S/R) insbesondere die Senkrechtkomponenten detektiert werden, zeigt sich der Einfluß der Quadrupolkopplung hauptsächlich durch eine  $m_I$ -abhängige Vergrößerung bzw. Verkleinerung der Linienaufspaltung.

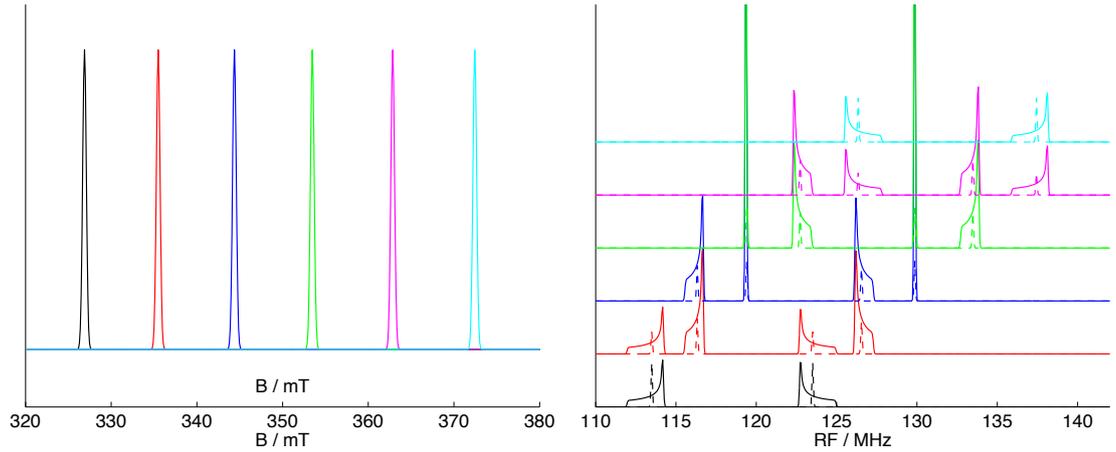
### 3.5 Relaxation

Im thermischen Gleichgewicht sind die einzelnen Energieniveaus gemäß der Boltzmannverteilung besetzt. Jede Störung, bspw. durch die Absorption von Mikrowellen, stört diese Gleichgewichtsbesetzung. Die Rückkehr des Systems nach Einwirkung der Störung in das thermische Gleichgewicht wird als Relaxation bezeichnet. Die Relaxation der Spins beruht auf verschiedenen Prozessen. Eine ausführliche Darstellung findet sich in [80].

Die transversale Relaxation  $T_2$  beruht auf Spin-Spin-Wechselwirkungen und führt unter anderem zum Verlust von Phasenkohärenzen. Die longitudinale Relaxation  $T_1$  wird allgemein durch Spin-Gitter-Wechselwirkungen bestimmt und beschreibt die Rückkehr der Besetzung in den thermischen Gleichgewichtszustand. Dabei findet man bei tiefen Temperaturen zwei Hauptprozesse. Zum einen gibt es direkte Ein-Phonon-Prozesse (Orbach-Prozesse), zum anderen Raman-Prozesse, die als zweite-Ordnungs-Prozesse über Zwei-Phononen-Wechselwirkungen ablaufen. Über die Temperaturabhängigkeit von  $T_1$  kann auf diese Prozesse rückgeschlossen werden. Dabei gilt für Orbach-Prozesse folgender Zusammenhang:



**Abbildung 3.5:** Simulierte  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR Spektren einer isotropen  $^{55}\text{Mn}$ -Hyperfeinkopplung  $A = -300$  MHz in den drei Frequenzbändern. Die ENDOR-Linien sind entsprechend des  $m_I$ -Übergangs farbkodiert. Simulationsparameter:  $S = 1/2$ ,  $g = 1,97$ ,  $^{55}\text{Mn}$ -Kern mit  $A = 300$  MHz. X-Band:  $B = 345$  mT,  $f = 9,7$  GHz. Q-Band:  $B = 1227$  mT,  $f = 34,0$  GHz. W-Band:  $B = 3404$  mT,  $f = 94,0$  GHz. 39



**Abbildung 3.6:** Links: EPR-Spektrum eines  $S = 1/2, I = 5/2$  Systems, die Übergänge sind entsprechend ihres  $m_I$ -Levels farbkodiert. Rechts: Simulierte ENDOR-Spektren bei Berücksichtigung einer Quadrupolkopplung, die Farben entsprechen der jeweiligen Position im EPR-Spektrum. Die ENDOR-Linien ohne Berücksichtigung der Quadrupolkopplung sind zum Vergleich gestrichelt gezeichnet. Parameter:  $g = 1,96$ ,  $A = -250$  MHz,  $P = (-0,125, -0,125, 0,25)$  MHz,  $f = 9,6$  GHz.

$$\frac{1}{T_1} \sim e^{-\frac{\Delta}{kT}} \quad (3.28)$$

Hier ist  $\Delta$  der Abstand des Grundzustands zum ersten angeregten Zustand. Liegt ein Orbach-Prozess vor, kann also aus der Temperaturabhängigkeit der  $T_1$ -Relaxation dieser Energieunterschied abgeschätzt werden. Für Raman-Prozesse gilt folgende Temperaturabhängigkeit:

$$\frac{1}{T_1} \sim T^x, \text{ mit } 7 \leq x \leq 9 \quad (3.29)$$

### 3.6 Methoden der Puls-EPR

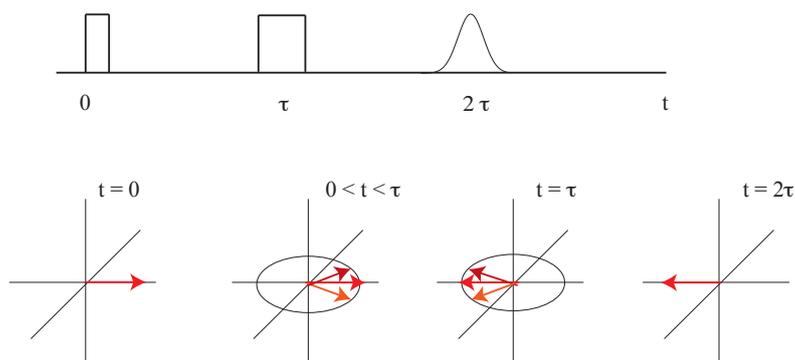
Im vorherigen Kapitel wurden die Energieunterschiede für EPR-Übergänge näherungsweise für verschiedene Systeme berechnet. Dabei war das Magnetfeld ein fester Parameter, der Übergang erfolgt bei passender Mikrowellenfrequenz. Aus technischen Gründen wird aber im Experiment bei fester Mikrowellenfrequenz das Magnetfeld verändert. Entspricht der Energieunterschied der Niveaus der eingestrahlten Frequenz, kommt es zum

Übergang. In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Mn-Komplexe Methoden der gepulsten EPR angewendet, die im folgenden kurz vorgestellt werden sollen. Ausführliche Darstellungen der cw- und Pulsmethoden finden sich in [76, 77].

In einem vereinfachten Bild betrachtet man zum Verständnis der Vorgänge während eines Puls-Experiments die Vektorsumme der einzelnen magnetischen Momente als klassische Magnetisierung  $\vec{M}$ . Diese Magnetisierung richtet sich entlang des äußeren Feldes  $B_0$  aus, welches im Allgemeinen die  $z$ -Achse definiert. Die Einstrahlung eines Mikrowellenpulses, der ein zweites Magnetfeld  $\vec{B}_1 \perp \vec{B}_0$  einführt und die Resonanzbedingung erfüllt, führt zur Präzession der Magnetisierung um  $\vec{B}_1$ . Mit geeigneter Wahl von Pulsdauer- und -leistung läßt sich die Magnetisierung um einen definierten Winkel drehen. Als Folge eines einzelnen Mikrowellenpulses mißt man aufgrund der Relaxation die Rückkehr der Magnetisierung in ihre Gleichgewichtslage parallel zu  $\vec{B}_0$  (freier Zerfall, FID).

### 3.6.1 Hahn-Echo-Experiment

Ein EPR-Spektrum wird mit einem Hahn-Echo-Experiment gemessen, dessen Ablauf in Abb. 3.7 gezeigt ist.



**Abbildung 3.7:** Hahn-Echo Pulsfolge (oben) und Verlauf der Magnetisierung zu ausgewählten Zeitpunkten (unten).

Ein  $\pi/2$ -Puls kippt die Magnetisierung in die  $xy$ -Ebene, wo die einzelnen magnetischen Momente aufgrund leicht unterschiedlicher lokaler Eigenfrequenzen dephasieren. Ein  $\pi$ -Puls nach der Zeit  $\tau$  führt zu einer Umkehr der Dephasierung, so daß nach der Zeit  $2\tau$  die magnetischen Momente wieder fokussiert sind und ein Echo entsteht. Während des

Experiments wird das Echo für jeden Feldpunkt integriert und so das EPR-Spektrum aufgenommen.

Durch Spin-Spin-Wechselwirkungen refokussiert der  $\pi$ -Puls nicht die vollständige Magnetisierung in der  $xy$ -Ebene. Die damit verknüpfte  $T_2$ -Relaxation bestimmt sich über die Abhängigkeit der Echoamplitude vom Pulsabstand  $\tau$ .

Der Flipwinkel eines Pulses hängt neben der Pulsdauer von der Pulsleistung ab, die die Präzessionsfrequenz der Magnetisierung bestimmt. Die Präzessionsfrequenz in einem isoliert betrachteten 2-Niveausystem wird bei fester Pulslänge durch

$$\omega = \mu g B_1 \sqrt{S(S+1) - m_S(m_S+1)} \quad (3.30)$$

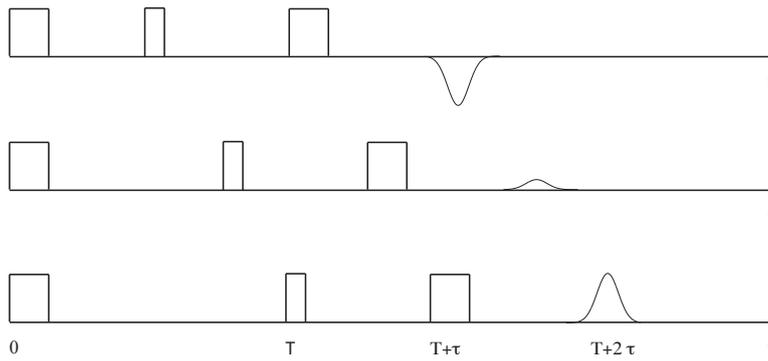
beschrieben [81]. Bei gegebenem Mikrowellenpuls ist der Flipwinkel für Übergänge zwischen gleichen  $m_S$ -Niveaus also abhängig vom Gesamtspin. Dieser Effekt läßt sich zur Trennung der Beiträge verschiedener Spezies mit unterschiedlichem Spin  $S$  nutzen. In allen Mangankomplexen findet man Untergrundsignale von freiem  $\text{Mn}^{2+}$ . Dieses besitzt einen Spin  $S = 5/2$ . Die EPR-Übergänge zwischen den  $m_S = -1/2 \rightarrow m_S = 1/2$  sind in höheren Frequenzbändern stark ausgeprägt. Diese Beiträge lassen sich minimieren, indem für jeden Feldpunkt die Echotransiente statt des Integrals aufgenommen wird. Das Integrationsfenster wird später per Hand so gewählt, daß Beiträge von Systemen mit höherem Spin  $S > 1/2$  möglichst wenig zum FSE beitragen.

Die  $T_1$ -Relaxation wird über eine Inversion-Recovery-Pulsfolge (siehe Abb. 3.8) bestimmt. Dabei wird der Zerfall der longitudinalen Magnetisierung nach einem Inversionspuls ( $180^\circ$ -Puls) durch ein Hahn-Echo in Abhängigkeit des Abstands  $T$  zwischen Inversionspuls und Detektionssequenz abgefragt.

### 3.6.2 Davies-ENDOR

Elektron-Kern-Doppelresonanz nutzt zur Untersuchung der Kernübergänge das EPR-Echo, indem Manipulationen der Kernniveaubesetzung als Änderung der Echoamplitude detektiert werden. Die Davies-ENDOR-Pulssequenz ist in Abb 3.9 gezeigt. Eine vereinfachte Erklärung ist anhand des Energieniveauschemas eines Systems mit  $S = 1/2, I = 1/2$  möglich (siehe Abb. 3.9 unten).

Ein selektiver Mikrowellenpuls invertiert die Besetzung auf dem EPR-Übergang  $1 \rightarrow 3$ . In Abhängigkeit der RF-Frequenz wird dann das Integral des Echos aufgezeichnet. Entspricht die Frequenz des selektiven RF-Pulses einem der beiden Kernübergänge  $3 \rightarrow 4$



**Abbildung 3.8:** Pulsfolge eines Inversion-Recovery-Experiments zur Bestimmung von  $T_1$ . Die Abfrage der Magnetisierung mittels des Hahn-Echos erfolgt zu verschiedenen Zeiten  $T$  nach dem Inversionspuls. Für kurze Zeiten  $T$  ist das Echo durch diesen invertiert.

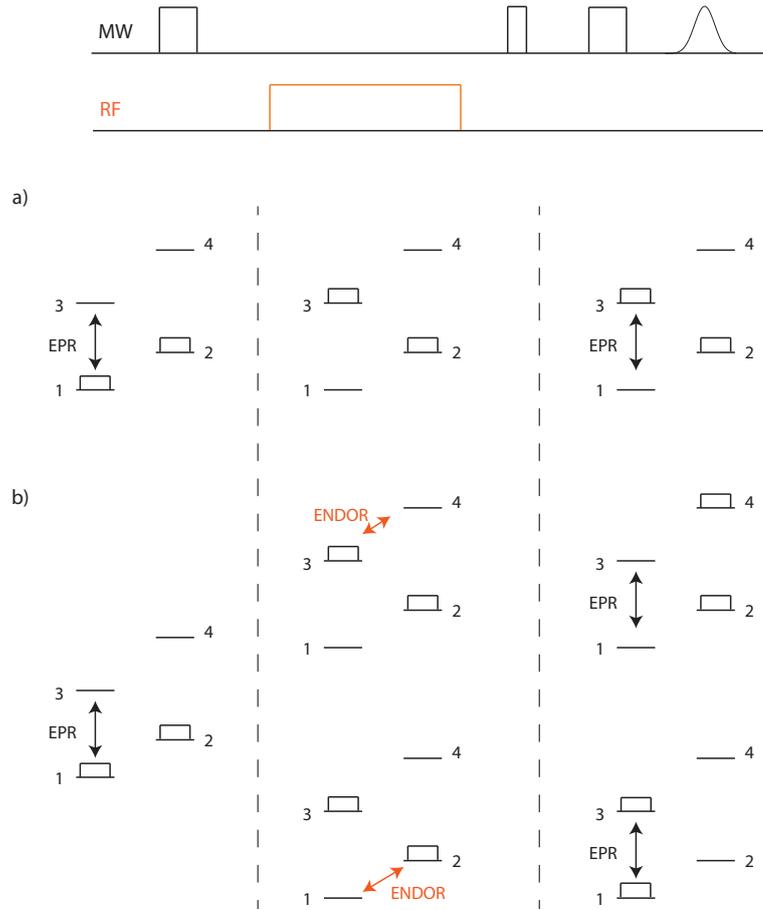
oder  $2 \rightarrow 1$  wird die Populationsdifferenz auf dem EPR-Übergang  $1 \rightarrow 3$  nivelliert und das Echointegral wird im idealen Fall Null. Im allgemeinen Fall wird die Inversion zumindest teilweise aufgehoben und es wird eine positive Intensitätsänderung detektiert.

Die Detektion sehr kleiner Hyperfeinkopplungen ist durch die notwendige Selektivität des Inversionspulses schwierig. Daneben wird in der Davies-ENDOR-Sequenz die Intensität der Hyperfeinkopplungen für  $A \rightarrow 0$  unterdrückt [82]. Dieses tritt insbesondere in  $^1\text{H}$ -ENDOR-Messungen deutlich zu Tage. Die ENDOR-Intensität einer Messung mit einer Davies-ENDOR-Sequenz zeigt folgende Abhängigkeit:

$$I_{\text{ENDOR}}(A(\text{MHz}), t_P(\mu\text{s})) \sim \frac{1,4(At_P)}{0,7^2 + (At_P)^2} \quad (3.31)$$

Dabei ist  $t_P$  die Länge des MW- $\pi$ -Pulses in der Davies-Sequenz und  $A$  die Hyperfeinkopplung. In einem Pulverspektrum durchläuft  $A$  dabei den gesamten Bereich der Kopplung zwischen maximaler und minimaler Hyperfeinkomponente. Diese Funktion führt also zu einer Unterdrückung der Intensität kleiner Kopplungen gegenüber größeren Hyperfeinbeiträgen. Im Fall von  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR sind die beteiligten Hyperfeinkopplungen allerdings so groß, daß diese Effekte vernachlässigbar sind.

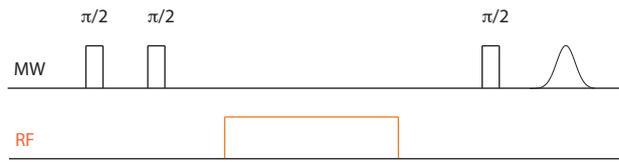
Für große Kopplungen, das heißt für  $A \gg \nu_{\text{Larmor}}$ , wird der Effekt des „hyperfine enhancement“ wichtig. Dieser beruht auf der Tatsache, daß das RF-Feld  $B_{\text{RF}}$  auch den Elektronenspin beeinflusst, der am Kernort für einen zusätzlichen Beitrag zum effektiven Feld sorgt. Der „enhancement“-Faktor für eine isotrope Hyperfeinkopplung  $A$  wird durch



**Abbildung 3.9:** Oben: Pulsfolge eines Davies-ENDOR-Experiments. Unten: Population der Level in einem System mit  $S = 1/2, I = 1/2$  im nicht-resonanten Fall a) mit  $f_{RF} \neq f_{ENDOR}$  und im resonanten Fall b) mit  $f_{RF} = f_{ENDOR}$ .

$$\epsilon = \left| 1 + m_S \frac{A}{\nu_{Larmor}} \right| \quad (3.32)$$

beschrieben. Erstens beeinflusst dieser Faktor die ENDOR-Intensitäten, die dadurch für die verschiedenen  $m_S$ -Mannigfaltigkeiten sowie deutlich unterschiedliche Hyperfeinkopplungen stark variieren. Für zwei Hyperfeinkopplungen  $A_1 = 300$  MHz und  $A_2 = 150$  MHz, wie sie für  $^{55}\text{Mn}$  in Mn(III)Mn(IV)-Komplexen typisch sind, unterscheiden sich die „enhancement“-Faktoren im Q-Band, also bei etwa 1200 mT,  $\epsilon_{m_S=1/2}^1 = 13$ ,  $\epsilon_{m_S=-1/2}^1 = 11$  und  $\epsilon_{m_S=1/2}^2 = 5$ ,  $\epsilon_{m_S=-1/2}^2 = 7$  um den Faktor 2. Zweitens führt diese Überhöhung des effektiven RF-Feldes am Kernort zu einer Verkürzung der für einen  $\pi$ -Puls notwendigen



**Abbildung 3.10:** Pulsfolge eines Mims-ENDOR-Experiments.

Pulsdauer. Dieser Effekt ist für die Untersuchung von Mn-Komplexen durch den kleinen  $g_N$ -Faktor (vgl. Gl. 3.30) und die beschränkte  $T_1$ -Relaxationszeit günstig.

### 3.6.3 Mims-ENDOR

Die in Abb. 3.10 gezeigte Pulssequenz des Mims-ENDOR-Experiments basiert auf der Messung des stimulierten Echos mit drei nicht-selektiven Mikrowellen- $\pi/2$ -Pulsen. Die ersten beiden MW-Pulse prägen der inhomogen verbreiterten EPR-Linie ein periodisches Polarisationsmuster auf. Falls der selektive RF-Puls resonant mit einem Kern-Übergang ist, verändert er die Besetzung der EPR-Übergänge und damit das Polarisationsmuster. In Abhängigkeit von der RF-Frequenz wird daher die integrierte Intensität des stimulierten Echos detektiert.

Die ENDOR-Intensität wird dabei in Abhängigkeit der Hyperfeinkopplung und dem MW-Pulsabstand  $\tau$  mit

$$I_{\text{ENDOR}} \sim \sin^2(\pi A \tau) \quad (3.33)$$

moduliert. Je nach erwarteten Hyperfeinkopplungen muß der Pulsabstand  $\tau$  möglichst kurz gewählt, bzw. für größere Kopplungen das ENDOR-Spektrum für verschiedene Werte von  $\tau$  aufgenommen werden.



# Kapitel 4

## Material und Methoden

### 4.1 Probenpräparation

#### Mn-Katalase

Die Mn-Katalaseproben aus *Thermus thermophilus* wurden von V. Barynin zur Verfügung gestellt, die Präparation des superoxidierten Zustands führte K. O. Schäfer nach dem Protokoll in Ref. [83] durch. Die Proben haben eine Konzentration von etwa 5 mMol.

#### PSII

Alle PSII Proben wurden als Kernkomplex-Präparation PSIIcc nach Ref. [84] von der Arbeitsgruppe von A. Zouni am Max-Volmer-Institut der TU Berlin präpariert und zur Verfügung gestellt. Alle Arbeitsschritte wie Präparation, Transport, Lagerung und Einbau erfolgten ohne Licht bzw. unter schwacher grüner Beleuchtung, um einen definierten S-Zustand der Probe zu garantieren.

Die Lösungsproben sind monomerische PSIIcc-Präparationen mit Chlorophyllkonzentrationen zwischen 5 mMol und 9 mMol, je nach Charge. Die Proben wurden dunkeladaptiert in EPR-Röhrchen gefüllt und eingefroren. Jeder Auftauvorgang sowie lange Lagerung bei Raumtemperatur führt zur Degradation einzelner Zentren, so daß soweit möglich frische Präparationen für die EPR-Untersuchungen verwendet wurden, um den Anteil an freiem  $Mn^{2+}$  zu minimieren.

Für die Messung eines Kristalls wurde der größte Kristall mehrerer Ansätze, der sich ohne Beschädigung mit einer Pipette in einem Tropfen Pufferlösung aufnehmen ließ, ausgewählt und in einem Flüssigkeitstropfen mit seiner langen morphologischen Achse parallel zu Röhrchenachse in ein offenes Q-Band Röhrchen (Innendurchmesser 1 mm) gelegt und eingefroren.

Für die PSII-Sr-Proben wurde PSII in einem Medium angezogen, welches kein Kalzium, stattdessen aber Strontium enthält. PSII-Sr wurde ebenfalls als monomerisches PSIIcc präpariert. Die Proben wurden auf etwa 3 mMol Chlorophyll aufkonzentriert. Die Zahl katalytisch aktiver Zentren ist in den hier verwendeten Präparationen um einen Faktor 4–7 geringer als im nativen PSII.

Für D<sub>2</sub>O-ausgetauschtes PSII wurde der Puffer von PSIIcc über 2 h bzw. 10 h gegen D<sub>2</sub>O-Puffer ausgetauscht.

Der S<sub>2</sub>-Zustand wurde jeweils vor einer Messung durch zweiminütige Beleuchtung mit einer 180 W Halogenlampe bei 200 K erzeugt.

## 4.2 EPR- und ENDOR-Experimente

### Experimentelle Parameter

Alle Messungen in dieser Arbeit wurden an kommerziellen Spektrometern der Firma Bruker durchgeführt, die mit einer DICE-II RF-Einheit ausgerüstet sind. Die Temperierung erfolgte mit einem ITC 5035 (Oxford Instruments).

Für X-Band-Messungen ( $f \approx 9,7$  GHz,  $B \approx 340$  mT) wurde ein Elexsys E580 Spektrometer mit einem 1 kW TWT Mikrowellenverstärker (Applied Systems Engineering) genutzt. Dabei wurde ein Bruker EN 4118X-MD4 Resonator mit einer dreiwindigen ENDOR-Spule verwendet. Alle Messungen fanden bei 5 K statt. Die EPR-Messungen verwenden eine Hahn-Echo-Sequenz mit einem  $\pi$ -Puls von 64 ns, einem Pulsabstand  $\tau = 300$  ns und einer Schußwiederholrate (srt) von 1000  $\mu$ s. Für die <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Messungen wurde eine Davies-ENDOR-Sequenz verwendet, der MW- $\pi$ -Puls war 64 ns lang, der RF-Puls 4  $\mu$ s, als srt wurde ebenfalls 1000  $\mu$ s gewählt. RF-Pulse wurden mit einem RF-Verstärker AR-250A250 (Amplifier Research) verstärkt.

Q-Band-Messungen ( $f \approx 34,0$  GHz,  $B \approx 1210$  mT) wurden an einem Elexsys E580 Spektrometer mit Super QFT Upgrade durchgeführt. Der verwendete Resonator ist ein Eigenbau. Für alle Messungen an PSII wurde eine Temperatur von 5 K gewählt. EPR- und <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Messungen des S<sub>2</sub>-MLS verwenden dieselben Parameter, die für die X-Band-Messungen angegeben sind. Als RF-Verstärker wurde ebenfalls der AR-250A250 genutzt. Für <sup>1</sup>H-ENDOR-Messungen wurde eine Davies-ENDOR-Sequenz verwendet, der MW- $\pi$ -Puls war 160 ns, der MW-Pulsabstand  $\tau$  500 ns und der RF-Puls 14  $\mu$ s lang. Die srt betrug 1400  $\mu$ s. Es wurde ein RF-Verstärker LPPA3008 (Dressler) verwendet. Nur für das <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum in PSII-Sr wurde nach Ausfall des LPPA3008

der Verstärker AR-250A250 ersatzweise benutzt. Für  $^2\text{H}$ -ENDOR-Messungen wurde eine Mims-ENDOR-Sequenz mit einem MW-Puls von  $\pi/2 = 32$  ns und einem Pulsabstand  $\tau = 240$  ns verwendet. Die srt betrug  $1400 \mu\text{s}$ . Der RF-Puls war  $14 \mu\text{s}$  lang, als RF-Verstärker wurde ein AR-LM8 (Amplifier Research) verwendet.

Messungen an Mn-Katalase wurden bei 15 K durchgeführt. Die Hahn-Echo-Sequenz verwendet einen  $\pi$ -Puls von 80 ns, einen Pulsabstand  $\tau = 300$  ns und eine srt von  $6000 \mu\text{s}$ .  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Messungen nutzen eine Davies-ENDOR-Sequenz mit einem MW- $\pi$ -Puls von 80 ns, einem RF-Puls von  $4 \mu\text{s}$  und eine srt von  $4000 \mu\text{s}$ .

Die W-Band-Messungen ( $f \approx 94,0$  GHz,  $B \approx 3400$  mT) wurden an einem Eleksys E680 Spektrometer mit einem E680 PU Power Upgrade durchgeführt. Es wurde ein Teraflex EN-600-1021H ENDOR Resonator genutzt, als RF-Verstärker wurde ein AR-150A400 verwendet. Die RF-Pulslänge für die  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR Messungen betrug  $3 \mu\text{s}$ , die srt bei den  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Messungen an PSII betrug  $4000 \mu\text{s}$ .

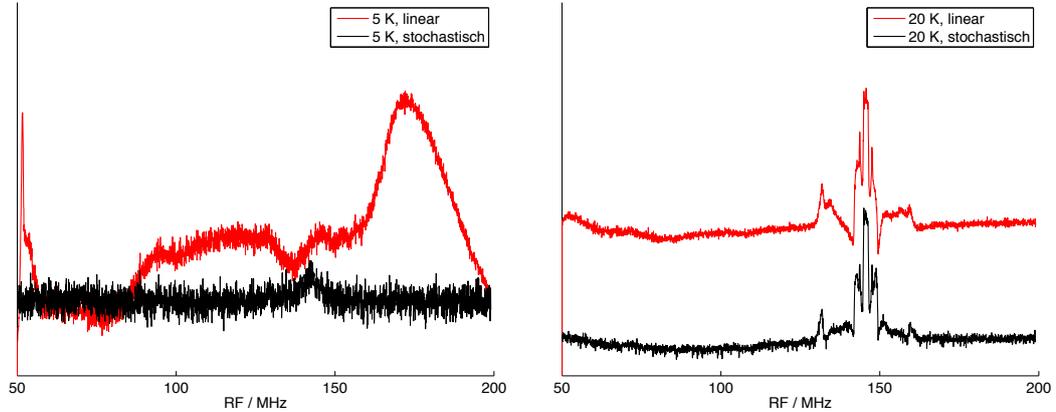
Das EPR-Spektrum der Mn-Katalase wurde bei 20 K mit einer Hahn-Echo-Sequenz gemessen. Dabei wurde ein  $\pi$ -Puls mit 80 ns Länge, ein Pulsabstand  $\tau = 360$  ns und eine srt von  $5000 \mu\text{s}$  verwendet. Die ENDOR-Messungen wurden mit einer Davies-ENDOR-Sequenz aufgenommen, der MW- $\pi$ -Puls war 80 ns lang, der RF-Puls  $4 \mu\text{s}$ .

W-Band-EPR-Spektroskopie an Signalen, die breiter als etwa 80 mT sind, sind sehr aufwändig. Der W-Band-Magnet ist neben einer supraleitenden Spule mit Raumtemperaturspulen für Feldbereiche  $\pm 40$  mT um das Hauptfeld ausgestattet. Für breite EPR-Signale muß daher das Hauptfeld des supraleitenden Magneten variiert werden. Dabei verdampft ein großer Teil des flüssigen Heliums, das die supraleitende Spule kühlt. Die Meßzeit für ein Spektrum ist daher durch diese Verdampfung begrenzt, da rechtzeitig vor Absinken des Heliumfüllstands auf Höhe der supraleitenden Spulen mit Flüssighelium nachgefüllt werden muß.

## ENDOR-Messungen mit stochastisch variiertes RF

ENDOR-Messungen bei den in dieser Arbeit verwendeten tiefen Temperaturen sind experimentell anspruchsvoll. In den höheren Frequenzbändern wird der Energieeintrag durch die RF-Pulse problematisch, da dadurch die lokale Temperatur der Probe stark ansteigt. Dies führt zu Schwankungen der Echointensität, die unabhängig vom tatsächlichen ENDOR-Effekt sind. Im linken Teil der Abb. 4.1 ist ein ENDOR-Spektrum des  $\text{Y}_D^\bullet$  im W-Band bei 5 K gezeigt. Dabei wurde die RF-Frequenz linear (rot) oder stochastisch (schwarz) variiert. Nur bei stochastischer Variation der ENDOR-Frequenz werden die

Artefakte durch Aufheizung der Probe und des Resonators so minimiert, daß eine gerade Grundlinie die Detektion des ENDOR-Effektes (hier im Protonenbereich um 145 MHz erwartet) ermöglicht.



**Abbildung 4.1:** ENDOR-Spektren des  $Y_D^{\bullet}$  in PSII bei 5 K (links) bzw. 20 K (rechts). Die RF-Frequenz wurde linear (rot) bzw. stochastisch (schwarz) variiert. Experimentelle Bedingungen:  $f = 94,0$  GHz,  $B = 3350,6$  mT, MW  $\pi = 240$  ns, RF  $\pi = 19000\mu\text{s}$ , srt =  $5000\mu\text{s}$ .

Ein weiteres Problem, welches durch eine stochastische Variation der RF-Frequenz vermieden wird, ist im rechten Teil der Abb. 4.1 illustriert. Bei tiefen Temperaturen (hier 20 K) kann die Relaxationszeit der Kernspins sehr lang werden. Wird dann eine relativ kurze Schußwiederholrate verwendet, kommt es zu Polarisierungseffekten einzelner Kernübergänge (rotes Spektrum), die die Form des Spektrums stark verzerren.

Um die eben angesprochenen Probleme zu vermeiden, wurden alle ENDOR-Messungen in dieser Arbeit mit stochastisch variiert RF-Frequenz durchgeführt.

### 4.3 Simulationen

Die Simulationen der EPR- und ENDOR-Spektren erfolgte mit dem Programmpaket *EasySpin* [85] mit der Software MATLAB.

Für die Simulationen der Mn-Katalase Spektren wurde Matrixdiagonalisierung verwendet. Die Simulationen der PSII-Spektren nutzen 2. Ordnung ST. Die Parameter für die Simulation der ENDOR-Spektren wurden manuell variiert, um eine größtmögliche Übereinstimmung mit den experimentellen Spektren zu erzielen. Die Nutzung eines automatisierten Fitalgorithmus war durch die Unsicherheit der relativen ENDOR-Intensitäten

nicht möglich.

Orientierungen von Kopplungen werden mit drei Eulerwinkeln angegeben. Diese folgen der „ $zy'z''$ “-Konvention, vgl. [76].



# Kapitel 5

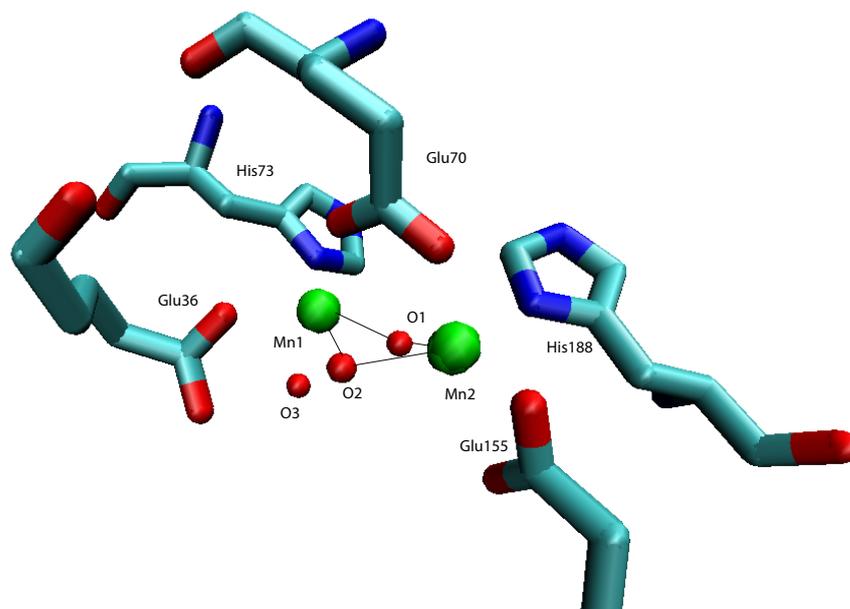
## EPR- und $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektroskopie des Mn(III)Mn(IV)-Zustands der Mn-Katalase

### 5.1 Einführung

Der WOC ist mit seinen vier stark austauschgekoppelten  $^{55}\text{Mn}$ -Kernen ein sehr komplexes System, das mit einer Vielzahl an Parametern zu beschreiben ist. Um diese durch EPR- und insbesondere  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Untersuchungen näher zu bestimmen, ist es hilfreich, zuvor grundlegende Eigenschaften stark austauschgekoppelter Mn-Komplexe an einem einfacheren System zu untersuchen. Solch ein System stellen zweikernige Mn-Modellkomplexe dar.

Es gibt verschiedenste synthetische zweikernige Komplexe, wobei die Mn-Kerne in verschiedenen Oxidationsstufen präpariert werden können. Eine Reihe anorganischer Komplexe mit den Oxidationsstufen Mn(III) und Mn(IV) wurden intensiv mit verschiedenen EPR-Methoden untersucht und charakterisiert [43, 86–88]. Dabei wurden Zusammenhänge zwischen magnetischen Parametern und verschiedenen Bindungsmotiven der Mn-Kerne abgeleitet.

Die Mn-Katalase ist dabei ein gegenüber synthetischen Komplexen besonders interessantes System, da es ein Protein mit einem eingebauten stark austauschgekoppelten zweikernigen Mn-Komplex ist. Die Struktur des aktiven Zentrums von Mn-Katalase aus *Thermus thermophilus* im Mn(III)Mn(III)-Zustand ist in Abb. 5.1 gezeigt [89]. Die beiden Mn-Kerne sind über eine di- $\mu$ -oxo-Brücke (O1, O2) verbunden. Histidine und Glutamate sind weitere Ligandierungspartner. Auffällig ist das Motiv der zweizähnigen Verbrückung über die Karboxylatgruppen des Glu70, das fast senkrecht über der Mn-O<sub>2</sub>-Mn-Ebene steht. Die Struktur des Mn-Zentrums und die umliegenden Proteinliganden sind dem

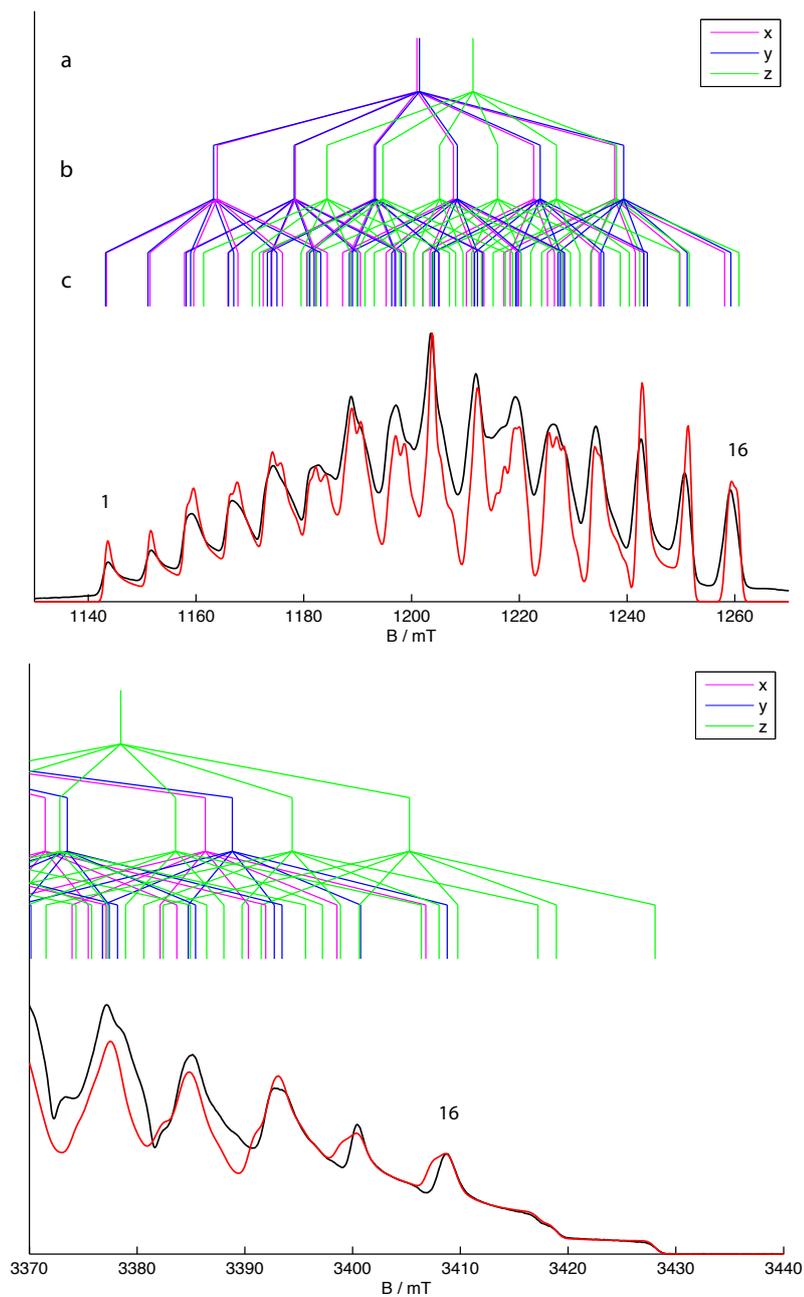


**Abbildung 5.1:** Struktur des aktiven Zentrums von Mn-Katalase aus *Thermus thermophilus* im Mn(III)Mn(III)-Zustand nach der PDB-Struktur 2V8U [89].

WOC sehr ähnlich. Strukturell bedingte Eigenschaften der magnetische Parameter der Mn-Katalase können daher auf den WOC übertragen werden.

Mn-Katalase kann auch in einem inaktiven super-oxidierten Zustand Mn(III)Mn(IV) präpariert werden und ist in diesem ein ideales Modellsystem für den  $S_2$ -Zustand des WOC. DFT-Rechnungen [90] favorisieren für diesen Zustand ein Modell, in welchem Mn1 die Oxidationsstufe (III) trägt und die Jahn-Teller Achse durch O3 und Glu70 vorgegeben ist. Mn2 wird in diesem Modell durch Glu155 zweifach gebunden und trägt die Oxidationsstufe (IV).

Die Analyse von Multifrequenz-EPR- und  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Messungen im X-Band durch Schäfer *et al.* [83] haben zu einem guten Parametersatz des Systems geführt, der als Ausgangspunkt für die Diskussion der im Folgenden dargestellten neuen Messungen dient. Diese zeigen das Potenzial insbesondere von Multifrequenz- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektroskopie, verlässliche Orientierungen von Hyperfein- und Quadrupolkopplungen zu bestimmen.



**Abbildung 5.2:** Oben: Q-Band-FSE der Mn-Katalase (schwarz), Simulation nach [83] (rot), Parameter in Tab. 5.1. Das Strichspektrum für die drei Hauptkomponenten der  $g$ -Matrix verdeutlicht den Aufbau des Spektrums aus dem  $g$ -Beitrag (Stufe a), einem beitragenden Kern (Stufe b) bzw. den Beiträgen beider Kerne (Stufe c). Experimentelle Parameter:  $f = 33,7$  GHz. Unten: W-Band-FSE (schwarz) mit Simulation (rot), Parameter in Tab. 5.1. Experimentelle Parameter:  $f = 93,99$  GHz.

## 5.2 Multifrequenz-EPR am Modellsystem

In Abb. 5.2 ist das EPR-Spektrum des Modellsystems im Q-Band und die Hochfeldflanke des Spektrums im W-Band gezeigt. Das Q-Band-Spektrum zeigt die für Mn(III)Mn(IV)-Komplexe typische Struktur aus 16 Linien. Diese ergeben sich aus der Überlagerung der 36 Übergänge, die nach Gl. 3.20 in einem System mit  $(S = 1/2, I_{1,2} = 5/2)$  erlaubt sind. In diesen Komplexen liegen die Mn-Ionen im Allgemeinen als Hochspinsysteme mit  $S_{Mn(III)} = 2, S_{Mn(IV)} = 3/2$  vor. Die idealisierten Projektionsfaktoren ohne Berücksichtigung lokaler Nullfeldwechselwirkung des Mn(III) ergeben sich nach Gl. 3.14 zu  $c_{Mn(III)} = -2, c_{Mn(IV)} = 1$ . Im idealisierten Fall gleicher intrinsischer Hyperfeinkopplung der beiden Manganionen stünden die effektiven Hyperfeinkopplungen im Verhältnis der Beträge der Projektionsfaktoren  $A_{III}/A_{IV} = 2/1$ . Dieses Verhältnis der Hyperfeinkopplungen führt zu der beobachteten Überlagerung eines Großteils der 36 erlaubten Übergänge zu einem Aufspaltungsmuster mit 16 Linien. Die tatsächlichen intrinsischen Kopplungen sind durch die unterschiedlichen Oxidationszustände ungleich und leicht rhombisch. Es ergibt sich das in Abb. 5.2 über den EPR-Spektren eingezeichnete Strichspektrum entlang der Hauptachsen der  $\mathbf{g}$ -Matrix mit den beobachteten Aufspaltungen und Schultern der 16 Hauptlinien.

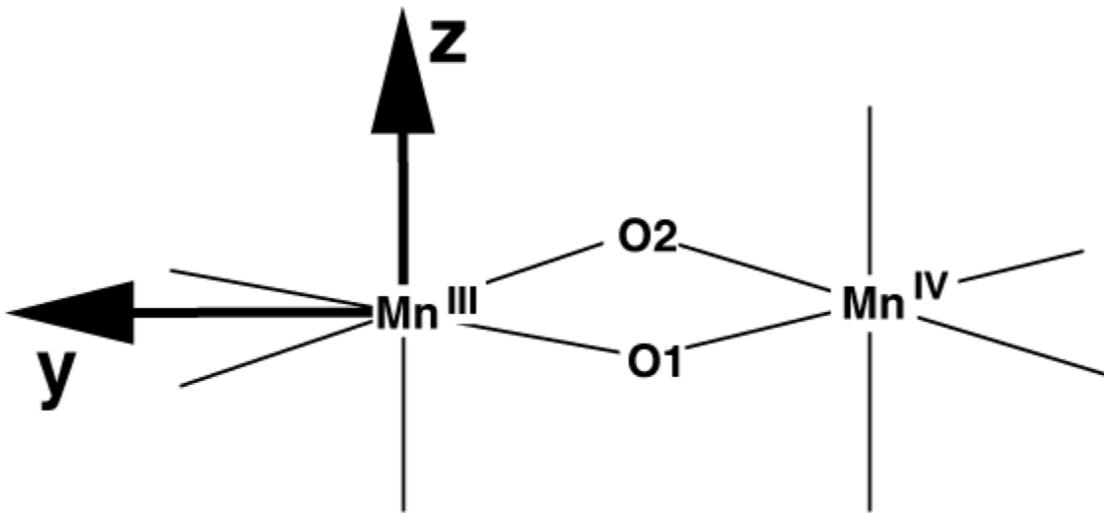
In den Strichspektren sieht man eine durch die Hyperfeinkopplungen dominierte Breite des Spektrums. Im Q-Band-Spektrum sind die ersten beiden Maxima auf der Tieffeldseite nur durch  $x, y$ -Komponenten von  $\mathbf{g}$ -Matrix und Hyperfeinkopplungen gebildet. Das W-Band-EPR-Spektrum zeigt nur einen Teil der Hochfeldflanke des Signals. Hier ist durch die Zunahme der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung gegenüber dem Q-Band auch eine Aufspaltung der  $z$ -Komponenten auf der Hochfeldseite sichtbar. Insbesondere ermöglicht der größere Anteil der  $\mathbf{g}$ -Matrix am Spektrum die Bestimmung desselben mit recht hoher Genauigkeit. In den niedrigeren Frequenzbändern ist die Trennung von  $\mathbf{g}$  und  $\mathbf{A}$  deutlich schwieriger.

Die von Schäfer *et al.* [83] bestimmten magnetischen Parameter sind in Tab. 5.1 zusammengefaßt. In Abb. 5.3 ist eine idealisierte Darstellung des zweikernigen Mn-Komplexes der Mn-Katalase (vgl. Struktur in Abb. 5.1) mit dem Koordinatensystem der  $\mathbf{g}$ -Matrix aus Tab. 5.1 gezeigt. Die  $z$ -Achse entspricht hier der Ligandierungsachse der senkrecht über der Mn-O<sub>2</sub>-Mn-Ebene stehenden Karboxylatgruppen des Glu70. In beiden Manganionen liegt die ausgezeichnete Achse der Hyperfeinkopplung entlang der  $z$ -Achse, damit also entlang der Ligandierungsachse der zweizähligen Karboxylatverbrückung (vgl. Tab. 5.1).

Die Parameter der  $\mathbf{g}$ -Matrix und der Hyperfeinkopplungen aus Tab. 5.1 bestimmten

	$g$	$A_{III}$	$A_{IV}$	$P_{III}$	$P_{IV}$
$x$	2,0048	-414	230	0,4	-1,3
$y$	2,0040	-427	224	0,4	0,2
$z$	1,9876	-299	254	-0,8	1,1

**Tabelle 5.1:** Parametersatz nach [83]. Hyperfein- und Quadrupolkopplungen sind in MHz gegeben.



**Abbildung 5.3:** Idealisierte (planare) Darstellung des zweikernigen Mn-Zentrums. Eingezeichnet ist die Lage der  $y,z$ -Achsen wie sie in Tab. 5.1 verwendet werden.

Schäfer *et al.* aus der Simulation von X-, Q- und W-Band-EPR. Die gefundenen Hyperfeinkopplungen konnten von Schäfer mittels X-Band-ENDOR bestätigt und Quadrupolkopplungen abgeschätzt werden [83]. Allerdings ist die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung im X-Band etwa einen Faktor drei kleiner als im Q-Band. Daher gibt es im X-Band-EPR-Spektrum praktisch keine Separation der Hauptkomponenten, was eine präzise Bestimmung der Parameter nahezu unmöglich macht. Im Rahmen dieser Arbeit wird deshalb Q- und W-Band-ENDOR genutzt, das System genauer zu charakterisieren.

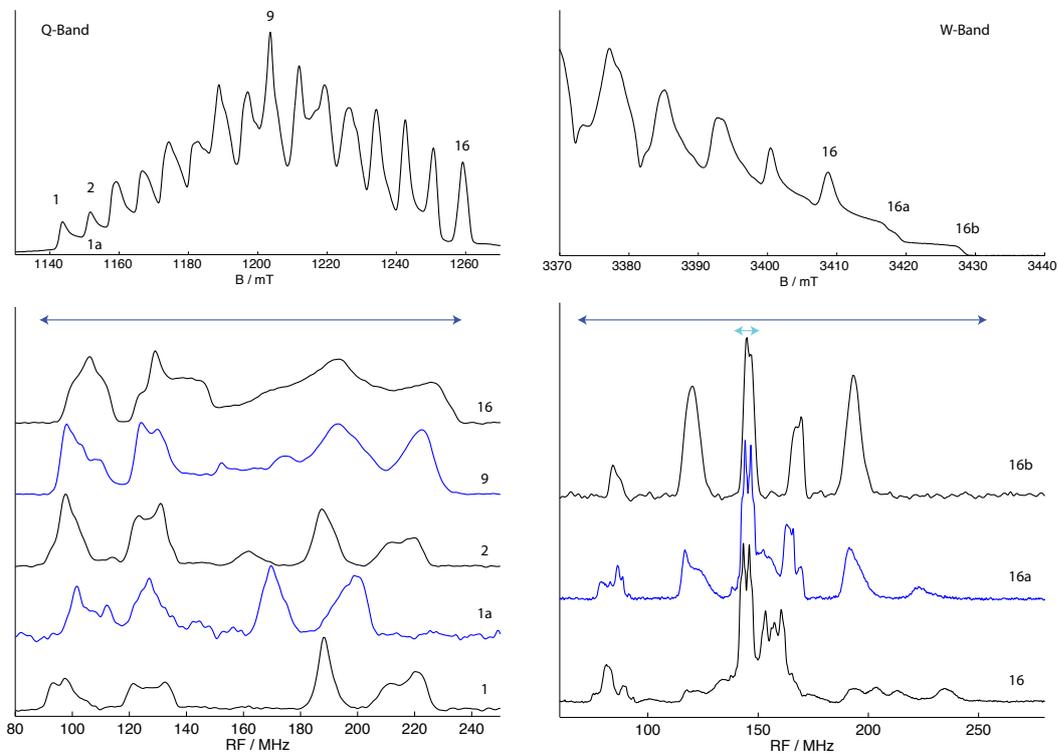
### 5.3 Multifrequenz-<sup>55</sup>Mn-ENDOR am Modellsystem

In Abb. 5.4 sind <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektren an verschiedenen Positionen des EPR-Spektrums in Q- und W-Band gezeigt. Die <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Signale sind in einem Bereich von etwa 160 MHz sichtbar (blauer Pfeil in Abb. 5.4). In den ENDOR-Spektren im W-Band sind die <sup>55</sup>Mn-Signale bei 145 MHz von Protonensignalen (durch einen hellblauen Pfeil gekennzeichnet) überlagert. Diese liegen im Q-Band bei 52 MHz und damit außerhalb des dargestellten Frequenzbereiches.

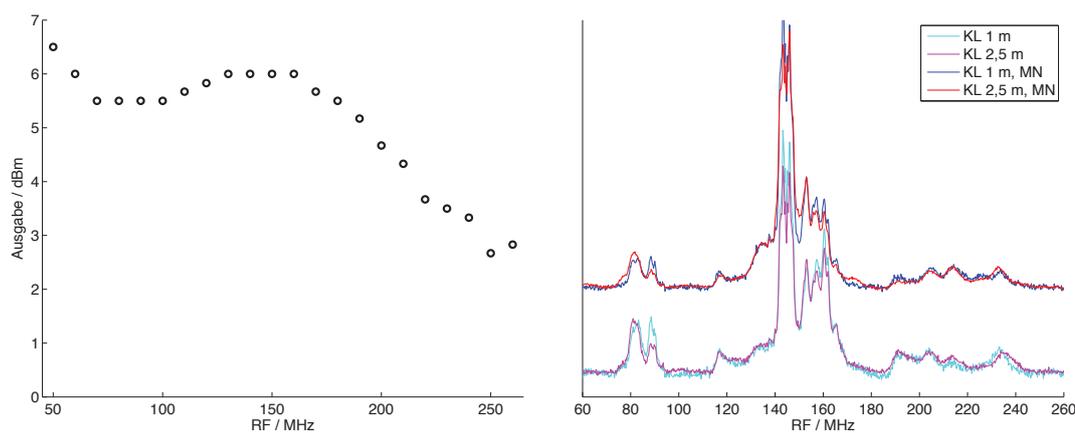
Aus den ENDOR-Spektren können Linienpositionen zuverlässig bestimmt werden. Im Gegensatz dazu sind Linienintensitäten stark durch den experimentellen Aufbau beeinflusst. Insbesondere die breiten <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektren stellen hohe Anforderungen an den Aufbau. Interpretierbare ENDOR-Intensitäten erfordern ein möglichst vergleichbares RF-Feld über den gesamten Bereich des Spektrums. Das RF-Feld am Probenort ist durch den Frequenzgang der RF-Quelle und der RF-Spule bestimmt.

In Abb. 5.5 ist im linken Teilbild die ausgegebene Leistung der RF-Quelle (DICE-II) aufgetragen. Im Bereich von 60 MHz bis 190 MHz variiert die RF-Leistung relativ wenig um 0,5 dB. Für höhere Frequenzen fällt die ausgegebene Leistung bis 250 MHz etwa linear um 3 dB ab. Dies bedeutet eine Verringerung des RF-Feldes um den Faktor  $\sqrt{2}$  über diesen Frequenzbereich und damit einhergehend einen Intensitätsrückgang. Diese Abhängigkeit zeigen alle hier durchgeführten ENDOR-Messungen.

Durch unterschiedliches Resonatordesign in den verschiedenen Frequenzbändern ist die frequenzabhängige RF-Leistung, die von der RF-Spule selbst erzeugt wird, sehr verschieden. Insbesondere im W-Band sind die gemessenen Spektren in Bezug auf die relativen Signalamplituden nicht verlässlich. In Abb. 5.5 sind im rechten Bild ENDOR-Spektren der Mn-Katalase gezeigt. Hier wurde der Einfluß der RF-Kabellängen und des „matching network“ (MN, Anpassung des RF-Kreises insbesondere um die Protonenfrequenz herum) untersucht. Man sieht, daß die RF-Kabellänge im Bereich um 80 MHz das Intensitätsmuster stark ändert. Ein weiterer gravierender Effekt ist die scheinbare Verschiebung des Signalmaximums bei 230 MHz. Bei Verwendung des „matching network“ werden die Unterschiede der zwei Kabellängen sehr viel kleiner. Das veränderte Intensitätsmuster um 80 MHz zeigt sich aber auch hier. Im Bereich um 230 MHz sind die Spektren jetzt aber vergleichbar. Bei Verwendung des MN zeigt sich für beide Kabellängen ein verändertes Intensitätsmuster der Dreierstruktur im Bereich 180 bis 220 MHz. Mit eingebautem MN nimmt die Amplitude der Signalmaxima zu größeren Frequenzen hin zu, während ohne MN das hochfrequente Maximum der Struktur die kleinste Intensität zeigt.



**Abbildung 5.4:** Links: Q-Band-ENDOR-Spektren an ausgewählten Feldstellen (Pos. 1: 1142 mT, Pos. 1a: 1147,6 mT, Pos. 2: 1150,2 mT, Pos. 9: 1202,2 mT, Pos. 16: 1257,7 mT), die im darüber gezeigten EPR-Spektrum markiert sind. Der Frequenzbereich der  $^{55}\text{Mn}$ -Signale ist mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet. Experimentelle Parameter:  $f = 33,7$  GHz. Rechts: W-Band-ENDOR-Spektren an ausgewählten Feldstellen (Pos. 16b: 3424,3 mT, Pos. 16a: 3414,3 mT, Pos. 16: 3397,1 mT), die im darüber gezeigten EPR-Spektrum markiert sind. Der Bereich der  $^{55}\text{Mn}$ -Signale ist mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet. Überlagernde Protonensignale bei 145 MHz sind mit einem hellblauen Pfeil markiert. Experimentelle Parameter:  $f = 93,99$  GHz. Pos 16a, 16b:  $T = 20$  K, srt 5000  $\mu\text{s}$ . Pos. 16:  $T = 10$  K, srt 30000  $\mu\text{s}$ .



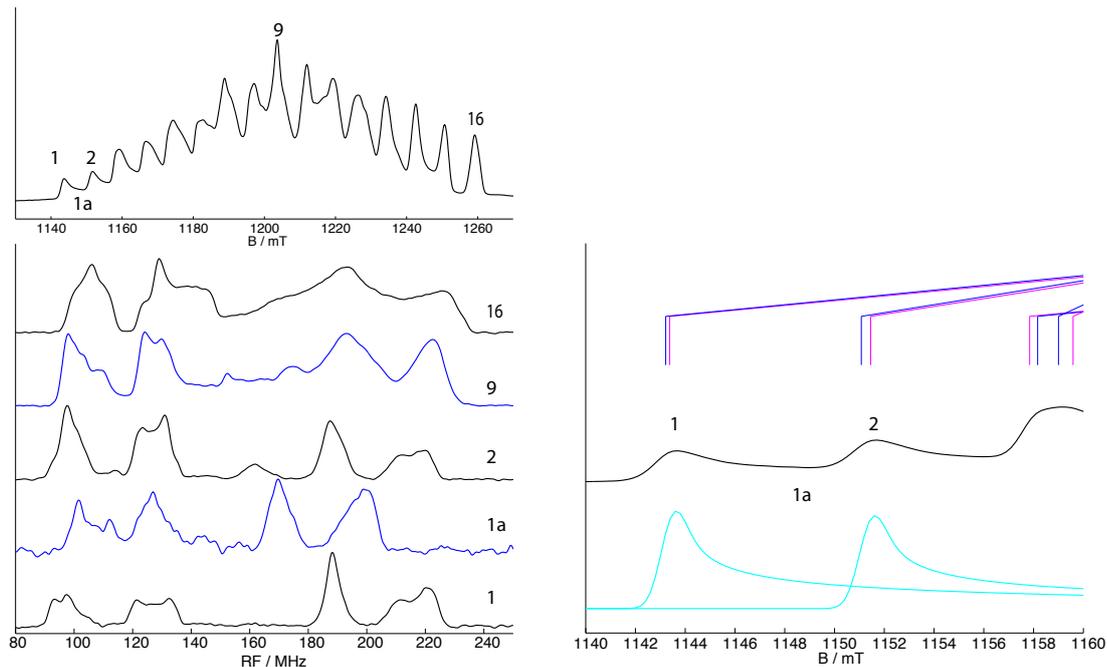
**Abbildung 5.5:** Links: Ausgabe der DICE-Box II in Abhängigkeit der Frequenz, die Leistung wurde mit einem Spectrum Analyzer gemessen. Rechts: ENDOR-Spektrum von Mn-Katalase bei  $B_0 = 3398$  mT mit zwei unterschiedlichen Kabellängen (KL). Zusätzlich wurde für jedes Kabel der Einfluß eines „matching network“ (MN), also einer Anpassung des Schwingkreises im Bereich der Protonensignale um 145 MHz untersucht.

Die beobachteten Abhängigkeiten der W-Band-ENDOR-Spektren von Kabellängen scheinen dabei ein Ergebnis des Resonator-Designs zu sein, da für zwei unterschiedliche Probenköpfe gleicher Bauart die Spektren exakt reproduziert werden konnten.

ENDOR-Spektren aus anderen Frequenzbändern sind natürlich ebenso durch die RF-Charakteristiken der verwendeten Probenköpfe geprägt. Dabei zeigt sich aber im Q-Band im Gegensatz zu den Phänomenen im W-Band keinerlei Beeinflussung des Spektrums durch Kabellängen. Der RF-Kreis des Q-Band-Resonators scheint deutlich unempfindlicher in seinem Verhalten gegen äußere Aufbauten, als das beim W-Band-Resonator der Fall ist.

Der Einfluß des experimentellen Aufbaus auf die ENDOR-Intensitäten in breitbandigen ENDOR-Spektren läßt sich mangels Referenzspektren in den betroffenen Frequenzbereichen nicht quantifizieren. Daher sind für eine Analyse und Simulation von ENDOR-Spektren hauptsächlich Linienpositionen heranzuziehen. Eine quantitative Simulation der ENDOR-Spektren, die auch den Intensitätsverlauf wiedergibt, ist im Allgemeinen kaum möglich.

In Abb. 5.6 sind im linken Bild noch einmal Q-Band-ENDOR-Spektren an ausgewählten Positionen des EPR-Spektrums gezeigt. Die Spektren zeigen je nach gewählter Feldposition im EPR-Spektrum deutlich unterschiedliche Merkmale. Das Spektrum bei



**Abbildung 5.6:** Links: Q-Band-ENDOR-Spektren an ausgewählten Feldstellen (Pos. 1: 1142 mT, Pos. 1a: 1147,6 mT, Pos. 2: 1150,2 mT, Pos. 9: 1202,2 mT, Pos. 16: 1257,7 mT), die im darüber gezeigten EPR-Spektrum markiert sind. Rechts: Tieffeldbereich des EPR-Spektrums. In diesem Bereich tragen nur die Niveaus mit  $m_I^{III} = -5/2, m_I^{IV} = 5/2$  und  $m_I^{III} = -5/2, m_I^{IV} = 3/2$  bei, die entsprechenden Beiträge zum EPR-Spektrum sind in hellblau eingezeichnet.

Position 1 ist relativ einfach. Es zeigt vier Linien, von denen drei eine zusätzliche Aufspaltung zeigen. Dies ist ein deutliches Zeichen, daß zur Beschreibung der Spektren auch Quadrupolkopplungen benötigt werden. Die Spektren an weiteren Positionen der EPR-Linie zeigen zunehmend mehr Strukturierung, die beobachteten Signale decken den gesamten erwarteten Bereich der Hyperfeinkopplung ab. Die Kernlarmorfrequenz von  $^{55}\text{Mn}$  liegt im Q-Band bei 12 MHz. Da die Hyperfeinkopplungen der Manganionen deutlich größer sind, liegen die ENDOR-Resonanzen in erster Näherung zentriert um die halbe Hyperfeinkopplung. Damit finden sich Beiträge von Mn(IV) im Bereich zwischen 80 MHz und 140 MHz (vgl. Tab. 5.1). Mn(III)-Beiträge erstrecken sich durch die deutlich größere Anisotropie von 138 bis 225 MHz. Außer im Bereich der  $A_z^{III}$ -Komponente sind die Beiträge der beiden Kerne also gut getrennt.

Im Folgenden wird zunächst qualitativ das unterschiedliche Erscheinungsbild der EN-

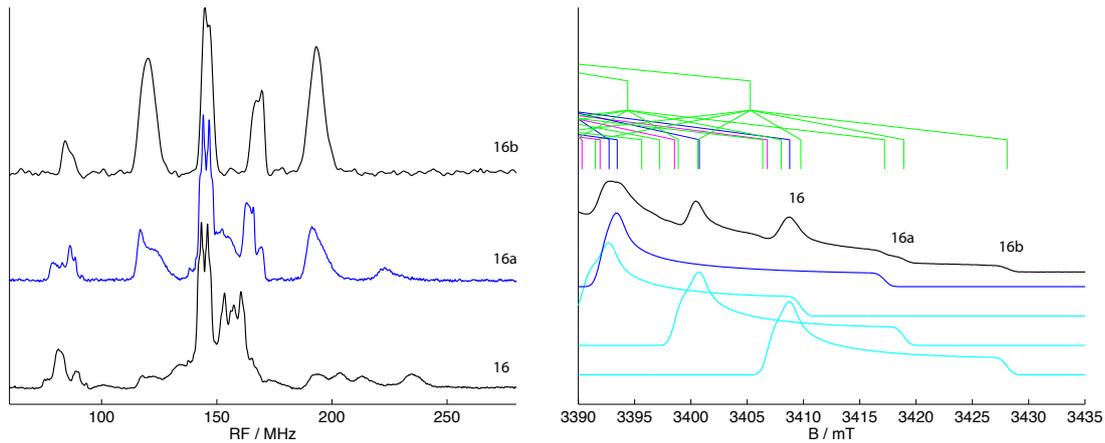
DOR-Spektren aus Abb. 5.6 abhängig von der gewählten Feldposition durch die starke Orientierungs- und  $m_I$ -Selektion erklärt.

In Abb. 5.6 ist rechts die Tieffeldseite des EPR-Spektrums gezeigt. Im Strichspektrum darüber sieht man, daß das erste Maximum (Pos. 1) nur von jeweils einer Linie der  $x,y$ -Komponente mit  $m_I^{III} = -5/2, m_I^{IV} = 5/2$  gebildet wird. Demnach erwartet man für das ENDOR-Spektrum an dieser Position ein einkristallartiges Spektrum nur einer Orientierung. Dabei wird für jeden Kern nur ein einziger ENDOR-Übergang angeregt, nämlich von  $m_I^{III} = -5/2 \rightarrow m_I^{III} = -3/2$  und  $m_I^{IV} = 5/2 \rightarrow m_I^{IV} = 3/2$  in den beiden  $m_S$ -Mannigfaltigkeiten, also vier Linien. Die auf diesen Linien beobachtete Aufspaltung ist auf zusätzliche Quadrupolkopplung zurückzuführen (vgl. Kap. 3.4). An Position 1a sind ebenfalls nur die für Position 1 auftretenden Übergänge beteiligt. Jetzt wird aber jeweils eine andere Komponente der Kopplung ausgewählt, nicht mehr die mit  $g_{x,y}$  verknüpften  $A_{x,y}$ -Komponenten, sondern Zwischenwerte der Kopplung. Diese Verschiebung der abgefragten Orientierung ist im Bereich des Mn(III) durch die größere Anisotropie besonders deutlich zu sehen.

An Position 2 setzt sich dieser Effekt fort, das Signal des Mn(III) ist weiter in Richtung der  $A_z$ -Komponente verschoben. Der zum Signal bei 162 MHz gehörende tieffrequente Partner liegt dabei im Bereich von 136 MHz und wird von den Signalen des Mn(IV) verdeckt. An dieser Position des EPR-Spektrums trägt jetzt zusätzlich ein weiterer Kernzustand mit  $m_I^{III} = -5/2, m_I^{IV} = 3/2$  bei, von dem an dieser Position die  $x,y$ -Komponenten der Hyperfeinkopplung ausgewählt werden. Daher ähneln sich die Spektren an Positionen 1 und 2, besonders deutlich ist dies wieder im Bereich des Mn(III) zu sehen. Die unterschiedliche Form und leichte Verschiebung der Linien in den Spektren an Position 1 und Position 2 ist durch die  $m_I$ -abhängige ENDOR-Resonanz aufgrund von Effekten 2. Ordnung Störungstheorie der Hyperfein- und Quadrupolkopplungen bedingt.

ENDOR-Spektren weiter im Zentrum der EPR-Linie werden durch die zunehmende Zahl beteiligter Übergänge deutlich komplexer und zeigen beispielsweise an Position 9 im Mn(III)-Bereich eine sehr breite strukturierte Intensitätsverteilung. Auf dem Hochfeldmaximum des EPR-Spektrums (Pos. 16) ist, wie aus dem Strichspektrum in Abb. 5.2 oben ersichtlich, die gesamte Hyperfeinkopplung des Mn(III) angeregt.

Für eine Analyse der magnetischen Parameter sind selektive Spektren einzelner Komponenten der Kopplungen wie bei Position 1 der Q-Band-ENDOR-Spektren sehr hilfreich. Die  $z$ -Komponente der Kopplungen kann im Q-Band nicht separat abgefragt werden. Eine Selektion der  $z$ -Komponente ist erst bei W-Band-Frequenzen durch die größere Elektron-Zeeman-Aufspaltung möglich. In Abb. 5.7 sind ENDOR-Spektren an ausgewählten Po-



**Abbildung 5.7:** Links: W-Band-ENDOR-Spektren an ausgewählten Feldstellen (Pos. 16: 3397,1 mT, Pos. 16a: 3414,3 mT, Pos. 16b: 3424,3 mT). Um 145 MHz sind Protonenbeiträge sichtbar. Rechts: Hochfeldbereich des EPR-Spektrums. Darunter sind die Beiträge einzelner Zustände zum EPR-Spektrum eingezeichnet, in hellblau  $m_I^{III} = -5/2, m_I^{IV} = 5/2 - 1/2$  und in blau  $m_I^{III} = -3/2, m_I^{IV} = 5/2$ .

sitionen an der Hochfeldflanke des EPR-Spektrums gezeigt.

Durch die ebenfalls mit dem Feld skalierte Kern-Zeeman-Wechselwirkung ist die Aufspaltung der ENDOR-Signale um die zweifache Kernlarmorfrequenz deutlich größer als im Q-Band und die Signale von Mn(III) und Mn(IV) überlagern. Trotzdem ist durch die geringe Anisotropie der Mn(IV)-Kopplung eine Zuordnung gut möglich.

An Position 16b findet man analog zu Position 1 im Q-Band nur einen beitragenden ENDOR-Übergang je Kern und  $m_S$ -Mannigfaltigkeit, also vier Linien. Auffällig ist, daß nur die zwei Linien des Mn(IV) bei 85,5 MHz und 168 MHz eine Struktur zeigen. Die beiden Mn(III)-Linien liegen bei 120,5 und 193 MHz. Diese Linien zeigen keine Struktur, zudem entspricht die Aufspaltung der zweifachen Kernlarmorfrequenz. Die  $z$ -Komponente des Mn(III) zeigt also keinen Beitrag einer Quadrupolwechselwirkung, obwohl für die maximalen  $m_I$ -Werte der größte Beitrag erwartet wird (vgl. Kap. 3.4).

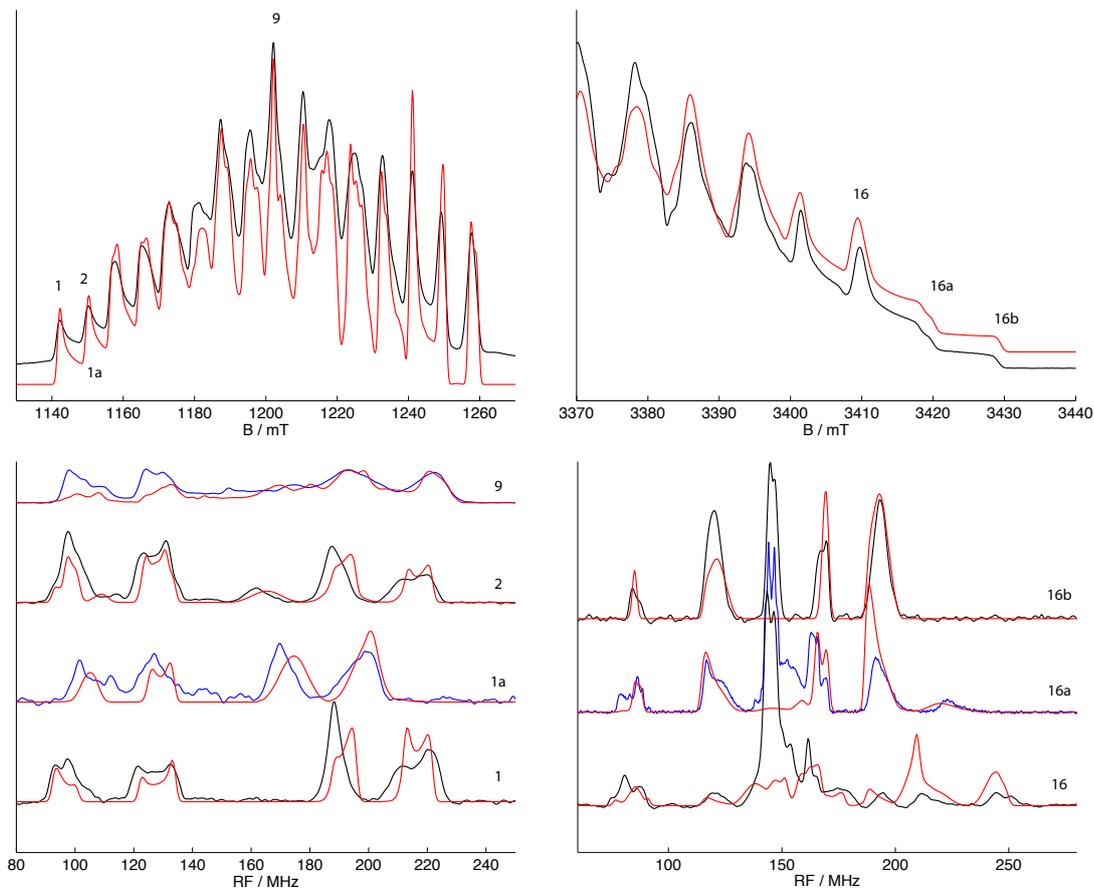
Sobald eine Position in Richtung des Zentrums der EPR-Linie gewählt wird, zeigen sich im ENDOR-Spektrum zusätzliche Signale, die sich ähnlich wie im Q-Band-Spektrum erklären lassen. Bei Position 2 trägt neben einer anderen Orientierung des Zustands mit  $m_I^{III} = -5/2, m_I^{IV} = 5/2$  auch die  $z$ -Komponente des Zustandes mit  $m_I^{III} = -5/2, m_I^{IV} = 3/2$  bei. Zusätzlich trägt auch der Zustand mit  $m_I^{III} = -3/2, m_I^{IV} = 5/2$

(siehe Abb. 5.7, rechts unten, blau für  $m_I^{III} = -3/2$ , hellblau für  $m_I^{III} = 5/2$ ) bei. Für diese Position ist nun ein Quadrupolbeitrag auch auf den Mn(III)-Signalen zu beobachten, erkennbar an den deutlich unterschiedlich ausgeprägten Schultern der Linien bei 117 MHz und 192 MHz. Wie im Q-Band wird das Spektrum für weiter in der Mitte der EPR-Linie liegende Positionen strukturierter und komplizierter.

Als Ausgangspunkt für Simulationen der ENDOR-Spektren bieten sich die selektiven Spektren der äußersten Maxima an. Im Q-Band selektiert Position 1 sehr gut die  $x,y$ -Komponenten, Position 16b im W-Band die  $z$ -Komponente der Hyperfein- und Quadrupolkopplung. Insbesondere das W-Band-ENDOR-Spektrum an Position 16b zeigt, daß die von Schäfer *et al.* angegebene Orientierung der Quadrupolkopplung des Mn(III) relativ zur Hyperfeinkopplung nicht zutrifft. Schäfer *et al.* [83] legt die größte Komponente der Mn(III)-Quadrupolkopplung entlang der  $z$ -Achse. Das selektive ENDOR-Spektrum an Position 16b zeigt aber für das Mn(III) keinen Quadrupolbeitrag.

Eine Simulation aller ENDOR-Spektren ist schwierig. Neben den Hauptwerten von Hyperfein- und Quadrupolkopplung beeinflussen die Orientierungen dieser Wechselwirkungen gegenüber der  $\mathbf{g}$ -Matrix durch die große Orientungsselektion des Systems die Spektren sehr stark. Die zwei Hyperfeinkopplungen sind jeweils durch drei Hauptwerte und drei Eulerwinkel beschrieben. Zusätzlich zu diesen 12 Parametern werden noch jeweils zwei Parameter (vgl. Gl. 3.7) für die Quadrupolkopplung benötigt. Ein eindeutiger Fit der 16 Parameter ist kaum möglich. Die Diskussion der Simulation beschränkt sich daher hier auf die Randspektren, in denen eine Zuordnung der Signale recht gut möglich ist.

Eine Simulation der EPR- und ENDOR-Spektren mit den in Tab. 5.2 aufgeführten Parametern ist in Abb. 5.8 gezeigt. Die Simulationen bilden die ENDOR-Spektren qualitativ gut ab. Besonders gut werden die zwei äußersten W-Band-Positionen simuliert. Da diese Spektren nur Beiträge entlang  $g_z$  enthalten, ist die Zahl der Parameter beschränkt und eine gute Simulation leicht möglich. Schwieriger gestaltet sich die Simulation der Q-Band-ENDOR-Spektren, da auch auf den Tieffeldpositionen Hyperfein- und Quadrupolkomponenten entlang  $g_x$  und  $g_y$  beitragen. Tendenziell werden die qualitativen Trends der Mn(III)-Signale gut beschrieben, auch wenn einzelne Positionen nicht genau getroffen werden. Dies liegt insbesondere an der großen Anisotropie der Mn(III)-Hyperfeinkopplung, die die Signale sehr empfindlich auf relative Orientierungen der Hyperfein- und Quadrupolkopplung macht. Dagegen werden die Positionen der Mn(IV)-Signale gut getroffen, die Signalförmigkeit wird aber nicht für alle Positionen gut wiedergegeben.



**Abbildung 5.8:** Oben Links: Q-Band-FSE (schwarz) und Simulation (rot). Oben Rechts: W-Band-FSE (schwarz) und Simulation (rot). Unten Links: Q-Band-ENDOR, Simulationen in rot, Positionen wie in Abb. 5.6. Unten Rechts: W-Band-ENDOR, Simulationen in rot, Positionen wie in Abb. 5.7.

Die hier verwendeten Parameter für Hyperfeinkopplungen stimmen sehr gut mit den bereits für dieses System aus Simulation von EPR-Spektren gefundenen [88,91] überein. Die Bestimmung von Quadrupolkopplungen ist nur aus ENDOR-Spektren möglich, hier können die Parameter von Schäfer *et al.* aus Ref. [83] nur als Abschätzung betrachtet werden, da die Auflösung der ENDOR-Spektren im X-Band nicht für eine genaue Bestimmung der Parameter genügt. Hauptwerte und Orientierungen der Hyperfein- und Quadrupolkopplungen sind jedoch dank der aufgelösten Q- und W-Band-ENDOR-Spektren verlässlich bestimmbar.

Die hier bestimmten Hyperfeinkopplungen sind gegenüber den Parametern in Ref. [83]

		$g$	$A_{III}$	$A_{IV}$	$P_{III}$	$P_{IV}$
diese Arbeit	$x$	2,0048	-411	233	-0,4	-1,3
	$y$	2,0040	-425	224	0,3	0,2
	$z$	1,9876	-299	256	0,1	1,1
Schäfer <i>et al.</i> [83]	$x$	2,0048	-414	230	0,4	-1,3
	$y$	2,0040	-427	224	0,4	0,2
	$z$	1,9876	-299	254	-0,8	1,1

**Tabelle 5.2:** Parametersatz für die Simulationen in Abb. 5.8. Hyperfein- und Quadrupolkopplungen sind in MHz gegeben. Die Orientierung der Hyperfeinkopplungen  $A_{III}$  und  $A_{IV}$  relativ zur  $\mathbf{g}$ -Matrix ist durch die Eulerwinkel ( $25^\circ$ ,  $0^\circ$ ,  $13^\circ$ ) und ( $13^\circ$ ,  $3^\circ$ ,  $19^\circ$ ) gegeben.

in der  $x$ - $y$ -Ebene verdreht (vgl. Beschriftung von Tab. 5.2). Im Koordinatensystem der  $\mathbf{g}$ -Matrix entspricht dies einer Orientierung der Hyperfeinkomponenten eher entlang der Bindungsachsen der Mn-O<sub>2</sub>-Mn-Ebene als entlang der direkten Mn-Mn-Verbindungsline bzw. senkrecht zu dieser in der Ebene. Die  $z$ -Komponenten der Hyperfeinkopplungen liegen parallel zu  $g_z$ , diese Orientierung wurde auch von Schäfer *et al.* [83] gefunden. Damit liegt die ausgezeichnete Achse der Hyperfeinkopplungen für beide Manganionen entlang der Verbrückungsachsen des Glu70 (vgl. Abb.5.3 und 5.1). Die hier beschriebenen Überlegungen zum Zusammenhang der Hyperfeinorientierung zur Struktur beruhen auf dem gewählten Koordinatensystem der  $\mathbf{g}$ -Matrix. Eine davon unabhängige Korrelation der Hyperfeinkopplungen zur Struktur wäre zum Beispiel über Einkristallmessungen möglich.

Ein markanter Unterschied zwischen den Parametern nach Ref. [83] und den hier gefundenen ist die Orientierung der Quadrupolkopplung des Mn(III). In verschiedenen anorganischen Mn(III)Mn(IV)-Komplexen wurde für das Mn(III) die Quadrupolkopplung mit der größten Komponente  $P_z$  entlang  $A_z$  bestimmt [43, 83]. In diesen Arbeiten wurde von der Jahn-Teller-Achse des Mn(III) auf die Orientierung des Feldgradienten am Kernort geschlossen, allerdings wurden nur X-Band-ENDOR-Messungen genutzt. Daher sind die Angaben zur Orientierung der Quadrupolkopplung nicht verlässlich. In verschiedenen Veröffentlichungen von DFT-Rechnungen an Mn-Modellkomplexen [90, 92, 93], unter anderem an Mn-Katalase(III,IV), werden ausschließlich die Hauptwerte der Hyperfein- und Quadrupolkopplung diskutiert, Orientierungen der Kopplungen relativ zueinander blei-

ben dabei unberücksichtigt. Eine neue Studie von Cox *et al.* [94] an einem Mn(II)Mn(III)-Dimer findet experimentell in Q-Band-ENDOR-Spektren und theoretisch für das Mn(III) in diesem Komplex eine Quadrupolkopplung, die gegenüber der Hyperfeinkopplung um  $90^\circ$  verkippt ist. Damit liegt die größte Komponente  $P_z$  in der  $x$ - $y$ -Ebene der Hyperfeinkopplung. Diese Konfiguration entspricht der in dieser Arbeit für das Mn(III) in Mn-Katalase gefundenen.

## 5.4 Zusammenfassung

Die vorgestellten Untersuchungen des superoxidierten Zustands in Mn-Katalase als zweikerniges Mn-Modellsystem zeigen die prinzipielle Leistungsfähigkeit von EPR-Methoden für die Bestimmung der magnetischen Parameter des Komplexes.

Über die Analyse der aufgelösten EPR-Spektren sind sehr gute Abschätzungen der Hyperfeinkopplungen möglich. Eine genaue Bestimmung der  $\mathbf{g}$ -Matrix erfordert den Einsatz von Multifrequenz-EPR, da erst in höheren Frequenzbändern der Beitrag von  $\mathbf{g}$  zum Spektrum dominant wird.

Die  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren erlauben durch die starke Orientierungsselektion eine unabhängige Bestimmung der Hyperfeinkopplungen und ihrer Orientierung relativ zu  $\mathbf{g}$ . Die Quadrupolkopplungen können dank der aufgelösten ENDOR-Spektren ebenso bestimmt werden.

Insbesondere die Untersuchungen verschiedener RF-Aufbauten im W-Band zeigen, daß gemessene ENDOR-Intensitäten stark vom experimentellen Aufbau beeinflusst werden. Dabei kann es im Extremfall zu scheinbaren Verschiebungen von Signalmaxima kommen, auch relative Intensitätsmuster einzelner Linien sind nicht sehr verlässlich. Diese Schwierigkeiten beruhen auf der enormen spektralen Breite der ENDOR-Signale, die eine große Herausforderung für den RF-Kreis darstellt.

Die Multifrequenz- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR Messungen erlaubten erstmals eine genauere Bestimmung der Quadrupolkopplungen der Manganionen und ihrer Orientierung in der Mn-Katalase. Dabei weicht die Orientierung der Quadrupolkopplung des Mn(III) deutlich von bisherigen Annahmen ab.

Die Hyperfeinkopplung des Mn(III) ist oblat (zwei große Komponenten), die Hyperfeinkopplung des Mn(IV) ist prolat (zigarrenförmig mit zwei kleinen Komponenten). Die ausgezeichnete Achse der beiden Hyperfeinkopplungen steht senkrecht auf der Mn-O<sub>2</sub>-Mn-Ebene und liegt damit parallel zu den Ligandierungsachsen der Karboxylatbrücke.

Sowohl die Axialität (oblat für Mn(III), prolat für Mn(IV)) als auch die Orientierung der Hyperfeinkopplungen (ausgezeichnete Achse entlang der Ligandierungsachse der Carboxylatbrücke) ist in mehreren anorganischen zweikernigen Mn(III)Mn(IV)-Komplexen bestimmt worden [83]. Damit ermöglichen insbesondere die Orientierungen der Hyperfeinkopplungen der Manganionen eine Korrelation zwischen magnetischen Parametern und geometrischer Struktur.

Die hier verwendeten Methoden, deren Möglichkeiten am Modellsystem demonstriert wurden, werden im Folgenden auch zur Untersuchung des vierkernigen Mn-Komplexes im PSII eingesetzt.

## Kapitel 6

# EPR- und $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektroskopie des $\text{S}_2$ -Zustands in PSII

Wie in Kap. 2.2 erläutert, ist die experimentelle Charakterisierung der einzelnen Zustände des Kok-Zyklus für das Verständnis des Mechanismus der katalytischen Wasserspaltung in PSII entscheidend.

Der paramagnetische  $\text{S}_2$ -Zustand mit einem Spin  $S = 1/2$  im Grundzustand [34] war seit seiner Entdeckung durch Dismukes *et al.* [33] Gegenstand zahlreicher Untersuchungen mittels EPR- und ENDOR-Methoden. Diese ergaben, daß der Ursprung des Signals der vierkernige gekoppelte Mn-Komplex ist [43]. Dabei sind die Oxidationszustände der Manganionen in diesem Zustand  $\text{Mn(III)Mn(IV)}_3$  [44]. Über die Zeit wurden verschiedene magnetische Parametersätze zur Beschreibung des Signals des  $\text{S}_2$ -Zustands veröffentlicht [23, 42, 45, 95]. Dabei wurden aus diesen Parametersätzen Kopplungsmuster abgeleitet, um daraus Aussagen zur Struktur des Mn-Komplexes im  $\text{S}_2$ -Zustand sowie insbesondere zur Position des Mn(III) in diesem Zustand zu ermöglichen. Dessen Position im Komplex ist von Interesse, da verschiedene Modelle des Mechanismus von einer Beteiligung dieses Mn-Ions an der Ausbildung der Sauerstoffbindung ausgehen. Bisherige Untersuchungen und DFT-Rechnungen ergaben widersprüchliche Zuordnungen des Mn(III) zu Positionen in den Strukturmodellen.

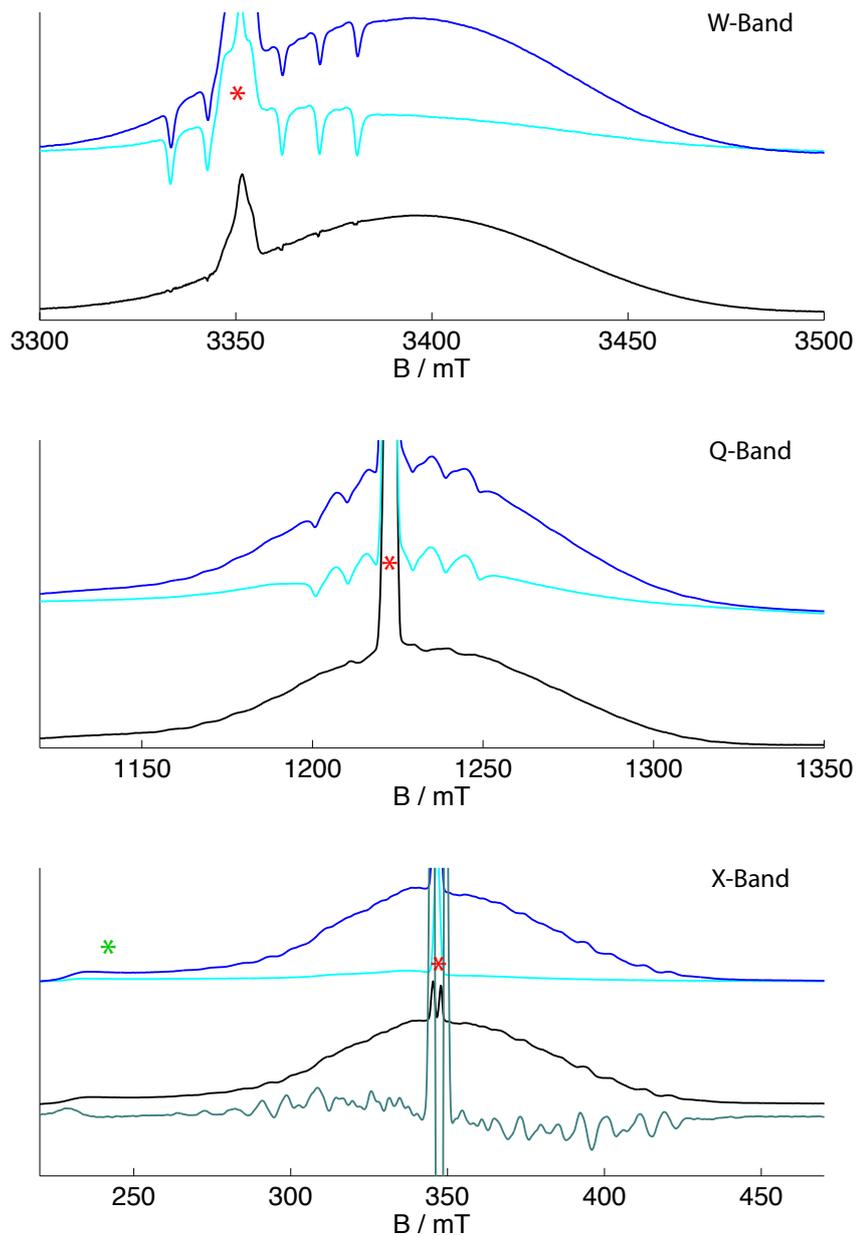
Zur Überprüfung der Strukturmodelle des Komplexes und darauf aufbauender möglicher Reaktionspfade aus DFT-Rechnungen ist eine noch bessere experimentelle Charakterisierung der magnetischen Parameter des  $\text{S}_2$ -Zustandes unerlässlich. Im Folgenden werden nach einer kurzen Vorstellung des EPR-Signals des  $\text{S}_2$ -Zustandes die in dieser Arbeit durchgeführten  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Untersuchungen in Lösung und am Einkristall gezeigt und auf der Grundlage der erfolgten Simulationen eine Zuordnung der magnetischen Kopplungen zur Struktur des Mn-Komplexes vorgeschlagen.

## 6.1 Multifrequenz-EPR des $S_2$ -Zustands in PSII

In Abb. 6.1 sind die EPR-Spektren von PSII im dunkeladaptierten und beleuchteten Zustand im X-, Q- und W-Band in hellblau und blau gezeigt. Neben dem Mn-Komplex gibt es noch weitere paramagnetische Zentren im PSII, deren EPR-Signale zum Teil mit dem des Mn-Komplexes im  $S_2$ -Zustand überlappen. Diese Zentren sind zum Teil über lange Zeit stabil und somit auch in dunkeladaptiertem PSII detektierbar. Es ist daher möglich ein Hintergrundspektrum dieser Beiträge in dunkeladaptierten Proben aufzunehmen, in denen der Mn-Komplex im  $S_1$ -Zustand ist und kein EPR-Signal im Bereich um  $g = 2$  aufweist. Der  $S_2$ -Zustand kann durch geeignete Belichtungsprotokolle (vgl. Kap. 4.1) präpariert werden. Das EPR-Signal des Mn-Komplexes im  $S_2$ -Zustand ist nach Differenzbildung aus den Spektren von belichtetem und dunkeladaptiertem PSII in Abb. 6.1 in schwarz gezeigt.

Zu den paramagnetischen Zentren im PSII gehören neben dem WOC insbesondere das dunkelstabile  $Y_D^\bullet$  und das Cytochrom cyt-c550. Das schmale Signal des  $Y_D^\bullet$  ist um  $g = 2,004$  in allen Proben sichtbar. Die Verschiebung des  $Y_D^\bullet$ -Signals gegen das Signal des  $S_2$ -Zustands mit zunehmender Frequenz liegt an den unterschiedlichen  $g$ -Faktoren, die mit höherer Frequenz besser aufgelöst werden. Das  $Y_D^\bullet$  ist zwar sehr dunkelstabil, ein Teil der Population rekombiniert aber doch langsam, so daß in den belichteten Spektren des  $S_2$ -Zustands das Signal deutlich größere Intensität zeigt. Zusätzlich ändert sich die  $T_2$ -Relaxation des  $Y_D^\bullet$  in Abhängigkeit des S-Zustandes des Mn-Komplexes [96]. Durch beide Faktoren sind die Intensitäten des Signals in den beiden S-Zuständen nicht gleich und es bleibt ein Subtraktionsartefakt im Differenzspektrum (Abb. 6.1, schwarz). Das EPR-Spektrum des cyt-c550 überlappt einen Teil des EPR-Spektrums des MLS, was im X-Band-Spektrum des dunkeladaptierten PSII besonders deutlich wird. Da die Intensität des Signals des cyt-c550 ebenfalls eine gewisse Abhängigkeit von Belichtung zeigt [46], kommt es zu Restintensitäten im Differenzspektrum.

In allen Proben findet sich außerdem freies  $Mn^{2+}$  in unterschiedlicher Konzentration, das von degradierten PSII-Zentren freigesetzt wird.  $Mn^{2+}$  hat einen Elektronenspin  $S = 5/2$ . In diesem System sind alle Übergänge außer  $m_S = \pm 1/2 \rightarrow m_S = \mp 1/2$  durch die Nullfeldwechselwirkung  $D$  stark verbreitert und im Spektrum nicht deutlich sichtbar. Die nahezu isotrope, große Hyperfeinkopplung des  $Mn^{2+}$  mit dem Kernspin  $I = 5/2$  führt zu einer Aufspaltung des Übergangs  $m_S = \pm 1/2 \rightarrow m_S = \mp 1/2$  in sechs schmale Linien. Neben den erlaubten Übergängen mit  $\Delta m_S = \pm 1, \Delta m_I = 0$  gibt es formal verbotene Übergänge mit  $\Delta m_S = \pm 1, \Delta m_I = \pm 1$ , deren Intensität mit zunehmender Dominanz der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung bei höheren Frequenzen abnimmt. Die

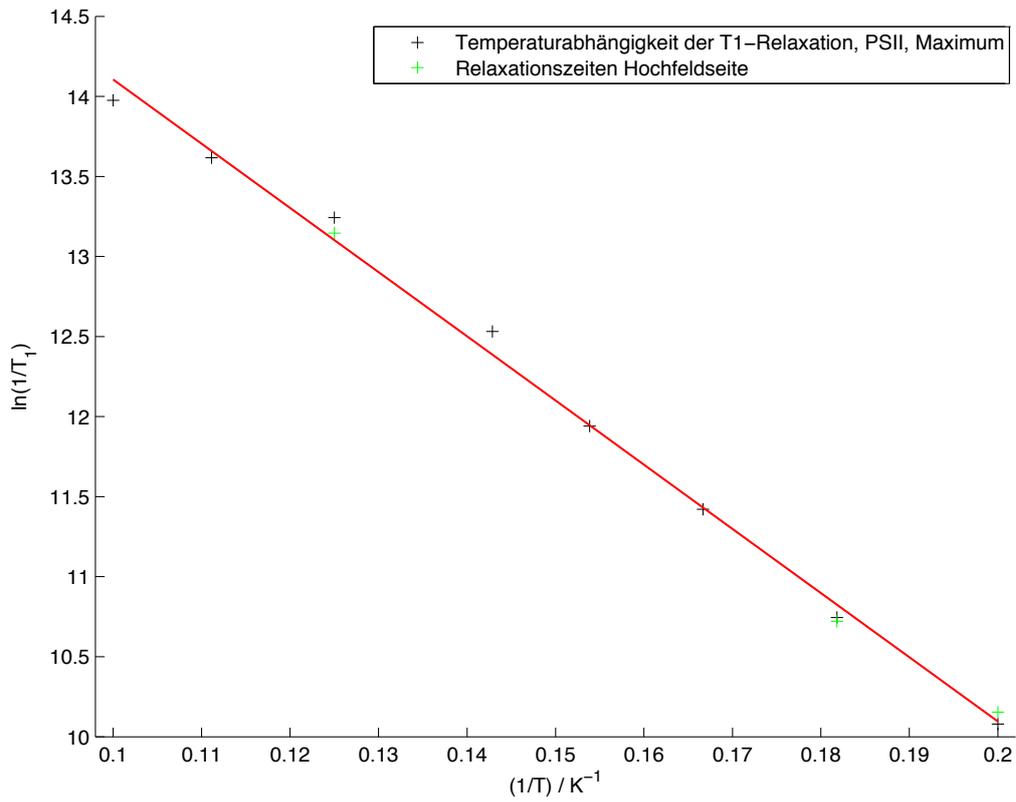


**Abbildung 6.1:** EPR-Spektren von dunkeladaptiertem (hellblau) und belichtetem (blau) PSII in den drei Frequenzbändern X-, Q- und W-Band. Das Differenzspektrum in schwarz zeigt jeweils das EPR-Signal des WOC im  $S_2$ -Zustand. Das X-Band Spektrum des  $S_2$ -Zustands ist auch in erster Ableitung in türkis gezeigt. Das EPR-Signal des  $Y_D^\bullet$  ist in allen drei Frequenzbändern mit einem roten Stern markiert. Das EPR-Signal des cyt-c550 ist im X-Band-Spektrum gut erkennbar und mit einem grünen Stern markiert. Experimentelle Parameter:  $f_X = 9,74$  GHz,  $f_Q = 34,33$  GHz,  $f_W = 93,96$  GHz.

Linienbreite der Übergänge  $m_S = -1/2 \rightarrow m_S = +1/2$  ist dabei in zweiter Ordnung ST proportional zu  $D^2/B_0$  [77]. Dadurch werden die sechs erlaubten Übergänge in den höheren Frequenzbändern Q- und W-Band schmaler und scheinen somit intensiver. Die Mikrowellenpulse sind für den Spin  $S = 1/2$  des  $S_2$ -MLS optimiert, dieser erfährt also einen  $\pi/2$ - bzw.  $\pi$ -Puls. Der Spinzustand  $S = 5/2$  des  $Mn^{2+}$  erfährt nach Gl. 3.30 einen anderen Drehwinkel, was zu negativer Signalintensität führt. Durch leicht unterschiedliche Positionen der Probe im Resonator verändert sich dessen Resonanzfrequenz und Kopplung, was zu leicht unterschiedlichen Drehwinkeln für alle Spins führt. Solche kleinen Änderungen haben auf die Systeme mit  $S = 1/2$  kaum Einfluß, da die MW-Pulse auf maximale Signalintensität optimiert sind. Für den Spin  $S = 5/2$  des  $Mn^{2+}$  hat jedoch eine kleine Drehwinkeländerung deutlich größere Auswirkungen auf die gemessene Signalamplitude. Dadurch kommt es in den Differenzspektren zu kleinen Überresten des  $Mn^{2+}$ -Signals (so z.B. im Q-Band-Spektrum in Abb. 6.1).

Die EPR-Spektren des Mn-Komplexes im  $S_2$ -Zustand sind in Abb. 6.1 in schwarz in drei Frequenzbändern (X-, Q-, W-Band) gezeigt. Das Signal ähnelt in seiner Form einer Gaußlinie mit einer vollen Breite von etwa 180 mT um  $g = 2$  und zeigt je nach Frequenzband eine unterschiedlich stark ausgeprägte Strukturierung. Die Substruktur des X-Band-Spektrums zeigt sich in der ersten Ableitung als 18 bis 20 aufgelöste Linien im Abstand von etwa 8 mT (vgl. Abb. 6.1, X-Band, Spektrum in türkis). Dieses Erscheinungsbild gab zur Bezeichnung des Signals als „Multiline Signal“ (MLS) Anlaß. Das Q-Band-Spektrum hat dieselbe Grundform, zeigt aber eine deutlich weniger ausgeprägte Substruktur. Diese tritt stärker auf der Niederfeldflanke hervor, einige Wellen sind auch auf der auslaufenden Hochfeldseite sichtbar. Das Spektrum hat eine Ausdehnung von etwa 182 mT und ist damit ähnlich breit wie im X-Band. Im W-Band-Spektrum ist die Substruktur des Signals ganz verschwunden. Man sieht nur die etwa 200 mT breite gaußförmige Linie, die deutlich breiter ist, als bei den kleineren Frequenzen.

Der Ursprung des  $S_2$ -MLS ist der Mn-Komplex, der im  $S_2$ -Zustand einen effektiven Spin  $S = 1/2$  im Grundzustand besitzt. An diesen Elektronenspin koppeln die vier Mn-Kerne des Komplexes, die jeweils einen Kernspin  $I = 5/2$  tragen (100 % natürliche Häufigkeit). Nach Gleichung 3.20 ergeben sich damit 1296 Übergänge, deren teilweise Überlagerung das Spektrum des Mn-Komplexes im  $S_2$ -Zustand bilden. Dabei wird die Breite des Signals in den niedrigen Frequenzbändern durch die  $^{55}Mn$ -Hyperfeinkopplungen dominiert, mit steigender Mikrowellenfrequenz nimmt der Anteil der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung an der Breite des Signals zu. Die je nach Frequenzband unterschiedlich stark ausgeprägte Substruktur auf dem gaußförmigen MLS ergibt sich aus dem jeweiligen Zusammenspiel von Elektron-Zeeman- und Hyperfeinwechselwirkung.



**Abbildung 6.2:** Temperaturabhängigkeit der  $T_1$ -Relaxation des  $S_2$ -MLS in PSII. Schwarz:  $B_0 = 3400$  mT. Grün:  $B_0 = 3440$  mT. Rot: Linearer Fit nach Gl. 3.28, Steigung  $|m| = (40,1 \pm 1,1) \text{ K} \cong (27,8 \pm 0,8) \text{ cm}^{-1}$ .

In Kap. 3.5 wurden verschiedene Relaxationsprozesse durch Spin-Spin-Wechselwirkung beschrieben. Für das S<sub>2</sub>-MLS wurde über die Temperaturabhängigkeit der T<sub>1</sub>-Relaxation auf einen Orbach-Prozeß geschlossen [97]. Für Orbach-Prozesse läßt sich bei geeigneter Auftragung der T<sub>1</sub>-Relaxationszeiten in Abhängigkeit von der Temperatur die Energieseparation des Grundzustandes vom ersten angeregten Zustand abschätzen (siehe Gl. 3.28). Solch eine Auftragung ist in Abb. 6.2 für das S<sub>2</sub>-MLS gezeigt. Die Messungen wurden im W-Band auf dem Signalmaximum (schwarz) und für einige ausgewählte Temperaturen auch auf halber Höhe der beiden Signalflanken (grün, Hochfeldflanke) durchgeführt. Die gemessene T<sub>1</sub>-Relaxation ist unabhängig von der gewählten Feldposition. Da an den verschiedenen Feldstellen einzelne Orientierungen unterschiedlich stark beitragen, kann auf eine isotrope T<sub>1</sub>-Relaxation geschlossen werden. Aus der Steigung der Auftragung ergibt sich gemäß Gleichung 3.28 die Energieseparation des Grundzustands vom ersten angeregten Zustand. In den in dieser Arbeit verwendeten PSIIcc-Präparationen beträgt diese Separation  $\Delta = (27,8 \pm 0,8) \text{ cm}^{-1}$  und liegt damit im oberen Bereich verschiedener Literaturangaben [53, 97]. Im W-Band liegt die verwendete Mikrowellenfrequenz im Bereich von  $3,1 \text{ cm}^{-1}$  und ist damit nur um einen Faktor 0,1 kleiner als der abgeschätzte Energieabstand des Grundzustandes zum ersten angeregten. In diesem Frequenzband ist damit die Gültigkeit der Beschreibung des S<sub>2</sub>-Zustands als stark gekoppeltes System mit einem isolierten Grundzustand mit  $S = 1/2$  nicht mehr zwangsläufig gegeben.

Wie bereits einleitend erwähnt, wurden verschiedene Parametersätze zur Beschreibung des S<sub>2</sub>-MLS veröffentlicht. Frühe Ansätze auf Basis des X-Band-EPR-Spektrums verwendeten vier inäquivalente isotrope Hyperfeinkopplungen zur Beschreibung des Mn-Komplexes sowie eine axiale bzw. rhombische **g**-Matrix [98, 99]. Weitergehende Analysen insbesondere unter Einbeziehung des X-Band-<sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektrums des S<sub>2</sub>-MLS zeigten die Notwendigkeit mindestens axiale, besser rhombische Hyperfeinkopplungen zu verwenden [40–44]. Die große Zahl veröffentlichter Parametersätze beruht auf der Komplexität des Systems. Zur Beschreibung des S<sub>2</sub>-MLS sind eine rhombische **g**-Matrix und vier anisotrope Hyperfeinkopplungen notwendig, die dazu nicht zwingend kollinear zueinander orientiert sein müssen.

Durch die große Dominanz der Hyperfeinkopplungen auf das EPR-Spektrum in den niedrigen Frequenzbändern ist eine genaue Bestimmung der **g**-Matrix aus dem X-Band-EPR-Spektrum kaum möglich. Im W-Band nimmt der Beitrag der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung zum Spektrum deutlich zu, so daß Messungen des S<sub>2</sub>-MLS im W-Band eine Bestimmung der **g**-Matrix ermöglichen [100]. Zusätzlich bildet das W-Band-Spektrum ein weiteres Selektionskriterium, da nicht alle veröffentlichten Parametersätze die Strukturlosigkeit des W-Band-EPR-Spektrums abbilden.

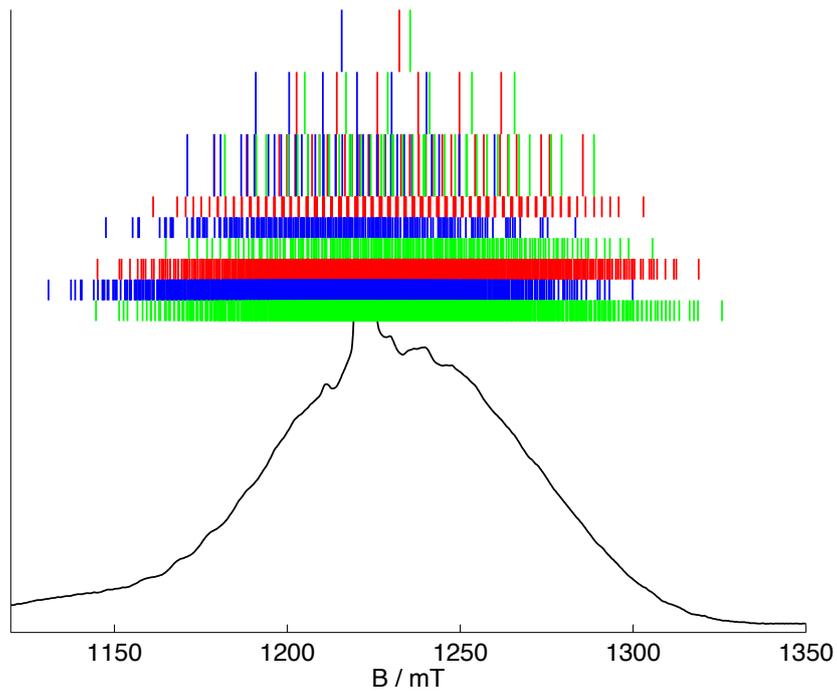
Allerdings führt auch die Simulation der Multifrequenz-EPR-Spektren nicht zu einem eindeutigen Parametersatz. Durch die Überlagerung der vielen Linien sind im Gegensatz zu den zweikernigen Modellkomplexen aus der EPR die Hyperfeinkopplungen nicht direkt abschätzbar. Einen unmittelbaren Zugang zu den Hyperfeinkopplungen ermöglicht  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektroskopie. Bisherige Veröffentlichungen konzentrierten sich dabei auf die Analyse von X-Band- oder Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -MLS [44, 45, 53, 101]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Multifrequenz- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Messungen am  $\text{S}_2$ -Zustand durchgeführt, die im Folgenden ausführlich vorgestellt werden.

## 6.2 Multifrequenz- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR des $\text{S}_2$ -Zustands in PSII

Bei der Untersuchung der Mn-Katalase waren die einkristallartigen ENDOR-Spektren an den Randpositionen des EPR-Spektrums für die Simulation besonders hilfreich. Eine ähnliche Strategie ist für  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Untersuchungen des  $\text{S}_2$ -MLS experimentell nicht durchführbar. Das System mit  $S = 1/2$  und vier Mn-Kernen mit  $I = 5/2$  hat nach Gl. 3.20 1296 erlaubte Übergänge. In Abb. 6.3 ist das Q-Band-EPR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -MLS mit dem Strichspektrum der erlaubten Übergänge gezeigt. Zur besseren Übersicht sind die Übergänge der  $g$ -Komponenten untereinander gezeigt. Es wird deutlich, daß die Vielzahl der Linien eine Selektion einzelner Komponenten nur auf den äußersten Randbereichen des EPR-Signals ermöglicht. Durch die Größe der PSIIcc-Monomere können die Proben nur beschränkt aufkonzentriert werden. Die Konzentration des paramagnetischen Zentrums, also des Mn-Komplexes, ist in den PSII-Proben etwa einen Faktor 50 kleiner als in den Proben der Mn-Katalase. Die äußersten einzelnen Übergänge des EPR-Signals können daher durch die Beschränkung des S/R nicht in ENDOR-Messungen abgefragt werden.

Für einen ersten Überblick wurden  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -MLS in den drei Frequenzbändern X-, Q- und W-Band auf dem Maximum des EPR-Signals aufgenommen, diese sind in Abb. 6.4 gezeigt. An diesen Stellen sind praktisch alle der nach Gl. 3.21 40 erlaubten ENDOR-Übergänge angeregt. Das Signal des Mn-Komplexes ist in allen Spektren ein sehr breites, nur wenig strukturiertes Signal zwischen 60 MHz und 200 MHz (in Abb. 6.4 blau gekennzeichnet).

Neben dem  $^{55}\text{Mn}$ -Beitrag sieht man im ENDOR-Spektrum im Q-Band bei 53 MHz und W-Band bei 145 MHz auch  $^1\text{H}$ -Signale. Die Hyperfeinkopplungen der Protonen sind klein gegen die Kernlarmorfrequenz und daher um diese zentriert. Im X-Band sind diese Signal um 15 MHz zu finden und liegen damit außerhalb des beobachteten RF-Bereichs,

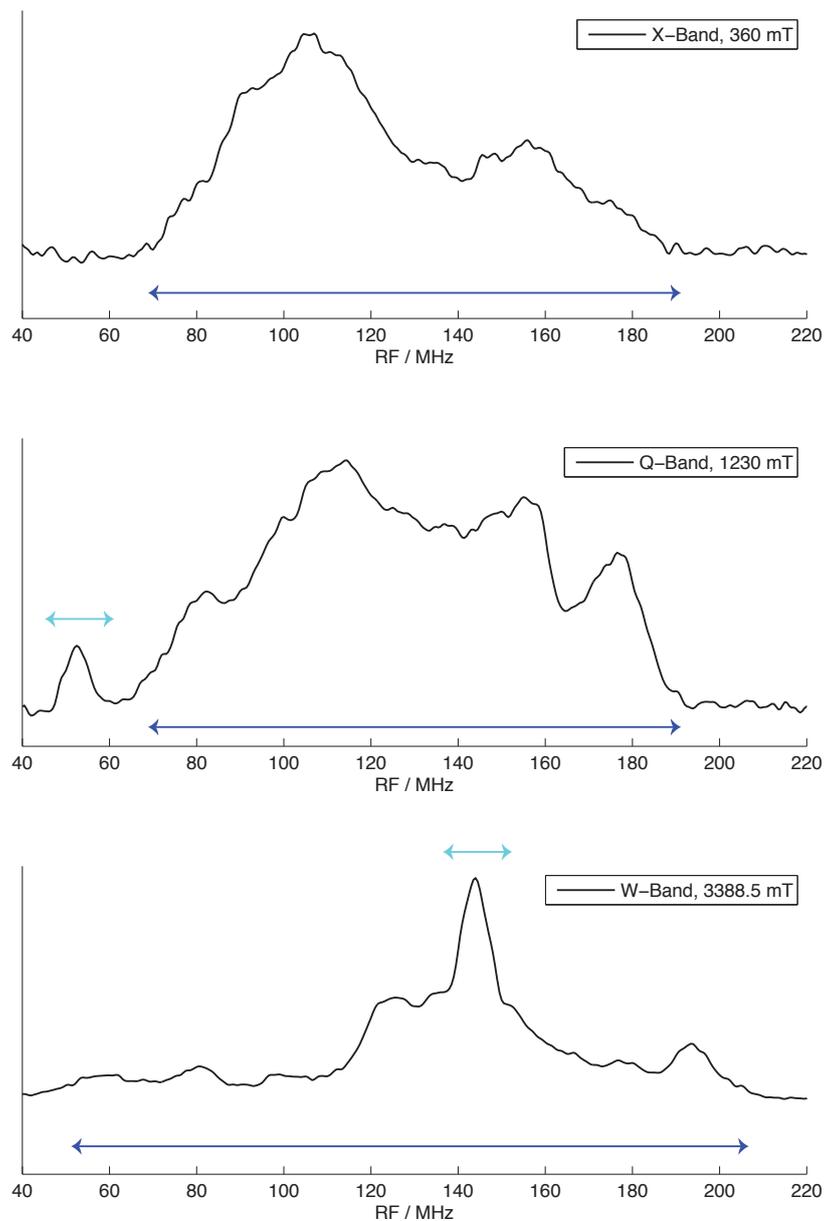


**Abbildung 6.3:** Q-Band-EPR-Spektrum des  $S_2$ -MLS (schwarz). Darüber ist das Strichspektrum für die Hauptkomponenten entlang  $g_x$  (rot),  $g_y$  (blau) und  $g_z$  (grün) bei Berücksichtigung keines Kernes, eines Kernes usw. bis zu vier Mn-Kernen gezeigt. Zur besseren Sichtbarkeit sind die Übergänge der Hauptkomponenten bei Berücksichtigung von drei bzw. vier Mn-Kernen untereinander gezeichnet.

im Q- und W-Band sind die Protonenbeiträge in Abb. 6.4 mit einem hellblauen Pfeil gekennzeichnet. Im Q-Band sind die Protonensignale klein gegenüber dem breiten  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektrum. Der verwendete relativ kurze RF-Puls ist für das  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Signal des  $S_2$ -Zustands optimiert. Die Protonen erfahren durch diesen RF-Puls nur einen kleinen Drehwinkel und sind gegenüber dem  $^{55}\text{Mn}$ -Signal unterdrückt. Im W-Band ist die Intensität der Protonensignale deutlich größer gegenüber dem  $^{55}\text{Mn}$ -Spektrum, obwohl dieses eine vergleichbare Breite wie im Q-Band zeigt. Trotz des kurzen RF-Pulses ist die Unterdrückung der Protonensignale im W-Band deutlich geringer. Dieser Effekt ist gleichermaßen in den W-Band-ENDOR-Spektren der Mn-Katalase sichtbar (vgl. Abb. 5.4, insbesondere Position 16).

Mit zunehmender Mikrowellenfrequenz wird das ENDOR-Spektrum des Mn-Komplexes im  $S_2$ -Zustand breiter und strukturierter. Das X-Band-Spektrum liegt im Bereich 70 MHz bis 185 MHz und zeigt nur zwei breite Signalmaxima bei 110 MHz und 160 MHz. Das strukturiertere Q-Band-Spektrum zeigt vier Signalmaxima bei 80 MHz, 110 MHz, 150 MHz und 178 MHz und erstreckt sich über den Bereich von etwa 60 MHz bis 190 MHz. Das W-Band-Spektrum zeigt Intensität von 45 MHz bis 210 MHz. Im Niederfrequenzbereich liegen zwei Signalmaxima bei 60 MHz und 80 MHz, gefolgt von einem Maximum bei 125 MHz. Der Bereich zwischen 135 MHz und 155 MHz ist durch Protonensignale überlagert. Der Hochfrequenzbereich zeigt ein Maximum bei 190 MHz.

Neben den je nach Frequenzband zum Teil überlappenden Protonensignalen überlagern auch die ENDOR-Signale von freiem  $\text{Mn}^{2+}$  das Spektrum des  $S_2$ -Zustands des Mn-Komplexes. Die Beiträge des freien  $\text{Mn}^{2+}$  werden besonders deutlich, wenn die Mikrowellenleistung für den Spin  $S = 5/2$  des  $\text{Mn}^{2+}$  optimiert wird. Die sechs EPR-Linien des  $\text{Mn}^{2+}$  zeigen im EPR-Spektrum dann positive Intensität. In Abb. 6.5 ist das Q-Band-ENDOR-Spektrum des  $S_2$ -Zustands gezeigt. Im schwarzen Spektrum ist die Mikrowellenleistung für den Spin  $S = 1/2$  des Mn-Komplexes optimiert. Im blauen Spektrum ist die Mikrowellenleistung für den Spin  $S = 5/2$  des freien  $\text{Mn}^{2+}$  optimiert. Das freie  $\text{Mn}^{2+}$  zeigt hier zwei Linien bei 114 MHz und 158 MHz mit etwa 10 MHz Halbwertsbreite. Unter den für den  $S_2$ -Zustand optimierten Bedingungen wird die Linienform des  $\text{Mn}^{2+}$  ENDOR-Spektrums kompliziert. In Abb. 6.6 sind  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $S_1$ -Zustands in PSII gezeigt. In diesen Spektren sieht man im abgebildeten Frequenzbereich nur Beiträge des  $\text{Mn}^{2+}$ . Die sechs EPR-Linien des  $\text{Mn}^{2+}$  haben negative Intensität. Das ENDOR-Spektrum auf einer der Linien (Abb. 6.6 in schwarz) zeigt ebenfalls negative Intensität. Ein Spektrum am Rand einer  $\text{Mn}^{2+}$ -EPR-Linie ist in Abb. 6.6 in blau gezeigt. In diesem haben die ENDOR-Linien die Form einer ersten Ableitung und zeigen sowohl positive als auch negative Intensität. Je nach Position im EPR-Spektrum sieht man den



**Abbildung 6.4:**  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $S_2$ -Zustands in PSII in drei Frequenzbändern. Der Bereich des  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektrums ist jeweils mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet, der Bereich der zum Teil überlappenden Protonensignale ist in hellblau markiert. Im X-Band liegt das Protonensignal außerhalb des gezeigten Frequenzbereichs. Experimentelle Parameter:  $f_X = 9,7$  GHz,  $f_Q = 34,3$  GHz,  $f_W = 94,1$  GHz.

Beitrag des freien  $\text{Mn}^{2+}$  im ENDOR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -Zustands also als zusätzliche Linien bzw. Schultern oder als Intensitätseinbrüche.

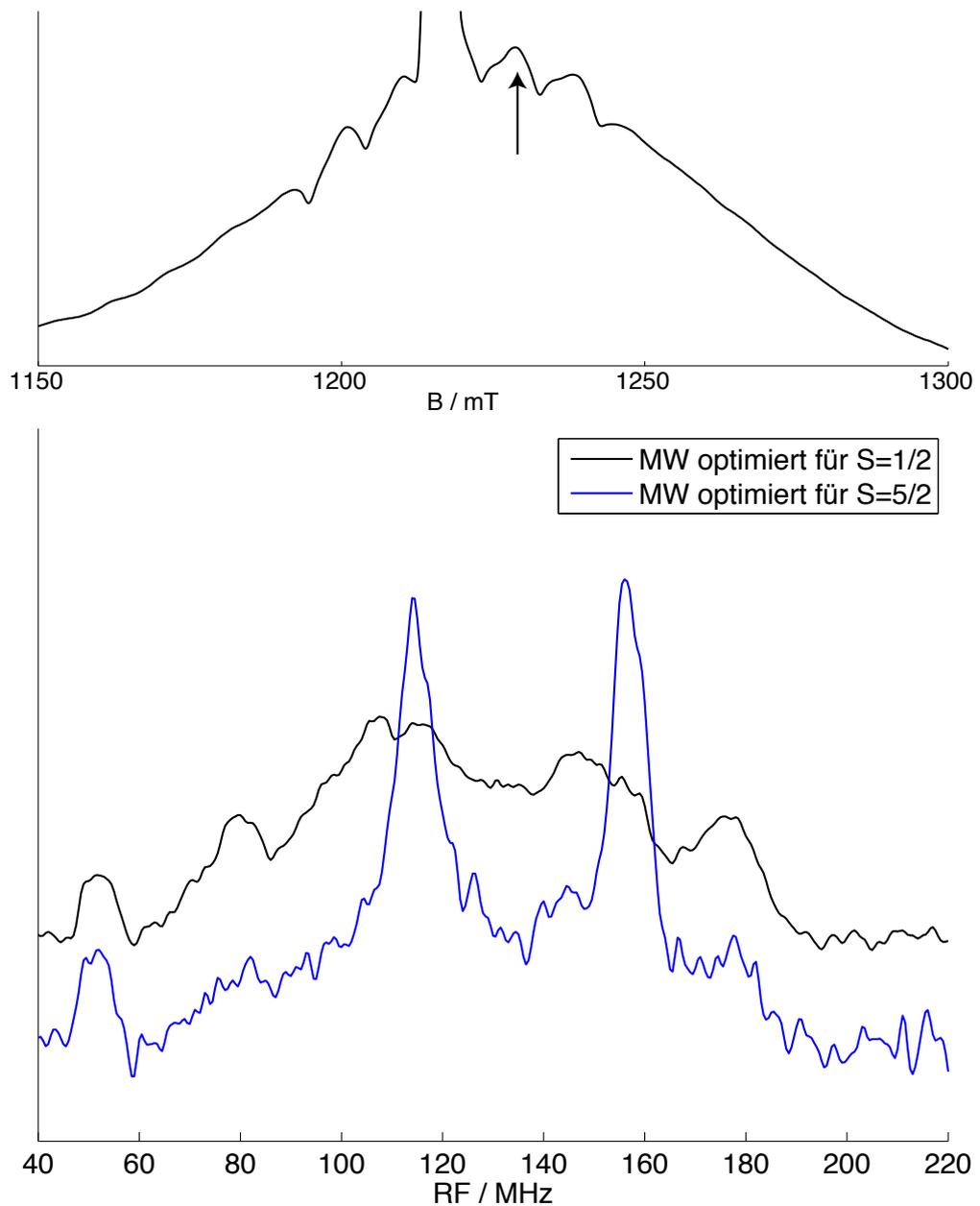
In Abb. 3.5 wurde das prinzipielle Erscheinungsbild des ENDOR-Spektrums des  $^{55}\text{Mn}$ -Kerns am Beispiel einer isotropen Hyperfeinkopplung in den drei Frequenzbändern X-, Q- und W-Band erklärt. Zum ENDOR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -MLS tragen vier Hyperfeinkopplungen vergleichbarer Größe bei, deren Überlagerung zu den beobachteten breiten Spektren führt. Insbesondere das X-Band-Spektrum zeigt durch den starken Überlapp der Linien nur sehr wenig Struktur. Im Q- und W-Band wird das Spektrum ein wenig entzerrt. Die ENDOR-Linien eines Pärchens sind separiert und Komponenten einzelner Hyperfeinkopplungen können teilweise aufgelöst werden.

In den Abb. 6.7–6.9 sind ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -Zustands an verschiedenen Feldstellen des EPR-Spektrums in den drei Frequenzbändern gezeigt. Wie anhand Abb. 6.3 bereits vermutet, sieht man nur eine geringe Orientierungsabhängigkeit der ENDOR-Spektren.

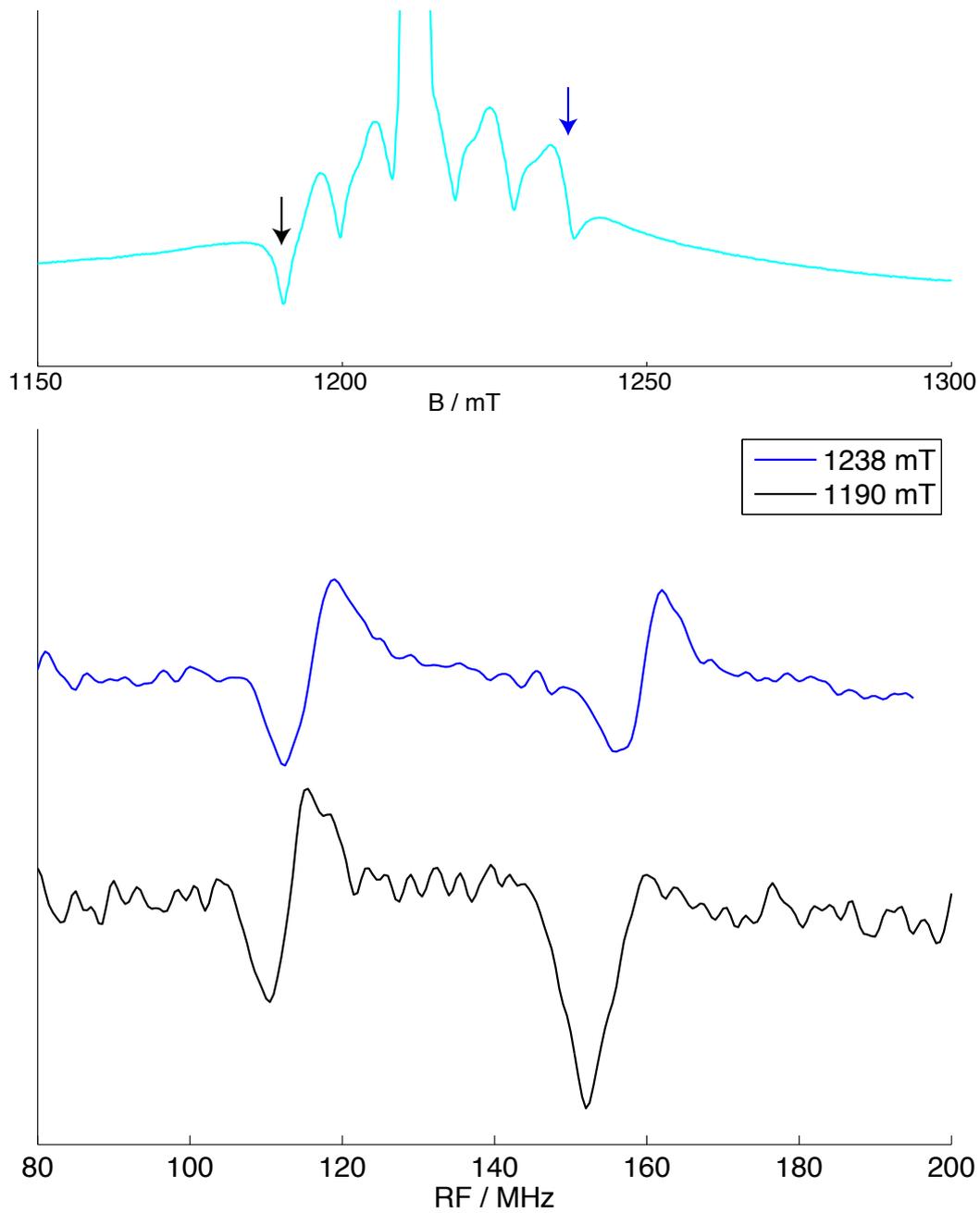
Die drei X-Band-Spektren in Abb. 6.7 zeigen eine sehr ähnliche Struktur. Die Position des Hauptmaximums bei 110 MHz ist in den drei Spektren vergleichbar. Jedoch verschiebt sich die auslaufende Flanke des Hochfrequenzsignals für höhere Feldpositionen zu größeren Frequenzen.

In den Q-Band-Spektren in Abb. 6.8 sind zwei feldabhängige Tendenzen neben der prinzipiell in den vier Spektren vergleichbaren Struktur auszumachen. Die ENDOR-Spektren an den Hochfeldpositionen bei 1265 mT und 1280 mT sind deutlich strukturierter als das Niederfeldspektrum bei 1184 mT, welches praktisch nur aus einem wenig aufgelösten Beitrag von 60 MHz bis 160 MHz und einem Hochfrequenzsignal bei etwa 170 MHz besteht. Beiträge von freiem  $\text{Mn}^{2+}$  sind hier mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Neben dieser generellen Tendenz fällt wiederum die feldabhängige Verschiebung des Hochfrequenzsignals auf. Dessen Maximum verschiebt sich von 172 MHz bei 1184 mT zu 180 MHz bei 1265 mT.

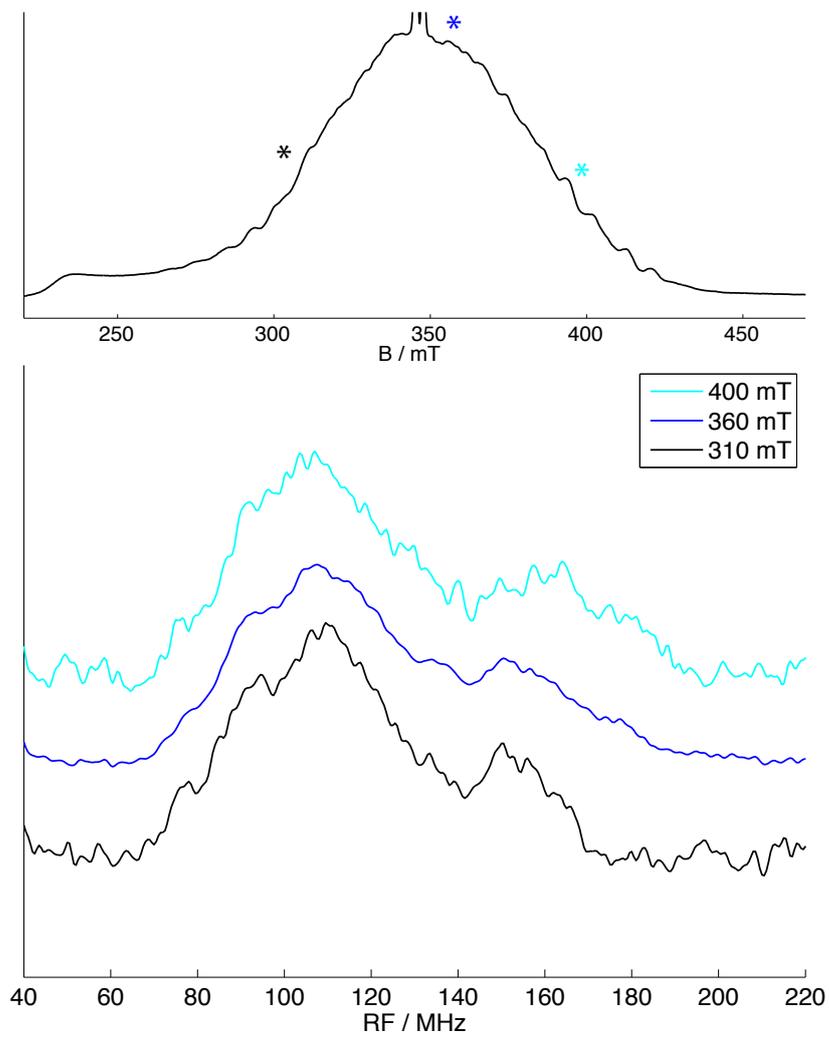
Die feldabhängigen W-Band-ENDOR-Spektren sind in Abb. 6.9 gezeigt. Generell sind die  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Messungen des  $\text{S}_2$ -Zustands im W-Band schwierig. Die langen Akkumulationszeiten über mehrere Tage (3 Tage für das ENDOR-Spektrum bei 3450 mT) stellen extrem hohe Anforderungen an die Stabilität des Aufbaus. Geringe Frequenzverschiebungen der Mikrowellenbrücke oder Temperaturschwankungen führen zu einer merklichen Verstimmung des Resonators, was zu einer Phasenverschiebung des detektierten Echos führt. Das führt einerseits zu einer geringeren Echointensität und damit prozentual größerem Rauschen. Bei einer kontinuierlichen Phasenverschiebung wird zusätzlich be-



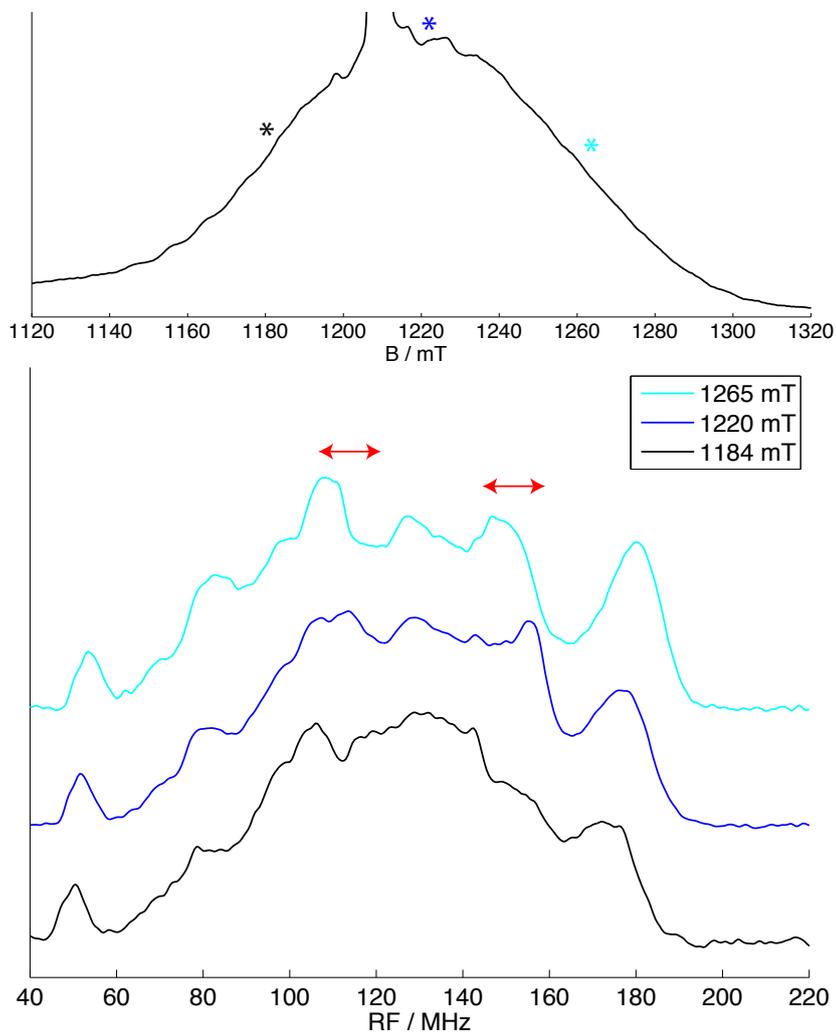
**Abbildung 6.5:** Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR Spektrum des  $S_2$ -Zustands in PSII. Die Mikrowellenleistung ist für einen Spin  $S = 1/2$  (schwarz) bzw. für einen Spin  $S = 5/2$  (blau) optimiert. Das EPR-Spektrum des  $S_2$ -Zustands ist darüber gezeigt, die Feldstelle ist markiert. Experimentelle Parameter:  $B_0 = 1230$  mT,  $f = 34,15$  GHz.



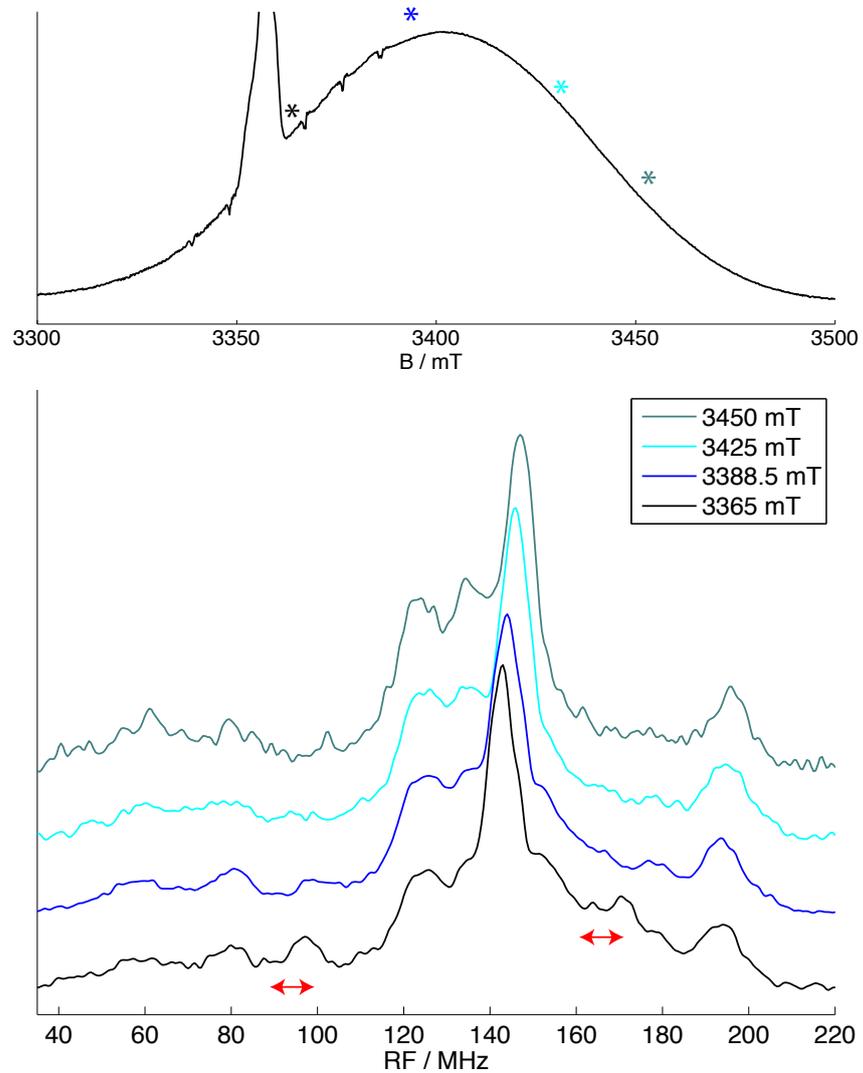
**Abbildung 6.6:** Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $S_1$ -Zustands in PSII an zwei Feldstellen, die im darüber gezeigten EPR-Spektrum des  $S_1$ -Zustands markiert sind. Experimentelle Parameter:  $f = 34,03$  GHz.



**Abbildung 6.7:** X-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -Zustands an drei Feldstellen. Diese sind im darüber gezeigten EPR-Spektrum markiert. Experimentelle Parameter:  $f = 9,7$  GHz.



**Abbildung 6.8:** Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $S_2$ -Zustands an drei Feldstellen. Diese sind im darüber gezeigten EPR-Spektrum markiert. Die Bereiche, in denen Beiträge von freiem  $\text{Mn}^{2+}$  das ENDOR-Spektrum des  $S_2$ -Zustands verzerren können, sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Experimentelle Parameter:  $f = 33,9$  GHz.

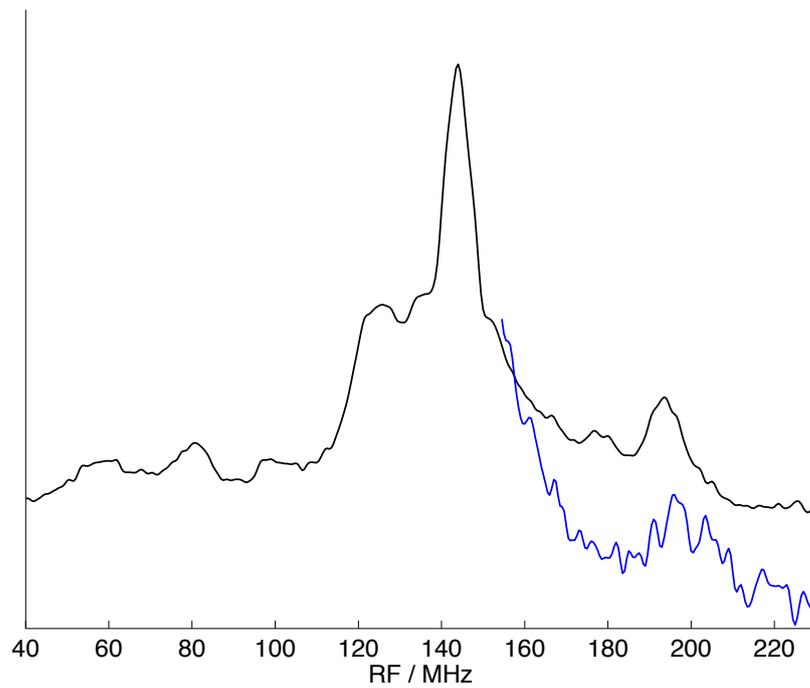


**Abbildung 6.9:** W-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $S_2$ -Zustands an vier Feldstellen. Diese sind im darüber gezeigten EPR-Spektrum markiert. Die Bereiche, in denen Beiträge von freiem  $Mn^{2+}$  das ENDOR-Spektrum des  $S_2$ -Zustands verzerren können, sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Experimentelle Parameter:  $f = 94,1$  GHz.

reits akkumuliertes Signal nivelliert. Diese Instabilitäten führen zu Spektren mit schlechtem S/R, auch nach langer Akkumulationszeit. Die W-Band-ENDOR-Spektren zeigen Beiträge von freiem  $\text{Mn}^{2+}$ , die entsprechenden Bereiche sind mit roten Pfeilen markiert. In den einzelnen ENDOR-Spektren ändert sich die Lage der Protonensignale durch die Verschiebung der Kernlarmorfrequenz der Protonen mit dem Feld. Die feldabhängige Verschiebung der Larmorfrequenz der Protonen ist deutlich größer als für  $^{55}\text{Mn}$ . Dadurch werden in den einzelnen Spektren verschiedene Bereiche des  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Signals des  $S_2$ -Zustands überlagert. Für größere Feldpositionen werden also  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Beiträge des  $S_2$ -Zustands auf der Tieffrequenzseite des Protonenbereiches sichtbar, während gleichzeitig Beiträge auf der Hochfrequenzseite überlagert werden. Die überlagernden Signale und das beschränkte S/R lassen keine Abschätzung eventueller Orientierungsselektion in den Spektren zu.

Im rechten Teil der Abb. 5.5 wurde die Problematik verlässlicher Intensitäten von ENDOR-Linien im W-Band veranschaulicht. Insbesondere sind im Bereich zwischen 180 MHz und 220 MHz höhere Frequenzbeiträge gegenüber kleineren unterdrückt. In Abb. 6.9 sind  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren auf dem Maximum des W-Band-EPR-Spektrums des  $S_2$ -Zustands gezeigt. In blau ist der Hochfrequenzteil des  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektrums bei Verwendung eines „matching network“ zur Anpassung des RF-Kreises im Bereich um 150 MHz gezeigt. Dabei wird ein ähnliches Phänomen wie in Abb. 5.5 beobachtet. Die ENDOR-Intensität für Frequenzen  $> 195$  MHz ist ohne „matching network“ unterdrückt. Dadurch ist die Position des Maximums des Hochfrequenzsignals von etwa 200 MHz zu 190 MHz scheinbar verschoben und die asymmetrische Form mit der langsam abfallenden Hochfrequenzflanke begründet. Eine eventuelle Feldabhängigkeit der Position des Hochfrequenzsignals, wie sie im X- und Q-Band beobachtet wurde, ist durch die unterdrückte Intensität im Bereich  $> 195$  MHz nicht detektierbar.

Prinzipiell gibt es mehrere mögliche Ursachen für die Beobachtung der feldabhängigen Position einer ENDOR-Linie. Zunächst ist der Effekt der Verschiebung der Kernlarmorfrequenz mit dem Feld zu berücksichtigen. Die Kernlarmorfrequenz des  $^{55}\text{Mn}$  ist klein, die Verschiebung über 100 mT beträgt nur etwa 1 MHz. Die beobachteten Verschiebungen in den X- und Q-Band-ENDOR-Spektren sind jedoch deutlich größer, im Q-Band sind es 8 MHz über 81 mT. Daher sind Selektionseffekte für diese Beobachtung verantwortlich. In Kap. 5.3 wurde für die Analyse der Q- und W-Band-ENDOR-Spektren insbesondere die Orientierungsselektion einzelner Hyperfeinkomponenten entlang einer  $g$ -Komponente genutzt. Desweiteren können über die Feldposition ENDOR-Übergänge zwischen bestimmten  $m_I$ -Niveaus selektiert werden (vgl. Abb. 3.4).



**Abbildung 6.10:** W-Band  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -Zustands bei 3390 mT (schwarz). In blau ist der Hochfrequenzteil des Spektrums bei Verwendung eines „matching network“ gezeigt. Experimentelle Parameter:  $f = 93,9$  GHz.

Die  $g$ -Anisotropie des  $S_2$ -MLS ist im X-Band klein und trägt nur etwa 10 % zur Linienbreite des EPR-Spektrums bei. Im Q-Band ist dieser Beitrag durch die größere Elektron-Zeeman-Wechselwirkung mit etwa 25 % bereits größer, im W-Band trägt die  $g$ -Anisotropie mit etwa 60 % zur Linienbreite bei. Die beobachtete Feldabhängigkeit im X-Band kann, da die  $g$ -Aufspaltung dafür zu gering ist, nicht durch den Mechanismus der Orientierungsselektion erklärt werden. Die  $m_I$ -Abhängigkeit der ENDOR-Positionen ist als Effekt zweiter Ordnung im X-Band besonders stark ausgeprägt (vgl. Abb. 3.5). Die unterschiedlichen Anteile der einzelnen  $m_I$ -Niveaus an verschiedenen Positionen auf der EPR-Linie führen zu einer entsprechenden Verschiebung des Schwerpunktes der ENDOR-Linie. Im Q-Band tragen durch die größere Elektron-Zeeman-Wechselwirkung sowohl Orientierungs- als auch  $m_I$ -Selektion bei.

Für die Simulation werden zunächst nur die ENDOR-Spektren aus Abb. 6.4 an Positionen in der Mitte des EPR-Spektrums berücksichtigt, in denen alle ENDOR-Übergänge angeregt sind. Einen Ausgangspunkt für die Simulation bieten dabei einerseits Untersuchungen an zweikernigen Mn(III)Mn(IV)-Modellsystemen. Andererseits gibt es verschiedene veröffentlichte Parametersätze für den Mn-Komplex im  $S_2$ -Zustand. Dabei ist der Großteil dieser Studien an PSII-Präparationen aus Spinat durchgeführt, denen häufig Methanol zugesetzt wurde, um ein strukturierteres und damit per cw-EPR leichter meßbares  $S_2$ -MLS zu erhalten. Da Methanol direkt am Mn-Komplex bindet [58], werden dadurch auch die Hyperfeinkopplungen des Komplexes beeinflusst [45]. Bereits Boussac *et al.* [46] zeigten, daß es kleine speziesabhängige Unterschiede im EPR-Spektrum des  $S_2$ -MLS zwischen pflanzlichem und cyanobakteriellem PSII gibt. Diese Unterschiede im EPR-Spektrum sind durch unterschiedliche Hyperfeinkopplungen in beiden Systemen bedingt [47, 48].

Aus Studien an zweikernigen Mn(III)Mn(IV)-Komplexen ist bekannt, daß das Mn(III) in diesen Systemen die größte Hyperfeinkopplung trägt. Zudem zeigt die Hyperfeinkopplung des Mn(III) oblate Axialität mit zwei großen Komponenten, das Mn(IV) prolate mit dementsprechend zwei kleinen Komponenten. Dabei sind die Hyperfeinkopplungen in der Regel rhombisch. Im Gegensatz zu den aufgelösten ENDOR-Spektren der zweikernigen Mn-Katalase zeigen die ENDOR-Spektren des  $S_2$ -Zustands sehr breite Linien mit etwa 7 MHz Linienbreite. Eventuelle Beiträge durch Quadrupolkopplungen sind hier nicht aufgelöst und werden daher in der Simulation nicht berücksichtigt.

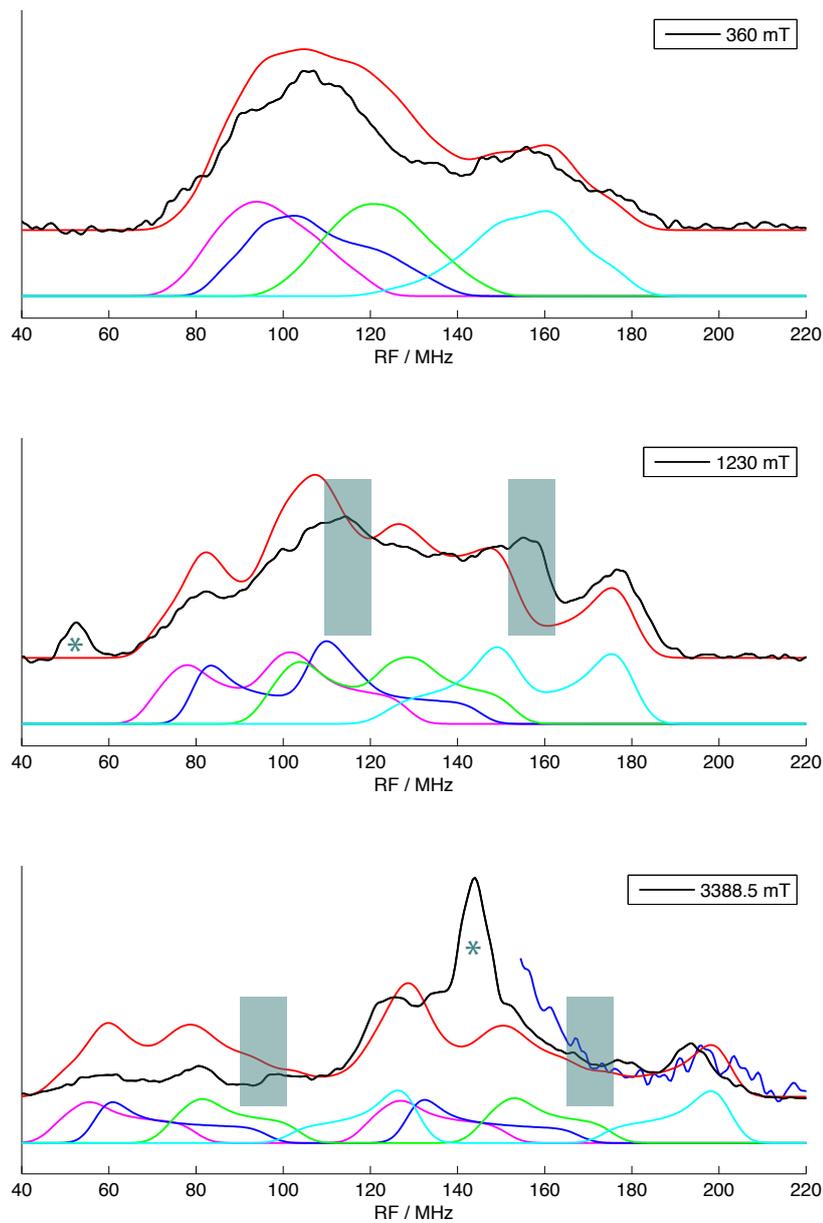
In Abb. 6.11 sind Simulationen der ENDOR-Spektren des  $S_2$ -Zustands mit den in Tab. 6.1 aufgeführten Parametern in den drei Frequenzbändern X-, Q- und W-Band gezeigt. Die ENDOR-Simulationen in 2. Ordnung Störungstheorie (vgl. Kap. 3.4) zeigen

	$g$	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$
x	1.997	165	187	218	275
y	1.970	183	191	235	326
z	1.965	232	265	280	335

**Tabelle 6.1:** Parametersatz des Mn-Komplexes im  $S_2$ -Zustand. Die Hauptwerte der Hyperfeinkopplungen sind in MHz gegeben. Die  $g$ -Matrix wurde von Teutloff *et al.* [100] durch Simulation des W-Band-EPR-Spektrums bestimmt. Fehler:  $\Delta g = 0,002$  nach [100],  $\Delta A = 3$  MHz.

das gesamte ENDOR-Spektrum, da auf den Positionen in der Mitte des jeweiligen EPR-Spektrums keine Orientierungsselektion auftritt bzw. berücksichtigt werden muß. Dabei sind die zehn erlaubten Übergänge je Mn-Kern zu einem Gesamtbeitrag addiert und farbkodiert dargestellt. Die Hyperfeinkopplungen wurden per Hand angepaßt. Ein Fit der Spektren ist durch die große Zahl der Parameter (vier Hyperfeinkopplungen mit jeweils drei Hauptwerten) nicht möglich. Dazu kommt das bereits in Kap. 5.3 diskutierte Problem der relativen ENDOR-Intensitäten für diese sehr breiten ENDOR-Spektren, weshalb sich die Simulationen insbesondere auf die Linienpositionen konzentrieren. Da der Einfluß des experimentellen Aufbaus auf die ENDOR-Intensitäten nicht quantifiziert ist, sind in den Simulationen keine Intensitätseffekte wie z.B. „hyperfine enhancement“ (vgl. Kap. 3.6.2) berücksichtigt und die vier Hyperfeinkopplungen tragen mit gleicher Intensität zur gezeigten Simulation bei.

Der hier gefundene Parametersatz simuliert die experimentellen ENDOR-Spektren qualitativ zufriedenstellend. Für alle drei Frequenzbänder sind die Struktur des ENDOR-Spektrums und die Positionen der einzelnen Signalmaxima gut getroffen. Im Q-Band ist das ENDOR-Spektrum des  $S_2$ -Zustands stark durch Signale von freiem  $Mn^{2+}$  überlagert, Bereiche in denen diese Beiträge das Spektrum des  $S_2$ -Zustands verfälschen, sind in Abb. 6.11 türkis unterlegt. Dabei ermöglicht das Q-Band-Spektrum durch das gute S/R und die gegenüber dem X-Band-Spektrum ausgeprägtere Struktur die Bestimmung der Senkrechtkomponenten der  $A_1$ -,  $A_2$ - und  $A_4$ -Hyperfeinkopplungen. Diese Werte werden durch das W-Band-ENDOR-Spektrum bestätigt, zudem ermöglicht es die genauere Bestimmung der  $A_3$ -Hyperfeinkopplung, als dies aus dem Q-Band-Spektrum allein möglich wäre. Der Hochfrequenzteil des W-Band-ENDOR-Spektrums bei Verwendung des „matching network“ bestätigt die aus dem Q-Band bestimmte Senkrechtkomponente der  $A_4$ -Hyperfeinkopplung. Dabei ist die Qualität der W-Band-ENDOR-Simulation vergleichbar zu den anderen beiden Frequenzbändern. Auch im W-Band kann der Mn-Komplex trotz



**Abbildung 6.11:**  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $S_2$ -Zustands in den drei Frequenzbändern X-, Q- und W-Band. Die ENDOR-Spektren sind jeweils in der Mitte des EPR-Signals gemessen. Simulationen in 2. Ordnung ST mit den Parametern aus Tab. 6.1 sind in rot gezeigt. Die Beiträge der einzelnen Kerne sind farbkodiert:  $A_1$  in magenta,  $A_2$  in blau,  $A_3$  in grün,  $A_4$  in hellblau. Die Bereiche in denen Signale von freiem  $\text{Mn}^{2+}$  überlagern, sind türkis unterlegt, Protonensignale sind mit einem Stern (türkis) markiert.

der relativ großen Elektron-Zeeman-Wechselwirkung im Vergleich zum Abstand des ersten angeregten Spinzustands also als isoliertes System mit  $S = 1/2$  betrachtet werden und damit in allen drei Frequenzbändern mit einem konsistenten Parametersatz beschrieben werden.

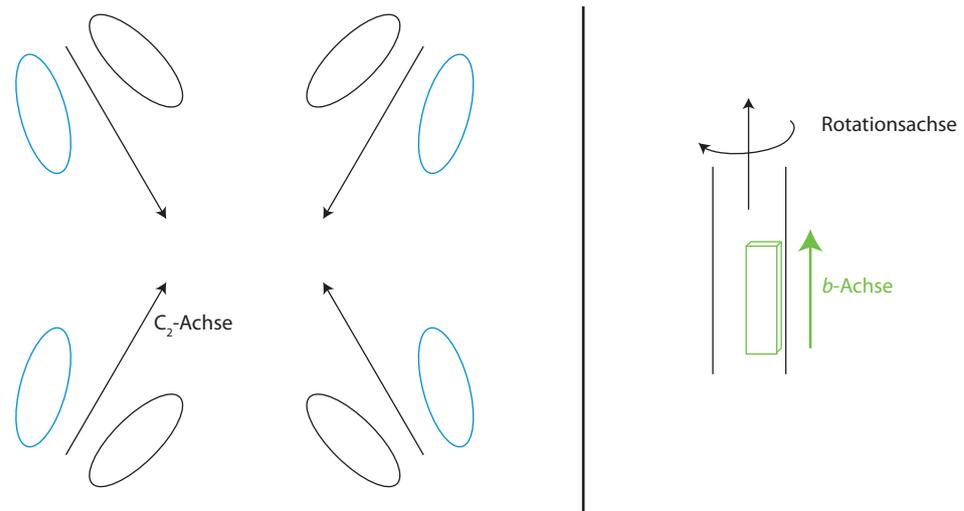
### 6.3 Q-Band-EPR- und $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR am PSII-Einkristall

EPR- und ENDOR-Messungen an Einkristallen bieten die Möglichkeit, Orientierungen der magnetischen Parameter mit Bezug auf ein Kristall- oder Molekülreferenzsystem zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Q-Band-EPR- und -ENDOR-Spektroskopie zur Untersuchung von PSIIcc-Einkristallen eingesetzt. Die Q-Band-ENDOR-Spektren der Lösungsproben sind relativ strukturiert und erlauben die Identifikation einzelner Hyperfeinkopplungskomponenten. Daneben sind die ENDOR-Signale der Protonen und Manganionen gut separiert. Zusätzlich zeigen die Q-Band-Spektren das beste S/R und der experimentelle Aufbau ist auch über einen Zeitraum von Wochen stabil.

Die PSIIcc-Kristalle wachsen in Nadelform, der für die EPR-/ENDOR-Messungen verwendete Kristall hat die Dimensionen  $1,2 \text{ mm} \times 0,5 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}$ . Da PSII als Dimer in der  $P2_12_12_1$ -Symmetrie kristallisiert, befinden sich 8 PSII-Moleküle in einer Einheitszelle mit  $128 \text{ \AA} \times 225 \text{ \AA} \times 306 \text{ \AA}$  Ausdehnung. Mit etwa  $10^{13}$  PSII-Monomeren im Kristall liegt die Zentrenzahl um den Faktor 500 niedriger als in Q-Band Lösungsproben. Die Messung der breiten EPR- und ENDOR-Spektren stellt damit extreme Anforderungen an die Sensitivität des experimentellen Aufbaus. Als Konsequenz ist insbesondere das S/R der ENDOR-Messungen sehr beschränkt. Jedes ENDOR-Spektrum wurde über 10 – 12 h akkumuliert, die gesamte Messung lief über mehrere Wochen. In dieser Zeit rekombinierten etwa 15 % des  $S_2$ -Zustandes in den dunkelstabilen, EPR-inaktiven  $S_1$ -Zustand. Testmessungen an PSII-Einkristallen zeigten, daß sich das S/R durch Verwendung eines dickwandigeren EPR-Röhrchens mit einem Innendurchmesser von 1 mm statt der üblichen 2 mm verbesserte. Das Quarzglas fungiert dabei einerseits als Dielektrikum und fokussiert Mikrowelle im Zentrum des Resonators. Da der Kristall an der Röhrchenwand anliegt, ist er in einem dickwandigeren EPR-Röhrchen besser im Zentrum des Resonators positioniert.

Die Positionierung des PSII-Kristalls im EPR-Röhrchen ist im rechten Teil in Abb. 6.12 skizziert. Der Kristall wurde in einem Tropfen Pufferflüssigkeit mit einer Pipette aufgenommen und in ein offenes EPR-Röhrchen gelegt. Dadurch liegt die lange morphologische Achse ungefähr entlang der Wand des EPR-Röhrchens. Die lange morphologische Achse des PSII-Kristalls fällt mit der kristallographischen  $b$ -Achse zusammen [84].

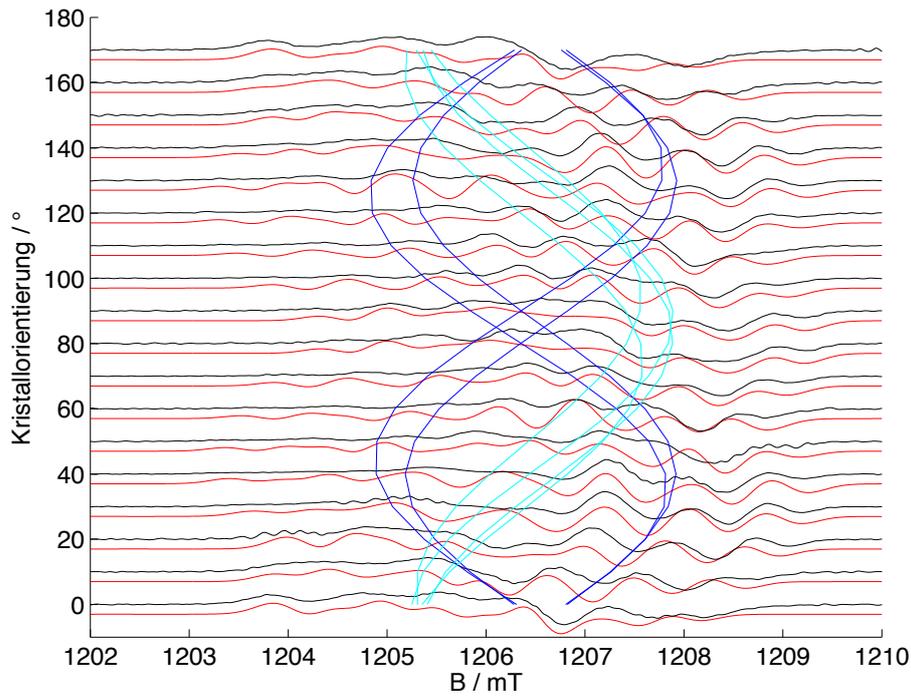
Die vier Dimere der Einheitszelle sind entsprechend der  $P2_12_12_1$ -Symmetrie durch Schraubendrehungen, genauer  $180^\circ$ -Drehungen mit folgender Translation, verbunden. In der EPR sind nur die relativen Orientierungen relevant, durch Translationen verbundene Zentren sind magnetisch äquivalent. Die relative Lage der vier Dimere in der Einheitszelle



**Abbildung 6.12:** Links: Schematische Darstellung der  $P2_12_12_1$ -Symmetrie des PSII-Einkristalls. Die vier Dimere der Einheitszelle werden durch  $180^\circ$ -Drehungen um die Hauptachsen und folgende Translation entlang der entsprechenden Achse ineinander überführt. Rechts: Positionierung des Einkristalls im EPR-Röhrchen. Die lange morphologische Achse fällt mit der kristallographischen  $b$ -Achse zusammen [84]. Die lange morphologische Achse des Kristalls ist bedingt durch den Einbau in etwa parallel mit der Röhrchenachse.

ist schematisch im linken Teil der Abb. 6.12 gezeigt, die Dimere können durch  $180^\circ$ -Drehungen um die Kristallachsen ineinander überführt werden. Die zwei PSII-Monomere eines Dimers sind über eine  $180^\circ$ -Drehung um eine nicht-kristallographische  $C_2$ -Achse verbunden, die nicht mit einer der Kristallsymmetrieachsen zusammenfällt.

Für die Analyse von Einkristallspektren muß die Orientierung des Kristalls im Laborkoordinatensystem bestimmt werden. In den EPR-Spektren des  $S_2$ -Zustands ist neben dem  $S_2$ -MLS stets das EPR-Signal des  $Y_D^\bullet$  sichtbar. Neben den magnetischen Parametern des  $Y_D^\bullet$  ist auch dessen Orientierung im Kristall sehr genau bekannt [103,104]. Damit kann über eine Simulation der orientierungsabhängigen  $Y_D^\bullet$ -EPR-Spektren die Orientierung des Kristalles im Laborkoordinatensystem bestimmt werden. Diese Möglichkeit bietet den großen Vorteil, die Orientierungen von Signalen relativ zum Kristallkoordinatensystem zu ermitteln und direkt mit der Kristallstruktur vergleichen zu können. In Abb. 6.13 sind die Simulationen der EPR-Spektren des  $Y_D^\bullet$  in erster Ableitung gezeigt. EPR-Spektren wurden in  $10^\circ$ -Schritten über einen  $180^\circ$ -Bereich aufgenommen. Alle Messungen am PSII-Kristall wurden bei 5 K durchgeführt. Aufgrund der langen  $T_1$ -Relaxation des organischen Radikals bei diesen tiefen Temperaturen mußte eine sehr lange Schußwieder-



**Abbildung 6.13:** EPR-Spektren des  $Y_D^\bullet$  in erster Ableitung am Einkristall in schwarz, Simulation in rot. Die  $g$ -Werte der vier über die  $P2_12_12_1$ -Symmetrie verknüpften Monomere in Abhängigkeit der Kristallorientierung sind blau dargestellt. Die  $g$ -Werte der anderen vier entsprechend der  $C_2$ -Symmetrie dazu verkippten Monomere sind hellblau eingezeichnet. Experimentelle Parameter:  $f = 33,85$  GHz,  $T = 5$  K, Hahn-Echo-Sequenz mit  $\pi = 40$  ns,  $\tau = 420$  ns, srt 140 ms. Simulationsparameter: Für die Simulation wurden die Parameter aus Ref. [102] verwendet. Es wurden nur die drei größten Protonenkopplungen berücksichtigt.

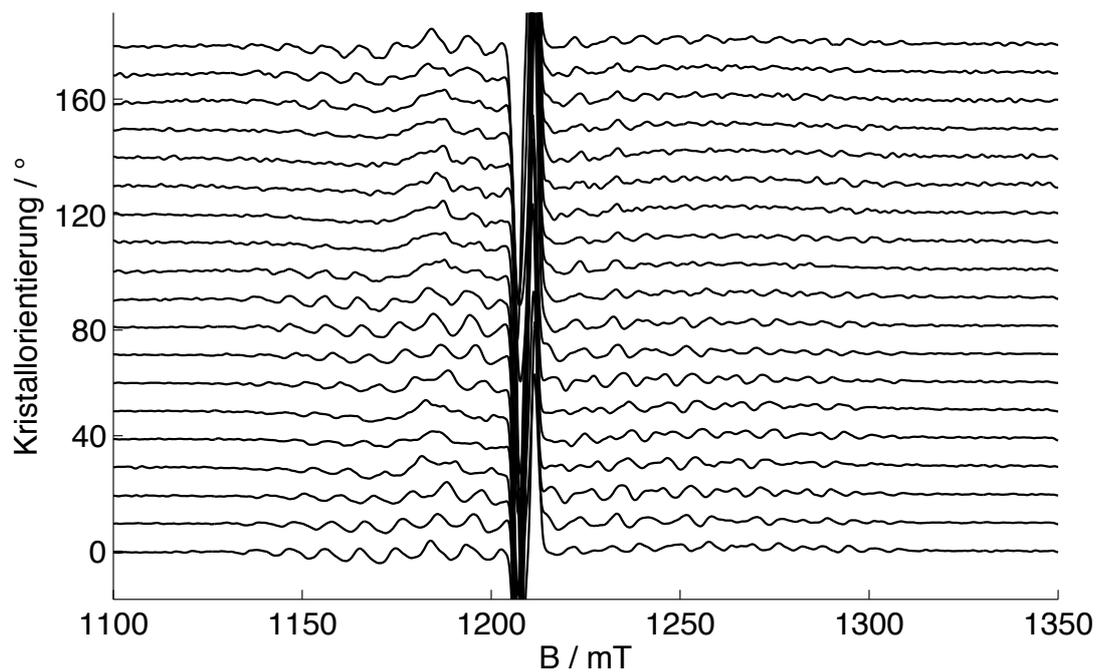
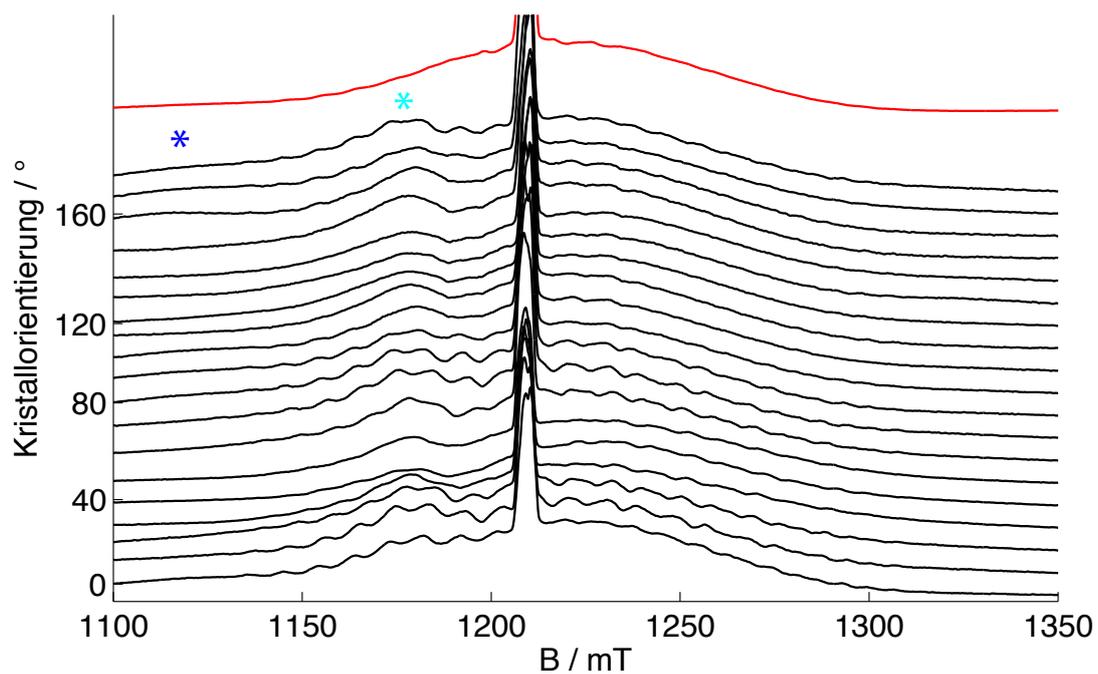
holrate von 140 ms verwendet werden. Die Orientierung des PSII-Kristalls im Laborkoordinatensystem ergibt sich aus der Simulation der EPR-Spektren des  $Y_D^\bullet$  und ist durch die drei Eulerwinkel ( $5^\circ$ ,  $21^\circ$ ,  $-175^\circ$ ) bestimmt. Für die verwendete Kristallpositionierung ist die Rotationsachse nur  $3^\circ$  gegen die kristallographische  $b$ -Achse verkippt.

Im oberen Teil der Abb. 6.14 sind die EPR-Spektren des  $S_2$ -Zustands im Einkristall gezeigt. Neben dem breiten Signal des  $S_2$ -MLS sieht man zusätzlich EPR-Signale des  $Y_D^\bullet$  und des Cytochrom c550 auf der Tieffeldseite des  $S_2$ -MLS (blauer Stern in Abb. 6.14). Das  $S_2$ -MLS ist ungefähr um einen Faktor 30 breiter als das  $Y_D^\bullet$ -Signal. Das S/R des  $S_2$ -MLS ist gegenüber dem des  $Y_D^\bullet$  darüberhinaus durch die relativ kurze  $T_2$ -Relaxationszeit des  $S_2$ -MLS verringert. Aufgrund der geringen Signalintensität des  $S_2$ -MLS wird das Untergrundsignal von Kupfer im Resonator sichtbar, das in Abb. 6.14 mit einem hellblauen Stern markiert ist.

In allen Orientierungen ist das breite gaußförmige  $S_2$ -MLS gut erkennbar. Die Position des Maximums ist in allen Orientierungen sehr vergleichbar, kleinere Orientierungsabhängigkeiten werden durch das EPR-Signal des  $Y_D^\bullet$  verdeckt. Da das  $S_2$ -MLS sehr breit ausläuft und auf der Tieffeldseite durch mehrere andere EPR-Signale überlagert wird, sind keine orientierungsabhängigen Positionsverschiebungen des  $S_2$ -MLS auszumachen. Auch in den EPR-Spektren in erster Ableitung im unteren Teil in Abb. 6.14 ist keine Verschiebung des Linienschwerpunktes mit der Kristallorientierung auszumachen. Dagegen zeigt die Substruktur des  $S_2$ -MLS eine deutliche Orientierungsabhängigkeit. Für einzelne Positionen wie z.B.  $10^\circ$  und  $20^\circ$  zeigt das Spektrum über die ganze Breite eine stark ausgeprägte Substruktur. Andere Positionen wie z.B.  $120^\circ$  zeigen ein glattes, gaußförmiges EPR-Signal ohne Feinstruktur. An Zwischenpositionen zeigt sich ein Bild, das dem Lösungsspektrum (in rot über den Kristall-EPR-Spektren gezeigt) ähnelt, z.B. zeigt das Spektrum bei  $100^\circ$  nur im Tieffeldbereich eine Substruktur.

Wie bereits in Kap. 6.1 erläutert, wird das  $S_2$ -MLS in erster Ordnung aus der Überlagerung der erlaubten 1296 EPR-Übergänge gebildet. Je nach Kristallorientierung führt die Überlagerung der unterschiedlichen  $g$ - und Hyperfeinkomponenten zu einer ausgeprägten Substruktur beziehungsweise einer Ausmittelung der Linienstruktur. Die EPR-Spektren werden dabei durch die Größe und Orientierung der vier Hyperfeinkopplungen (je drei Hauptwerte und drei Eulerwinkel) und Größe und Orientierung der  $\mathbf{g}$ -Matrix beeinflusst. Die Bestimmung dieser großen Zahl an Parametern aus den EPR-Spektren ist nicht praktikabel. Darum bietet sich auch für die Messungen am Kristall  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR als Methode mit direktem Zugriff auf die Hyperfeinkopplungen und ihre Orientierungen an.

Die orientierungsabhängigen  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des PSII-Einkristalls sind in Abb.



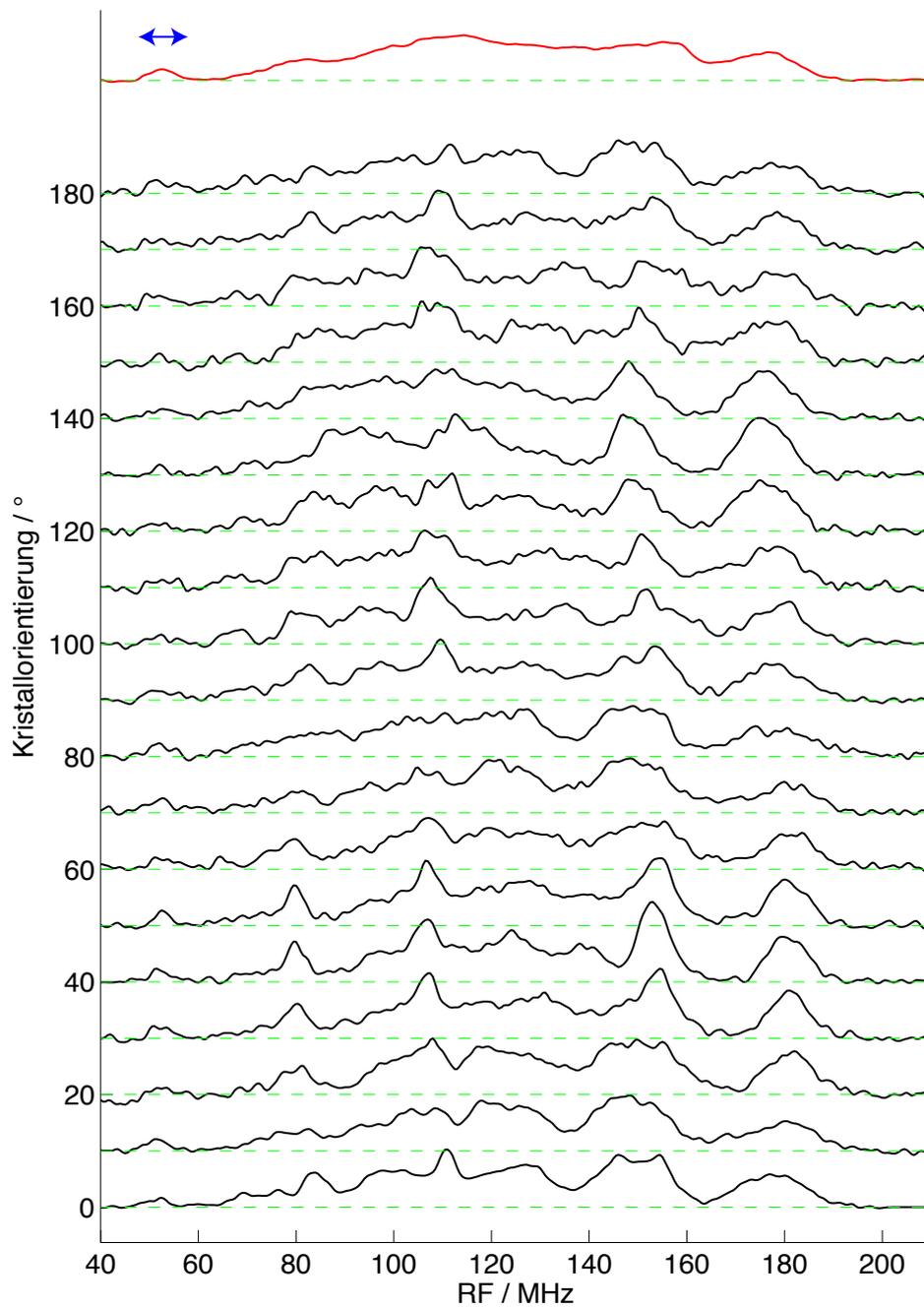
**Abbildung 6.14:** Oben: Orientierungsabhängige Q-Band-EPR-Spektren des S<sub>2</sub>-MLS. Das Lösungsspektrum ist zum Vergleich in rot gezeigt. Das EPR-Signal des c550 ist mit einem blauen Stern markiert, das Hintergrundsignal des Resonators mit einem hellblauen Stern. Unten: Q-Band-EPR-Spektren in erster Ableitung. Experimentelle Parameter:  $f = 33,95$  GHz. 95

6.15 gezeigt. Da das S/R durch die Zentrenzahl sehr beschränkt ist, sind die ENDOR-Spektren auf dem Maximum des S<sub>2</sub>-MLS aufgenommen. An dieser Feldposition sind für alle acht magnetisch inäquivalenten Mn-Komplexe der Einheitszelle alle 40 erlaubten Übergänge angeregt. Eine Orientierungsselektion muß hier, da es sich um einen Kristall handelt, in erster Näherung nicht berücksichtigt werden. Eine  $m_I$ -Selektion über die Wahl der Feldstelle ist durch das geringe S/R unmöglich. Die resultierenden breiten <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektren ähneln dem <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektrum der PSII-Lösung. Im Gegensatz bspw. zu Untersuchungen am Y<sub>D</sub><sup>•</sup>-Signal [102] zeigen die <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektren im PSII-Kristall auf den ersten Blick nur wenig Auflösungsgewinn.

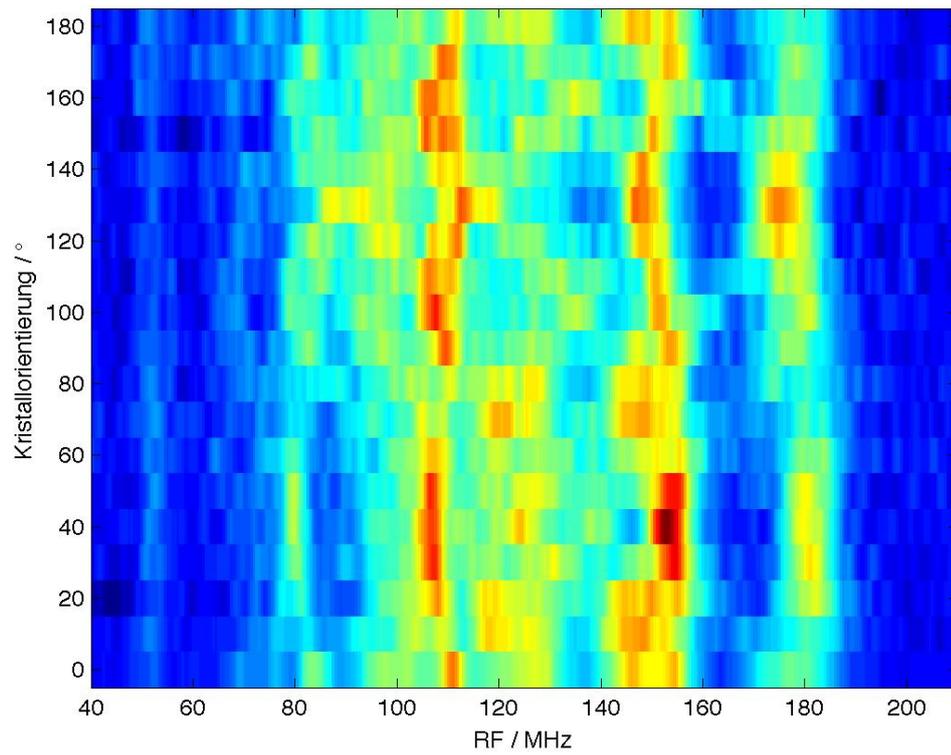
Die <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektren zeigen im Bereich von 60 MHz bis etwa 195 MHz Signal, bei 50 MHz ist das Protonensignal sichtbar. Im Vergleich der Kristallspektren mit dem <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektrum in Lösung sind in den Bereichen um 80 MHz, 105 MHz und 150 MHz deutliche Maxima sichtbar. An diesen Positionen sind im Lösungsspektrum keine vergleichbar schmalen Linien erkennbar. Weiterhin fällt der Bereich zwischen 155 MHz und 170 MHz auf. Im Lösungsspektrum ist die ENDOR-Intensität hier etwa halb so groß wie für das Hochfrequenzmaximum. In den Kristallspektren ist für eine Mehrzahl der Orientierungen in diesem Bereich nahezu keine ENDOR-Intensität sichtbar. Die Zahl und Position der sichtbaren Signalmaxima variiert also durchaus mit der Kristallorientierung, Linienverläufe sind in dieser Darstellung allerdings schwer auszumachen. Die Orientierungsabhängigkeit der ENDOR-Signale ist in einer zweidimensionalen Konturdarstellung mit farbkodierten Intensitäten in Abb. 6.16 deutlich besser erkennbar.

Mehrere Bereiche mit intensivem Linienverlauf über alle Orientierungen fallen in Abb. 6.16 ins Auge. Es gibt bei 180 MHz und 155 MHz in der Mehrzahl der Orientierungen deutliche Intensitätsmaxima, deren Position nur geringe Orientierungsabhängigkeit zeigt. Zwischen dem hochfrequenten Signal um 180 MHz und dem breiten Hauptbereich des Signals sind vier helle Intensitätsstreifen sichtbar. Diese laufen in den Orientierungen 0° bis 30° und 140° bis 170° von 180 MHz bis etwa 155 MHz und in den Orientierungen 60° bis 90° sowie 90° bis 120° in entgegengesetzter Richtung von 155 MHz nach 180 MHz.

Die farbkodierte Konturdarstellung aus Abb. 6.16 wird zum Vergleich mit simulierten ENDOR-Positionen in Abhängigkeit von der Kristallorientierung benutzt. Dieses Vorgehen bietet sich aufgrund der bereits diskutierten Problematik der Simulation von ENDOR-Intensitäten und dem beschränkten S/R der ENDOR-Spektren des PSII-Einkristalls an. Einen idealen Ausgangspunkt der Simulation stellt der relativ isoliert liegende Bereich des Hochfrequenzsignals um 180 MHz dar. Die Simulation des Q-Band-ENDOR-Spektrums in Lösung hat gezeigt, daß dieses ENDOR-Signal nur durch die größte Hy-



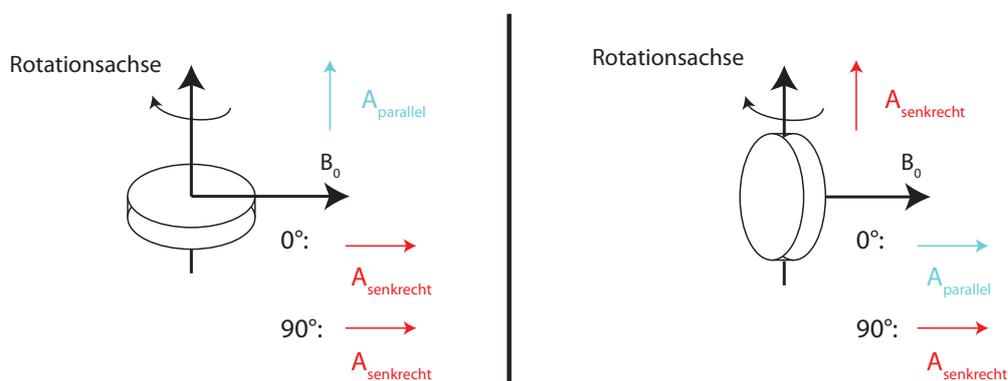
**Abbildung 6.15:** Orientierungsabhängige Q-Band-<sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektren des S<sub>2</sub>-Zustands im PSII-Einkristall. Alle ENDOR-Spektren sind bei  $B_0 = 1230$  mT (Maximum des EPR-Signals) gemessen. Das Lösungsspektrum ist zum Vergleich in rot gezeigt. Der Bereich der Protonensignale bei 50 MHz ist mit einem blauen Pfeil markiert. Experimentelle Parameter:  $f = 33,95$  GHz.



**Abbildung 6.16:** Orientierungsabhängige Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren aus Abb. 6.15 in einer 2D-Konturdarstellung. Die Intensität der ENDOR-Spektren ist dabei farbkodiert.

perfeinkopplung  $A_4$  bestimmt wird. Die schwache Orientierungsabhängigkeit des hochfrequenten Signals um 180 MHz wiederholt sich parallel dazu in dem intensiven Streifen großer Intensität um 155 MHz. Der Abstand dieser Intensitätsstreifen von 25 MHz entspricht in etwa der doppelten Kernlarmorfrequenz des  $^{55}\text{Mn}$  von  $2 \times 12,9$  MHz. In erster Näherung können diese Intensitätsverläufe also dem ENDOR-Pärchen der größten Hyperfeinkopplung  $A_4$  zugeordnet werden.

Dieser quasi orientierungsunabhängige Linienverlauf kann nur entstehen, wenn während der Kristalldrehung die Komponente der Hyperfeinkopplung parallel zum Magnetfeld  $B_0$  praktisch unverändert bleibt. Dieser Fall ist im linken Teil in Abb. 6.17 skizziert.



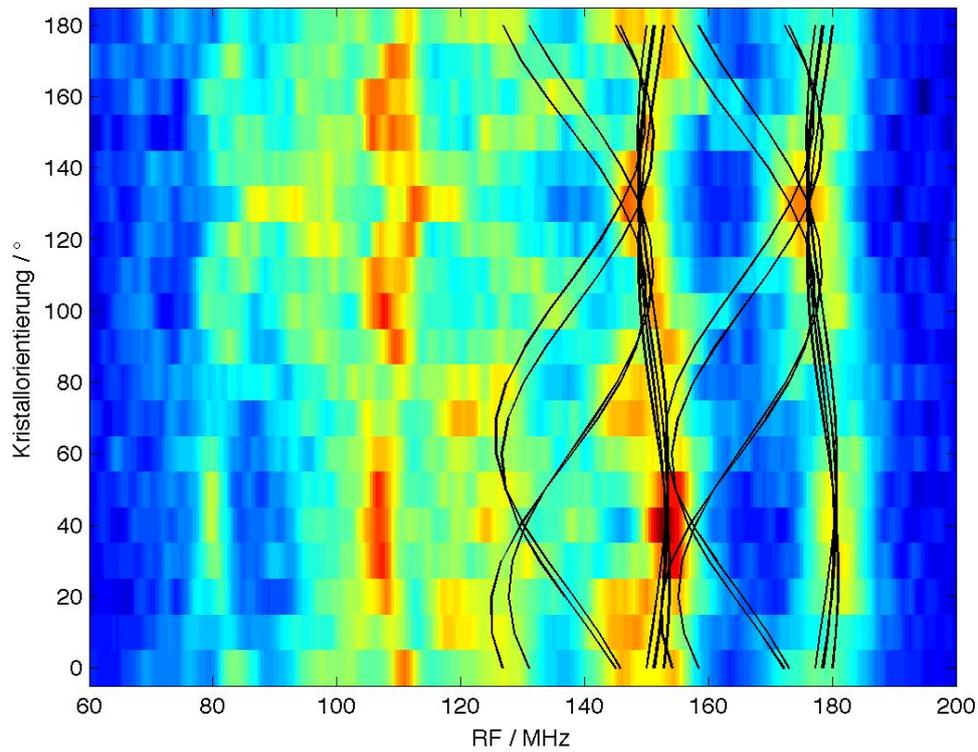
**Abbildung 6.17:** Links: Schematische Skizze einer axialen Kopplung mit der Komponente  $A_{parallel}$  entlang der Rotationsachse. Für alle Orientierungen liegen dann die Komponenten  $A_{senkrecht}$  parallel zum äußeren Magnetfeld  $B_0$ . Rechts: Schematische Skizze einer axialen Kopplung mit einer Komponente  $A_{senkrecht}$  entlang der Rotationsachse. Als Extremfall liegt bei Rotation der Kopplung um die Rotationsachse entweder die Komponente  $A_{senkrecht}$  oder  $A_{parallel}$  parallel zum äußeren Feld  $B_0$ .

Liegt die ausgezeichnete Achse einer axialen Kopplung parallel zur Rotationsachse, dann liegen die Senkrechtkomponenten der Kopplung in der Ebene senkrecht zur Drehachse. Für diesen Fall gibt es keine Orientierungsabhängigkeit der ENDOR-Linien bei einer Probenrotation. Für den hier verwendeten Kristall liegt die kristallographische  $b$ -Achse näherungsweise parallel der Rotationsachse. Liegt in einem Monomer des PSII eine Hyperfeinkopplung in der beschriebenen Weise, so sind die vier durch die  $P2_12_12_1$ -Symmetrie verknüpften Monomere magnetisch äquivalent und die jeweiligen ENDOR-Linien liegen übereinander.

Der zweite Extremfall der Positionierung einer axialen Kopplung ist im rechten Teil der Abb. 6.17 gezeigt. Bei Drehung des Systems um die Rotationsachse werden alle Werte

der Kopplung zwischen den Extremen  $A_{senkrecht}$  und  $A_{parallel}$  durchlaufen.

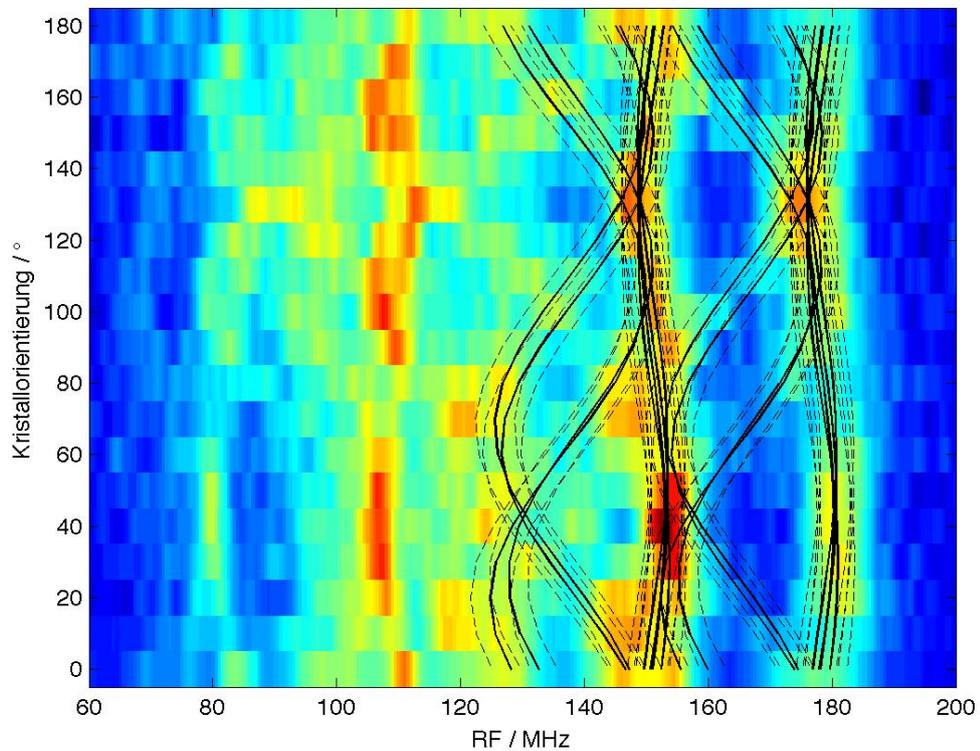
In Abb. 6.18 ist der orientierungsabhängige Verlauf der ENDOR-Positionen der aus der Simulation der  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren in Lösung bestimmten, größten Hyperfeinkopplung  $A_4 = (326, 335, 275)$  MHz (vgl. Tab. 6.1) gezeigt, wobei die ausgezeichnete Achse der Hyperfeinkopplung mit  $7^\circ$  leicht gegen die kristallographische  $b$ -Achse verkippt ist. Zur besseren Übersicht sind dabei zunächst nur die Positionen der Übergänge  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  für die acht Zentren der Einheitszelle eingezeichnet, der Beitrag der anderen ENDOR-Übergänge wird weiter unten diskutiert. Ausgangspunkt der Simulation ist die geringe Orientierungsabhängigkeit des intensiven Streifens um 180 MHz bzw. 155 MHz, dessen Entstehung in Abb. 6.17 für den Idealfall skizziert ist. Die beiden liegenden Streifen zeigen bei genauer Betrachtung durchaus eine geringe Orientierungsabhängigkeit. Die leichte Rhombizität der Hyperfeinkopplung von 9 MHz ist erforderlich, um diese Orientierungsabhängigkeit der beiden intensiven Streifen um 180 MHz und 155 MHz zu reproduzieren. Da die kristallographische  $b$ -Achse näherungsweise parallel zur Rotationsachse liegt, sind die vier durch die  $P2_12_12_1$ -Symmetrie verknüpften Monomere näherungsweise kollinear und damit quasi magnetisch äquivalent. Diese Linien bilden die Streifen um 180 MHz und 155 MHz. Die ENDOR-Linien der anderen vier Zentren sind durch die  $C_2$ -Symmetrie des Dimers vorgegeben. Die  $C_2$ -Achse liegt grob in Richtung einer Raumdiagonalen der Einheitszelle des Kristalls, so daß die ausgezeichnete Achse der Hyperfeinkopplung in Richtung der Ebene senkrecht zur Rotationsachse verkippt wird. Durch diese Lage der Achse in der  $a$ - $c$ -Ebene kommt es aufgrund der  $P2_12_12_1$ -Symmetrie für diese vier Zentren zur Pärchenbildung. Durch die Verkipfung der ausgezeichneten Achse aufgrund der  $C_2$ -Symmetrie in Richtung der Rotationsebene, wird quasi die gesamte Anisotropie der Hyperfeinkopplung bei Drehung des Kristalls überstrichen. Die beiden Pärchen folgen dabei durch die gewählte kleine Verkipfung von etwa  $7^\circ$  der ausgezeichneten Achse der Hyperfeinkopplung gegen die kristallographische  $b$ -Achse sehr gut dem Verlauf der beschriebenen Intensitätsbänder, auch der Gangunterschied von etwa  $40^\circ$  wird getroffen. Die gezeigte Simulation folgt einzig aus der Annahme, daß für ein Monomer die ausgezeichnete Achse der Kopplung etwa entlang der kristallographischen  $b$ -Achse und der Rotationsachse liegt. Die Orientierungen für die vier durch die  $P2_12_12_1$ -Symmetrie verbundenen Monomere sind damit automatisch festgelegt. Der entscheidende Punkt ist, daß durch die Anwendung der nicht-kristallographischen  $C_2$ -Symmetrie die Orientierung der Achse für die anderen vier Monomere ebenfalls festgelegt ist und nicht frei variiert werden kann. Die korrekte Reproduktion der paarweisen Intensitätsbänder aus dieser Annahme zeigt die Belastbarkeit und Güte der simulierten Orientierung der Hyperfeinkopplung  $A_4$ .



**Abbildung 6.18:** Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren am PSII-Einkristall in Konturdarstellung. In schwarz ist der orientierungsabhängige Verlauf der Übergänge  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  für die größte Hyperfeinkopplung  $A_4 = (326, 335, 275)$  MHz bei einer Orientierung der ausgezeichneten Achse näherungsweise parallel zur kristallographischen  $b$ -Achse durch die Eulerwinkel  $(101^\circ, 83^\circ, -91^\circ)$  für alle acht Monomere der Einheitszelle gezeigt.

Die für die Simulation verwendete Orientierung der großen Hyperfeinkopplung beschreibt den Positionsverlauf der hochfrequenten ENDOR-Signale sehr gut. Im Bereich des Maximums um 178 MHz wird die Orientierungsabhängigkeit gut getroffen. Die beobachtete Intensitätsschwankung dieses Bereiches mit Maxima zwischen  $20^\circ$  und  $40^\circ$  sowie zwischen  $120^\circ$  und  $140^\circ$  wird durch das Zusammenlaufen der vier bzw. aller acht Zentren in diesen Bereichen qualitativ wiedergegeben.

In Abb. 6.19 sind neben den mittleren ENDOR-Übergängen  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  auch die Übergänge  $m_I = -5/2 \rightarrow m_I = -3/2$  und  $m_I = 3/2 \rightarrow m_I = 5/2$  für alle acht Zentren eingezeichnet. Es wird deutlich, daß die breiten Linien aus der Überlagerung der  $m_I$ -abhängigen ENDOR-Linien resultieren. Im Fall des Hochfrequenzmaximums entsteht das Signal durch die Überlagerung der vier Monomere aus  $4 \times 6 = 24$  Linien.



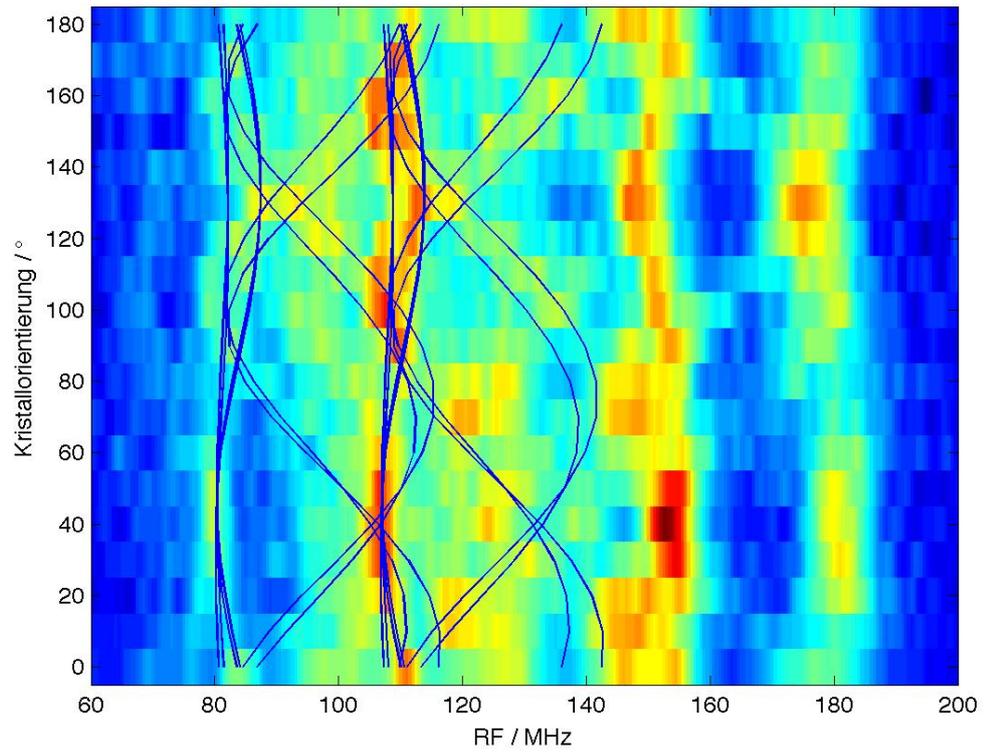
**Abbildung 6.19:** Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren am PSII-Einkristall in Konturdarstellung. Für die Hyperfeinkopplung  $A_4 = (326, 335, 275)$  MHz mit der Orientierung  $(101^\circ, 83^\circ, -91^\circ)$  ist der Verlauf der Übergänge  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  in schwarz eingezeichnet. Der Verlauf der Übergänge  $m_I = -5/2 \rightarrow m_I = -3/2$  und  $m_I = 3/2 \rightarrow m_I = 5/2$  ist gestrichelt dargestellt.

Ein weiterer Bereich in den  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des PSII-Kristalls fällt in der Konturdarstellung auf. Zwei Intensitätsstreifen um 80 MHz und deutlich intensiver um 105 MHz zeigen wie die Linien bei 180 MHz kaum eine Orientierungsabhängigkeit. Zusätzlich sind Intensitätsbänder sichtbar, die in den Orientierungen von  $100^\circ$  bis  $130^\circ$  von 140 MHz bis 105 MHz und in den Spektren der Orientierungen  $130^\circ$  bis  $160^\circ$  entgegengesetzt von 105 MHz bis 140 MHz verlaufen. Parallel dazu liegen bei denselben Orientierungen Intensitätsbänder im Bereich 80 MHz bis 100 MHz. Die Positionen der Streifen bei 80 MHz und 105 MHz entsprechen in etwa den Senkrechtkomponenten der zweitgrößten Kopplung  $A_2$  in der Simulationen des Lösungsspektrums. Die Orientierung dieser Kopplung ist der der größten Kopplung  $A_4$  offenbar vergleichbar. In Abb. 6.20 sind zunächst wiederum nur die Verläufe der ENDOR-Linien der Übergänge  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  eingezeichnet. Dabei ist die ausgezeichnete Achse der Hyperfeinkopplung  $A_2$  gegenüber  $A_4$  um etwa  $10^\circ$  leicht verkippt.

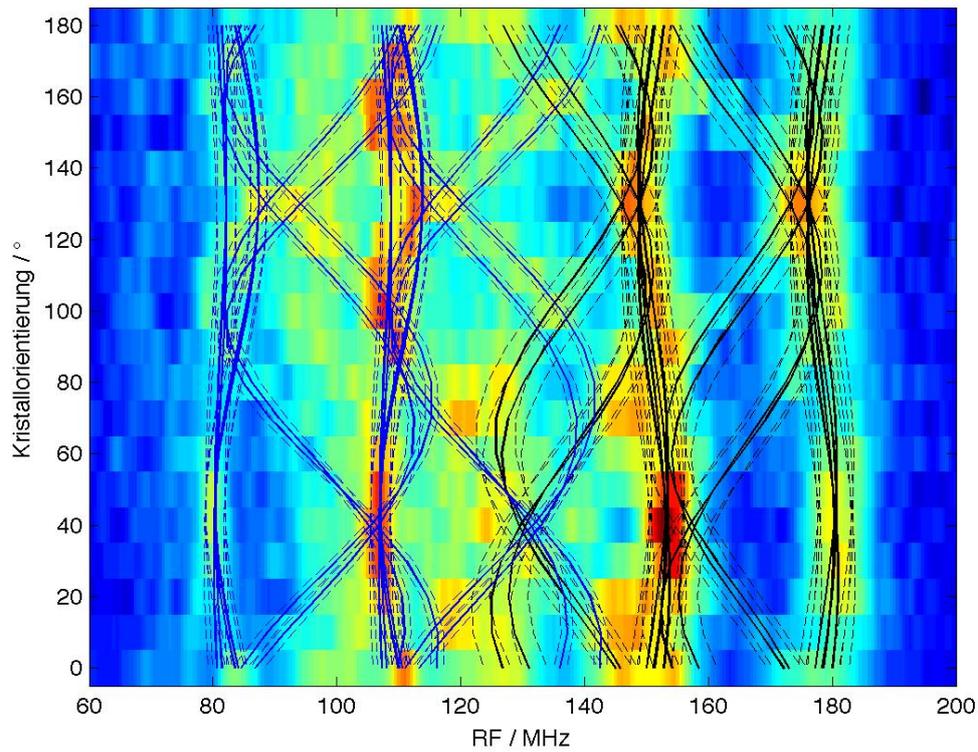
Auch für diese Kopplung trifft die Simulation sehr gut die besprochenen auffälligen Strukturen in der Konturdarstellung. Ebenso wie für die Kopplung  $A_4$  sind alle acht Linien durch die Orientierung eines Zentrums der Einheitszelle bestimmt.

In Abb. 6.21 sind neben den mittleren ENDOR-Übergängen  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  auch die Übergänge  $m_I = -5/2 \rightarrow m_I = -3/2$  und  $m_I = 3/2 \rightarrow m_I = 5/2$  der beiden bisher diskutierten Hyperfeinkopplungen eingezeichnet. Durch diese beiden Kopplungen sind die prominentesten Strukturen der Konturdarstellung getroffen. Bei genauer Betrachtung der Abb. 6.21 werden weitere orientierungsabhängige Intensitätsverläufe sichtbar, die den noch nicht diskutierten Kopplungen  $A_1$ ,  $A_3$  zuzuordnen sind. Im Niederfrequenzbereich ist eine Doppelbogenstruktur in den Spektren von  $80^\circ$  bis  $170^\circ$  im Bereich zwischen 65 MHz und 80 MHz zu erkennen. Desweiteren fallen zwei Intensitätsbänder ins Auge, die noch nicht durch die Simulation beschrieben sind. Eines läuft von 105 MHz bis 90 MHz in den Orientierungen von  $80^\circ$  bis  $100^\circ$ , das Zweite in entgegengesetzter Richtung in den Spektren von  $150^\circ$  bis  $180^\circ$ . Sowohl die Doppelbogenstruktur als auch die beiden Bänder liegen im Bereich der kleinsten Hyperfeinkopplung  $A_1$ . Durch das geringe S/R im Tieffrequenzbereich ist eine eindeutige Simulation dieser Muster mit einer einzigen zwingend passenden Orientierung nicht möglich.

Im mittleren Frequenzbereich zwischen 110 und 160 MHz werden Beiträge der Hyperfeinkopplung  $A_3$  erwartet. In diesem Bereich sind keine weiteren deutlichen Intensitätsbänder sichtbar. Durch die  $P2_12_12_1$ -Symmetrie und die Rotationsachse, die etwa parallel zu einer kristallographischen Achse liegt, kommt es zwangsweise für alle Orientierungen zu einer paarweisen magnetischen Äquivalenz der Monomere. Genauere Aussagen zur



**Abbildung 6.20:** Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren am PSII-Einkristall in Konturdarstellung. In blau ist der orientierungsabhängige Verlauf der Übergänge  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  für die Hyperfeinkopplung  $A_2 = (191, 187, 265)$  MHz mit der Orientierung  $(101^\circ, 88^\circ, -101^\circ)$  für alle acht Monomere der Einheitszelle gezeigt.



**Abbildung 6.21:** Q-Band  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren am PSII-Einkristall in Konturdarstellung. Durchgezogene Linien stellen den Verlauf der Übergänge  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  dar, gestrichelte Linien zeigen die Übergänge  $m_I = -5/2 \rightarrow m_I = -3/2$  und  $m_I = 3/2 \rightarrow m_I = 5/2$ . Schwarz:  $A_4 = (326, 335, 275)$  MHz mit der Orientierung  $(101^\circ, 83^\circ, -91^\circ)$ . Blau:  $A_2 = (191, 187, 265)$  MHz mit der Orientierung  $(101^\circ, 88^\circ, -101^\circ)$ .

Orientierung der Hyperfeinkopplung  $A_3$  sind ohne weitere Anhaltspunkte nicht möglich, da es keine Intensitätsmuster gibt, die dieser Kopplung zugeordnet werden können und damit von einer Simulation abgebildet werden müssten. Das Fehlen starker Intensitätsmuster stellt einzig die Bedingung, daß keine Hauptachse der Kopplung  $A_3$  entlang der Rotationsachse liegen kann. Stattdessen müssen die vier Pärchen möglichst inäquivalent orientiert sein, so daß es zu keinem Zusammenfallen einzelner Linien kommt.

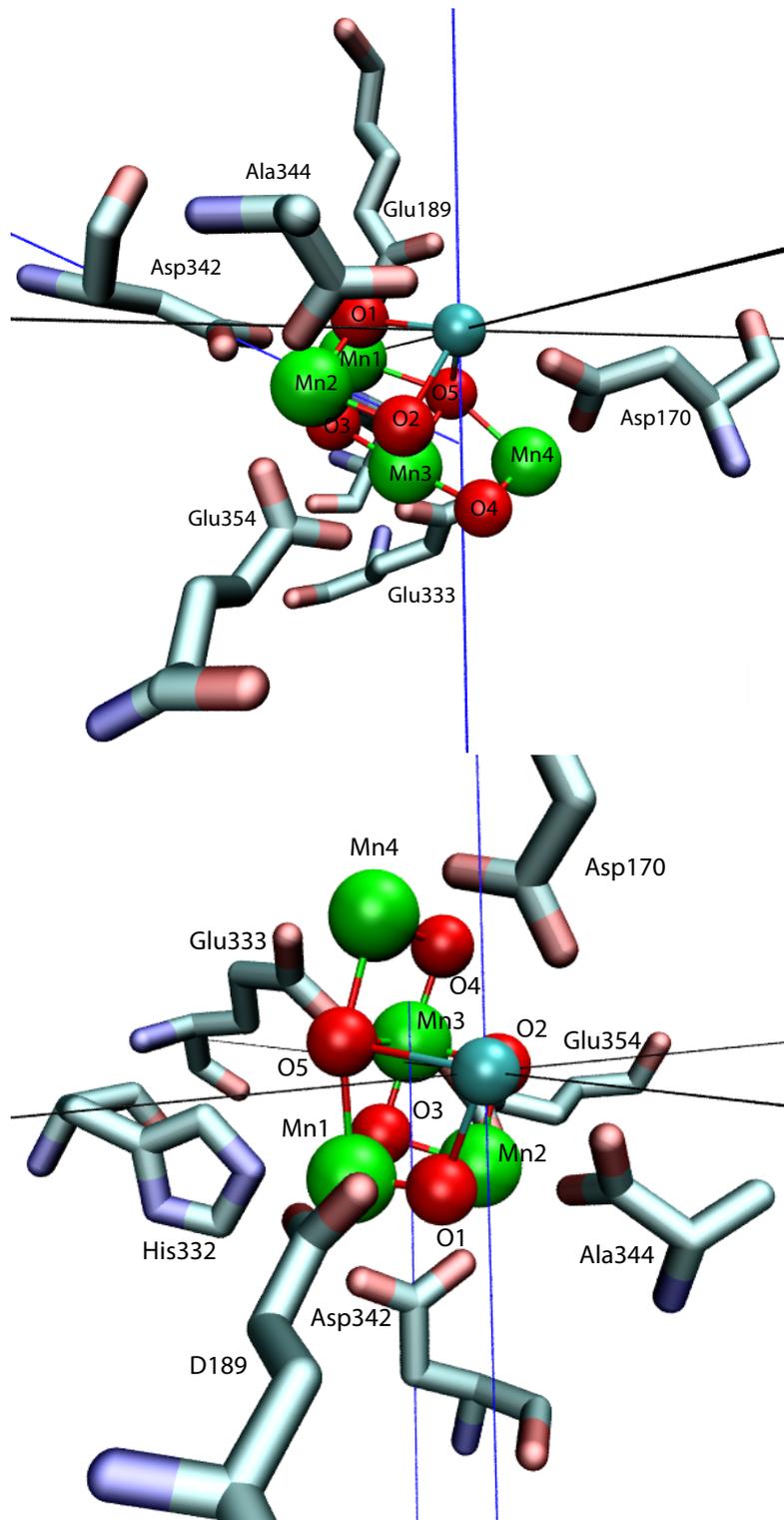
Da das S/R und die Auflösung der  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren am PSII-Einkristall vorerst keine Bestimmung der Orientierungen der Kopplungen  $A_1$  und  $A_3$  ermöglicht, konzentriert sich die folgende Diskussion zunächst auf die bereits charakterisierten Hyperfeinkopplungen  $A_2$  und  $A_4$ .

In Kap. 5 wurde Mn-Katalase im Mn(III)Mn(IV)-Zustand stellvertretend für zweikernige Mn(III)Mn(IV)-Modellsysteme mit EPR- und ENDOR-Spektroskopie untersucht (vgl. Kap. 5.3 und [43, 86–88]). Dabei fanden sich Korrelationen zwischen den magnetischen Parameter der Komplexe und ihrer geometrischen Struktur. Für di- $\mu$ -oxo verbrückte Systeme, die senkrecht zur Mn-O<sub>2</sub>-Mn-Ebene durch eine Karboxylatbrücke ligandiert sind, stehen die ausgezeichneten Achsen der Hyperfeinkopplungen der zwei Manganionen senkrecht auf der Mn-O<sub>2</sub>-Mn-Ebene. Damit liegen die ausgezeichneten Achsen parallel zu der Ligandierungsachse der Karboxylatbrücke. Für die zwei Hyperfeinkopplungen  $A_2$  und  $A_4$  des Mn-Komplexes in PSII wurde praktisch dieselbe Orientierung der ausgezeichneten Achse gefunden. In Analogie zu Strukturmotiven in zweikernigen Mn-Modellsystemen deutet diese Orientierung der zwei Kopplungen auf ein di- $\mu$ -oxo-verbrücktes Mn-O<sub>2</sub>-Mn-Teilsystem hin, das über eine Karboxylatgruppe ligandiert wird.

Auf der Suche nach diesem Strukturmotiv wurden die Orientierungen der möglichen Proteinliganden mit Karboxylatgruppe in der Kristallstruktur untersucht. Die simulierten Orientierungen erfordern eine Ligandierungsachse einer Karboxylatgruppe, die in einem Monomer näherungsweise parallel zur kristallographischen  $b$ -Achse liegt. Die Orientierung dieser Achse im zweiten Monomer ist dann durch die  $C_2$ -Symmetrie des Dimers festgelegt.

Unter den möglichen Liganden des WOC findet sich genau eine Aminosäure, Asp342, die die genannten Bedingungen bezüglich der Orientierung der Ligandierungsachse für beide Monomere erfüllt. In Abb. 6.22 ist der WOC in beiden Monomeren gezeigt, die kristallographischen Achsen sind eingezeichnet, wobei die in blau gezeichnete  $b$ -Achse näherungsweise der Drehachse entspricht.

Die terminale C-C-Achse der Aminosäure Asp342 liegt in einem Monomer fast parallel zur kristallographischen  $b$ -Achse. Im anderen Monomer ragt die C-C-Achse, durch die



**Abbildung 6.22:** Struktur des WOC in beiden Monomeren nach Ref. [1]. Die kristallographischen *a-c*-Achsen sind in schwarz, die *b*-Achse ist in blau eingezeichnet. Die Ligandierungsachse des Asp342 ist ebenfalls in blau eingezeichnet.

$C_2$ -Symmetrie bedingt, leicht aus der  $a$ - $c$ -Ebene heraus. Die Orientierung der terminalen C-C-Achse des Asp342 liegt genau entlang der ausgezeichneten Achse der Hyperfeinkopplung  $A_2$ . Die Orientierung der ausgezeichneten Achse der Hyperfeinkopplung  $A_4$  ist nur wenig, etwa  $10^\circ$ , gegen die terminale C-C-Achse des Asp342 verkippt. In der Struktur verbrückt Asp342 die Manganionen Mn1 und Mn2. In Analogie zu den zweikernigen Modellkomplexen können diesen beiden Manganionen die Kopplung  $A_4$  bzw.  $A_2$  zugeordnet werden.

Die größte Hyperfeinkopplung  $A_4$  ist (vgl. Tab. 6.1) hier oblat mit zwei großen Komponenten, die Hyperfeinkopplung  $A_2$  hingegen prolat mit zwei kleinen Komponenten. In den zweikernigen Mn-Modellkomplexen findet sich die große Hyperfeinkopplung durch die Spinprojektion stets auf dem Mn(III). Zusätzlich zeigt das Mn(III) eine oblate Kopplung mit zwei großen Komponenten, während die Kopplung des Mn(IV) prolat mit zwei kleinen Komponenten ist [43, 86–88]. Unter Einbeziehung dieser Tatsachen kann folgende Zuordnung getroffen werden. Die einzige oblate und gleichzeitig größte Hyperfeinkopplung  $A_4$  gehört zu dem Mn(III), die prolate Hyperfeinkopplung  $A_2$  zu einem der drei Mn(IV)-Kerne des WOC im  $S_2$ -Zustand.

Es ist also einerseits aus der Orientierung der ausgezeichneten Achse der beiden Hyperfeinkopplungen eine Zuordnung der Kopplungen zu den Manganionen Mn1 und Mn2 in der Kristallstruktur möglich. Zusätzlich gibt es über die Größe und Axialität der Kopplungen eine Zuordnung der Oxidationszustände zu den beiden Hyperfeinkopplungen und damit gleichzeitig zu den beiden Positionen Mn1 und Mn2.

In der Struktur ist die Bindung des Mn1 zum O5 ungewöhnlich lang. Trotz der Unsicherheiten, mit denen die Struktur behaftet ist, liefert dies einen Hinweis auf eine mögliche verzerrte Jahn-Teller-Achse entlang dieser Verbindungslinie. Diese Geometrie liefert damit einen Hinweis, welcher der beiden Positionen der Oxidationszustand (III) zugeordnet werden kann. Demnach trägt das Mn1 den Oxidationszustand (III) sowie die Hyperfeinkopplung  $A_4$ . Das Mn2 ist dann eines der drei Manganionen im Oxidationszustand (IV) und besitzt die Kopplung  $A_2$ . Beide Manganionen werden durch Asp342 ligandiert.

Wie bereits beschrieben erlauben die ENDOR-Spektren am PSII-Kristall für die anderen beiden Hyperfeinkopplungen des Mn-Komplexes  $A_1$  und  $A_3$  keine eindeutige Bestimmung der Orientierungen. Für die Hyperfeinkopplungen  $A_2$  und  $A_4$  ließ sich das Strukturmotiv der zweikernigen Mn-Modellsysteme auf den WOC übertragen. Für die beiden noch unbestimmten Hyperfeinkopplungen wird daher eine analoge Argumentation geführt.

Neben den drei einzähnigen Mn-Liganden mit Karboxylatgruppe Ala344, Glu189 und

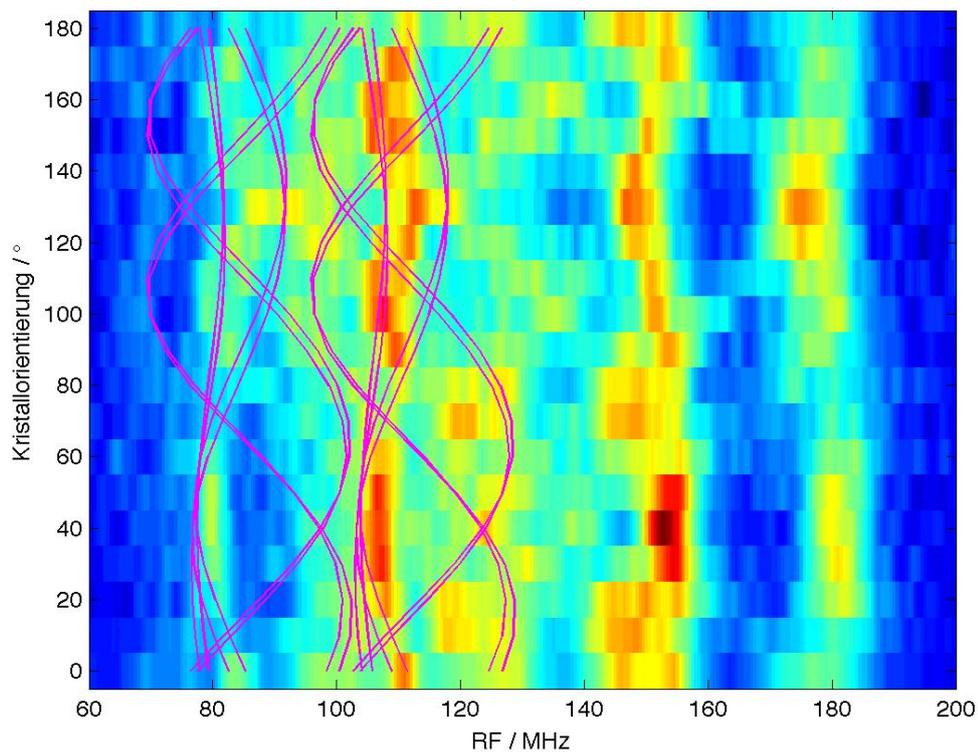
Asp170 gibt es in der Struktur neben Asp342 zwei weitere zweizählige Mn-ligandierende Aminosäuren, Glu333 und Glu354. Für alle diese Aminosäuren wurde die Orientierung der terminalen C-C-Achse bestimmt. Danach wurden die ENDOR-Positionen der Hyperfeinkopplungen  $A_1$  und  $A_3$  simuliert, wobei die ausgezeichnete Achse der Kopplungen jeweils entlang einer der Ligandierungsachsen der berücksichtigten Aminosäuren orientiert war.

In Abb. 6.23 ist der Verlauf der Übergänge  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  der kleinsten Hyperfeinkopplung  $A_1$  gezeigt, wobei die ausgezeichnete Achse entlang der terminalen C-C-Achse des Glu333 orientiert ist. Unter den berücksichtigten möglichen Liganden werden nur für diese Orientierung der Hyperfeinkopplung die beschriebenen Intensitätsmuster wie die Doppelbogenstruktur in den Spektren von  $80^\circ$  bis  $170^\circ$  im Bereich zwischen 65 MHz und 80 MHz und die Intensitätsbänder von 105 MHz bis 90 MHz in den Orientierungen von  $80^\circ$  bis  $100^\circ$  und  $150^\circ$  bis  $180^\circ$  simuliert.

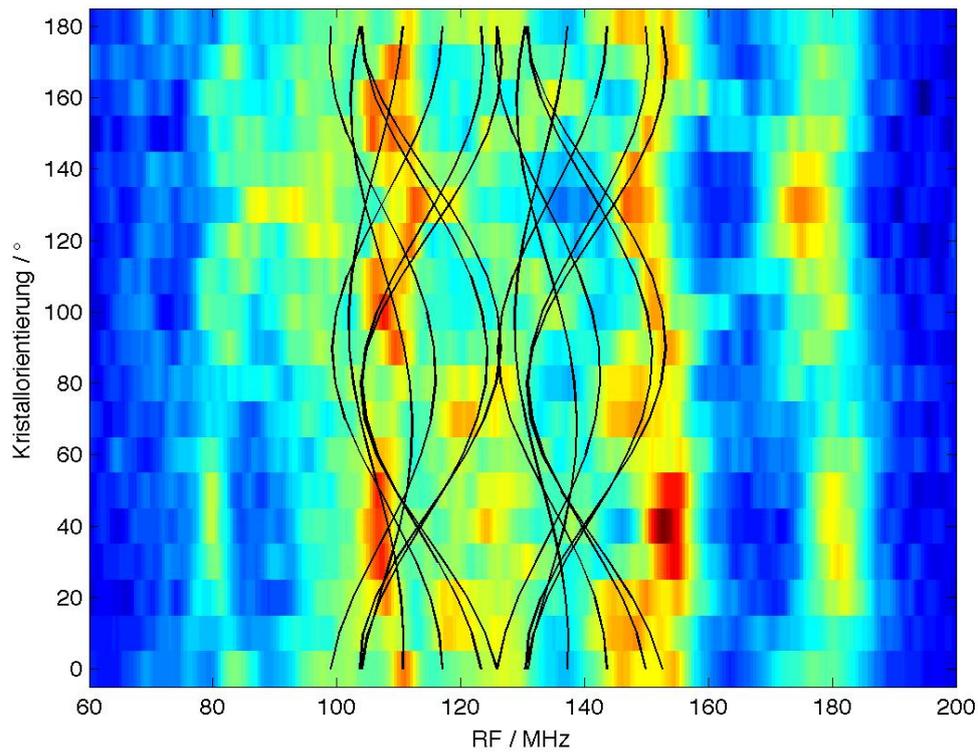
In Abb. 6.24 ist der Verlauf der Übergänge  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  der Hyperfeinkopplung  $A_3$  gezeigt, wobei die ausgezeichnete Achse entlang der terminalen C-C-Achse des Glu354 orientiert ist. Wie gefordert, sind für diese Orientierung der Hyperfeinkopplung die acht Zentren der Einheitszelle magnetisch inäquivalent. Dadurch sind die ENDOR-Positionen aller acht Zentren aufgespalten und es bilden sich keine klar erkennbaren Strukturen. Zusätzlich werden Minima der ENDOR-Intensität wie bspw. der Bereich zwischen 128 MHz und 135 MHz in der  $130^\circ$ -Orientierung des Kristalls von den simulierten ENDOR-Linien umgangen.

In Abb. 6.25 ist die Simulation aller vier Hyperfeinkopplungen für die mittleren Übergänge  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$ , sowie die extremen  $m_I = -5/2 \rightarrow m_I = -3/2$  und  $m_I = 3/2 \rightarrow m_I = 5/2$  mit den in Tab. 6.2 gegebenen Hyperfeinparametern gezeigt. Alle Intensitätsmuster der  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren sind durch die Simulation abgebildet. Gleichzeitig sind größere Einbrüche der ENDOR-Intensität von den Linienverläufen ausgespart. Die Linienpositionen der  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren am PSII-Einkristall werden durch die Hyperfeinkopplungen sehr gut beschrieben.

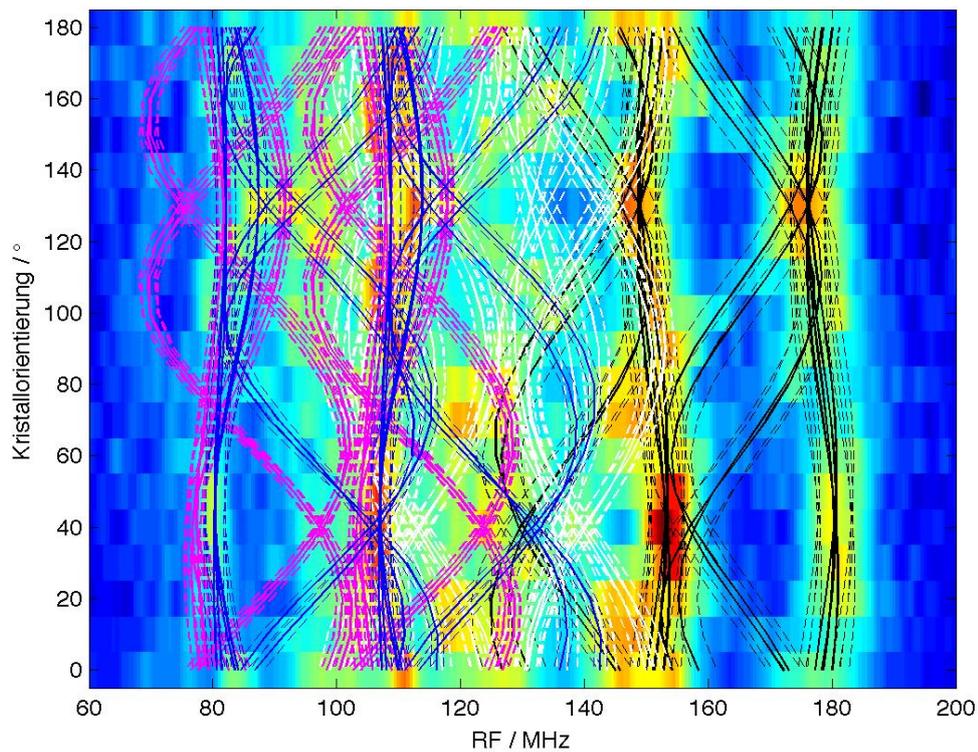
Die für die Hyperfeinkopplungen  $A_2$  und  $A_4$  bestimmten Parameter sind sehr robust, da die ENDOR-Signale dieser Hyperfeinkopplungen deutlich sichtbar und eindeutig simulierbar sind. Die Parameter der kleinsten Kopplung sind ebenfalls überzeugend. Die Orientierung war nicht eindeutig aus den  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren zu ermitteln, die Übertragung der Argumentation für  $A_{2,4}$  ergibt jedoch eine sehr gute Simulation der relevanten Intensitätsmuster. Die Parameter der Hyperfeinkopplung  $A_3$  sind mit der größten Unsicherheit behaftet, da in den  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren keine offensichtlichen Intensitäts-



**Abbildung 6.23:** Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren am PSII-Einkristall in Konturdarstellung. In magenta ist der orientierungsabhängige Verlauf der Übergänge  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  für die Hyperfeinkopplung  $A_1 = (165, 183, 232)$  MHz mit der Orientierung  $(-153^\circ, 26^\circ, 153^\circ)$  für alle acht Monomere der Einheitszelle gezeigt.



**Abbildung 6.24:** Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren am PSII-Einkristall in Konturdarstellung. In blau ist der orientierungsabhängige Verlauf der Übergänge  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  für die Hyperfeinkopplung  $A_3 = (235, 218, 280)$  MHz mit der Orientierung  $(14^\circ, 51^\circ, -14^\circ)$  für alle acht Monomere der Einheitszelle gezeigt.



**Abbildung 6.25:** Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren am PSII-Einkristall in Konturdarstellung. Durchgezogene Linien stellen den Verlauf der Übergänge  $m_I = -1/2 \rightarrow m_I = +1/2$  dar, gestrichelte Linien zeigen die Übergänge  $m_I = -5/2 \rightarrow m_I = -3/2$  und  $m_I = 3/2 \rightarrow m_I = 5/2$ . Schwarz:  $A_4$ . Weiß:  $A_3$ . Blau:  $A_2$ . Magenta:  $A_1$ . Die Hyperfeinparameter sind in Tab. 6.2 gegeben.

	$A_x$	$A_y$	$A_z$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$		
$A_1$	165	183	232	-153°	26°	153°	Glu333	Mn4
$A_2$	191	187	265	101°	88°	-101°	Asp342	Mn2
$A_3$	235	218	280	14°	51°	-14°	Glu354	Mn3
$A_4$	326	335	275	101°	83°	-91°	Asp342	Mn1

**Tabelle 6.2:** Hyperfeinparameter des Mn-Komplexes im  $S_2$ -Zustand. Die Hauptwerte der Hyperfeinkopplungen sind in MHz gegeben. Die Eulerwinkel geben die Orientierungen der Hyperfeinkopplung relativ zum Kristallkoordinatensystem an. Die Orientierungen entsprechen den terminalen C-C-Achsen der gegebenen Aminosäuren in den Untereinheiten  $a$  und  $c$  der pdb-Struktur 3ARC [1]. In der letzten Spalte ist die abgeleitete Zuordnung der jeweiligen Hyperfeinkopplung zu einer Mn-Position in der Struktur gegeben. Die Nomenklatur entspricht der aus der pdb-Struktur 3ARC. Fehler:  $\Delta A = \pm 3$  MHz,  $\Delta(\alpha, \beta, \gamma)_{2,4} = \pm 5^\circ$ ,  $\Delta(\alpha, \beta, \gamma)_{1,3} = \pm 10^\circ$ .

muster der ENDOR-Linien dieser Kopplung sichtbar sind. Die gefundene Orientierung zeigt durch die Aufspaltung der Linien der acht Zentren diese fehlende Musterbildung. Diese Orientierung beruht insbesondere auf der Übertragung des Strukturmotivs, das für die Kopplungen  $A_{2,4}$  bestimmt wurde.

Die Aminosäure Glu354 ligandiert die Manganionen Mn2 und Mn3. Das Mn2 wurde dabei bereits mit der Hyperfeinkopplung  $A_2$  über die Orientierung der ausgezeichneten Achse parallel zur terminalen C-C-Achse des Asp342 identifiziert. Damit ergibt sich in analoger Argumentation die Zuordnung der Hyperfeinkopplung  $A_3$  zu der Position des Mn3 in der Struktur. Das Mn4 wird von Glu333 ligandiert. Die ausgezeichnete Achse der kleinsten Kopplung liegt in der Simulation parallel zur terminalen C-C-Achse des Glu333. Damit ergibt sich konsistent die Zuordnung der kleinsten Kopplung  $A_1$  zu der Position des Mn4, das außerhalb des MnCa-Kubans liegt. Die größte Hyperfeinkopplung und einzige mit oblater Axialität wird dabei dem Mangan im Oxidationszustand (III), also der Position Mn1, zugeordnet.

## 6.4 Diskussion

Die in den vorangegangenen Kapiteln mittels Multifrequenz- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Messungen bestimmten Hyperfeinparameter sind der bislang vollständigste Parametersatz zur Beschreibung des  $S_2$ -Zustands des WOC. Zudem sind die Parameter durch den Multifre-

quenz-Ansatz und die Einkristallmessungen sehr belastbar, da mehrere unabhängige Datensätze konsistent simuliert wurden. Der hier vorgestellte Parametersatz kann daher als Maßstab für die Bewertung vorgeschlagener Modelle der Struktur und Reaktionsmechanismen des Mn-Komplexes dienen.

Zusätzlich wurde eine Korrelation zwischen den Hyperfeinparametern und der geometrischen Struktur in Analogie zu zweikernigen Mn-Modellsystemen postuliert. Auf Grundlage dieses Zusammenhangs sind für drei Aminosäuren Aussagen über ihre Rolle als Liganden an den Mn-Komplex im  $S_2$ -Zustand möglich. Die Aminosäuren Asp342, Glu333 und Glu354 sind hierbei zweizählige Liganden, Asp342 für die Manganionen Mn1 und Mn2, Glu333 für die Manganionen Mn3 und Mn4, sowie Glu354 für Mn2 und Mn3.

Die Ligandierung des Mn-Komplexes in den einzelnen S-Zuständen ist Gegenstand mehrerer, in der Mehrzahl FTIR-spektroskopischer, Untersuchungen an nativem PSII sowie zahlreichen PSII-Mutanten [21, 74, 75, 105, 106]. Diese Untersuchungen kommen zu teilweise widersprüchlichen Aussagen bezüglich der Natur der Ligandierung (vergleiche [74, 75]). Auch in der Zuordnung einzelner Liganden zu Manganionen, die im Lauf des Kok-Zyklus oxidiert werden, gibt es Unstimmigkeiten und widersprüchliche Interpretationen der experimentellen Daten. Die Hauptschwierigkeiten liegen dabei in der Zuordnung von FTIR-Banden zu bestimmten Aminosäuren sowie in der Korrelation beobachteter spektraler Veränderungen mit strukturellen Umordnungsprozessen während des Kok-Zyklus. Aus diesen Gründen wurden daher bisher außer aus Röntgenkristallographie keine verlässlichen Ligandierungsmodelle auf Basis von FTIR- oder anderen spektroskopischen Untersuchungen vorgeschlagen.

Die im Rahmen dieser Arbeit postulierte zweizählige Ligandierung der Aminosäuren Asp342, Glu333 und Glu354 ist damit ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung der Ligandenstruktur des WOC im  $S_2$ -Zustand.

Neben Aussagen zur Ligandierung des Mn-Komplexes wurden Positionen der Manganionen in der Struktur Hyperfeinkopplungen zugeordnet und die Position des Mn1 mit dem Manganion im Oxidationszustand (III) identifiziert. Diese Zuordnung konnte in dieser Arbeit erstmals auf Grundlage experimenteller Daten getroffen werden. Bisher wurde die Diskussion über die Identifikation der Position des Mn(III) in der Struktur des WOC auf Grundlage von mit DFT-Methoden entwickelten Strukturmodellen für den  $S_2$ -Zustand des Mn-Komplexes geführt. Die in dieser Arbeit bestimmten magnetischen Parameter des  $S_2$ -Zustands sowie die Zuordnung des Mn(III) zu Position Mn1 sind dabei ein mögliches Kriterium, aus unterschiedlichen theoretischen Ansätzen realistische Modelle auszuwählen.

Die hier vorgestellte Zuordnung des Mn(III) zu einem der beiden von Asp342 ligandierten Manganionen Mn1 bzw. Mn2 erfolgte bereits 2009 [102] auf Basis der damals aktuellen Struktur 3BZ1 von Guskov *et al.* [107]. Die Struktur 3BZ1 [107] wurde auf Basis der Struktur von Loll *et al.* [108] modelliert. Bereits bei Loll *et al.* [108] entspricht die Orientierung des Asp342 der aus den  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Kristallmessungen gefundenen. Im Gegensatz dazu weist die von Ferreira *et al.* 2004 veröffentlichte Struktur [109] eine deutlich andere als die hier vorgeschlagene Ligandenumgebung des WOC auf. In der Ferreira-Struktur liegt für keine ligandierende Aminosäure die terminale C-C-Achse entlang der experimentell geforderten Orientierung nahezu parallel zur kristallographischen *b*-Achse. Es ist daher davon auszugehen, daß die Strahlenschädigung des WOC in der Ferreira-Struktur deutlich größer ist als in den Strukturen von Loll *et al.* [108] und Guskov *et al.* [107] und sich bis in die Ligandenumgebung bemerkbar macht. Die neue Struktur von Umena *et al.* [1] ist bezüglich der hier besprochenen Aminosäuren Asp342, Glu333 und Glu354 den Berliner Strukturen [107, 108] sehr ähnlich. Angesichts der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Aussagen zur Ligandenumgebung des WOC sind die Strukturen aus Ref. [1, 107, 108] als gute Grundlage für Modellentwicklungen zu betrachten, während die Ferreira-Struktur [109] dies nicht ist.

In der Literatur werden jedoch noch immer Modellstrukturen auf Basis der Ferreira-Kristallstruktur diskutiert [18, 110–112]. In diesen Modellen widerspricht die Ligandenstruktur der hier vorgeschlagenen. Insbesondere sind die Aminosäuren Asp342 und Glu354 in diesen Modellen häufig nur einzähnige Mn-Liganden. Unter Berücksichtigung der hier getroffenen Aussagen zur Ligandierung des WOC sind diese Modelle als unrealistisch einzustufen.

Modelle, die auf den Strukturen nach Loll *et al.* bzw. Umena *et al.* beruhen, verändern die Ligandenumgebung des WOC kaum. Insbesondere entspricht die Ligandierung der Aminosäuren Asp342, Glu333 und Glu354 in diesen Modelle der hier geforderten. In den Ref. [53, 113, 114] wird das Mn(III) mit der Position Mn1 identifiziert und zusätzlich die Jahn-Teller-Achse des Mn(III) entlang der Ligandierungsachse des Asp342 postuliert. Dabei ergibt sich bei Cox *et al.* [53] und Ames *et al.* [113] explizit die Orientierung der ausgezeichneten Achse der Hyperfeinkopplung des Mn(III) parallel zur Ligandierungsachse des Asp342. Die beiden Arbeiten unterscheiden sich allerdings in der Größe der Hyperfeinkopplung, die dem Mn(III) an Position Mn1 zugewiesen wird.

In der Arbeit von Cox *et al.* [53] wird die größte Hyperfeinkopplung dem Mn(III) an Position Mn1 zugeordnet. Die zweitgrößte Kopplung *HFK2* trägt das Manganion an Position Mn2. Die kleinste Hyperfeinkopplung *HFK1* trägt das Manganion an Position

Mn3, die drittgrößte Kopplung *HF<sub>K</sub>3* entsprechend Position Mn4. Im Gegensatz dazu wird in den Arbeiten von Ames *et al.* [113] und ebenso Schinzel *et al.* [115] dem Mn(III) an Position Mn1 die drittgrößte Hyperfeinkopplung *HF<sub>K</sub>3* zugeordnet. Hier trägt das Manganion an Position Mn4 die größte Hyperfeinkopplung *HF<sub>K</sub>4*, die anderen beiden Kopplungen können den verbliebenen Positionen nicht definitiv zugeordnet werden.

Dabei beruhen die hier vorgestellten Modelle auf vergleichbaren Ausgangsstrukturen, die favorisierten Modellstrukturen nach Optimierungen sind sich relativ ähnlich, die Ligandierung des Mangankomplexes ist ebenso vergleichbar. Über den im Rahmen dieser Arbeit experimentell bestimmten Parametersatz der Hyperfeinkopplungen kann zwischen diesen Modellen weiter differenziert werden. Insbesondere die Orientierungen der Hyperfeinkopplungen relativ zu den zweizähligen Karboxylatverbrückungen bieten einen idealen Maßstab für die Qualität von theoretischen Strukturmodellen des WOC im S<sub>2</sub>-Zustand.

# Kapitel 7

## Multifrequenz-EPR- und -<sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektroskopie des S<sub>2</sub>-Zustands in PSII-Sr

Im vorangegangenen Kapitel stand die elektronische Struktur und Ligandierung der Mn-Ionen des WOC im Vordergrund. Der Mn-Komplex beinhaltet zusätzlich zu den vier Mn-Ionen ein Kalziumion (vgl. Kap. 2.2). Kalzium ist dabei ein essentieller Bestandteil des funktionsfähigen WOC. Die Entfernung des Kalziumions führt zu einem Verlust der katalytischen Funktion [116,117]. Der einzige bekannte funktionelle Ersatz für Kalzium ist das Einbringen eines Strontiumions an Stelle des Kalziums [3,52]. Bereits erste Messungen an Sr-ausgetauschtem PSII im S<sub>2</sub>-Zustand zeigten ein gegenüber dem nativen System verändertes S<sub>2</sub>-MLS [52,116]. Diese Untersuchungen wurden an Proben aus Spinatpräparationen durchgeführt, in denen das Kalzium durch verschiedene Methoden (für eine Übersicht siehe Ref. [118]) entfernt wurde. Bei anschließender Zugabe von Sr bindet dieses an Stelle des Kalziums und stellt die katalytische Aktivität teilweise wieder her.

Die Funktion des Kalziums für die katalytische Wasserspaltung ist bisher nicht verstanden. Einen Überblick über Untersuchungen zur strukturellen und funktionalen Rolle des Kalziums während des Kok-Zyklus geben Ref. [32,118,119].

Die Charakterisierung der magnetischen Parameter des S<sub>2</sub>-Zustands in PSII-Sr ermöglicht im Vergleich zum nativen System Rückschlüsse auf die Rolle des Kalziumions. Neben mehreren Erwähnungen des durch Sr-Austausch modifizierten S<sub>2</sub>-MLS in der Literatur erschien im Verlauf dieser Arbeit eine parallele Studie. In dieser wurde der S<sub>2</sub>-Zustand von in Sr-Medium gewachsenem PSII (PSII-Sr) aus *Thermosynechococcus elongatus* mit EPR- und <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektroskopie im Q-Band untersucht [53].

Die hier vorgestellten Resultate gehen dabei über Ref. [53] hinaus. Im Rahmen dieser

Arbeit wurde der  $S_2$ -Zustand von in Sr-Medium gewachsenem PSII (PSII-Sr) zusätzlich mittels W-Band-EPR und W-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR untersucht. Die aus der Nutzung von Multifrequenz-EPR-Methoden resultierenden Vorteile bei der Bestimmung der magnetischen Parameter und die daraus folgende größere Belastbarkeit der Aussagen sind bereits in den vorhergehenden Kapiteln deutlich geworden.

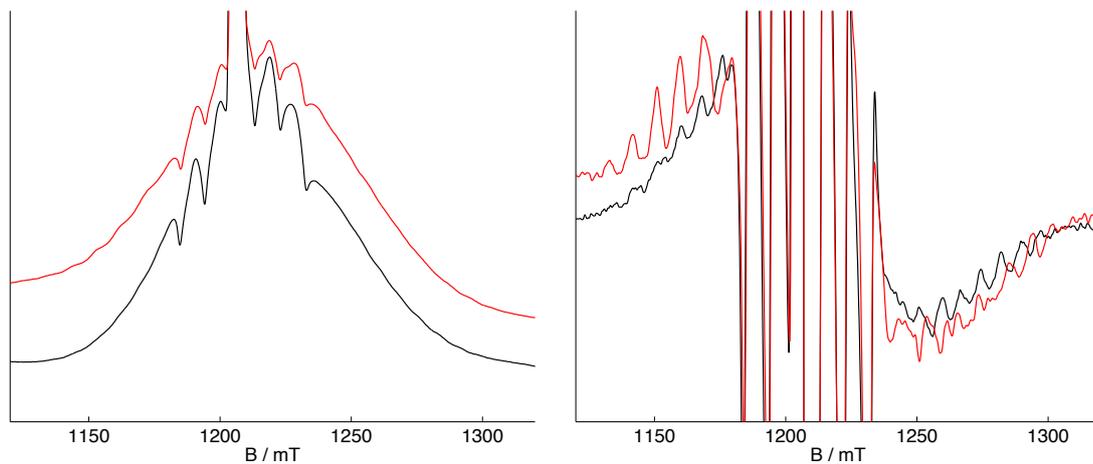
## 7.1 Multifrequenz-EPR des $S_2$ -Zustands in PSII-Sr

Im linken Teil der Abbildung 7.1 ist das Q-Band-EPR-Spektrum des  $S_2$ -Zustands in PSII-Sr (schwarz) im Vergleich mit dem EPR-Signal des  $S_2$ -Zustands in nativem PSII (rot) gezeigt. Die beiden Spektren unterscheiden sich insbesondere im Anteil an freiem  $\text{Mn}^{2+}$ . Dieser Anteil ist in den Proben des PSII-Sr deutlich größer als in Proben des nativen PSII. Das Kalzium kann zwar funktional durch Strontium ersetzt werden, dies gilt aber nicht für alle PSII-Moleküle. Die Zahl katalytisch aktiver Zentren ist in den Präparationen des PSII-Sr etwa um einen Faktor 4–7 geringer als im nativen System. Der größere Anteil inaktiver, höchstwahrscheinlich degradiertes Zentren in den Proben des PSII-Sr verursacht den größeren Anteil an  $\text{Mn}^{2+}$ -Signal in den EPR-Spektren und ist gleichzeitig der Grund für die deutlich geringere Signalintensität des  $S_2$ -MLS in diesen Proben.

Das in den Spektren sichtbare breite, gaußförmige  $S_2$ -MLS um  $g = 2$  ist außerhalb des durch  $^{55}\text{Mn}$ -Beiträge überlagerten Teil des Spektrums in den beiden Systemen sehr ähnlich. Die deutlich unterschiedliche Substruktur der beiden EPR-Signale wird in der ersten Ableitung der Spektren im rechten Teil der Abb. 7.1 sichtbar.

Dieser Unterschied in der Substruktur beruht auf den unterschiedlichen magnetischen Parametern der zwei Systeme. Wie sich schon bei zweikernigen Modellsystemen und nativem PSII gezeigt hat, ist für eine Bestimmung der  $\mathbf{g}$ -Matrix W-Band-EPR vorteilhaft [100], da durch die größere Elektron-Zeeman-Wechselwirkung der Beitrag der  $\mathbf{g}$ -Matrix zum EPR-Spektrum deutlich zunimmt und besser von Beiträgen der Hyperfeinkopplungen getrennt werden kann.

Die W-Band-EPR-Messungen des  $S_2$ -Zustands sind, wie in Kap. 4.2 beschrieben, relativ aufwändig und die Meßzeit zur Aufnahme des EPR-Spektrums begrenzt. Während das  $S_2$ -MLS für Proben des nativen PSII noch hinreichend intensiv ist, daß die experimentellen Schwierigkeiten nicht sehr ins Gewicht fallen, ist dies bei PSII-Sr deutlich schwieriger. Die etwa um den Faktor 5 verringerte effektive Probenkonzentration würde für eine vergleichbare Qualität des S/R gegenüber dem nativen System entsprechend



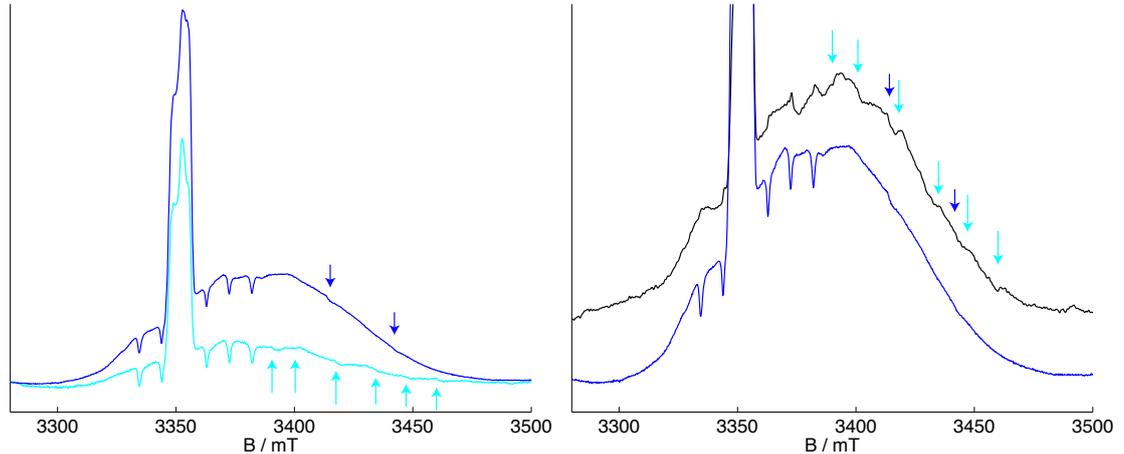
**Abbildung 7.1:** Links: Q-Band-EPR-Spektrum des  $S_2$ -Zustands von PSII-Sr (schwarz) und nativem PSII (rot). Rechts: Spektren in erster Ableitung. Experimentelle Parameter:  $f = 33,88$  GHz.

längere Akkumulationszeiten erfordern.

Die EPR-Spektren im dunkeladaptierten (hellblau) und belichteten Zustand (blau) von PSII-Sr sind im linken Teil in Abb. 7.2 gezeigt. Das Spektrum des dunkeladaptierten Zustands zeigt den durch freies  $Mn^{2+}$  und Cytochrom cyt-c550 gebildeten Untergrund. Dieses Untergrundspektrum zeigt neben den sechs typischen scharfen Linien ein sehr breites Signal im Bereich des  $S_2$ -MLS. Dieses Spektrum des dunkeladaptierten PSII-Sr ist gleich dem in nativem PSII im dunkeladaptierten Zustand gemessenen. Das Spektrum des belichteten Zustands zeigt gegenüber dem EPR-Spektrum der dunkeladaptierten Proben deutlich mehr Intensität im Bereich zwischen 3300 mT und 3480 mT sowie eine Verschiebung des Schwerpunkts dieses neuen, breiten Signals gegenüber dem Spektrum des Untergrunds.

Das Spektrum des dunkeladaptierten Zustands (vgl. Abb. 7.2) zeigt mehrere Intensitätssprünge. Diese sind durch Instabilitäten im experimentellen Aufbau bedingt, welche zu Verstimmungen des Resonators und damit Änderungen der Phase des EPR-Echos führen. Das Spektrum des  $S_2$ -Zustands in PSII-Sr ist in deutlich geringerem Ausmaß von diesen Intensitätsschwankungen betroffen. Das Differenzspektrum entspricht dem  $S_2$ -MLS und ist im rechten Teil in Abb. 7.2 in schwarz gezeigt. Das Signal des Differenzspektrums ist durch die Intensitätssprünge des Dunkelspektrums und Subtraktionsartefakte im Bereich des  $Mn^{2+}$  beeinträchtigt. Das EPR-Spektrum des  $S_2$ -Zustands, zum Vergleich

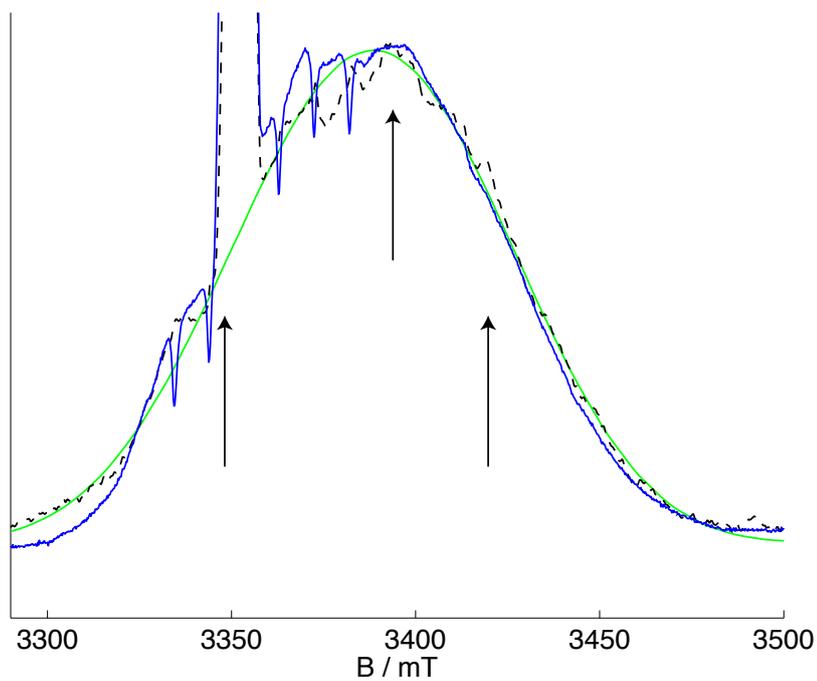
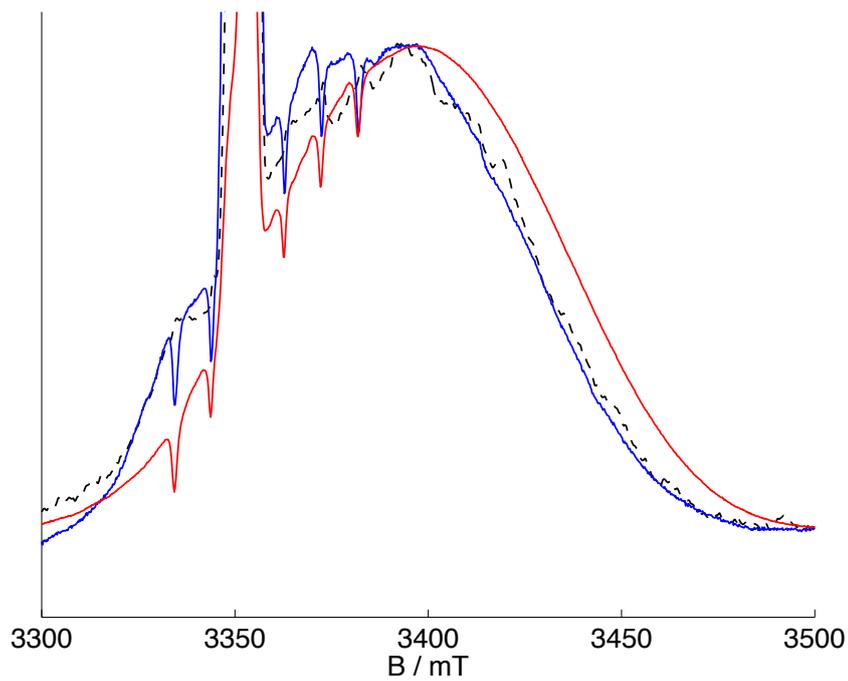
in blau gezeigt, ist im Bereich der Tieffeldflanke durch Beiträge von  $\text{Mn}^{2+}$  überlagert. Die Signalform des  $\text{S}_2$ -MLS ist dadurch in diesem Bereich nicht eindeutig zu erkennen. Das Differenzspektrum deutet aber darauf hin, daß diese Überlagerung das  $\text{S}_2$ -MLS nur wenig verzerrt. Die Hochfeldflanke ab der Mitte des Spektrums bei 3390 mT ist in beiden gezeigten Spektren jedoch gleich.



**Abbildung 7.2:** Links: W-Band-EPR-Spektrum der dunkeladaptierten Probe ( $\text{S}_1$ -Zustand) (blau) und der belichteten ( $\text{S}_2$ -Zustand) (schwarz) in PSII-Sr. Die durch Pfeile markierten Intensitätssprünge werden durch Instabilitäten im experimentellen Aufbau hervorgerufen. Rechts: Das Differenzspektrum in schwarz zeigt das EPR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -MLS. Das Spektrum des  $\text{S}_2$ -Zustands ist zum Vergleich in blau eingezeichnet. Experimentelle Parameter:  $f = 94,05$  GHz, Hahn-Echo-Sequenz:  $\pi$ -Pulslänge 64 ns,  $\tau$  360 ns, srt 200  $\mu\text{s}$ .

Im oberen Teil der Abb. 7.3 ist das EPR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -Zustands in PSII-Sr im Vergleich mit dem  $\text{S}_2$ -MLS des nativen Systems gezeigt. Zusätzlich ist das Differenzspektrum des  $\text{S}_2$ -MLS in PSII-Sr eingezeichnet (vgl. rechtes Bild in Abb. 7.2). Der Schwerpunkt des  $\text{S}_2$ -MLS des Sr-ausgetauschten PSII ist gegenüber dem nativen  $\text{S}_2$ -MLS deutlich zu höheren  $g$ -Werten verschoben. In Breite und Form unterscheiden sich die beiden Spektren leicht, das  $\text{S}_2$ -MLS des PSII-Sr ist etwas breiter als das  $\text{S}_2$ -MLS des nativen Systems und zeigt nicht ganz dessen Gaußlinienform. Im unteren Teil der Abb. 7.3 ist eine Simulation des  $\text{S}_2$ -MLS in PSII-Sr (grün) gezeigt. Die verwendete  $\mathbf{g}$ -Matrix ist in Tab. 7.1 aufgeführt, im Vergleich mit der  $\mathbf{g}$ -Matrix des nativen  $\text{S}_2$ -MLS und der von Cox *et al.* [53] aus der Simulation von X- und Q-Band-EPR-Spektren in erster Ableitung bestimmten  $\mathbf{g}$ -Matrix.

Der Mn-Komplex im  $\text{S}_2$ -Zustand in PSII-Sr zeigt hier gegenüber dem nativen System einen erhöhten  $g$ -Wert, der isotrope Wert ist um 0,007 verschoben. Zusätzlich ist die  $\mathbf{g}$ -



**Abbildung 7.3:** Oben: W-Band-EPR-Spektrum des  $S_2$ -Zustandes in PSII-Sr (blau) im Vergleich mit dem Spektrum von nativem PSII (rot). Das Differenzspektrum des  $S_2$ -MLS in PSII-Sr ist in schwarz gezeigt. Unten: Das Spektrum des  $S_2$ -Zustandes in PSII-Sr (blau), Differenzspektrum des  $S_2$ -MLS in PSII-Sr (schwarz) und die Simulation des Signals (grün). Die verwendete  $g$ -Matrix ist in Tab. 7.1 gegeben. Die den  $g$ -Komponenten entsprechenden Feldpositionen sind mit schwarzen Pfeilen markiert.

$g$	PSII-Sr	PSII	PSII-Sr [53]
$x$	2,007	1,997	1,995
$y$	1,980	1,970	1,968
$z$	1,965	1,965	1,957
$iso$	1,984	1,977	1,973
$aniso$	0,035	0,030	0,025

**Tabelle 7.1:**  $g$ -Matrix des S<sub>2</sub>-MLS von PSII-Sr, von nativem PSII (PSII) nach Ref. [100] und von PSII-Sr nach Ref. [53], die Angaben  $g_{iso}$  und  $g_{aniso}$  sind so in Ref. [53] angegeben. Der isotrope  $g$ -Wert  $g_{iso}$  berechnet sich als arithmetisches Mittel der drei  $g$ -Komponenten, der Wert der  $g$ -Anisotropie nach  $g_{aniso} = (g_x + g_y)/2 - g_z$ . Fehler:  $\Delta g_{x,y} = \pm 0.003$ ,  $\Delta g_z = \pm 0.002$ .

Matrix des S<sub>2</sub>-MLS in PSII-Sr etwas anisotroper und zeigt eine höhere Rhombizität. Diese Verschiebung der  $g_{x,y}$ -Komponente bei Beibehaltung des Wertes der  $g_z$ -Komponente ist durch die Form des S<sub>2</sub>-MLS in PSII-Sr begründet, welches im Gegensatz zum nativen System keine Gaußform zeigt. Das Signal ist rhombischer, der verschobene Schwerpunkt wird insbesondere über die Verschiebung der  $g_y$ -Komponente reproduziert. Der von Cox *et al.* bestimmte  $g$ -Wert ist hingegen deutlich zu klein, der isotrope Wert ist noch einmal kleiner als der des nativen S<sub>2</sub>-MLS. Cox *et al.* geben einen sehr kleinen Anisotropiewert von  $g_{aniso} = 0,025$  an. Dieser Vergleich mit Literaturwerten zeigt einmal mehr die Vorteile der W-Band-EPR bei der Bestimmung von  $g$ -Werten. Die Genauigkeit des hier simulierten  $g$ -Wertes wird abgeschätzt zu  $\Delta g_{x,y} = \pm 0.003$ ,  $\Delta g_z = \pm 0.002$ . Die  $g_z$ -Komponente kann etwas genauer bestimmt werden, da die Hochfeldflanke des Signals kaum durch Überlagerung von Mn<sup>2+</sup>-Signalen gestört wird.

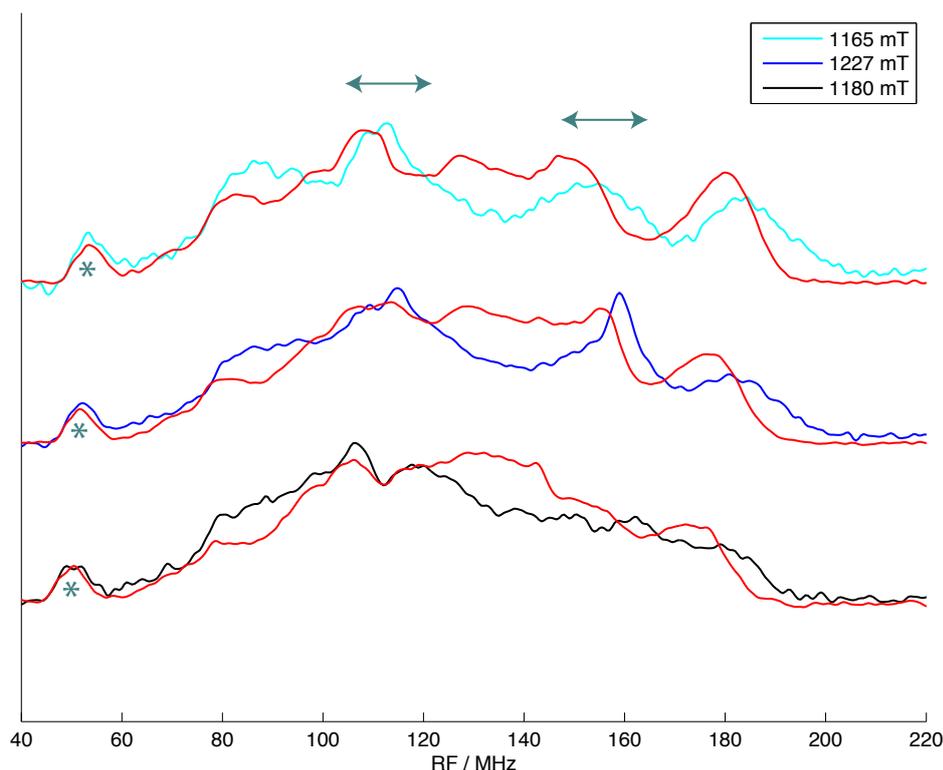
Die hier für das S<sub>2</sub>-MLS in PSII-Sr erstmals im Hochfeld bestimmte  $g$ -Matrix ist eine wichtige Größe zur Charakterisierung des Systems. Beim Ersatz des Kalziumions durch das Strontium im Kalzium-freien Anzuchtmedium gibt es aufgrund des größeren Radius des Strontiumions gegenüber dem Kalzium von etwa 0,1 Å kleinere Umordnungen des Mn-Komplexes. Untersuchungen der geometrischen Veränderungen des Komplexes durch den Metallaustausch mit EXAFS und XAS (für einen Überblick siehe Ref. [118]) zeigten insbesondere eine Verlängerung vermutlich zweier Mn-Sr Abstände um etwa 0,1 Å im Vergleich zum nativen System. Für die Mn-Mn-Abstände wurden nur sehr kleine Änderungen beobachtet, so daß die Mehrzahl der Untersuchungen zu dem Schluß kommt, daß die strukturellen Anpassungen über eine Verschiebung des Strontiumions gegen die Mangan-

ionen erfolgt. Die Änderung des  $g$ -Wertes des Mn-Komplexes im  $S_2$ -Zustand durch den Austausch des Kalziumions gegen Strontium zeigt dabei deutlich, daß mit den kleinen geometrischen Umstrukturierungen eine Änderung der elektronischen Struktur verknüpft ist. Es lassen sich allerdings aufgrund der Komplexität des Systems keine direkten Rückschlüsse auf entsprechende Auswirkungen auf die  $\mathbf{g}$ -Matrix ziehen. DFT-Rechnungen an zweikernigen Mn(III)Mn(IV)-Komplexen konnten bisher keinen quantifizierbaren Zusammenhang zwischen der genauen Struktur des Mn-Zentrums (Abstände der Mn-Ionen, Protonierungszustand der  $\mu$ -oxo Brücken, Art und Geometrie der Liganden) und der berechneten  $\mathbf{g}$ -Matrix herstellen [90, 93].

Die Hyperfeinparameter des Mn-Komplexes im  $S_2$ -Zustand in PSII-Sr werden hier analog zum Vorgehen in Kap. 6.2 mit Multifrequenz- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektroskopie untersucht.

## 7.2 Multifrequenz- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR des $S_2$ -Zustands in PSII-Sr

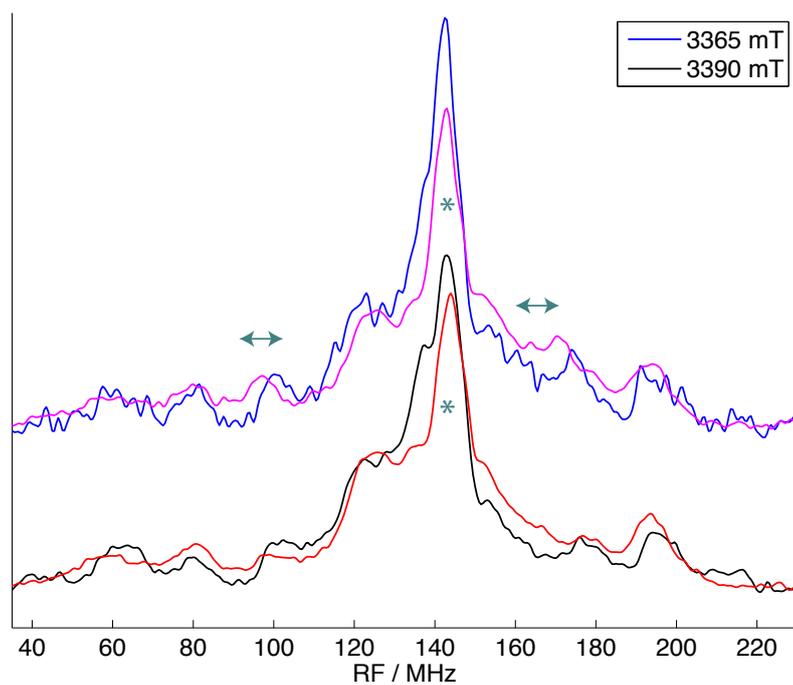
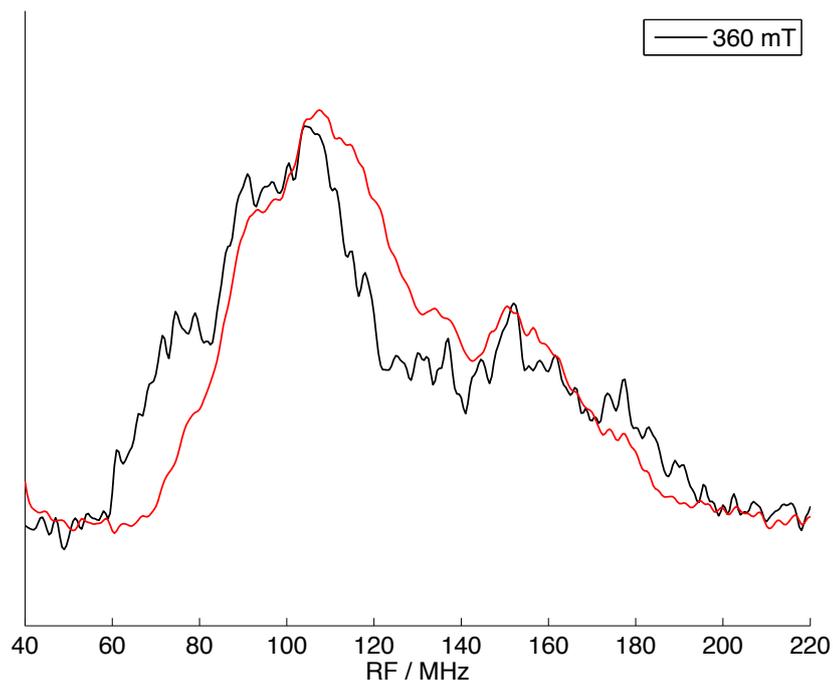
In Abb. 7.4 sind Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR Spektren des  $S_2$ -Zustands von PSII-Sr an verschiedenen Positionen im EPR-Spektrum gezeigt. Zum Vergleich sind für jede Feldstelle die ENDOR-Spektren des nativen Systems in rot eingefügt. Im untersuchten Feldbereich sind die ENDOR-Spektren des  $S_2$ -Zustands in PSII-Sr durchgängig breiter. Das Maximum des Hochfrequenzsignals ist gegenüber dem nativen PSII an allen Feldpositionen um etwa 4 MHz zu höheren Frequenzen verschoben. Diese Verschiebung betrifft ebenso den zugehörigen Linienpartner, der im nativen System um 150 MHz und im PSII-Sr ebenfalls bei etwa 4 MHz höheren Frequenzen liegt. Dies deutet auf eine mindestens 8 MHz größere Hyperfeinkopplung hin. Im mittleren Bereich des ENDOR-Spektrums zwischen 120 MHz und 160 MHz fällt insbesondere die verringerte Intensität durch das spektral ausgedehntere Spektrum im PSII-Sr ins Auge. Dies geht einher mit einer deutlichen Intensitätszunahme im Bereich von 80 MHz bis 100 MHz in den Spektren des PSII-Sr. Zusätzlich scheinen sich dessen ENDOR-Spektren auch zu niedrigeren Frequenzen, als die des nativen PSII, zu erstrecken. Der erste Anstieg der ENDOR-Signale läßt sich aber durch die Überlagerung mit  $^1\text{H}$ -Signalen in beiden Systemen nicht genau bestimmen. Diese Verschiebung der Signalintensität bedeutet wiederum die Verschiebung einer Hyperfeinkopplung, hier zu geringeren Werten. Interessant ist die Feldabhängigkeit in den beiden Systemen. Obwohl die Linienpositionen und Linienintensitäten deutlich gegeneinander verschoben sind, ist die über die Feldabhängigkeit sichtbare, relative Orientierung zwischen  $\mathbf{g}$ -Matrix und Hyperfeinkopplung gleich.



**Abbildung 7.4:** Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -Zustands von PSII-Sr (schwarz, blau, grün) an drei Feldpositionen.  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des nativen PSII von vergleichbaren Feldpositionen sind in rot gezeigt. Die Protonensignale sind mit einem Stern markiert, die Bereiche, in denen  $\text{Mn}^{2+}$  beiträgt, mit Pfeilen.

Im oberen Teil der Abb. 7.5 ist das X-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -Zustands in PSII-Sr (schwarz) im Vergleich mit dem Spektrum von nativem PSII gezeigt. Dabei erstreckt sich das Spektrum in PSII-Sr von 60 MHz bis 192 MHz und ist damit etwa 10 MHz breiter als das Spektrum des nativen Systems. Diese Beobachtung, sowie der zu deutlich kleineren Frequenzen verschobene Signalanstieg, der damit einhergehende Intensitätsabfall im mittleren Bereich des Spektrum zwischen 100 MHz und 140 MHz und die Verschiebung der Hochfrequenzflanke zu größeren Frequenzen entsprechen qualitativ den so auch im Q-Band beschriebenen Unterschieden.

Im unteren Teil von Abb. 7.5 sind W-Band-ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -Zustands von PSII-Sr an zwei verschiedenen Feldstellen im Vergleich zu ENDOR-Spektren des nativen PSII gezeigt. Im Rahmen des beschränkten S/R der ENDOR-Spektren des PSII-Sr

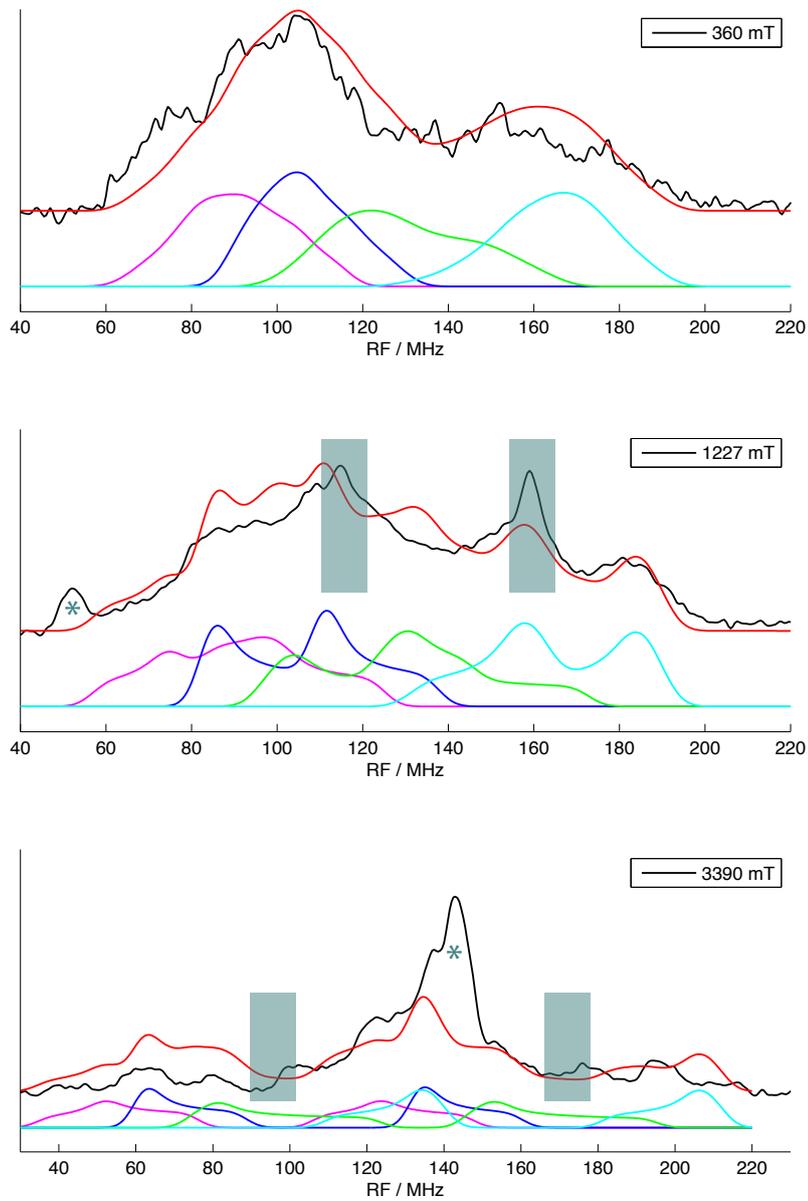


**Abbildung 7.5:** Oben: X-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -Zustands von PSII-Sr (schwarz) und nativem PSII (rot) bei 360 mT. Unten: W-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -Zustands von PSII-Sr (schwarz, blau) und nativem PSII (rot) an zwei verschiedenen Feldpositionen. Die Protonensignale sind mit einem Stern markiert, die Bereiche in denen freies  $\text{Mn}^{2+}$  überlagert mit Pfeilen.

zeigen die Spektren der zwei Systeme große Ähnlichkeit. Die größere Breite des ENDOR-Spektrums von PSII-Sr, die im X- und Q-Band sehr deutlich zu sehen ist, ist hier schwerer auszumachen. Im Niederfrequenzbereich ist der Beginn des Signals nur zu erahnen, die hervortretenden Signale bei 60 MHz, 80 MHz, 100 MHz und 125 MHz ähneln sich in beiden Systemen stark. Deutlichere Intensitätsunterschiede zeigen die Spektren der beiden Systeme im Frequenzbereich zwischen 130 MHz und 220 MHz. In Abb. 5.5 wurde das Problem unterdrückter ENDOR-Intensität im Bereich zwischen 180 MHz bis 220 MHz in den W-Band-ENDOR-Messungen illustriert. Durch diese Intensitätsunterdrückung des experimentellen Aufbaus ist das Maximum des Hochfrequenzsignals in PSII in den W-Band-ENDOR-Spektren scheinbar von etwa 200 MHz zu 190 MHz verschoben (vgl. Abb. 6.10). Diese Verschiebung des detektierten Maximums zu kleineren Frequenzen trifft auf das Spektrum des PSII-Sr ebenso zu. Der hochfrequente plateauartige Ausläufer im Bereich von 205 MHz bis 215 MHz des Hochfrequenzmaximums in PSII-Sr kann unter Berücksichtigung der Intensitätsunterdrückung als eigentliche Ausdehnung des Hochfrequenzmaximums interpretiert werden, welches wie in den X-Band- und Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren gegenüber dem Hochfrequenzmaximum in nativem PSII zu höheren Frequenzen verschoben ist.

In Abb. 7.6 sind Simulationen der  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -Zustands in PSII-Sr in den drei Frequenzbändern X-, Q- und W-Band mit den Hyperfeinparametern aus Tab. 7.2 gezeigt.

Beim Vergleich der  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren der zwei Systeme ist insbesondere auf die größere Breite des Spektrums des PSII-Sr hingewiesen worden. Die beobachtete Verschiebung des Hochfrequenzmaximums zu höheren und die Verschiebung der Niederfrequenzflanke zu kleineren Frequenzen verlangt eine entsprechende Anpassung der größten und kleinsten Hyperfeinkopplungen  $A_4$  und  $A_1$  in PSII-Sr gegenüber denen des nativen PSII. Um die verbleibenden Signalmaxima in allen drei Spektren zu reproduzieren, ist auch eine Anpassung der zwei Hyperfeinkopplungen  $A_2$  und  $A_3$  notwendig. Dabei zeigt die Kopplung  $A_2$  eine deutlich verringerte Anisotropie im Vergleich mit dem nativen System. Die der Kopplung  $A_3$  ist hingegen vergrößert. Die Simulationen des X- und Q-Band-Spektrums bilden die Form der Spektren qualitativ gut ab. Die Qualität der Simulation des W-Band-Spektrums ist durch das beschränkte S/R und die Problematik der relativen ENDOR-Intensitäten geringer als in den anderen beiden Frequenzbändern. So ist hier im Bereich des hochfrequenten Signalmaximums die Intensität stark unterdrückt, der Beginn des ENDOR-Spektrums ist durch das schlechte S/R und die geringe Intensität der ersten Signalmaxima kaum auszumachen. Da der mittlere Frequenzbereich des Spektrums durch die  $^1\text{H}$ -ENDOR-Signale überlagert wird, ist eine unabhängige Simula-



**Abbildung 7.6:**  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -Zustands in PSII-Sr in drei Frequenzbändern (schwarz) mit Simulation (rot). Die Beiträge der einzelnen Mn-Kerne sind farbkodiert,  $A_1$  in magenta,  $A_2$  in blau,  $A_3$  in grün,  $A_4$  in hellblau. Die Simulationsparameter sind in Tab. 7.2 gegeben. Die Protonensignale sind mit einem Stern markiert, Bereiche in denen  $\text{Mn}^{2+}$  das Spektrum verfälscht sind ebenfalls markiert.

		$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$
Sr	$x$	140	196	245	341
	$y$	176	192	218	355
	$z$	225	250	320	290
Ca	$x$	165	191	235	326
	$y$	183	187	218	335
	$z$	232	265	280	312

**Tabelle 7.2:** Hyperfeinkopplungen der Mn-Ionen im  $S_2$ -Zustand in PSII-Sr, zum Vergleich sind die in Kap. 6.3 bestimmten Hyperfeinkopplungen des Mn-Komplexes im  $S_2$ -Zustand von nativem PSII aufgeführt. Die Orientierungen der Hyperfeinkopplungen entsprechen den für das native System bestimmten (siehe Kap 6.3). Fehler:  $\Delta A_{1,4} = \pm 3$  MHz,  $\Delta A_3 = \pm 5$  MHz,  $\Delta A_2 = \pm(3, 3, 5)$  MHz.

tion des Spektrums bzw. eine Zuordnung der deutlich sichtbaren Signalmaxima zu ihren Partnern und den entsprechenden Hyperfeinkopplungen nicht möglich. Aufgrund dieser Schwierigkeiten und dank der guten Übereinstimmung der Simulation im Vergleich mit den X- und Q-Band-ENDOR-Spektren ist die Qualität des Hyperfein-Parametersatzes als befriedigend anzusehen.

## 7.3 Diskussion

Die EPR- und  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren von nativem und PSII-Sr sind trotz der beobachteten Unterschiede im Prinzip sehr ähnlich. Diese prinzipielle Ähnlichkeit zeigen auch die magnetischen Parameter, insbesondere die Hyperfeinkopplungen weichen um weniger als 10 % in den zwei Systemen voneinander ab. Die Korrelation der beobachteten Änderungen mit der elektronischen und geometrischen Struktur des Mn-Komplexes ist nicht trivial, da die effektiven magnetischen Parameter durch die intrinsischen Parameter und das Kopplungsschema beeinflusst sind. Trotzdem kann zumindest auf Basis der prinzipiellen Ähnlichkeit der EPR- und  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren der zwei Systeme davon ausgegangen werden, daß der Austausch des Kalziumions gegen Sr zu keinen größeren Umstrukturierungen des Mn-Komplexes führt. Weiterhin kann darauf aufbauend davon ausgegangen werden, daß praktisch keine wesentliche Änderung des Kopplungsschemas erfolgt.

Diese Schlußfolgerungen werden dabei von EXAFS-Untersuchungen [112] gestützt, die praktisch keine Änderungen der Mn-Mn-Abstände für PSII-Sr feststellten. DFT-Rechnungen an zweikernigen Mn(III)Mn(IV)-Modellkomplexen zeigen zudem [93], daß die Kopplung der Manganionen insbesondere von der Geometrie (vor allem in Bezug auf die Planarität) und dem Protonierungsgrad der Verbrückung beeinflusst wird. Liganden und kleinere Umorientierungen innerhalb der Verbrückung haben auf die Kopplungsstärke kaum Einfluß.

Zu einem ähnlichen Ergebnis bezüglich des Kopplungsschemas der Manganionen, das praktisch keine Änderung durch den Austausch des Kalziumions erfährt, kommt die parallel im Verlauf der vorliegenden Arbeit veröffentlichte Studie von Cox *et al.* [53]. In dieser Untersuchung wurden EPR-Spektren nur in X- und Q-Band sowie  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren lediglich im Q-Band in nativem PSII und PSII-Sr untersucht und DFT-Rechnungen für beide Systeme mit verschiedenen Modellen für den Mn-Komplex durchgeführt. Auch in dieser Arbeit wurde keine Änderung des Kopplungsschemas durch den Ca/Sr-Ersatz gefunden. Allerdings fanden Cox *et al.* für die  $\mathbf{g}$ -Matrix und die Hyperfeinkopplungen in PSII-Sr hauptsächlich Änderungen der Anisotropie gegenüber nativem PSII und praktisch keine Verschiebungen der isotropen Werte. Dies steht im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gefundenen Parametern (vgl. Tab. 7.2, 7.1), die im Vergleich zu nativem PSII Änderungen des isotropen Wertes als auch der Anisotropie sowohl für die  $\mathbf{g}$ -Matrix als auch die Hyperfeinkopplungen zeigen. Der in dieser Arbeit gefundene Parametersatz ist durch den Multifrequenzansatz belastbar, da Simulationen die EPR- und  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren in den drei Frequenzbändern X-, Q- und W-Band reproduzieren

müssen. Durch den großen Parameterraum ist solch eine Überprüfung der magnetischen Parameter gegen möglichst viele unabhängige Datensätze ein wichtiges Kriterium.

Die Auswirkungen der lokalen Struktur auf die intrinsischen und damit auf die effektiven magnetischen Parameter von zweikernigen Mn-Modellkomplexen wurden in neueren DFT-Studien untersucht [93, 120]. Dabei zeigt sich, daß die intrinsischen Hyperfeinkopplungen in für die jeweilige Oxidationsstufe charakteristischen Bereichen liegen. Im konkreten System ist die tatsächliche intrinsische Hyperfeinkopplung dabei durch die lokale Umgebung beeinflusst. Insbesondere untersuchten Schraut *et al.* [120] die Bedeutung intrinsischer Nullfeldwechselwirkung des Mn(III) auf die effektiven magnetischen Parameter. Dabei ist die intrinsische Nullfeldwechselwirkung sehr stark von der lokalen Struktur beeinflusst. In stark austauschgekoppelten Systemen führt eine nicht zu vernachlässigende intrinsische Nullfeldwechselwirkung auf dem Mn(III) zu einem substantiellen Anisotropietransfer auf die effektive Hyperfeinkopplung des Mn(IV). Veränderungen der intrinsischen Nullfeldwechselwirkung beeinflussen also insbesondere die Anisotropie der effektiven Hyperfeinkopplungen beider Manganionen. Für Systeme, in denen die Nullfeldwechselwirkung keine kleine Störung mehr ist, ist die Austauschwechselwirkung nicht länger absolut dominierend. In diesem Fall wird auch die effektive isotrope Hyperfeinkopplung der Manganionen durch die intrinsische Nullfeldwechselwirkung des Mn(III) beeinflusst. Insbesondere zeigte sich, daß die intrinsischen magnetischen Parameter sehr empfindlich auf kleine Strukturänderungen der Mn-O<sub>2</sub>-Mn Verbrückung reagieren.

Die in EXAFS-Untersuchungen [112] gefundenen verlängerten Sr-Mn-Abstände im Vergleich zu Ca-Mn-Abständen sind dem etwas größeren Radius des Sr-Ions im Vergleich zu Kalzium geschuldet. Diese Verschiebung des Sr im Vergleich zu Ca beeinflusst mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die direkte Umgebung. Drei Sauerstoffliganden des Ca/Sr sind Teil des Mn-Komplexes und damit Teil der lokalen Umgebung der Manganionen. Durch die di- $\mu$ -oxo-Verbrückung aller Manganionen ist jeweils nur eines der verbrückenden Sauerstoffionen zugleich ein Ligand an das Ca/Sr-Ion.

Die diskutierten Studien und hier vorgestellten Ergebnisse deuten also darauf hin, daß der Ersatz des Kalziums durch Strontium nur geringe Auswirkungen auf die Struktur des Mn-Komplexes hat und von diesen Änderungen hauptsächlich Sauerstoffliganden des Ca/Sr, die gleichzeitig Teil der di- $\mu$ -oxo-Brücken zwischen den Manganionen sind, betroffen sind. Das führt zu der auch von anderen Forschern experimentell und theoretisch bestätigten Aussage, daß das Kopplungsschema des Mn-Komplexes von diesem Austausch praktisch nicht betroffen ist. Die geringen Strukturänderungen der verbrückenden Sauerstoffionen äußern sich insbesondere als Beeinflussung der intrinsischen und damit

der beobachteten effektiven Hyperfeinkopplungen.

Diese Hypothesen sind durch einen weiteren Punkt zu ergänzen. In dieser Arbeit zeigen die feldabhängigen  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren in Q- und W-Band von PSII-Sr dieselbe Orientierungsabhängigkeit wie natives PSII. Der Parametersatz für PSII-Sr unterscheidet sich von nativem PSII also nur in der Größe der einzelnen Parameter. Die Orientierungen der Hyperfeinkopplungen sind vom Ersatz des Kalzium durch Strontium nicht betroffen, das heißt insbesondere, daß keine Umstrukturierung der Liganden des Mn-Komplexes stattfindet.

Dieses Ergebnis gleicher Orientierungen der Hyperfeinkopplungen in beiden Systemen wird von DFT-Rechnungen an zweikernigen Mn(III)Mn(IV)-Komplexen gestützt [120]. In Systemen mit vergleichsweise großer intrinsischer Nullfeldwechselwirkung des Mn(III), die gegenüber der Austauschkopplung nicht vernachlässigt werden kann, finden Schraut *et al.* eine Reorientierung der effektiven Hyperfeinkopplungen gegenüber dem intrinsischen Hauptachsensystem. Die bereits postulierten Änderungen der intrinsischen Nullfeldwechselwirkung des Mn(III) im Mn-Komplex des PSII beim Ersatz von Kalzium gegen Strontium sind prozentual vergleichsweise klein. Für diese Änderungen der intrinsischen Nullfeldwechselwirkung kann entsprechend der experimentellen Beobachtung eine Reorientierung der effektiven Hyperfeinkopplungen in PSII-Sr gegenüber nativem PSII ausgeschlossen werden.

Die Frage der Ligandierung des WOC und insbesondere Änderungen in der Ligandenstruktur des WOC durch den Ersatz von Kalzium gegen Strontium wird auch in FTIR-Studien untersucht. Dabei wurden deutliche Unterschiede der beiden Systeme gefunden [121–123]. Dabei kamen diese Studien jedoch zu dem Schluß, daß eine Zuordnung der Änderungen in den FTIR-Spektren aufgrund des Ca/Sr-Austausches zu einzelnen Liganden nicht möglich wäre [122, 123]. Vielmehr werden allgemeine strukturelle Veränderungen des Mn-Komplexes detektiert, die nicht direkt Rückschlüsse auf eine Umordnung der Ligandierung erlauben.

Insgesamt wird deutlich, daß die Rolle des Kalziumions für die Wasserspaltung offenbar nicht struktureller Natur ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß bei einem Ersatz des Kalziumions gegen Strontium die Struktur des Mn-Komplexes kaum beeinflusst wird und auch die Ligandierung des Komplexes erhalten bleibt. Lediglich lokale Strukturanpassungen an das etwas größere Strontiumion führen zu geringen Änderungen der lokalen Umgebung der Manganionen und damit derer intrinsischer Parameter, was sich durch das unveränderte Kopplungsschema auf die effektiven Hyperfeinkopplungen überträgt.

Somit stellt sich die Frage nach einer funktionalen Rolle des Kalziumions für die Was-

zerspaltung. In diesem Zusammenhang wird insbesondere die Bedeutung des Kalziumions für das Wasserstoffbrückennetzwerk in der Umgebung des WOC diskutiert [29, 124, 125]. Dieser funktionale Aspekt und die eventuelle Störung des Wasserstoffbrückennetzwerks des WOC durch den Ersatz von Kalzium durch Strontium wird in Kap. 8.2 eingehender diskutiert.

## Kapitel 8

# $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektroskopie des $\text{S}_2$ -Zustands in PSII

Zentral für das Verständnis des Mechanismus der Wasserspaltung ist die Kenntnis über die Bindung des Substratwassers an den WOC. Dabei sind Fragen nach Transportpfaden, Zeitpunkt und Ort der Substratbindung durch die Forschung noch nicht beantwortet.

Vor der Veröffentlichung der neuesten Kristallstruktur [1] konnte die Röntgenkristallographie keine Wassermoleküle im PSII auflösen. Dagegen ermöglichten EPR-Methoden wie ESEEM und ENDOR schon früher die Detektion von Protonen in der Umgebung des paramagnetischen Zentrums. Aus den experimentellen Kopplungen können dann Informationen über die Geometrie abgeleitet werden. Die Mehrzahl der Studien zur Protonierungsumgebung des WOC im  $\text{S}_2$ -Zustand nutzte ESEEM- und cw-ENDOR-Spektroskopie [58, 60–62, 65, 66]. Nur in einer Veröffentlichung [64] wurde Puls-ENDOR-Spektroskopie zur Detektion der Protonenkopplungen des Mn-Komplexes genutzt. Abgesehen von einer älteren Studie [61] an cyanobakteriellem PSII, in der auf Unterschiede im cw-ENDOR-Spektrum zu pflanzlichem PSII hingewiesen wurde, sind alle anderen Untersuchungen an PSII aus Spinat durchgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit an PSII aus *Thermosynechococcus elongatus* erfolgten  $^1\text{H}$ -ENDOR-Untersuchungen ermöglichen hingegen eine Vergleichbarkeit der bestimmten magnetischen Parameter mit der Röntgenstruktur.

Die cw-ENDOR-Spektren in den verschiedenen Studien [61, 62, 65] zeigen vier Signale, deren Positionen in den genannten Veröffentlichungen vergleichbar sind. Die Interpretation, welche Komponenten der Hyperfeinkopplung dabei beobachtet wurden, führte in jeder der Studien zu unterschiedlichen Angaben bezüglich der Zahl der gekoppelten Protonen. ESEEM- und Puls-ENDOR-Untersuchungen postulierten ebenfalls unterschiedliche Hyperfeinkopplungen in Bezug auf Stärke und Anzahl der umliegenden Protonen [58, 60, 64, 66]. Dabei postuliert die Mehrzahl der Veröffentlichungen auf Grundlage

mechanistischer Überlegungen mindestens ein Proton bzw. Hydroxid als Ligand eines Mangankerns.

In der neuesten Röntgenkristallstruktur sind erstmals auch Wasserliganden des WOC aufgelöst. Der Protonierungszustand dieser Wassermoleküle, des Mn-Komplexes und der umliegenden Aminosäureliganden ist aber weiterhin ungeklärt. Aufbauend auf der neuen Struktur sind mehrere theoretische Modelle der Protonierung des WOC entwickelt worden [113, 114, 126]. Angesichts dieser Fortschritte der theoretischen Modelle ist eine möglichst umfassende Charakterisierung der Protonenkopplungen des WOC im S<sub>2</sub>-Zustand wichtig, um eine experimentelle Grundlage für weitere Modellentwicklungen der Struktur des WOC und des Reaktionsmechanismus zu liefern.

Im Rahmen dieser Arbeit sind daher <sup>1</sup>H-ENDOR-Messungen an PSII aus *Thermosynechococcus elongatus* durchgeführt worden. Da die EPR-Messungen im Q-Band ein gutes S/R zeigen und das Protonensignal in diesem Frequenzband bei etwa 52 MHz gut separiert von anderen Beiträgen wie <sup>55</sup>Mn und <sup>15</sup>N ist, wurden alle <sup>1</sup>H-ENDOR-Messungen im Q-Band durchgeführt.

## 8.1 Q-Band-<sup>1</sup>H-ENDOR in PSII

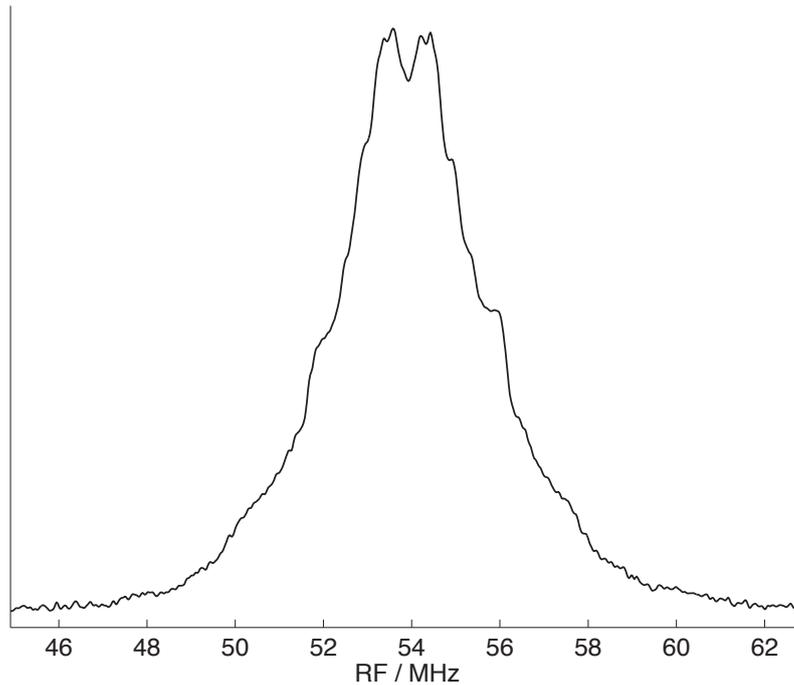
Damit das <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum des S<sub>2</sub>-Zustands nicht von <sup>1</sup>H-Signalen anderer paramagnetischer Zentren überlagert wird, wurden die <sup>1</sup>H-Spektren auf der Mitte der Hochfeldflanke des S<sub>2</sub>-MLS gemessen. Diese Feldstelle ist 45 mT vom EPR-Signal des Y<sub>D</sub><sup>•</sup> entfernt, so daß dessen Protonenkopplungen das <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum des S<sub>2</sub>-Zustand nicht überlagern.

In Abb. 8.1 ist das Q-Band-<sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum des S<sub>2</sub>-Zustands gezeigt. Das Signal erstreckt sich etwa ±7 MHz um die Protonlarmorfrequenz und zeigt mehrere Schultern. Die Ausdehnung des Spektrums und die breite Form mit mehreren Schultern ähneln dem von Aznar *et al.* [64] veröffentlichten X-Band-<sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum in PSII aus Spinat. Das Spektrum aus *Thermosynechococcus elongatus* zeigt jedoch eine größere Anzahl Schultern als in [64] sichtbar, auch die Positionen der Schultern sind gegenüber dem Spektrum des S<sub>2</sub>-Zustands aus Spinat verschoben. Ähnlich wie die EPR- und <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektren zeigt auch das <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum spezieabhängige Unterschiede.

Ein optimaler RF-Puls, also ein π-Puls, ist in dem verwendeten Resonator für <sup>1</sup>H deutlich länger als für <sup>55</sup>Mn. Die Echointensität am Ende der Davies-ENDOR-Sequenz ist aufgrund der relativ kurzen T<sub>1</sub>-Relaxation des S<sub>2</sub>-MLS jedoch begrenzt. Zudem zeigt das <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum nur wenig Auflösung. Um alle Strukturen und Schultern sicher bestimmen zu können, ist ein sehr gutes S/R notwendig. Dies ist hier nur über eine lange Akkumulationszeit von etwa 10 h je Spektrum zu erreichen.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Signale austauschbaren oder nicht austauschbaren Protonen zugeordnet werden können, wurde über 2 h ein Puffertausch gegen D<sub>2</sub>O-Puffer vorgenommen. Das <sup>2</sup>H-ENDOR-Spektrum des S<sub>2</sub>-Zustands in D<sub>2</sub>O-ausgetauschtem PSII ist im oberen Teil der Abb. 8.2 gezeigt. Da die Larmorfrequenz von <sup>2</sup>H um einen Faktor 6,5 kleiner als die von <sup>1</sup>H ist, sind die <sup>2</sup>H-Hyperfeinkopplungen um diesen Faktor skaliert und das Spektrum entsprechend schmaler. Um die kleinen Hyperfeinkopplungen empfindlich messen zu können, wurde eine Mims-ENDOR-Sequenz (vgl. Kap. 3.6.3) verwendet. Dabei wurde der Abstand τ so gewählt, daß das Spektrum nicht durch Mims-Löcher verfälscht wird. Auf dem <sup>2</sup>H-ENDOR-Spektrum ist kaum Struktur sichtbar, die Breite des Spektrums entspricht der skalierten Breite des <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrums. Auf der Tieffrequenzseite des <sup>2</sup>H-ENDOR-Spektrums ist eine breite Struktur im Bereich zwischen 5 MHz und 7,5 MHz sichtbar, die auch in nativem PSII detektiert wird. Wahrscheinlich handelt es hierbei um <sup>14</sup>N-ENDOR-Signale des S<sub>2</sub>-Zustands [71].

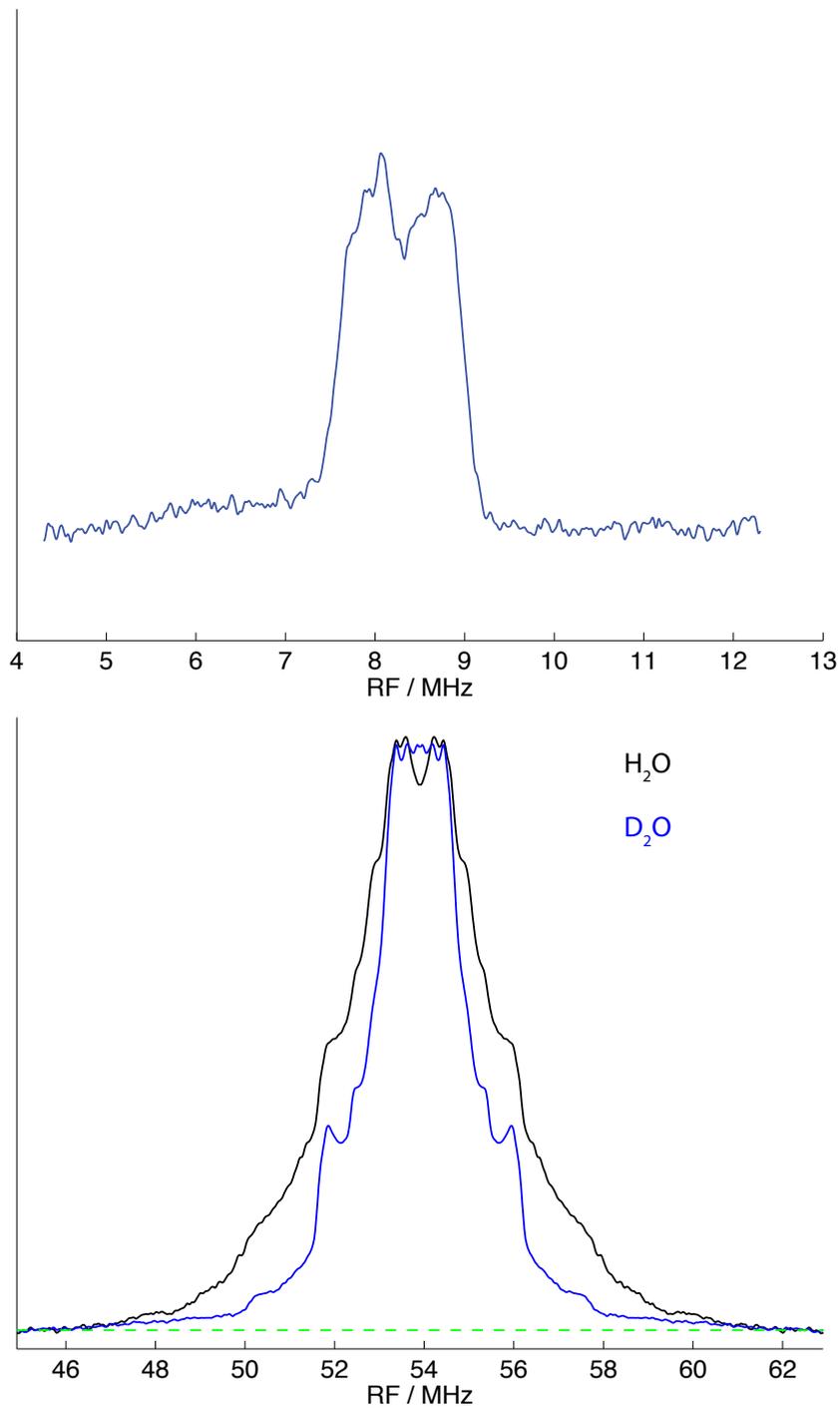
Im unteren Teil der Abb. 8.2 ist das <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum des S<sub>2</sub>-Zustands in D<sub>2</sub>O-



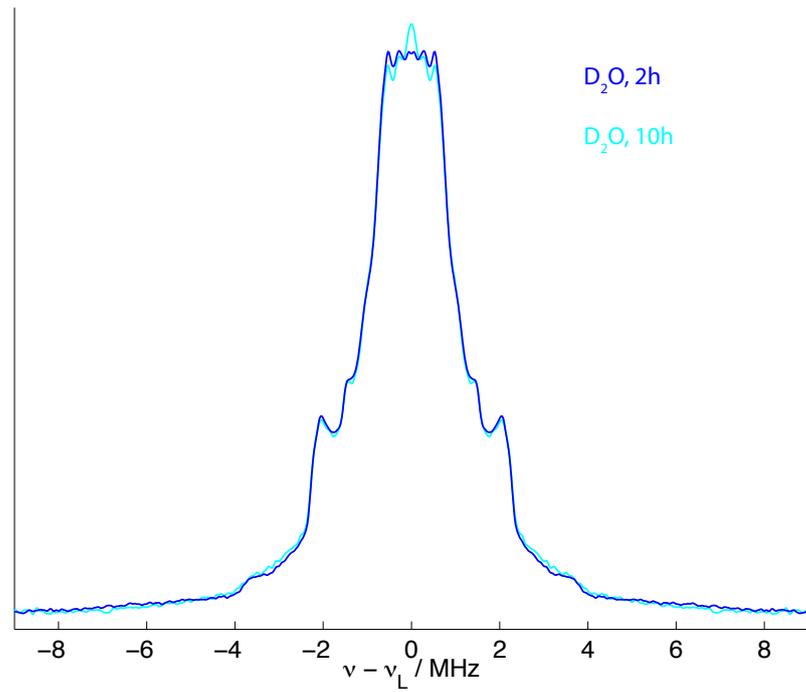
**Abbildung 8.1:** Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -Zustands. Experimentelle Parameter:  
 $B_0 = 1265 \text{ mT}$ ,  $f = 34,02 \text{ GHz}$ .

ausgetauschtem PSII im Vergleich zu dem des nativen Systems gezeigt. Die relativen Intensitäten einzelner Komponenten des Spektrums sind in den zwei Proben sehr unterschiedlich, alle Schultern des Spektrums des nativen Systems sind jedoch auch im  $\text{D}_2\text{O}$ -ausgetauschten PSII sichtbar. Auffällig ist, daß die in  $\text{D}_2\text{O}$ -PSII sichtbaren Schultern viel schmäler und definierter als im nativen System sind. Auf diese Unterschiede wird weiter unten genauer eingegangen. In PSII aus Spinat sind nach einem Puffertausch über eine Stunde nahezu alle  $^1\text{H}$ -Signale mit Ausnahme der Matrixregion verschwunden [62,64]. In PSII aus *Thermosynechococcus elongatus* ist dies nicht der Fall.

Auch nach einer Inkubation in  $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer über 10 h sind nicht alle sichtbaren Protonen ausgetauscht. In Abb. 8.3 sind die  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -Zustands in  $\text{D}_2\text{O}$ -ausgetauschtem PSII gezeigt, der Puffertausch erfolgte jeweils über 2 h beziehungsweise 10 h. Die Spektren sind sehr ähnlich, es gibt keine weiteren Verschiebungen relativer Intensitäten. Im Spektrum der über 10 h ausgetauschten Probe sind die sichtbaren Linien gegenüber der 2 h ausgetauschten Probe leicht verbreitert. Die Positionen der Linien und Schultern sind dabei in beiden Proben identisch.



**Abbildung 8.2:** Oben: Q-Band-<sup>2</sup>H-ENDOR-Spektrum des S<sub>2</sub>-Zustands in D<sub>2</sub>O-ausgetauschtem PSII. Das Spektrum wurde mit einer Mims-ENDOR-Sequenz aufgenommen (vgl. Kap 3.6.3). Unten: <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum des S<sub>2</sub>-Zustands in nativem PSII (schwarz) und D<sub>2</sub>O-ausgetauschtem PSII (blau). Experimentelle Parameter:  $B_0 = 1265$  mT,  $f = 33,96$  GHz.



**Abbildung 8.3:** Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -Zustands in  $\text{D}_2\text{O}$ -ausgetauschtem PSII. Die Inkubationszeit in  $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer betrug 2 h (blau) bzw. 10 h (hellblau). Die Spektren sind symmetrisiert und zentriert um die Protonlarmorfrequenz aufgetragen. Experimentelle Parameter:  $B_0 = 1265 \text{ mT}$ ,  $f = 33,96 \text{ GHz}$ .

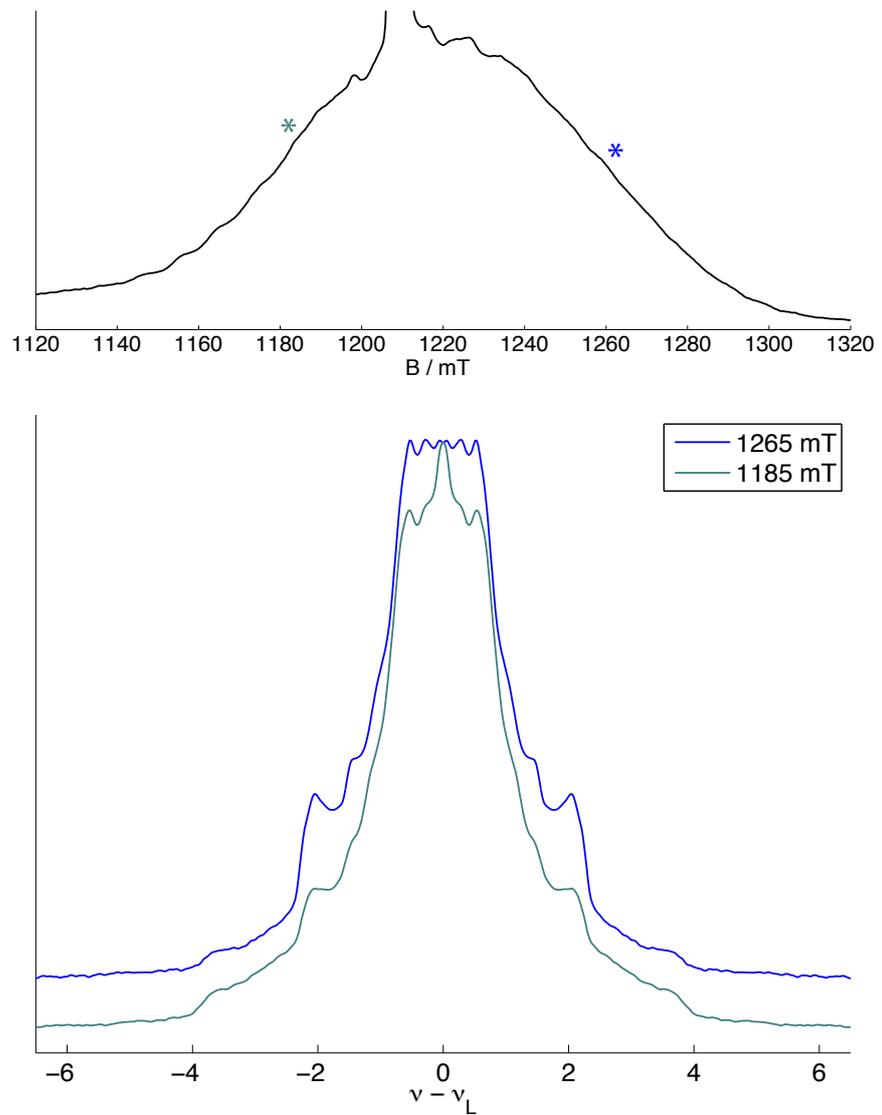
	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$	$A_5$	$A_6$
$A_{iso}$	0	0	0	0	-1,9	0,5
$T$	0,75	1,16	1,5	2,55	3,9	5,0
$\eta$	0	0	0	0,7	2,1	0

**Tabelle 8.1:** Parameter der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen. Alle Angaben sind in MHz. Fehler:  $\Delta A_{1,2,3,4} = \pm 0,05$  MHz,  $\Delta A_{5,6} = \pm 0,1$  MHz.

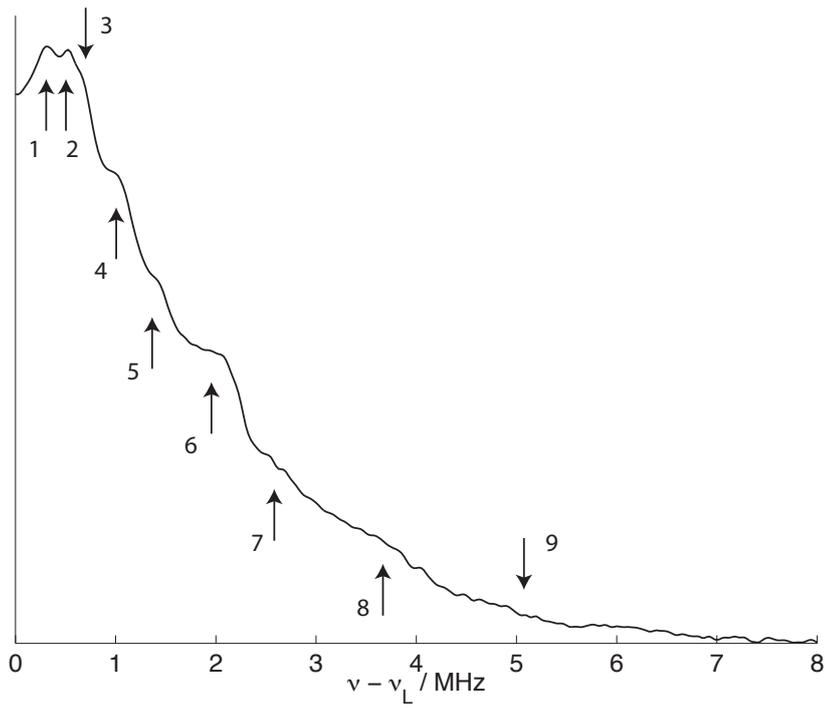
Durch die geringe  $g$ -Anisotropie des  $\text{S}_2$ -MLS im Q-Band ist keine Orientierungsselektion von  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen entlang einzelner  $g$ -Komponenten zu erwarten. In Abb. 8.4 ist das  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -Zustands an zwei Feldstellen gezeigt. Da die Protonarlarmorfrequenz für beide Feldstellen deutlich unterschiedlich ist, sind die Spektren um die entsprechende Larmorfrequenz korrigiert und ermöglichen einen direkten Vergleich der beobachteten Hyperfeinkopplungen. Die Anzahl und Position der in beiden Spektren sichtbaren Schultern und die Ausdehnung der Signale sind gleich. Nur die relativen Intensitäten dieser Merkmale unterscheiden sich leicht. Es werden also im  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrum alle Hyperfeinkopplungen vollständig beobachtet.

Die Analyse des  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrums konzentriert sich im Folgenden auf die Messung des  $\text{S}_2$ -Zustands in nativem PSII auf der Hochfeldflanke des  $\text{S}_2$ -MLS. In Abb. 8.5 ist eine Hälfte des  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrums gezeigt. Die Frequenzachse ist um die Protonarlarmorfrequenz korrigiert und die Schultern bzw. Plateaus des Spektrums sind markiert. Für die Analyse werden zunächst nur die kleinsten sichtbaren Hyperfeinkopplungen 1, 2 und 3 berücksichtigt. Die kleinen Kopplungen deuten darauf hin, daß die entsprechenden Protonen nicht in unmittelbarer Umgebung des Mn-Komplexes zu finden sind. Für diese Protonen ist daher mangels direktem Kontakt mit dem Elektronenspin keine isotrope Hyperfeinkopplung zu berücksichtigen. In erster Näherung kann den Schultern 1,2 und 3 daher jeweils eine Senkrechtkomponente einer dipolaren Hyperfeinkopplung zugeordnet werden. Die Simulation dieser drei Hyperfeinkopplungen  $A_{1,2,3}$  mit den in Tab. 8.1 gegebenen Parametern ist in Abb. 8.6 gezeigt.

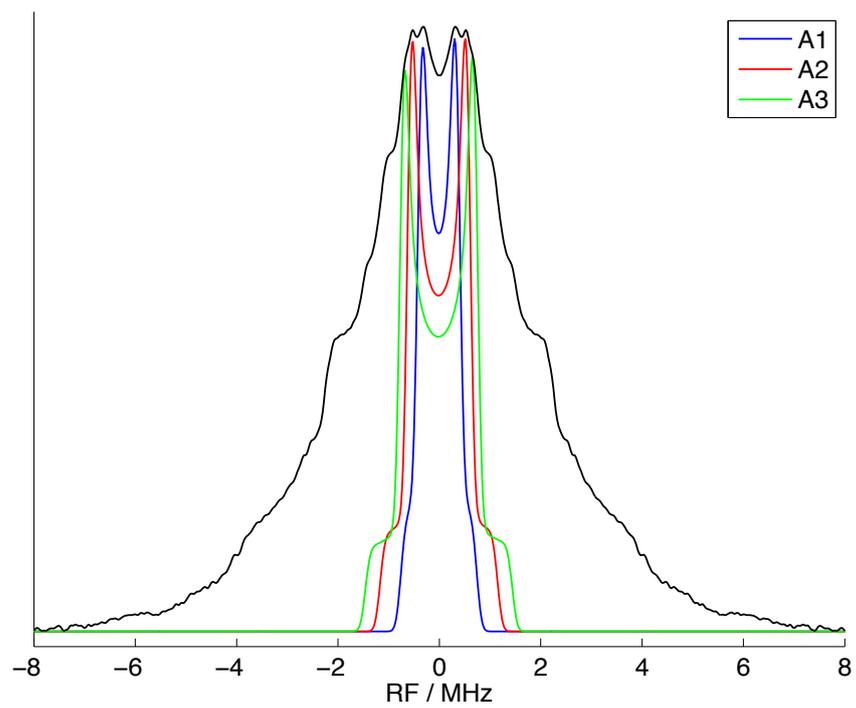
Prinzipiell kann auch für diese kleinen dipolaren Hyperfeinkopplungen ein rhombischer Anteil der Hyperfeinkopplung durch die Wechselwirkung mit mehr als einem Manganion nicht ausgeschlossen werden. Für die größere der drei Kopplungen  $A_3$  ergibt sich in der Näherung des Punkt-Dipol-Modells ein Abstand von etwa  $7 \text{ \AA}$  zwischen Proton und Elektronenspin, was nur wenig größer als die Ausdehnung des Mn-Komplexes von  $5,4 \text{ \AA}$



**Abbildung 8.4:** Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -Zustands in  $\text{D}_2\text{O}$ -ausgetauschtem PSII an zwei Feldstellen, 1265 mT in blau und 1185 mT in türkis. Das  $\text{S}_2$ -MLS ist darüber gezeigt, die Feldstellen sind mit einem Stern markiert. Die Spektren sind symmetrisiert und zentriert um die Protonlarmorfrequenz aufgetragen. Experimentelle Parameter:  $f = 33,96$  GHz.



**Abbildung 8.5:** Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -Zustands. Die einzelnen Schultern des Spektrums sind mit Pfeilen markiert. Experimentelle Parameter:  $B_0 = 1265$  mT,  $f = 34,02$  GHz.



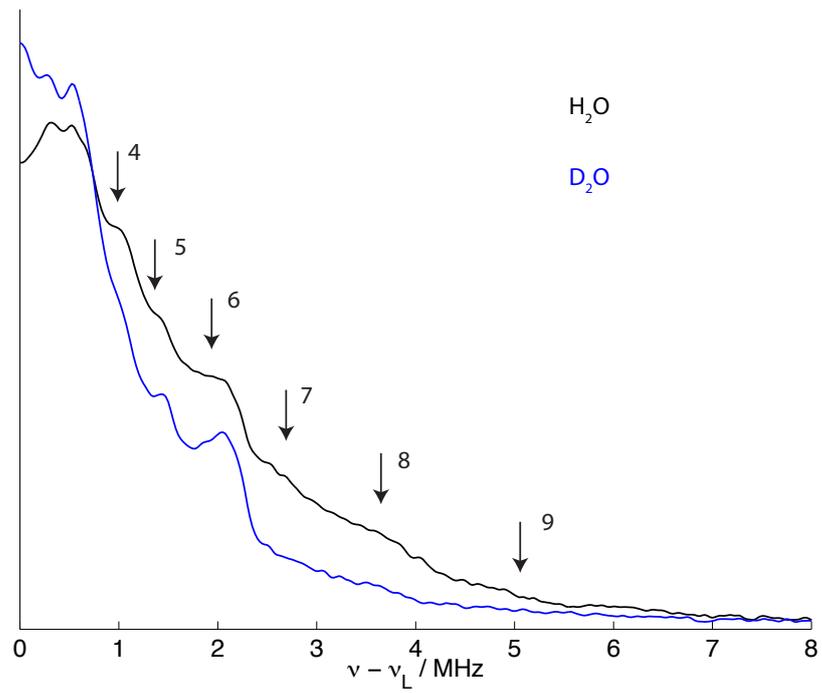
**Abbildung 8.6:** Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -Zustands. Die Simulation der drei kleinen  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen  $A_1$  (blau),  $A_2$  (rot) und  $A_3$  (grün) erfolgte mit den Parametern aus Tab. 8.1.

ist. Da die einzelnen Kopplungen kaum aufgelöst sind, ist eine Zuordnung der Schultern zu einzelnen Komponenten einer eventuell rhombischen Hyperfeinkopplung nicht möglich. Die drei Kopplungen  $A_{1-3}$  werden daher vereinfacht als dipolare Kopplungen betrachtet.

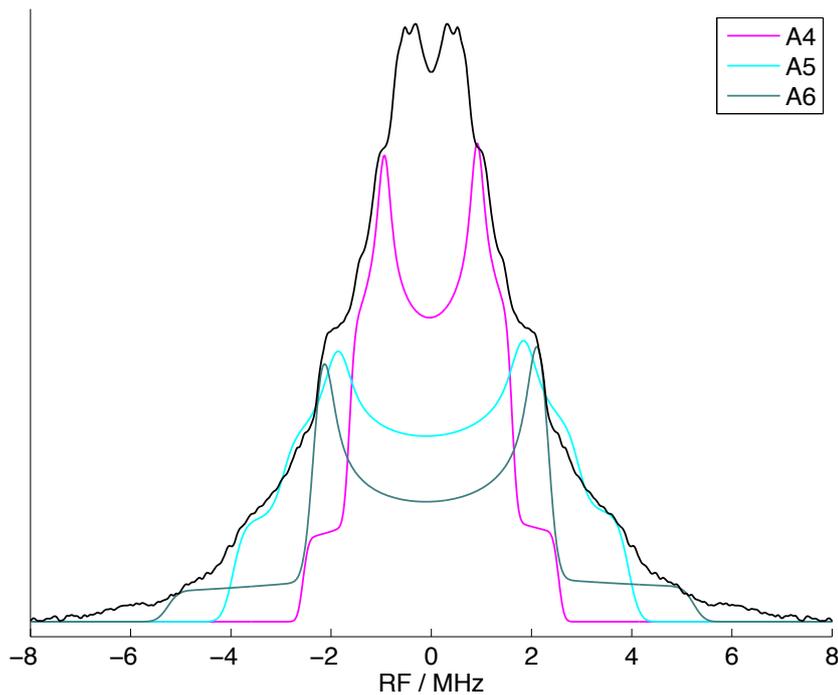
Der Vergleich zwischen nativem PSII und  $D_2O$ -ausgetauschtem PSII in Abb. 8.2 und 8.3 zeigt auch nach einem Austausch über 10 h keine Änderungen der relativen Intensitäten in dieser matrixnahen Region und auch die Signalintensität im Vergleich zu nativem PSII ist nicht um mehr als 33 % verringert. In Anbetracht dessen ist es diskussionswürdig, ob diese Protonen überhaupt austauschen. Falls es sich hier tatsächlich um nicht-austauschbare Protonen handelt, könnten die beobachteten und bereits simulierten Kopplungen zu fest gebundenen Protonen der den WOC ligandierenden Aminosäuren gehören. Für ligandierende Asparagin- bzw. Glutaminsäure können die fest gebundenen Protonen des Kohlenstoff  $C_\beta$  bzw.  $C_\gamma$  durchaus einen Abstand von etwa 6,5 Å bis 8 Å zum nächstgelegenen Manganion aufweisen und wären damit in einer Entfernung, die der Größenordnung der simulierten dipolaren Kopplungen  $A_{1-3}$  entspricht.

Die verbleibenden Schultern bzw. Plateaus 4-9 in Abb. 8.5 sind Komponenten größerer Hyperfeinkopplungen, die Protonen deutlich näher am Mn-Komplex zugeordnet werden können. Für diese Kopplungen kann sowohl ein rhombischer als auch isotroper Anteil möglich sein, je nach Bindungsort des jeweiligen Protons. Wie bereits erwähnt, findet man alle Schultern in den  $^1H$ -ENDOR-Spektren des nativen PSII sowie in PSII- $D_2O$ . Dabei sind jedoch relative Intensitäten und die Form der Signale in den beiden Spektren deutlich unterschiedlich. Folgt man der oben bereits angesprochenen Interpretation, daß im  $^1H$ -ENDOR-Spektrum des PSII- $D_2O$  nicht-austauschbare Protonen beobachtet werden, können die relativ scharfen und deutlich sichtbaren Signale im Bereich der Schultern 5 und 6 zwei weiteren fest gebundenen Protonen zugeordnet werden. Da diese nicht-austauschbaren Protonen für den Mechanismus der Wasserspaltung nicht relevant sind, wird hier auf eine Simulation dieser Kopplungen verzichtet. Stattdessen werden die in Abb. 8.7 deutlich sichtbaren Unterschiede zwischen dem  $^1H$ -ENDOR-Spektrum in PSII und  $D_2O$ -ausgetauschtem PSII als Anhaltspunkte für die Simulation der im folgenden besprochenen  $^1H$ -Hyperfeinkopplungen benutzt.

In Abb. 8.8 sind die Simulationen von drei weiteren Hyperfeinkopplungen gezeigt, die die Schultern des  $^1H$ -ENDOR-Spektrums gut reproduzieren. Die Simulationsparameter sind ebenfalls in Tab 8.1 aufgeführt. Für zwei dieser Kopplungen,  $A_{4,5}$ , wurde ein rhombischer Anteil der Hyperfeinkopplung bestimmt. Die zwei Kopplungen mit dem größten dipolaren Anteil,  $A_{5,6}$ , zeigen zudem eine isotrope Kopplung. Die Größe des dipolaren Anteils der Kopplung  $A_6$  wurde zusätzlich über die Breite des  $^2H$ -ENDOR-Spektrums



**Abbildung 8.7:** Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrum des  $\text{S}_2$ -Zustands in nativem PSII (schwarz) und  $\text{D}_2\text{O}$ -ausgetauschtem PSII (blau). Die einzelnen Schultern des Spektrums sind mit Pfeilen markiert. Experimentelle Parameter:  $B_0 = 1265$  mT,  $f_{\text{H}_2\text{O}} = 34,02$  GHz,  $f_{\text{D}_2\text{O}} = 33,96$  GHz.



**Abbildung 8.8:** Q-Band-<sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum des S<sub>2</sub>-Zustands. Die Simulation der drei großen <sup>1</sup>H-Hyperfeinkopplungen A<sub>4</sub> (magenta), A<sub>5</sub> (hellblau) und A<sub>6</sub> (türkis) erfolgte mit den Parametern aus Tab. 8.1.

abgeschätzt, da dieses im Gegensatz zum <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum eine gut definierte Abrißkante zeigt.

Die zwei intensiven Hauptkomponenten der Hyperfeinkopplung A<sub>4</sub> liegen dabei im Bereich der Schultern 4 und 5. Die Komponenten der Hyperfeinkopplung A<sub>5</sub> liegen im Bereich des „Lochs“ des Plateau Nr. 6 im Spektrum des D<sub>2</sub>O-ausgetauschten PSII, sowie der Schultern 7 und 8. Die größte Hyperfeinkopplung A<sub>6</sub> trägt ebenfalls im Plateaubereich Nr. 6 und im Bereich der Schulter Nr. 9 bei.

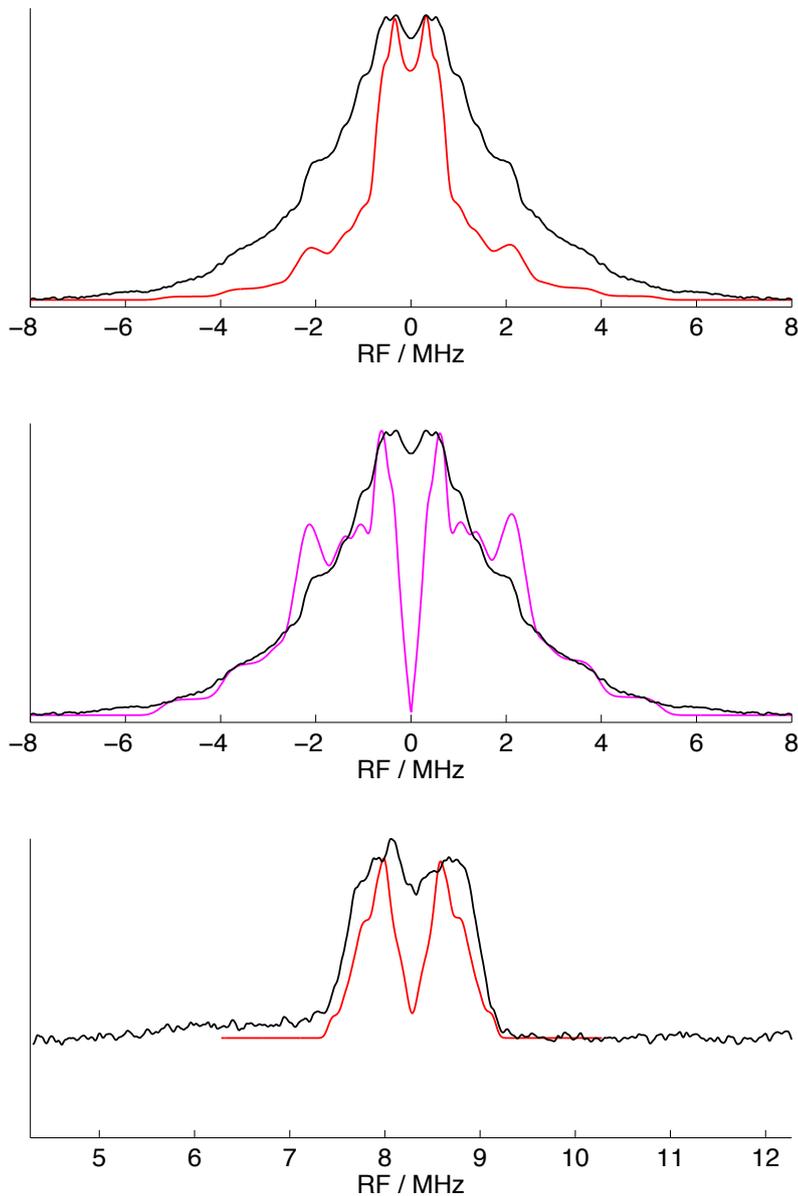
Die Simulation des <sup>1</sup>H- und <sup>2</sup>H-ENDOR-Spektrums unter Berücksichtigung aller sechs Hyperfeinkopplungen ist im oberen bzw. unteren Teil der Abb. 8.9 gezeigt. Die Breite des <sup>2</sup>H-ENDOR-Spektrums ist gut reproduziert, zusätzlich zeigt auch die Simulation nur wenige Schultern. Alle Merkmale des <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrums sind reproduziert. Die kleinen Kopplungen sind, da deutlich schmaler als die großen, in ihrer Intensität überschätzt. Falls, wie bereits diskutiert, das Spektrum aus mindestens zwei weiteren Kopplungen besteht, die zu nicht-austauschbaren Protonen gehören und in den <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektren

des D<sub>2</sub>O-ausgetauschten PSII gemessen werden, sind diese der Grund für die nicht gut reproduzierte Form des Spektrums.

Im mittleren Teil der Abb. 8.9 ist die Simulation (magenta) der sechs Kopplungen unter Berücksichtigung von Unterdrückungseffekten der Davies-ENDOR-Sequenz nach Gl. 3.31 [82] gezeigt. In dieser Darstellung ist die Qualität der Simulation hingegen gut, alle Schultern werden zufriedenstellend reproduziert und auch die Form des Spektrums wird in weiten Teilen relativ gut getroffen.

Im Folgenden, insbesondere für die Simulation und die Diskussion der Messungen in Kap. 8.3, werden die durch die Hyperfeinkopplungen  $A_{4,5,6}$  beschriebenen Protonen als austauschbar und den entsprechenden Bereich des <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrums vollständig beschreibend angesehen.

Für diese drei großen Hyperfeinkopplungen  $A_{4,5,6}$  kann aus dem dipolaren Anteil der Kopplung nicht einfach in Form der Punkt-Dipol-Näherung auf den Abstand der Protonen vom Mangankomplex geschlossen werden. Die Rhombizität und der isotrope Anteil dieser Kopplungen sind ein Indiz für die Nähe der Protonen zum Mangankomplex. Der dipolare und rhombische Anteil der ermittelten Hyperfeinkopplungen ist daher nach Gl. 3.25 eine Überlagerung der dipolaren Wechselwirkung des jeweiligen Protons mit mehreren Manganionen (vgl. Kap. 3.4.1). Eine weitergehende Diskussion dieser Kopplungen erfolgt in Kap. 8.3.



**Abbildung 8.9:** Oben: Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrum des  $S_2$ -Zustands. Die Simulation (rot) berücksichtigt alle sechs Hyperfeinkopplungen aus Tab. 8.1. Mitte: Die Simulation (magenta) der Hyperfeinkopplungen berücksichtigt Unterdrückungseffekte nach Gl. 3.31. Unten: Q-Band- $^2\text{H}$ -ENDOR-Spektrum des  $S_2$ -Zustands. Die Simulation (rot) des Mims-ENDOR-Spektrums berücksichtigt alle sechs Hyperfeinkopplungen aus Tab. 8.1, die Kopplungen sind entsprechend des Verhältnisses  $\nu_{Larmor}^H/\nu_{Larmor}^D$  skaliert. Zusätzlich wurde für alle  $^2\text{H}$ -Kerne ( $I = 1$ ) eine Quadrupolkopplung  $P = (-0,2, -0,2, 0,4)$  MHz berücksichtigt.

## 8.2 Q-Band-<sup>1</sup>H-ENDOR an PSII-Sr

In Kap. 7 wurden die magnetischen Parameter des Mn-Komplexes im S<sub>2</sub>-Zustand von in Sr-Medium gewachsenem PSII (PSII-Sr) charakterisiert. Dabei wurde in der Diskussion erläutert, daß die beobachteten Änderungen der Parameter gegenüber dem nativen System Schlüsse bezüglich der Funktion des Kalziumions für die Wasserspaltung zulassen. Dabei scheint die Rolle des Kalziumions keine strukturelle zu sein, da die Geometrie des WOC sich in PSII-Sr nur wenig ändert. Stattdessen scheint das Kalziumion eine funktionelle Komponente des WOC zu sein.

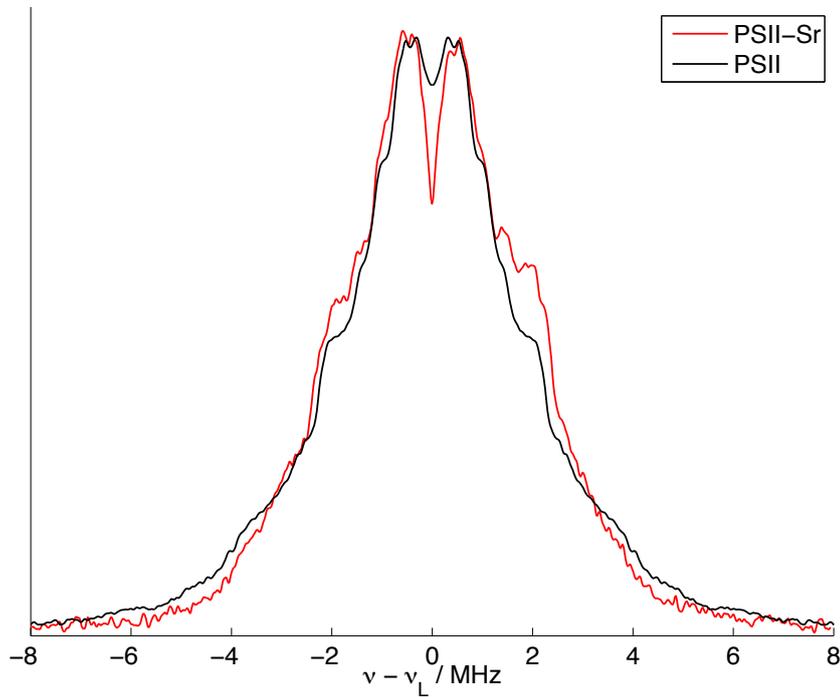
Wie bereits in Kap. 7 angesprochen, gibt es einige Hinweise, daß das Kalziumion wichtiger Bestandteil des Wasserstoffbrückennetzwerks in der Umgebung des WOC ist, welches durch das Strontiumion gestört wird.

In PSII-Sr ist der Austausch der Substratwasser deutlich verlangsamt [124]. Die Umwandlung des Zustands S<sub>3</sub>Y<sub>Z</sub><sup>•</sup> zu S<sub>0</sub> ist für PSII-Sr ebenfalls stark verlangsamt [125,127]. Die Verlangsamung dieses Schrittes in PSII-Sr wurde dabei einerseits mittels EPR-Spektroskopie [127], andererseits mittels zeitaufgelöster UV/Vis-Absorptionsspektroskopie [125] nachgewiesen. Die Interpretation dieser Daten legt nahe, daß das Kalzium eine wichtige Rolle für die Oxidation des Y<sub>Z</sub> durch das P<sub>680</sub><sup>+</sup> spielt. Diese Beobachtung wird durch ESEEM-Spektroskopie des EPR-Signals des S<sub>2</sub>Y<sub>Z</sub><sup>•</sup> gestützt [128]. Die in nativem PSII detektierten an das Y<sub>Z</sub> gekoppelten Protonensignale sind in PSII-Sr in ihrer Intensität stark reduziert.

In theoretischen Überlegungen [29] wird die Funktion des Kalziumions als eine Art „Wasserwächter“, der den Zugang von Substratwasser zum Mn-Komplex steuert, diskutiert. Diese Rolle wird auch von Fluoreszenz-Induktions-Kinetik-Messungen [129] angedeutet, die im Kalzium-freien PSII keine Sauerstoffproduktion jedoch trotzdem einen Elektronentransfer über die Membran detektierten.

Alle diese Untersuchungen zeigen die Bedeutung des Kalziumions für das Wasserstoffbrückennetzwerk und damit die Protonenumgebung des WOC. Um dieses in PSII-Sr näher zu untersuchen, wurde das <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum in PSII-Sr gemessen und in Abb. 8.10 mit dem des nativen Systems verglichen. Die relativen Intensitäten einzelner Schultern sind in den beiden Spektren leicht unterschiedlich. Diese Intensitätsunterschiede sind durch die Verwendung zweier unterschiedlicher RF-Verstärker für die beiden Spektren bedingt. Alle in diesem Kap. gezeigten <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektren außer dem Spektrum des PSII-Sr in Abb. 8.10 sind mit demselben Verstärker (siehe Kap. 4.2) aufgenommen. Dieser wurde vor der Messung des PSII-Sr beschädigt und konnte vor Fertigstellung die-

ser Arbeit nicht repariert werden. Die Positionen der aufgelösten Schultern sind jedoch in beiden Systemen gleich.



**Abbildung 8.10:** Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrum des  $S_2$ -Zustands in PSII-Sr (rot) und nativem PSII. Experimentelle Parameter:  $B_0 = 1265 \text{ mT}$ ,  $f = 34,02 \text{ GHz}$ ,  $B_{0,Sr} = 1251 \text{ mT}$ ,  $f_{Sr} = 33,84 \text{ GHz}$ .

Diese Messung zeigt, daß Umordnungen des Wasserstoffbrückennetzwerks durch den Ersatz des Kalziumions durch Strontium nicht in der unmittelbaren Umgebung des Mn-Komplexes detektierbar sind. Diese Änderungen müssen sich also eher in einem Bereich entfernt vom WOC, z.B. in Richtung des  $Y_Z$ , wie in Ref. [128] angedeutet, abspielen.

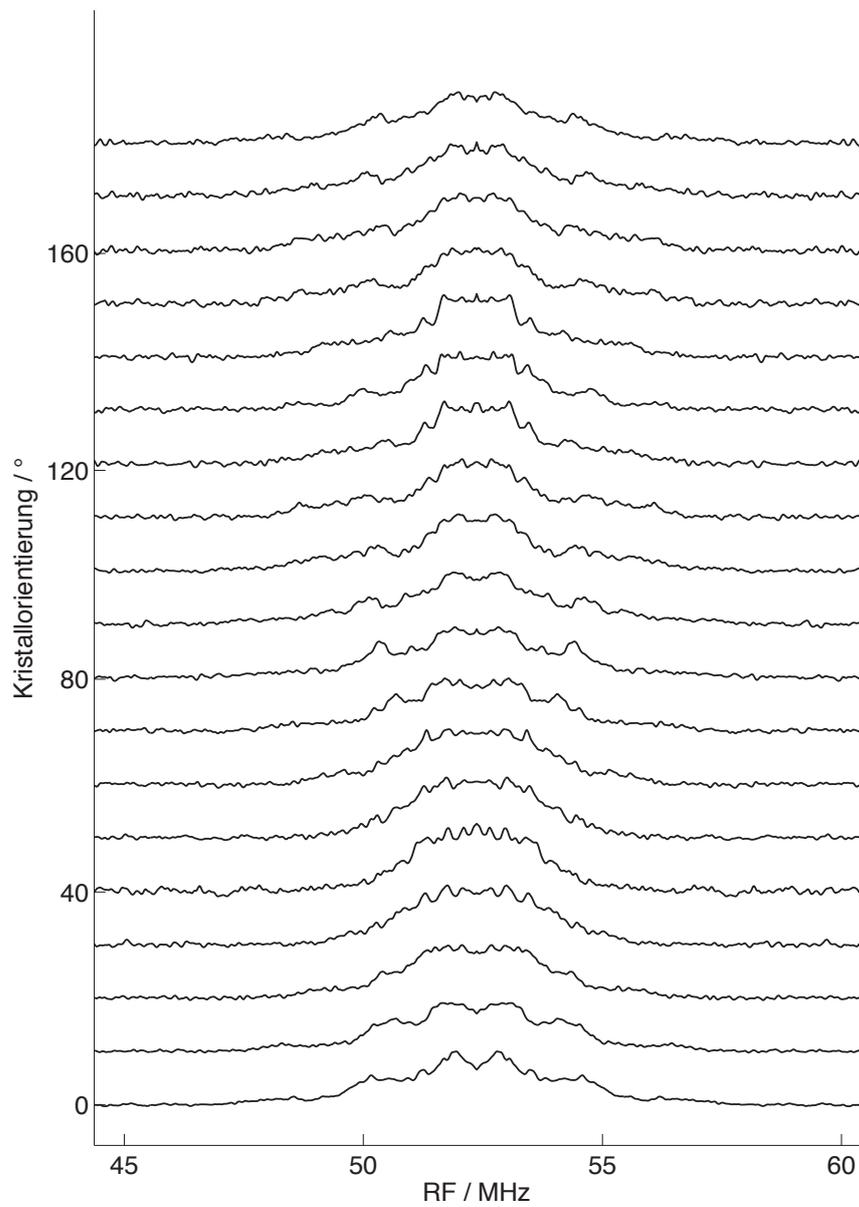
### 8.3 Q-Band-<sup>1</sup>H-ENDOR am PSII-Einkristall

Neben den in Kap. 6.3 vorgestellten <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Messungen am PSIIcc-Einkristall wurden an demselben Kristall für jede Orientierung auch <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektren gemessen. Jedes <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum wurde über etwa 12 h akkumuliert. Ähnlich wie die <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektren am Einkristall stellt auch die Aufnahme der <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektren extreme Anforderungen an den experimentellen Aufbau. Die <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektren sind zwar deutlich schmaler als die <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektren, für eine Auflösung aller Merkmale und Schultern ist aber eine deutlich höhere Punktdichte als in den <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektren mit ihren breiten Linien notwendig. Dadurch ist kein Gewinn an S/R aufgrund des schmaleren Spektrums möglich. Hinzu kommen die in Kap. 8.1 beschriebenen Schwierigkeiten bei der Messung der <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektren.

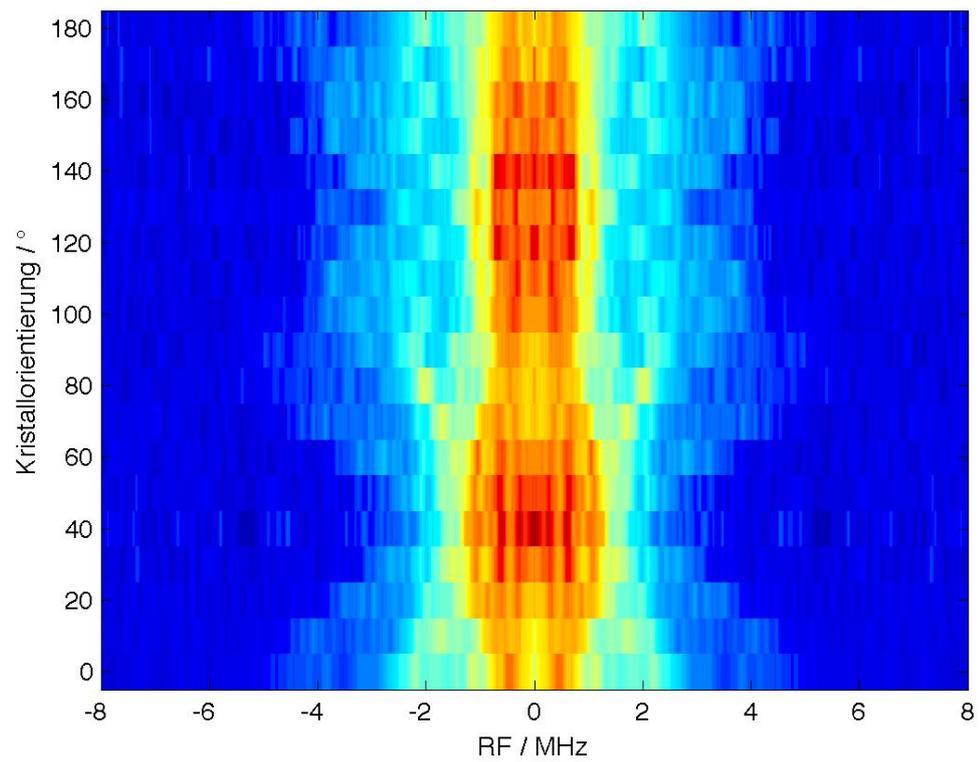
Die orientierungsabhängigen <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektren des S<sub>2</sub>-Zustands am PSIIcc-Einkristall sind in Abb. 8.11 gezeigt. Sowohl im Matrixbereich als auch in den Randbereichen der Spektren sind orientierungsabhängige Signale sichtbar. Die weit auslaufenden Schultern 7–9 des <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrums in Lösung (vgl. Abb. 8.5) sind aufgrund des geringen S/R nur schwer auszumachen. Die <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektren ähneln dem Lösungsspektrum in ihrer prinzipiellen Struktur einer breiten Linie mit einzelnen Schultern. In einigen Orientierungen, z. B. 80°, sind einzelne schmale Linien auszumachen, insgesamt genügt der Gewinn an Auflösung im Kristall aber nicht, alle Hyperfeinkopplungen einzeln in den Spektren zuzuordnen. Die breite Grundstruktur der Spektren ist durch die Zahl der überlagernden Linien bedingt. Jedes der acht Monomere der Einheitszelle zeigt ein Spektrum mit sechs Hyperfeinkopplungen, die Kristallspektren sind also die Summe der Überlagerung von 48 ENDOR-Linien.

Für die Darstellung der Orientierungsabhängigkeiten der <sup>1</sup>H-ENDOR-Linien bietet sich, ähnlich wie schon für die <sup>55</sup>Mn-ENDOR-Spektren am Einkristall, eine 2D-Konturdarstellung an, in der die ENDOR-Intensitäten farbkodiert sind. Abb. 8.12 zeigt die <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektren als Farbteppich, in dem einzelne Linienverläufe sehr gut erkennbar sind. Ausgehend von den größten <sup>1</sup>H-Hyperfeinkopplungen, deren Beiträge im Spektrum durch ihre Größe in bestimmten Bereichen eindeutig zugeordnet werden können, werden im Folgenden die Orientierungen der drei größten Hyperfeinkopplungen A<sub>4,5,6</sub> bestimmt. Wie später gezeigt wird, sind zwar orientierungsabhängige Verläufe in der Matrixregion sichtbar, eine Simulation dieser Kopplungen ist durch die Vielzahl der in diesem Bereich zusätzlich überlagernden Linien jedoch nicht möglich.

In der Konturdarstellung sieht man in den Orientierungen 0° und 80° bis 90° weit



**Abbildung 8.11:** Orientierungsabhängige Q-Band-<sup>1</sup>H-ENDOR-Spektren des S<sub>2</sub>-Zustands am PSII-Einkristall. Experimentelle Parameter:  $B_0 = 1230$  mT,  $f = 33,96$  GHz.



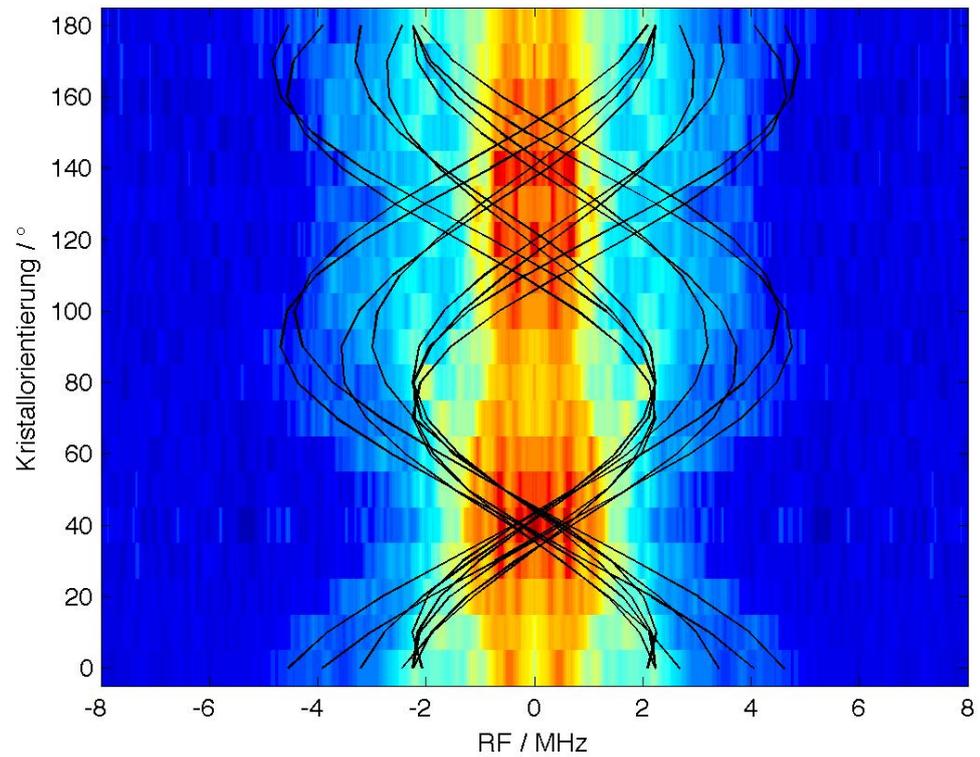
**Abbildung 8.12:** Orientierungsabhängige Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -Zustands am PSII-Einkristall in einer 2D-Konturdarstellung.

	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$	$A_5$	$A_6$
$A_{iso}$	0	0	0	0	-1,9	0,5
$T$	0,75	1,16	1,5	2,55	3,9	5,0
$\eta$	0	0	0	0,7	2,1	0
$\alpha$	-	-	-	0°	90°	0°
$\beta$	-	-	-	60°	120°	60°
$\gamma$	-	-	-	240°	150°	150°

**Tabelle 8.2:** Parameter der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen. Alle Kopplungen sind in MHz gegeben. Für die Kopplungen  $A_{4,5,6}$  sind die aus den orientierungsabhängigen  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektren am PSII-Einkristall bestimmten Orientierungen relativ zum Kristallachsensystem angegeben. Fehler:  $\Delta A_{1,2,3,4} = \pm 0,05$  MHz,  $\Delta A_{5,6} = \pm 0,1$  MHz,  $\Delta(\alpha, \beta, \gamma) = \pm 10^\circ$ .

auslaufende ENDOR-Intensität bis etwa  $\pm 4,5$  MHz. Der Verlauf dieser Intensität ist insbesondere in den Orientierungen  $0^\circ$  bis  $40^\circ$  von  $\pm 4,5$  MHz zu  $\pm 2$  MHz gut zu erkennen. In den Orientierungen  $40^\circ$  bis  $90^\circ$  läuft die Linie in umgekehrter Richtung von  $\pm 2$  MHz bis  $\pm 4,5$  MHz. Dieser Verlauf kann nur durch die größte  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplung  $A_6$  beschrieben werden. Dabei überstreichen diese ENDOR-Linien praktisch die gesamte Anisotropie der Kopplung  $A_6$ . Da diese Signale eindeutig zuzuordnen sind, wird zuerst die Orientierung dieser Kopplung simuliert. Da das S/R sehr gering ist und diese Linie in den  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektren in Abb. 8.11 kaum auszumachen ist, werden nur die orientierungsabhängigen Linienpositionen der acht Monomere der Einheitszelle mit der Konturdarstellung verglichen.

In Abb. 8.13 sind die ENDOR-Linien der größten  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplung mit den Parametern aus Tab. 8.2 simuliert. Dabei liegt das Augenmerk auf der Reproduktion der Verläufe von  $\pm 4,5$  MHz bis  $\pm 2$  MHz in den Orientierungen  $0^\circ$  bis  $30^\circ$ . Diese werden in Abb. 8.13 gut getroffen. In den Orientierungen  $60^\circ$  bis  $120^\circ$  wird der Bogenverlauf der Intensität mit maximaler Frequenz in der Orientierung  $90^\circ$  nur näherungsweise wiedergegeben. Eine der simulierten, bis  $\pm 4,5$  MHz auslaufenden, ENDOR-Linien hat ein Frequenzmaximum bei den beobachteten  $90^\circ$ , die andere hat eine etwa  $10^\circ$  verschobene Phase mit dem Frequenzmaximum in der Orientierung  $100^\circ$ . Insgesamt sind jedoch die bis  $\pm 4,5$  MHz auslaufenden Intensitätsbögen gut getroffen. Die ENDOR-Linien die nur bis etwa  $\pm 2$  MHz reichen, wurden bei der Bestimmung der Orientierung nicht berücksichtigt.



**Abbildung 8.13:** Orientierungsabhängige Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -Zustands am PSII-Einkristall in einer 2D-Konturdarstellung. In schwarz ist der orientierungsabhängige Verlauf der ENDOR-Linien der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplung  $A_6$  mit  $A_{iso} = 0,5$  MHz,  $A_{dip} = 5$  MHz und  $A_\eta = 0$  MHz in der Orientierung ( $0^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $150^\circ$ ) für alle acht Monomere der Einheitszelle eingezeichnet.

Bei Betrachtung der Konturdarstellung insbesondere in Abb. 8.12 fällt auf, daß in den Orientierungen  $100^\circ$  und  $110^\circ$  bei etwa  $\pm 3,5$  MHz eine weitere Intensitätsausbuchtung liegt. Dieses Frequenzmaximum ist gegenüber dem der Hyperfeinkopplung  $A_6$  zugeordneten um etwa  $10^\circ$  bis  $20^\circ$  verschoben. Ein ähnliches Bild zeigt sich in den Orientierungen  $150^\circ$  und  $160^\circ$ , auch hier gibt es ein Frequenzmaximum um  $\pm 3,5$  MHz. Dieser Intensitätsverlauf wird durch die Simulation der Kopplung  $A_6$  nicht getroffen. Aufgrund der Frequenzposition dieses Maximums bei etwa  $\pm 3,5$  MHz kann dieses Signal damit nur der Hyperfeinkopplung  $A_5$  zugeordnet werden.

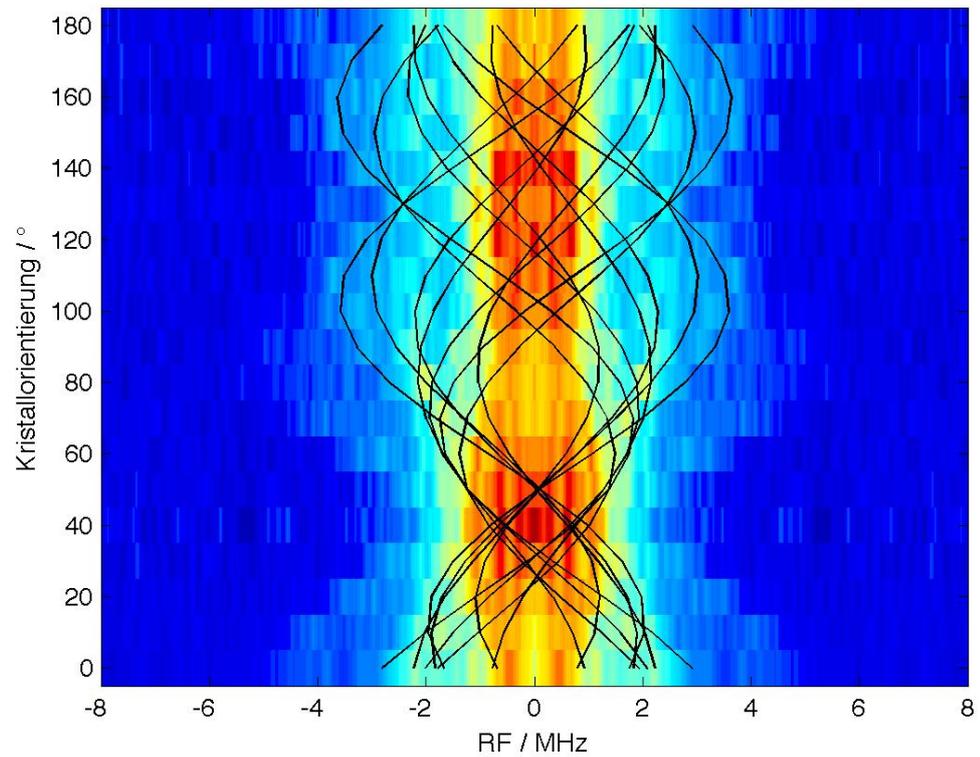
In Abb. 8.14 ist die Simulation der Linienpositionen der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplung  $A_5$  mit den Parametern aus Tab. 8.2 gezeigt. Die beschriebenen Verläufe werden von der gezeigten Simulation gut getroffen.

In Abb. 8.12 sind neben den bereits simulierten weit auslaufenden und steilen Bögen weitere Signalverläufe zu erkennen. Im mittleren Frequenzbereichbereich um  $\pm 2,5$  MHz sind relativ flache Verläufe in den Orientierungen  $0^\circ$  bis  $20^\circ$  von  $\pm 2,5$  MHz bis 1 MHz sichtbar, die in den Orientierungen  $50^\circ$  bis  $80^\circ$  in die entgegengesetzte Richtung laufen. Zusätzlich sind in den Orientierungen  $70^\circ$  bis  $110^\circ$  und  $140^\circ$  bis  $170^\circ$  flache Bögen mit einem Frequenzmaximum um  $\pm 2,5$  MHz sichtbar. Die bisher simulierten Linien liegen zum Teil etwa parallel zu den Verläufen in den Orientierungen  $0^\circ$  bis  $20^\circ$  und  $50^\circ$  bis  $80^\circ$ . Die beschriebenen flachen Bögen werden jedoch nicht gut getroffen. Diese Verläufe können also der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplung  $A_4$  zugeordnet werden.

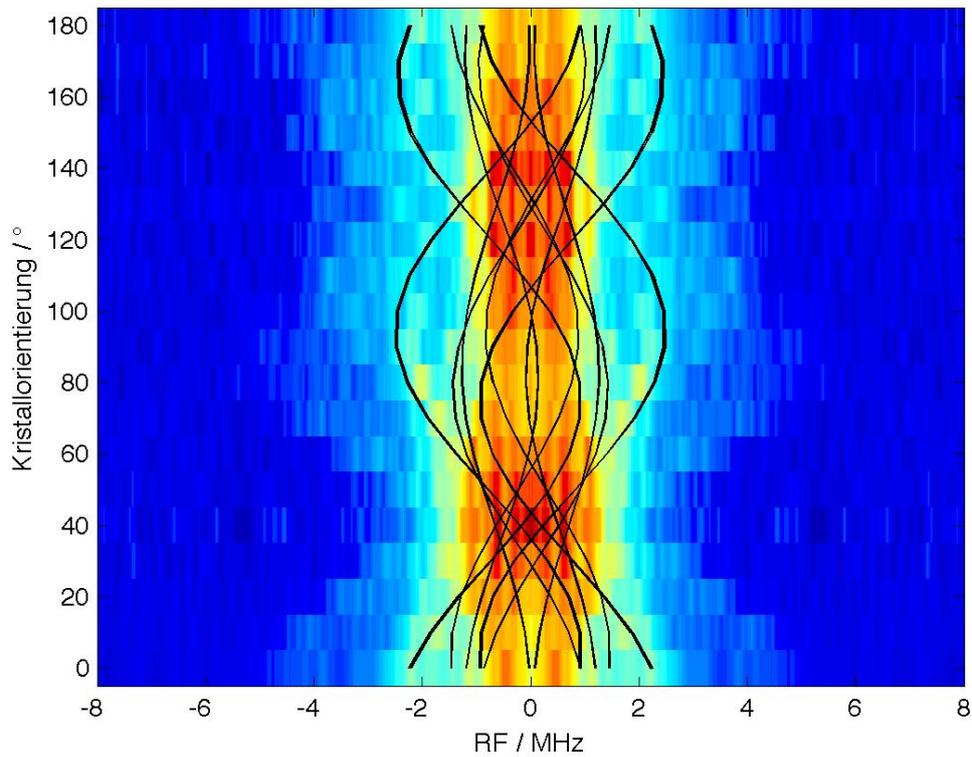
Die Simulation der ENDOR-Linien der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplung  $A_4$  mit den Parametern aus Tab. 8.2 ist in Abb. 8.15 gezeigt. Die beschriebenen sehr intensiven flachen Verläufe und Bögen sind gut abgebildet.

Die Simulation der Linienpositionen der drei vollständig charakterisierten  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen  $A_{4,5,6}$  ist in Abb. 8.16 gezeigt. Alle Intensitätsverläufe im Frequenzbereich  $> |2|$  MHz sind durch die Simulation gut reproduziert. Die Struktur der Matrixregion ist insbesondere durch die drei verbleibenden Kopplungen bestimmt. Da in diesem Bereich jedoch auch die Kreuzungspunkte der drei großen Hyperfeinkopplungen liegen, ist eine Bestimmung der Orientierungen der drei kleinen Hyperfeinkopplungen schwierig und kaum eindeutig möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher nur die durch ihre Größe gut identifizierbaren  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen  $A_{4,5,6}$  vollständig parametrisiert.

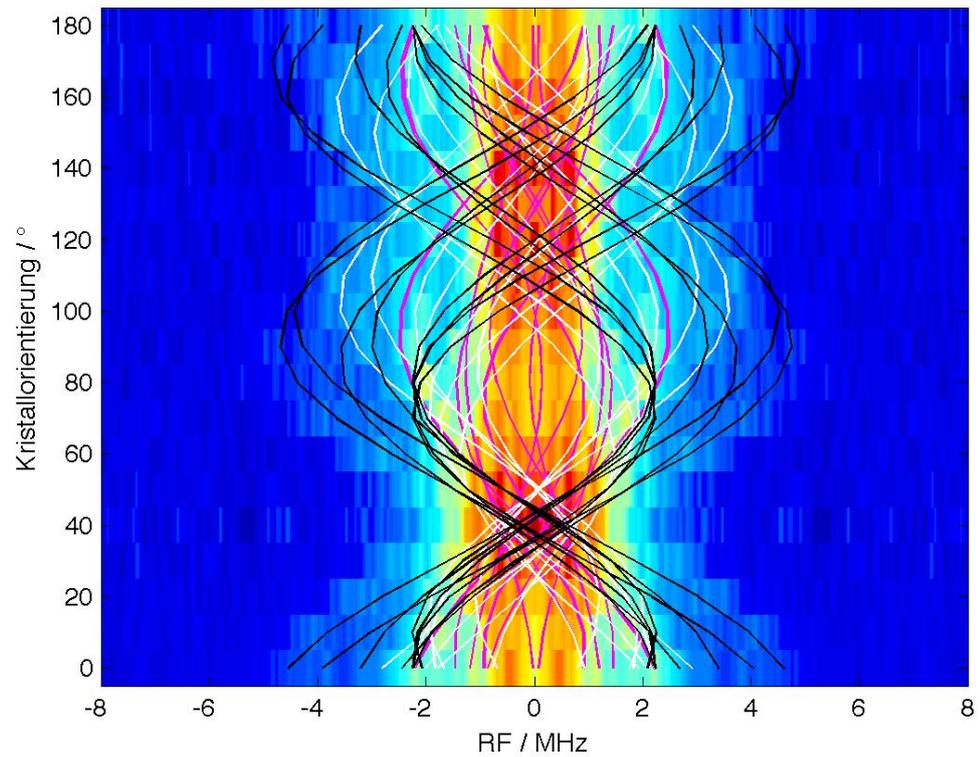
Die hier vorgestellten  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektren in Lösung und am PSII-Einkristall zeigen eine bisher nicht erreichte Qualität und Auflösung. Die hier bestimmten Hyperfeinparameter, insbesondere die Orientierungen der größten drei Kopplungen bieten damit eine wichtige Grundlage für weitergehende Analysen zur geometrischen Anordnung der Pro-



**Abbildung 8.14:** Orientierungsabhängige Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektren des  $\text{S}_2$ -Zustands am PSII-Einkristall in einer 2D-Konturdarstellung. In schwarz ist der orientierungsabhängige Verlauf der ENDOR-Linien der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplung  $A_5$  mit  $A_{iso} = -1,9$  MHz,  $A_{dip} = 3,9$  MHz und  $A_\eta = 2,1$  MHz in der Orientierung ( $90^\circ$ ,  $120^\circ$ ,  $150^\circ$ ) für alle acht Monomere der Einheitszelle eingezeichnet.



**Abbildung 8.15:** Orientierungsabhängige Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektren des  $S_2$ -Zustands am PSII-Einkristall in einer 2D-Konturdarstellung. In schwarz ist der orientierungsabhängige Verlauf der ENDOR-Linien der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplung  $A_4$  mit  $A_{iso} = 0$  MHz,  $A_{dip} = 2,55$  MHz und  $A_\eta = 0,7$  MHz in der Orientierung ( $0^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $240^\circ$ ) für alle acht Monomere der Einheitszelle eingezeichnet.



**Abbildung 8.16:** Orientierungsabhängige Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektren des  $S_2$ -Zustands am PSII-Einkristall in einer 2D-Konturdarstellung. Der orientierungsabhängige Verlauf der ENDOR-Linien der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen  $A_4$  (magenta),  $A_5$  (weiß) und  $A_6$  (schwarz) für alle acht Monomere der Einheitszelle ist eingezeichnet, die Simulationsparameter sind in Tab. 8.2 aufgeführt.

tonen bezüglich des Mn-Komplexes und eventuelle Ligandierung des WOC durch Substratwasser.

## 8.4 Diskussion

Wie in Kap. 3.4.1 erläutert, ist für die an einen mehrkernigen Metallkomplex koppelnden Protonen keine einfache Interpretation der Hyperfeinkopplungen möglich. Weder kann über den dipolaren Anteil einfach auf einen Abstand des Protons geschlossen werden, noch zeigt die z-Achse der Hyperfeinkopplung direkt in Richtung des Ortes des Elektronenspins. Die Erweiterung des Punkt-Dipol-Modells von Fiege *et al.* [62] ermöglicht eine graphische Analyse der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen eines zweikernigen Mn-Komplexes. Im Fall des Mn-Komplexes ist eine Reduktion auf ein zweikerniges System für die Interpretation jedoch nicht gut möglich.

In der neuesten Röntgenstruktur des PSII sind vier Sauerstoffatome in der Umgebung des Mn-Komplexes aufgelöst. Diese sind potentielle Wasserliganden W1–W4 (vgl. Abb. 2.4) des Mn-Komplexes, deren Protonierungszustand jedoch unbekannt ist. Zwei dieser Wasser, W3 und W4 haben zu jedem der vier Manganionen einen vergleichbaren Abstand im Bereich von 4 Å bis 5,5 Å für W3 und von 5 Å bis 6 Å für W4. Das Wasser W2 hat zu drei Manganionen einen Abstand im Bereich von 5 Å bis 6,5 Å, der Abstand zum vierten Manganion ist hingegen mit etwa 2 Å deutlich kürzer. Das Wasser W1 hat zu jeweils zwei Manganionen einen vergleichbaren Abstand, einmal liegt ein Mn-Pärchen in einer Entfernung um 7 Å, das andere um 3 Å. Damit wird deutlich, daß nur das Wasser W1 in einer vereinfachten zweikernigen Kopplungssituation betrachtet werden könnte. Für die anderen Liganden ist ein vergleichbarer Anteil aller Manganionen an der effektiven Hyperfeinkopplung zu erwarten.

Nach Gl. 3.25 und 3.27 gehen in die Berechnung der effektiven  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplung die Koordinaten der Manganionen sowie ihre Spinprojektionsfaktoren ein. Um aus den gemessenen effektiven Hyperfeinkopplungen Rückschlüsse auf die Geometrie des Protons gegenüber dem Mn-Komplex ziehen zu können, muß also ein Modell der elektronischen und geometrischen Struktur des Mn-Komplexes zu Grunde gelegt werden.

Die Mn-Mn-Abstände in der Kristallstruktur des PSII [1] sind im Vergleich zu den aus EXAFS-Messungen bestimmten zu groß. Aus den Untersuchungen von Yano *et al.* [2] ist bekannt, daß während der Röntgenspektroskopie die Manganionen zu  $\text{Mn}^{2+}$  reduziert werden. Dieser Prozeß der Strahlenschädigung kann dementsprechend zu längeren Mn-O-Bindungen und in Konsequenz zu längeren Mn-Mn-Abständen führen. Die Kristall-

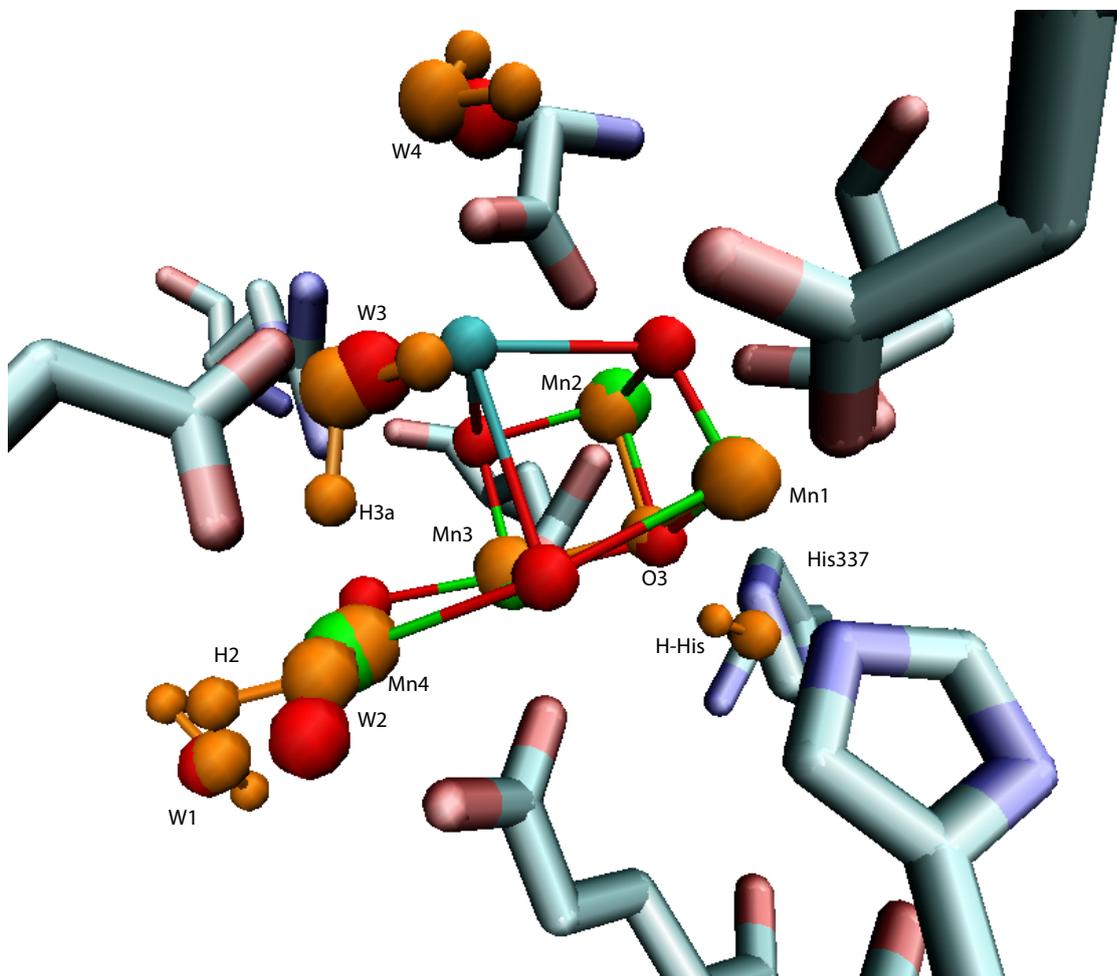
struktur bietet also nur ein bedingt geeignetes geometrisches Modell des Mn-Komplexes für die Analyse der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen.

Seit der Veröffentlichung der neuesten hochaufgelösten Kristallstruktur von PSII [1], sind mehrere theoretische Studien zur Protonierung des Mn-Komplexes auf Basis der neuen Röntgenstruktur von Umena *et al.* erschienen [113,114,126]. Dabei konzentriert sich die Veröffentlichung von Ames *et al.* [113] auf die Struktur des WOC im  $S_2$ -Zustand und untersucht verschiedene Protonierungsmodelle auf ihre Kompatibilität mit veröffentlichten magnetischen Parametern des  $S_2$ -Zustands. Ein Hauptkriterium für ein gutes Strukturmodell ist zum einen der Grundzustand mit  $S = 1/2$  sowie  $^{55}\text{Mn}$ -Hyperfeinkopplungen im Bereich veröffentlichter Parametersätze. In der von Ames *et al.* [113] vorgeschlagenen Modellstruktur des WOC im  $S_2$ -Zustand (Modell 1d2') wird das Manganion mit dem Oxidationszustand (III) auf dem Mn1 platziert und die Jahn-Teller-Achse dieses Mn(III) liegt in Richtung der Karboxylatbrücke des Asp342. Diese Zuordnung wurde experimentell im Kap. 6.3 ermittelt. Auch die jeweils zweizählige Ligandierung der Aminosäuren Glu333 und Glu354, die ebenfalls aus den experimentellen  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren abgeleitet wurde, ist in diesem Modell korrekt wiedergegeben. Ein Kritikpunkt des Modells ist die Tatsache, daß das Mn1 zwar den Oxidationszustand (III) zugewiesen bekommt, jedoch nicht die größte effektive Hyperfeinkopplung zeigt. Trotz dieses Nachteils kann das Strukturmodell 1d2' als das bisher realistischste Modell für den WOC im  $S_2$ -Zustand betrachtet werden.

Die Bedeutung der in diesem Kapitel charakterisierten  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen des WOC im  $S_2$ -Zustand für die Entwicklung realistischer Strukturmodelle soll hier im Folgenden am Beispiel des Modells 1d2' von Ames *et al.* demonstriert werden. In Abb. 8.17 ist die Röntgenstruktur nach [1] mit dem Modell 1d2' von Ames *et al.* [113] überlagert.

Für das Modell 1d2' wurden die effektiven Hyperfeinkopplungen der acht in der Umgebung des Mn-Komplexes postulierten Protonen mit der gegebenen Geometrie des Mn-Komplexes sowie den aus DFT-Rechnungen bestimmten Spinprojektionsfaktoren nach Gl. 3.25 und 3.27 berechnet. Im Modell sind die Wasserliganden W1, W3 und W4 zweifach protoniert, das Wasser W2 nur einfach. Zusätzlich ist das His337 protoniert und bildet über dieses Proton eine Wasserstoffbrücke zum Sauerstoffatom O3 des Mn-Komplexes. Für drei dieser acht Protonen werden dipolare und rhombische Hyperfeinparameter berechnet, die den drei größten experimentell gefundenen  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen  $A_{4,5,6}$  vergleichbar sind (siehe Tab. 8.3).

Die Hyperfeinkopplungen der ausgewählten Protonen des Modells stimmen gut mit den experimentellen Werten überein. So wird der große rhombische Anteil der Hyper-



**Abbildung 8.17:** Struktur des WOC nach [1]. In orange ist das Modell 1d2' nach [113] überlagert. Die Bezeichnung folgt der aus [1], die Bezeichnung der drei Protonen H2, H3a, H-His folgt der hier im Text und Tab. 8.3 verwendeten Nomenklatur.

	$H_{3a}$	$A_4$	$H_{His}$	$A_5$	$H_2$	$A_6$
$T$	2,6	2,55	3,3	3,9	4,2	5,0
$\eta$	0,8	0,7	2,0	2,1	0,2	0
$\alpha$	132°	0°	-158°	90°	12°	0°
$\beta$	28°	60°	37°	120°	59°	60°
$\gamma$	-164°	240°	-178°	150°	128°	150°

**Tabelle 8.3:** Parameter der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen  $H_{3a}$ ,  $H_{His}$  und  $H_2$  aus dem Model 1d2' von Ames *et al.* [113] im Vergleich mit den drei größten  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen  $A_{4,5,6}$  aus Tab. 8.2. Alle Kopplungen sind in MHz gegeben.

feinkopplung  $A_5$  durch das Proton  $H_{His}$  gut getroffen. Die Kopplung  $A_5$  ist in Kap. 8.1 zusätzlich mit einem vergleichsweise großen isotropen Kopplungsanteil (vgl. Tab. 8.2) simuliert worden. Die Position des Proton  $H_{His}$  im Modell 1d2' als Wasserstoffbrückenligand an das O3 des Mn-Komplexes schließt dabei einen isotropen Anteil der Kopplung vermittelt über Spindichte auf dem O3 als verbindendes Sauerstoffion der drei Mangankerne Mn1, Mn2, Mn3 nicht aus.

Eine weitergehende Beurteilung der Qualität des Modells ermöglichen die experimentell bestimmten Orientierungen der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen. Dabei stellt sich heraus, daß die Orientierung des Protons  $H_{His}$  weit von der experimentell bestimmten der Kopplung  $A_5$  abweicht. Die  $z$ -Achsen dieser beiden Kopplungen stehen quasi senkrecht aufeinander, das Modell ist an dieser Stelle nicht mit der experimentell beobachteten Struktur in Einklang zu bringen.

Für das Proton  $H_{3a}$  und die Kopplung  $A_4$  ist die Übereinstimmung der Orientierungen nicht sehr gut, die  $z$ -Achsen der beiden Kopplungen sind etwa 40° gegeneinander verkippt. In Anbetracht der Tatsache, daß das Modell nur über einen Abgleich der  $^{55}\text{Mn}$ -Hyperfeinkopplungen mit experimentellen Daten ausgewählt wurde, ist die Tendenz zur Übereinstimmung der postulierten Protonen mit den hier experimentell bestimmten  $^1\text{H}$ -Hyperfeinparametern relativ gut. Insbesondere ist zu berücksichtigen, daß die beiden Protonen  $H_{His}$  und  $H_{3a}$  zu mindestens drei Manganionen einen vergleichbaren Abstand haben. Kleinere Ungenauigkeiten in der berechneten Geometrie bzw. den Spinprojektionsfaktoren können zu den diskutierten Unterschieden in den Orientierungen der postulierten und experimentellen Kopplungen führen.

Die Übereinstimmung der Parameter des Protons  $H_2$  mit denen der experimentellen Kopplung  $A_6$  ist hingegen sowohl für die Hyperfeinwerte als auch die Orientierungen, die nur etwa  $18^\circ$  gegeneinander verkippt sind, ausgezeichnet. Das Proton  $H_2$  ist im Modell 1d2' ein  $\text{OH}^-$ -Ligand an das  $\text{Mn}4$ . Die Simulation der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplung  $A_6$  in Kap. 8.1 erforderte zusätzlich einen kleinen isotropen Kopplungsanteil (vgl. Tab. 8.2). Da das W2 im Modell 1d2' ein direkter Ligand des  $\text{Mn}4$  ist, ist auch hier die Möglichkeit eines isotropen Kopplungsanteil für das Proton  $H_2$  nicht ausgeschlossen.

Aus dem Vergleich der experimentellen Hyperfeinkopplungen mit den aus dem Modell 1d2' von Ames *et al.* berechneten Kopplungen ergibt sich, daß für die theoretische geometrische und elektronische Struktur des WOC zwei der postulierten Protonen eine sehr gute ( $H_2$ ) bzw. akzeptable ( $H_{3a}$ ) Übereinstimmung mit dem Experiment zeigen. Für ein drittes Proton  $H_{His}$  findet sich zwar eine Übereinstimmung der Hyperfeinparameter, jedoch weicht die Orientierung stark von der experimentell bestimmten ab. Auch in einer zweiten theoretischen Studie [126] wurde das His337 protoniert. An dieser Stelle ist eine weitere Verfeinerung der Modellstrukturen also notwendig. Im Bereich des Protons  $H_2$  hingegen ist die Struktur des Modells bereits plausibel.

Diese Diskussion zeigt die Möglichkeiten für die weitere Entwicklung von Modellstrukturen und der darauf aufbauenden Möglichkeit verschiedene Reaktionsmechanismen auf ihre Plausibilität zu überprüfen, die sich mit den in dieser Arbeit gefundenen Parametersätzen der  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen ergeben.



# Kapitel 9

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der WOC des PSII aus *Thermosynechococcus elongatus* im  $S_2$ -Zustand mittels Multifrequenz-EPR-Methoden untersucht. Über die Charakterisierung der magnetischen Parameter des Mn-Komplexes konnten Korrelationen zwischen elektronischer und geometrischer Struktur aufgezeigt werden.

Dabei wurden zunächst die Vorteile und Möglichkeiten von Multifrequenz-EPR-Methoden bei der Charakterisierung der magnetischen Parameter von mehrkernigen Mn-Komplexen am Beispiel des Mn(III)Mn(IV)-Zustands in Mn-Katalase demonstriert. Aus aufgelösten orientierungsselektiven Q- und W-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren konnten die Hyperfein- und Quadrupolkopplungen des Systems sowie deren Orientierungen relativ zur  $\mathbf{g}$ -Matrix, die durch W-Band-EPR bestimmt wurde, ermittelt werden. Die Orientierung und Axialität der Hyperfeinkopplungen des Mn(III) und Mn(IV) konnten im Folgenden mit dem Strukturmotiv der zweizähnigen Ligandierung der beiden Manganionen senkrecht zur Mn-O<sub>2</sub>-Mn-Ebene korreliert werden.

Die an der Mn-Katalase erprobten Methoden wurden dann auf den vierkernigen Mn-Komplex des PSII im  $S_2$ -Zustand übertragen. Die Simulation der Multifrequenz- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Messungen erlaubte die Bestimmung der Hyperfeinparameter des WOC. Im Gegensatz zu den ENDOR-Spektren der Mn-Katalase sind die Signale des WOC aufgrund der Komplexität des Systems sehr viel breiter und unstrukturierter. Die geringe Orientierungsselektivität der ENDOR-Spektren erlaubt hier keine Bestimmung der Orientierungen der Hyperfeinkopplungen aus den Lösungsspektren. Diese konnten jedoch mittels orientierungsabhängiger Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektroskopie am PSII-Einkristall ermittelt werden. Die Übertragung des in der Mn-Katalase gefundenen Strukturmotivs der Karboxylatligandierung auf den Mn-Komplex ergab eine Zuordnung der einzelnen Hyperfeinkopplungen zu Positionen in der Röntgenkristallstruktur. Darüberhinaus konnte auf Grundlage der in Mn-Katalase gefundenen Eigenschaften der Hyperfeinkopp-

lungen abhängig vom Oxidationszustand das Mn(III) im WOC identifiziert werden. Für drei Aminosäureliganden wurde weiterhin eine zweizählige Ligandierung an jeweils zwei Manganionen des Komplexes postuliert.

Multifrequenz-EPR- und  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Messungen des  $S_2$ -Zustands von in Strontium-Medium gewachsenem PSII untersuchten den Einfluß des Ca/Sr-Ersatzes auf den Mn-Komplex. Aus W-Band-EPR-Messungen konnte erstmals die  $g$ -Matrix des  $S_2$ -Zustands in PSII-Sr mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Daneben wurden die Hyperfeinparameter des Systems aus Multifrequenz- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektroskopie ermittelt. Die Unterschiede der magnetischen Parameter zwischen nativem PSII und PSII-Sr lassen sich als nur kleine strukturelle Umordnungen des Mn-Komplexes aufgrund des Ersatzes von Kalzium durch Strontium interpretieren. Insbesondere deuten die feldabhängigen Q-Band- $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR-Spektren darauf hin, daß die Orientierungen der Hyperfeinkopplungen in PSII-Sr gleich denen im nativen System sind. Daraus läßt sich schließen, daß durch den Ca/Sr-Ersatz keine Umstrukturierung der Ligandenumgebung des WOC im  $S_2$ -Zustand stattfindet.

Die Protonenumgebung des WOC im  $S_2$ -Zustand wurde mittels Q-Band- $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektroskopie erkundet. Es wurden sechs  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen identifiziert und charakterisiert. Aus orientierungsabhängigen  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektren am PSII-Einkristall konnten die Orientierungen der drei größten  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen simuliert werden. Die hier bestimmten magnetischen Parameter können nun als Maßstab für die Bewertung von theoretischen Strukturmodellen des WOC im  $S_2$ -Zustand herangezogen werden. Diese Möglichkeit ist an einem veröffentlichten detaillierten Strukturmodell, welches die magnetischen Parameter der Manganionen vergleichsweise gut reproduziert, demonstriert worden. Auf Basis dieses Modells wurde eine Zuordnung einer der charakterisierten  $^1\text{H}$ -Hyperfeinkopplungen zu einer geometrischen Position postuliert.

Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte umfassende Charakterisierung der magnetischen Parameter des WOC im  $S_2$ -Zustand in PSII aus *Thermosynechococcus elongatus* kann in Zukunft als Maßstab für die Bewertung theoretischer Strukturmodelle des WOC im  $S_2$ -Zustand dienen. Über die Auswahl realistischer Strukturmodelle bietet sich die Möglichkeit der Entwicklung eines detaillierten Modells des Reaktionsmechanismus der Wasserspaltung. Eine Übertragung der verwendeten Methoden auf den ebenfalls mit einem Spin  $S = 1/2$  paramagnetischen  $S_0$ -Zustand könnte dabei einen weiteren Satz magnetischer Parameter des WOC liefern und im Abgleich mit Modellen eine weitere Verfeinerung der Modelle des Reaktionsmechanismus eröffnen.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>A, A</b>	Hyperfeinkopplung
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosinriphosphat
$B_0$	äußeres Magnetfeld
$B_1$	Magnetfeld des Mikrowellenpulses
Chl	Chlorophyll
<b>D, D</b>	Nullfeldwechselwirkung
EPR	Elektron-Paramagnetische Resonanz
cw-EPR	( continuous wave), gibt das FSE-Spektrum in erster Ableitung
ENDOR	Elektron-Kern-Doppelresonanz von englisch „electron nuclear double resonance“
EXAFS	Röntgenabsorptionsspektroskopie ( extended X-ray absorption fine structure)
FSE	EPR-Absorptionsspektrum ( Field Swept Echo)
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
$g_e$	$g$ -Wert des freien Elektrons, 2.0023193043737(82)
Glu	Glutaminsäure
His	Histidin
$I$	Kernspin
$J$	Austauschkopplung
$\mu_B$	Bohrsches Magneton, $9.27400899(37) \times 10^{-24} \text{JT}^{-1}$

$\mu_N$	Kernmagneton, $5.05078317(20) \times 10^{-27} \text{JT}^{-1}$
MLS	EPR-Signal des $S_2$ -Zustands ( multiline signal)
Mn	Mangan
MW	Mikrowelle
<b>P</b> , $P$	Quadrupolkopplung
Pheo	Pheophytin
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PSIIcc	Kernkomplex-Präparation des PSII
$Q_{A,B}$	Plastochinon
Q-Band	Mikrowellenfrequenzband um 34 GHz
RF	Radiofrequenz
$S$	Elektronenspin
srt	Schußwiederholrate ( shot repetition time)
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis ( signal to noise ratio)
ST	Störungstheorie
Tyr	Tyrosin
W-Band	Mikrowellenfrequenzband um 94 GHz
WOC	Wasseroxidierender Komplex ( water oxidising complex)
XANES	Röntgenabsorptionsspektroskopie ( X-ray absorption near-edge structure spectroscopy)
X-Band	Mikrowellenfrequenzband um 9.7 GHz
$Y_D^\bullet$	stabiles Tyrosinradikal in PSII

# Literaturverzeichnis

- [1] Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen and N. Kamiya. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 angstrom. *Nature*, 473(7345):55–U65, 2011.
- [2] J. Yano, J. Kern, K. D. Irrgang, M. J. Latimer, U. Bergmann, P. Glatzel, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, K. Sauer, J. Messinger, A. Zouni and V. K. Yachandra. X-ray damage to the Mn<sub>4</sub>Ca complex in single crystals of photosystem II: A case study for metalloprotein crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34):12047–12052, 2005.
- [3] A. Boussac, F. Rappaport, P. Carrier, J. M. Verbavatz, R. Gobin, D. Kirilovsky, A. W. Rutherford and M. Sugiura. Biosynthetic Ca<sup>2+</sup>/Sr<sup>2+</sup> exchange in the photosystem II oxygen-evolving enzyme of *Thermosynechococcus elongatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(22):22809–22819, 2004.
- [4] L. Stryer. *Biochemistry*. W.H. Freeman, 1995.
- [5] N. Nelson and A. Ben-Shem. The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10):818–818, 2005.
- [6] C. W. Mullineaux. The thylakoid membranes of cyanobacteria: structure, dynamics and function. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26(7):671–677, 1999.
- [7] J. Barber. Photosynthetic energy conversion: natural and artificial. *Chemical Society Reviews*, 38(1):185–196, 2009.
- [8] C. Buchel and W. Kuhlbrandt. Structural differences in the inner part of Photosystem II between higher plants and cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 85(1):3–13, 2005.
- [9] T. M. Bricker, J. L. Roose, R. D. Fagerlund, L. K. Frankel and J. J. Eaton-Rye. The extrinsic proteins of Photosystem II. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1817(1):121–142, 2012.
- [10] B. Kok, B. Forbush and M. McGloin. Cooperation of Charges In Photosynthetic O<sub>2</sub> Evolution .1. A Linear 4step Mechanism. *Photochemistry and Photobiology*, 11(6):457–

475, 1970.

- [11] G. W. Brudvig, J. L. Casey and K. Sauer. The Effect of Temperature On the Formation and Decay of the Multiline Electron-paramagnetic-resonance Signal Species Associated With Photosynthetic Oxygen Evolution. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 723(3):366–371, 1983.
- [12] F. Reifarth and G. Renger. Indirect evidence for structural changes coupled with  $Q_B^\bullet$  formation in photosystem II. *Febs Letters*, 428(3):123–126, 1998.
- [13] C. Fufezan, C. X. Zhang, A. Krieger-Liszky and A. W. Rutherford. Secondary quinone in photosystem II of *Thermosynechococcus elongatus*: Semicinone-iron EPR signals and temperature dependence of electron transfer. *Biochemistry*, 44(38):12780–12789, 2005.
- [14] A. Zouni, H. T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger and P. Orth. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 angstrom resolution. *Nature*, 409(6821):739–743, 2001.
- [15] V. K. Yachandra, K. Sauer and M. P. Klein. Manganese cluster in photosynthesis: Where plants oxidize water to dioxygen. *Chemical Reviews*, 96(7):2927–2950, 1996.
- [16] S. G. Zech, J. Kurreck, G. Renger, W. Lubitz and R. Bittl. Determination of the distance between  $Y_Z^\bullet$  and  $Q_A^\bullet$  in photosystem II by pulsed EPR spectroscopy on light-induced radical pairs. *Febs Letters*, 442(1):79–82, 1999.
- [17] M. Haumann, C. Muller, P. Liebisch, L. Iuzzolino, J. Dittmer, M. Grabolle, T. Neisius, W. Meyer-Klaucke and H. Dau. Structural and oxidation state changes of the photosystem II manganese complex in four transitions of the water oxidation cycle ( $S_0 \rightarrow S_1$ ,  $S_1 \rightarrow S_2$ ,  $S_2 \rightarrow S_3$ , and  $S_3, S_4 \rightarrow S_0$ ) Characterized by X-ray absorption spectroscopy at 20 K and room temperature. *Biochemistry*, 44(6):1894–1908, 2005.
- [18] J. Yano, J. Kern, Y. Pushkar, K. Sauer, P. Glatzel, U. Bergmann, J. Messinger, A. Zouni and V. K. Yachandra. High-resolution structure of the photosynthetic Mn<sub>4</sub>Ca catalyst from X-ray spectroscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-biological Sciences*, 363(1494):1139–1147, 2008.
- [19] A. Grundmeier and H. Dau. Structural models of the manganese complex of photosystem II and mechanistic implications. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1817(1):88–105, 2012.
- [20] T. Okubo and T. Noguchi. Selective detection of the structural changes upon photoreactions of several redox cofactors in photosystem II by means of light-induced

- ATR-FTIR difference spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A-molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 66(4-5):863–868, 2007.
- [21] R. J. Debus. Protein ligation of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Coordination Chemistry Reviews*, 252(3-4):244–258, 2008.
- [22] R. D. Britt, J. M. Peloquin and K. A. Campbell. Pulsed and parallel-polarization EPR characterization of the photosystem II oxygen-evolving complex. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29:463–495, 2000.
- [23] J. M. Peloquin and R. D. Britt. EPR/ENDOR characterization of the physical and electronic structure of the OEC Mn cluster. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1503(1-2):96–111, 2001.
- [24] R. D. Britt, K. A. Campbell, J. M. Peloquin, M. L. Gilchrist, C. P. Aznar, M. M. Dicus, J. Robblee and J. Messinger. Recent pulsed EPR studies of the Photosystem II oxygen-evolving complex: implications as to water oxidation mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1655(1-3):158–171, 2004.
- [25] I. L. McConnell. Substrate water binding and oxidation in photosystem II. *Photosynthesis Research*, 98(1-3):261–276, 2008.
- [26] P. E. M. Siegbahn. Recent theoretical studies of water oxidation in photosystem II. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology*, 104(1-2):94–99, 2011.
- [27] G. Renger. Light induced oxidative water splitting in photosynthesis: Energetics, kinetics and mechanism. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology*, 104(1-2):35–43, 2011.
- [28] P. Gatt, R. Stranger and R. J. Pace. Application of computational chemistry to understanding the structure and mechanism of the Mn catalytic site in photosystem II - A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology*, 104(1-2):80–93, 2011.
- [29] F. M. Ho. Structural and mechanistic investigations of photosystem II through computational methods. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1817(1):106–120, 2012.
- [30] D. Shevela, V. Klimov and J. Messinger. Interactions of photosystem II with bicarbonate, formate and acetate. *Photosynthesis Research*, 94(2-3):247–264, 2007.
- [31] F. M. Ho and S. Styring. Access channels and methanol binding site to the CaMn<sub>4</sub> cluster in Photosystem II based on solvent accessibility simulations, with implications for substrate water access. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1777(2):140–

153, 2008.

- [32] V. K. Yachandra and J. Yano. Calcium in the oxygen-evolving complex: Structural and mechanistic role determined by X-ray spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology*, 104(1-2):51–59, 2011.
- [33] G. C. Dismukes and Y. Siderer. Epr Spectroscopic Observations of A Manganese Center Associated With Water Oxidation In Spinach-chloroplasts. *Febs Letters*, 121(1):78–80, 1980.
- [34] R. D. Britt, G. A. Lorigan, K. Sauer, M. P. Klein and J. L. Zimmermann. The  $g = 2$  Multiline Epr Signal of the  $S_2$  State of the Photosynthetic Oxygen-evolving Complex Originates From A Ground Spin State. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1140(1):95–101, 1992.
- [35] J. L. Casey and K. Sauer. Electron-paramagnetic-resonance Detection of A Cryogenically Photogenerated Intermediate In Photosynthetic Oxygen Evolution. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 767(1):21–28, 1984.
- [36] O. Hansson, R. Aasa and T. Vanngard. The Origin of the Multiline and  $G = 4.1$  Electron-paramagnetic Resonance Signals From the Oxygen-evolving System of Photosystem-II. *Biophysical Journal*, 51(5):825–832, 1987.
- [37] A. Boussac, S. Un, O. Horner and A. W. Rutherford. High-spin states ( $S \geq 5/2$ ) of the photosystem II manganese complex. *Biochemistry*, 37(12):4001–4007, 1998.
- [38] J. M. Peloquin, K. A. Campbell and R. D. Britt. Mn-55 pulsed ENDOR demonstrates that the Photosystem II "split" EPR signal arises from a magnetically-coupled mangano-tyrosyl complex. *Journal of the American Chemical Society*, 120(27):6840–6841, 1998.
- [39] K. A. Ahrling and R. J. Pace. Simulation of the  $S_2$  State Multiline Electron-paramagnetic-resonance Signal of Photosystem-II - A Multifrequency Approach. *Biophysical Journal*, 68(5):2081–2090, 1995.
- [40] M. Zheng and G. C. Dismukes. Orbital configuration of the valence electrons, ligand field symmetry, and manganese oxidation states of the photosynthetic water oxidizing complex: Analysis of the  $S_2$  state multiline EPR signals. *Inorganic Chemistry*, 35(11):3307–3319, 1996.
- [41] K. Hasegawa, M. Kusunoki, Y. Inoue and T. A. Ono. Simulation of  $S_2$ -state multiline EPR signal in oriented photosystem II membranes: Structural implications for the manganese cluster in an oxygen-evolving complex. *Biochemistry*, 37(26):9457–9465,

1998.

- [42] M. F. Charlot, A. Boussac and G. Blondin. Towards a spin coupling model for the Mn-4 cluster in photosystem II. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1708(1):120–132, 2005.
- [43] D. W. Randall, B. E. Sturgeon, J. A. Ball, G. A. Lorigan, M. K. Chan, M. P. Klein, W. H. Armstrong and R. D. Britt. Mn-55 ESR of A Mixed-valence Mn(III)Mn(IV) Complex - Comparison With the Mn Cluster of the Photosynthetic Oxygen-evolving Complex. *Journal of the American Chemical Society*, 117(47):11780–11789, 1995.
- [44] J. M. Peloquin, K. A. Campbell, D. W. Randall, M. A. Evanchik, V. L. Pecoraro, W. H. Armstrong and R. D. Britt. Mn-55 ENDOR of the S<sub>2</sub>-state multiline EPR signal of photosystem II: Implications on the structure of the tetranuclear Mn cluster. *Journal of the American Chemical Society*, 122(44):10926–10942, 2000.
- [45] L. V. Kulik, B. Epel, W. Lubitz and J. Messinger. Electronic structure of the Mn<sub>4</sub>O<sub>x</sub>Ca cluster in the S<sub>0</sub> and S<sub>2</sub> states of the oxygen-evolving complex of photosystem II based on pulse Mn-55-ENDOR and EPR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 129(44):13421–13435, 2007.
- [46] A. Boussac, H. Kuhl, E. Ghibaudi, M. Rogner and A. W. Rutherford. Detection of an electron paramagnetic resonance signal in the S<sub>0</sub> state of the manganese complex of photosystem II from *Synechococcus elongatus*. *Biochemistry*, 38(37):11942–11948, 1999.
- [47] S. Pudollek, F. Lendzian and R. Bittl. Mn-55-ENDOR of the S<sub>2</sub>-state multiline signal of Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochemical Society Transactions*, 36:1001–1004, 2008.
- [48] J.-H. Su, N. Cox, W. Ames, D. A. Pantazis, L. Rapatskiy, T. Lohmiller, L. V. Kulik, P. Dorlet, A. W. Rutherford, F. Neese, A. Boussac, W. Lubitz and J. Messinger. The electronic structures of the S<sub>2</sub> states of the oxygen-evolving complexes of photosystem II in plants and cyanobacteria in the presence and absence of methanol. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1807(7):829–840, 2011.
- [49] A. Boussac, H. Kuhl, S. Un, M. Rogner and A. W. Rutherford. Effect of near-infrared light on the S<sub>2</sub>-state of the manganese complex of photosystem II from *Synechococcus elongatus*. *Biochemistry*, 37(25):8995–9000, 1998.
- [50] A. Boussac and A. W. Rutherford. Comparative study of the  $g = 4.1$  EPR signals in the S<sub>2</sub> state of photosystem II. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1457(3):145–156, 2000.

- [51] A. Boussac, M. Sugiura, D. Kirilovsky and A. W. Rutherford. Near-infrared-induced transitions in the manganese cluster of photosystem II: Action spectra for the S<sub>2</sub> and S<sub>3</sub> redox states. *Plant and Cell Physiology*, 46(6):837–842, 2005.
- [52] A. Boussac, J. L. Zimmermann and A. W. Rutherford. Epr Signals From Modified Charge Accumulation States of the Oxygen Evolving Enzyme In Ca<sup>2+</sup>-deficient Photosystem-II. *Biochemistry*, 28(23):8984–8989, 1989.
- [53] N. Cox, L. Rapatskiy, J.-H. Su, D. A. Pantazis, M. Sugiura, L. Kulik, P. Dorlet, A. W. Rutherford, F. Neese, A. Boussac, W. Lubitz and J. Messinger. Effect of Ca<sup>2+</sup>/Sr<sup>2+</sup> Substitution on the Electronic Structure of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II: A Combined Multifrequency EPR, <sup>55</sup>Mn-ENDOR, and DFT Study of the S<sub>2</sub> State. *Journal of the American Chemical Society*, 133(10):3635–3648, 2011.
- [54] D. Koulougliotis, R. H. Schweitzer and G. W. Brudvig. The tetranuclear manganese cluster in photosystem II. Location and magnetic properties of the S<sub>2</sub> state as determined by saturation-recovery EPR spectroscopy. *Biochemistry*, 36(32):9735–9746, 1997.
- [55] Z. Deak, S. Peterson, P. Geijer, K. A. Ahrling and S. Styring. Methanol modification of the electron paramagnetic resonance signals from the S<sub>0</sub> and S<sub>2</sub> states of the water-oxidizing complex of Photosystem II. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1412(3):240–249, 1999.
- [56] W. F. Beck and G. W. Brudvig. Binding of Amines To the O<sub>2</sub>-evolving Center of Photosystem-ii. *Biochemistry*, 25(21):6479–6486, 1986.
- [57] R. D. Britt, J. L. Zimmermann, K. Sauer and M. P. Klein. The State of Manganese In the Photosynthetic Apparatus .10. Ammonia Binds To the Catalytic Mn of the Oxygen-evolving Complex of Photosystem-II - Evidence By Electron-spin Echo Envelope Modulation Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 111(10):3522–3532, 1989.
- [58] D. A. Force, D. W. Randall, G. A. Lorigan, K. L. Clemens and R. D. Britt. ESEEM studies of alcohol binding to the manganese cluster of the oxygen evolving complex of Photosystem II. *Journal of the American Chemical Society*, 120(51):13321–13333, 1998.
- [59] K. L. Clemens, D. A. Force and R. D. Britt. Acetate binding at the photosystem II oxygen evolving complex: An S<sub>2</sub>-state multiline signal ESEEM study. *Journal of the American Chemical Society*, 124(36):10921–10933, 2002.
- [60] K. A. Ahrling, M. C. W. Evans, J. H. A. Nugent, R. J. Ball and R. J. Pace. ESEEM

- studies of substrate water and small alcohol binding to the oxygen-evolving complex of photosystem II during functional turnover. *Biochemistry*, 45(23):7069–7082, 2006.
- [61] X. S. Tang, M. Sivaraja and G. C. Dismukes. Protein and Substrate Coordination To the Manganese Cluster In the Photosynthetic Water Oxidizing Complex - N-15 and H-1 Endor Spectroscopy of the S<sub>2</sub> State Multiline Signal In the Thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus-elongatus*. *Journal of the American Chemical Society*, 115(6):2382–2389, 1993.
- [62] R. Fiege, W. Zweggart, R. Bittl, N. Adir, G. Renger and W. Lubitz. EPR and ENDOR studies of the water oxidizing complex of Photosystem II. *Photosynthesis Research*, 48(1-2):227–237, 1996.
- [63] S. Turconi, D. J. MacLachlan, P. J. Bratt, J. H. A. Nugent and M. C. W. Evans. Analysis of the interaction of water with the manganese cluster of photosystem II using isotopically labeled water. *Biochemistry*, 36(4):879–885, 1997.
- [64] C. P. Aznar and R. D. Britt. Simulations of the <sup>1</sup>H electron spin echo-electron nuclear double resonance and <sup>2</sup>H electron spin echo envelope modulation spectra of exchangeable hydrogen nuclei coupled to the S<sub>2</sub>-state photosystem II manganese cluster. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-biological Sciences*, 357(1426):1359–1365, 2002.
- [65] H. Yamada, H. Mino and S. Itoh. Protons bound to the Mn cluster in photosystem II oxygen evolving complex detected by proton matrix ENDOR. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1767(3):197–203, 2007.
- [66] J. I. Martinez, I. Yruela, R. Picorel and P. J. Alonso. <sup>1</sup>H Hyperfine Interactions in the Mn-Cluster of Photosystem II in the S<sub>2</sub> State Detected by Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(46):15345–15353, 2010.
- [67] V. J. DeRose, V. K. Yachandra, A. E. McDermott, R. D. Britt, K. Sauer and M. P. Klein. The State of Manganese In the Photosynthetic Apparatus - Nitrogen Ligation To Manganese In the Photosynthetic Oxygen-evolving Complex - Continuous-wave and Pulsed Epr Studies of Photosystem-II Particles Containing N-14 Or N-15. *Biochemistry*, 30(5):1335–1341, 1991.
- [68] R. J. Debus, K. A. Campbell, W. Gregor, Z. L. Li, R. L. Burnap and R. D. Britt. Does histidine 332 of the D1 polypeptide ligate the manganese cluster in photosystem II? An electron spin echo envelope modulation study. *Biochemistry*, 40(12):3690–3699, 2001.

- [69] G. J. Yeagle, M. L. Gilchrist, R. M. McCarrick and R. D. Britt. Multifrequency pulsed electron paramagnetic resonance study of the S<sub>2</sub> state of the photosystem II manganese cluster. *Inorganic Chemistry*, 47(6):1803–1814, 2008.
- [70] M. Sugiura, F. Rappaport, W. Hillier, P. Dorlet, Y. Ohno, H. Hayashi and A. Bous-sac. Evidence that D1-His332 in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* Interacts with the S<sub>3</sub>-State and not with the S<sub>2</sub>-State. *Biochemistry*, 48(33):7856–7866, 2009.
- [71] T. A. Stich, G. J. Yeagle, R. J. Service, R. J. Debus and R. D. Britt. Ligation of D1-His332 and D1-Asp170 to the Manganese Cluster of Photosystem II from *Synechocystis* Assessed by Multifrequency Pulse EPR Spectroscopy. *Biochemistry*, 50(34):7390–7404, 2011.
- [72] J. A. Stull, T. A. Stich, R. J. Service, R. J. Debus, S. K. Mandal, W. H. Armstrong and R. D. Britt. <sup>13</sup>C ENDOR Reveals That the D1 Polypeptide C-Terminus Is Di-rectly Bound to Mn in the Photosystem II Oxygen Evolving Complex. *Journal of the American Chemical Society*, 132(2):446–447, 2010.
- [73] S. Milikisiyants, R. Chatterjee, A. Weyers, A. Meenaghan, C. Coates and K. V. Lakshmi. Ligand Environment of the S<sub>2</sub> State of Photosystem II: A Study of the Hyperfine Interactions of the Tetranuclear Manganese Cluster by 2D N-14 HYSCORE Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(33):10905–10911, 2010.
- [74] Y. Shimada, H. Suzuki, T. Tsuchiya, T. Tomo, T. Noguchi and M. Mimuro. Effect of a Single-Amino Acid Substitution of the 43 kDa Chlorophyll Protein on the Oxygen-Evolving Reaction of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803: Analysis of the Glu354Gln Mutation. *Biochemistry*, 48(26):6095–6103, 2009.
- [75] R. J. Service, J. Yano, I. McConnell, H. J. Hwang, D. Nicks, R. Hille, T. Wydrzynski, R. L. Burnap, W. Hillier and R. J. Debus. Participation of Glutamate-354 of the CP43 Polypeptide in the Ligation of Manganese and the Binding of Substrate Water in Photosystem II. *Biochemistry*, 50(1):63–81, 2011.
- [76] A. Schweiger and G. Jeschke. *Principles of pulse electron paramagnetic resonance*. Oxford University Press, 2001.
- [77] J. Weil and J. Bolton. *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications*. Wiley-Interscience, 2007.
- [78] A. Bencini and D. Gatteschi. *Electron paramagnetic resonance of exchange coupled systems*. Springer-Verlag, 1990.

- [79] M. Iwasaki. Second-order Perturbation Treatment of General Spin Hamiltonian In An Arbitrary Coordinate System. *Journal of Magnetic Resonance*, 16(3):417–423, 1974.
- [80] C. Poole and H. Farach. *Relaxation in magnetic resonance: dielectric and mössbauer applications*. Academic Press, 1971.
- [81] W. Hofbauer and R. Bittl. A novel approach to separating EPR lines arising from species with different transition moments. *Journal of Magnetic Resonance*, 147(2):226–231, 2000.
- [82] P. E. Doan, N. S. Lees, M. Shanmugam and B. M. Hoffman. Simulating Suppression Effects in Pulsed ENDOR, and the 'Hole in the Middle' of Mims and Davies ENDOR Spectra. *Applied Magnetic Resonance*, 37(1-4):763–779, 2010.
- [83] K. O. Schafer. *Exchange Coupled Manganese Complexes: Model Systems for the Active Centres of Redoxproteins Investigated with EPR Techniques*. Technische Universitaet Berlin, 2002.
- [84] J. Kern, B. Loll, C. Luneberg, D. DiFiore, J. Biesiadka, K. D. Irrgang and A. Zouni. Purification, characterisation and crystallisation of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* cultivated in a new type of photobioreactor. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1706(1-2):147–157, 2005.
- [85] S. Stoll and A. Schweiger. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *Journal of Magnetic Resonance*, 178(1):42–55, 2006.
- [86] D. W. Randall, M. K. Chan, W. H. Armstrong and R. D. Britt. Pulsed H-1 and Mn-55 ENDOR studies of dinuclear Mn(III)Mn(IV) model complexes. *Molecular Physics*, 95(6):1283–1294, 1998.
- [87] K. O. Schafer, R. Bittl, W. Zweggart, F. Lenzian, G. Haselhorst, T. Weyhermuller, K. Wieghardt and W. Lubitz. Electronic structure of antiferromagnetically coupled dinuclear manganese ((MnMnIV)-Mn-III) complexes studied by magnetic resonance techniques. *Journal of the American Chemical Society*, 120(50):13104–13120, 1998.
- [88] K. O. Schafer, R. Bittl, F. Lenzian, V. Barynin, T. Weyhermuller, K. Wieghardt and W. Lubitz. Multifrequency EPR investigation of dimanganese catalase and related Mn(III)Mn(IV) complexes. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(5):1242–1250, 2003.
- [89] S. V. Antonyuk, V. R. Melik-Adamyanyan, A. N. Popov, V. S. Lamzin, P. D. Hempstead, P. M. Harrison, P. J. Artymyuk and V. V. Barynin. Three-dimensional structure of the enzyme dimanganese catalase from *Thermus thermophilus* at 1 angstrom resolution.

*Crystallography Reports*, 45(1):105–116, 2000.

- [90] S. Sinnecker, F. Neese and W. Lubitz. Dimanganese catalase-spectroscopic parameters from broken-symmetry density functional theory of the superoxidized Mn-III/Mn-IV state. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10(3):231–238, 2005.
- [91] M. Zheng, S. V. Khangulov, G. C. Dismukes and V. V. Barynin. Electronic-structure of Dimanganese(ii,iii) and Dimanganese(iii,iv) Complexes and Dimanganese Catalase Enzyme - A General Epr Spectral Simulation Approach. *Inorganic Chemistry*, 33(2):382–387, 1994.
- [92] S. Sinnecker, F. Neese, L. Noodleman and W. Lubitz. Calculating the electron paramagnetic resonance parameters of exchange coupled transition metal complexes using broken symmetry density functional theory: Application to a Mn(III)/Mn(IV) model compound. *Journal of the American Chemical Society*, 126(8):2613–2622, 2004.
- [93] S. Schinzel and M. Kaupp. Validation of broken-symmetry density functional methods for the calculation of electron paramagnetic resonance parameters of dinuclear mixed-valence Mn(IV)Mn(III) complexes. *Canadian Journal of Chemistry-revue Canadienne De Chimie*, 87(10):1521–1539, 2009.
- [94] N. Cox, W. Ames, B. Epel, L. V. Kulik, L. Rapatskiy, F. Neese, J. Messinger, K. Wieghardt and W. Lubitz. Electronic Structure of a Weakly Antiferromagnetically Coupled Mn(II)Mn(III) Model Relevant to Manganese Proteins: A Combined EPR,  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR, and DFT Study. *Inorganic Chemistry*, 50(17):8238–8251, 2011.
- [95] A. Kawamori, J. R. Shen, K. Furukawa, E. Matsuoka and T. Kato. W-band EPR studies of Mn-cluster in the  $S_0$  and  $S_2$  states of Cyanobacterial single crystals.. *Plant and Cell Physiology*, 45:Japanese Soc Plant Physiol, 2004.
- [96] S. A. Styring and A. W. Rutherford. The Microwave-power Saturation of Siislow Varies With the Redox State of the Oxygen-evolving Complex In Photosystem-II. *Biochemistry*, 27(13):4915–4923, 1988.
- [97] G. A. Lorigan and R. D. Britt. Temperature-dependent Pulsed Electron-paramagnetic-resonance Studies of the  $S_2$  State Multiline Signal of the Photosynthetic Oxygen-evolving Complex. *Biochemistry*, 33(40):12072–12076, 1994.
- [98] J. Bonvoisin, G. Blondin, J. J. Girerd and J. L. Zimmermann. Theoretical-study of the Multiline Epr Signal From the  $S_2$  State of the Oxygen Evolving Complex of Photosystem-ii - Evidence For A Magnetic Tetramer. *Biophysical Journal*, 61(5):1076–1086, 1992.

- [99] M. Kusunoki. A New Paramagnetic Hyperfine-structure Effect In Manganese Tetramers - the Origin of Multiline Epr Signals From An  $S_2$  State of A Photosynthetic Water-splitting Enzyme. *Chemical Physics Letters*, 197(1-2):108–116, 1992.
- [100] C. Teutloff, S. Kessen, J. Kern, A. Zouni and R. Bittl. High-field (94-GHz) EPR spectroscopy on the  $S_2$  multiline signal of photosystem II. *Febs Letters*, 580(15):3605–3609, 2006.
- [101] L. V. Kulik, B. Epel, W. Lubitz and J. Messinger. Mn-55 pulse ENDOR at 34 GHz of the  $S_0$  and  $S_2$  states of the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Journal of the American Chemical Society*, 127(8):2392–2393, 2005.
- [102] C. Teutloff, S. Pudollek, S. Kessen, M. Broser, A. Zouni and R. Bittl. Electronic structure of the tyrosine D radical and the water-splitting complex from pulsed ENDOR spectroscopy on photosystem II single crystals. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(31):6715–6726, 2009.
- [103] W. Hofbauer. *Electron Paramagnetic Resonance at 94 GHz: Methodological Developments and Studies of Photosynthetic Reaction Centers*. Technische Universität Berlin, 2001.
- [104] S. Kessen. *Elektronenspin-Resonanzspektroskopie an einkristallinem Photosystem II*. Freie Universitaet Berlin, 2011.
- [105] M. Iizasa, H. Suzuki and T. Noguchi. Orientations of carboxylate groups coupled to the Mn cluster in the photosynthetic oxygen-evolving center as studied by polarized ATR-FTIR spectroscopy.. *Biochemistry*, 49(14):3074–82, 2010.
- [106] R. J. Service, W. Hillier and R. J. Debus. Evidence from FTIR Difference Spectroscopy of an Extensive Network of Hydrogen Bonds near the Oxygen-Evolving Mn(4)Ca Cluster of Photosystem II Involving D1-Glu65, D2-Glu312, and D1-Glu329. *Biochemistry*, 49(31):6655–6669, 2010.
- [107] A. Guskov, J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni and W. Saenger. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-angstrom resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(3):334–342, 2009.
- [108] B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni and J. Biesiadka. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 angstrom resolution structure of photosystem II. *Nature*, 438(7070):1040–1044, 2005.
- [109] K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber and S. Iwata. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, 303(5665):1831–1838, 2004.

- [110] E. M. Sproviero, J. A. Gascon, J. P. McEvoy, G. W. Brudvig and V. S. Batista. Computational studies of the O<sub>2</sub>-evolving complex of photosystem II and biomimetic oxomanganese complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 252(3-4):395–415, 2008.
- [111] J. Yano, J. Kern, K. Sauer, M. J. Latimer, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, W. Saenger, J. Messinger, A. Zouni and V. K. Yachandra. Where water is oxidized to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn<sub>4</sub>Ca cluster. *Science*, 314(5800):821–825, 2006.
- [112] Y. Pushkar, J. Yano, K. Sauer, A. Boussac and V. K. Yachandra. Structural changes in the Mn<sub>4</sub>Ca cluster and the mechanism of photosynthetic water splitting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6):1879–1884, 2008.
- [113] W. Ames, D. A. Pantazis, V. Krewald, N. Cox, J. Messinger, W. Lubitz and F. Neese. Theoretical Evaluation of Structural Models of the S<sub>2</sub> State in the Oxygen Evolving Complex of Photosystem II: Protonation States and Magnetic Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 133(49):19743–19757, 2011.
- [114] P. E. M. Siegbahn. Mechanisms for proton release during water oxidation in the S<sub>2</sub> to S<sub>3</sub> and S<sub>3</sub> to S<sub>4</sub> transitions in photosystem II. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(14):4849–4856, 2012.
- [115] S. Schinzel, J. Schraut, A. V. Arbuznikov, P. E. M. Siegbahn and M. Kaupp. Density Functional Calculations of <sup>55</sup>Mn, <sup>14</sup>N and <sup>13</sup>C Electron Paramagnetic Resonance Parameters Support an Energetically Feasible Model System for the S<sub>2</sub> State of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II. *Chemistry-a European Journal*, 16(34):10424–10438, 2010.
- [116] A. Boussac and A. W. Rutherford. The Step Which Requires Calcium In Photosynthetic Oxygen Evolution Is the S<sub>3</sub> To S<sub>0</sub> Transition. *Biophysical Journal*, 53(2):A414–A414, 1988.
- [117] D. F. Ghanotakis, G. T. Babcock and C. F. Yocum. Calcium Reconstitutes High-rates of Oxygen Evolution In Polypeptide Depleted Photosystem-II Preparations. *Febs Letters*, 167(1):127–130, 1984.
- [118] M. Miqyass, H. J. Gorkom and C. F. Yocum. The PSII calcium site revisited. *Photosynthesis Research*, 92(3):275–287, 2007.
- [119] C. F. Yocum. The calcium and chloride requirements of the O<sub>2</sub> evolving complex. *Coordination Chemistry Reviews*, 252(3-4):296–305, 2008.

- [120] J. Schraut, A. V. Arbuznikov, S. Schinzel and M. Kaupp. Computation of Hyperfine Tensors for Dinuclear MnIII-MnIV Complexes by Broken-Symmetry Approaches: Anisotropy Transfer Induced by Local Zero-Field Splitting. *Chemphyschem*, 12(17):3170–3179, 2011.
- [121] H. Suzuki, Y. Taguchi, M. Sugiura, A. Boussac and T. Noguchi. Structural perturbation of the carboxylate ligands to the manganese cluster upon  $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$  exchange in the S-state cycle of photosynthetic oxygen evolution as studied by flash-induced FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry*, 45(45):13454–13464, 2006.
- [122] Y. Taguchi and T. Noguchi. Drastic changes in the ligand structure of the oxygen-evolving Mn cluster upon  $\text{Ca}^{2+}$  depletion as revealed by FTIR difference spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1767(6):535–540, 2007.
- [123] T. Noguchi. Light-induced FTIR difference spectroscopy as a powerful tool toward understanding the molecular mechanism of photosynthetic oxygen evolution. *Photosynthesis Research*, 91(1):59–69, 2007.
- [124] G. Hendry and T. Wydrzynski.  $^{18}\text{O}$  isotope exchange measurements reveal that calcium is involved in the binding of one substrate-water molecule to the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Biochemistry*, 42(20):6209–6217, 2003.
- [125] N. Ishida, M. Sugiura, F. Rappaport, T.-L. Lai, A. W. Rutherford and A. Boussac. Biosynthetic exchange of bromide for chloride and strontium for calcium in the photosystem II oxygen-evolving enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19):13330–13340, 2008.
- [126] A. Galstyan, A. Robertazzi and E. W. Knapp. Oxygen-Evolving Mn Cluster in Photosystem II: The Protonation Pattern and Oxidation State in the High-Resolution Crystal Structure. *Journal of the American Chemical Society*, 134(17):7442–7449, 2012.
- [127] A. Boussac, N. Ishida, M. Sugiura and F. Rappaport. Probing the role of chloride in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* by exchanging chloride for iodide. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 1817(5):802–810, 2012.
- [128] F. Rappaport, N. Ishida, M. Sugiura and A. Boussac.  $\text{Ca}^{2+}$  determines the entropy changes associated with the formation of transition states during water oxidation by Photosystem II. *Energy & Environmental Science*, 4(7):2520–2524, 2011.
- [129] B. K. Semin, L. N. Davletshina, I. I. Ivanov, A. B. Rubin and M. Seibert. Decoupling of the processes of molecular oxygen synthesis and electron transport in  $\text{Ca}^{2+}$ -depleted PSII membranes. *Photosynthesis Research*, 98(1-3):235–249, 2008.



# Danksagung

Ich danke Robert Bittl für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Die gute Betreuung, stete Diskussionsbereitschaft und vielen Anregungen haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zouni, die mich über die Jahre mit Probenmaterial versorgt haben. Insbesondere Matthias Broser war eine große Hilfe beim Manövrieren der Kristalle in Röhrchen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe in dieser Zeit ein Dankeschön für die gute Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft. Insbesondere meinen zwei Bürokollegen Marc Brecht und Christoph Meier danke ich für viele anregende und hilfreiche Gespräche. Christian Teutloff nahm über die Jahre regen Anteil am Fortgang der Arbeit und steuerte viele Ideen zur Überwindung verschiedenster Schwierigkeiten bei. Roswitha Brunn versorgte die Magneten zuverlässig. Birgit Dabisch und Sylvia Luther unterstützten mich in allen Fragen der Verwaltung.

Dank gebührt ebenso dem Personal des TTL, insbesondere Hans Streuber, Claus Christiansen und Rolf Matte, die mir immer auch eine spontan benötigte Kanne Helium überließen. Kleinere und auch größere Ersatzteile und Neubauten insbesondere für den Q-Band-Resonator wurden dankenswerterweise meist zügig von der Feinwerktechnik bereitgestellt.

Vielen Dank an mein Team - Amandine, Ivana, Jenny und Sara, ihr habt mich großartig unterstützt.

Zuletzt ein dank an die wichtigsten Personen, deren Unterstützung und Vertrauen in meine Fähigkeiten mir in den letzten Phasen sehr geholfen haben - Annette, meinen Eltern und ganz besonders Richard.