



Zwei ineinander umwandelbare Strukturen erklären die spektroskopischen Eigenschaften des Wasser oxidierenden Enzyms des Photosystems II im S₂-Zustand**

Dimitrios A. Pantazis,* William Ames, Nicholas Cox, Wolfgang Lubitz und Frank Neese*

Der Wasser oxidierende Komplex im Photosystem II (PSII) der Natur, auch Sauerstoff produzierender Komplex (OEC) genannt, generiert bei der oxygenen Photosynthese unter Nutzung von Sonnenenergie Protonen, Elektronen und molekularen Sauerstoff aus Wasser. Während der Sauerstoffproduktion durchläuft der Komplex fünf Zwischenstufen im Kok-Zyklus, die mit S_i gekennzeichnet werden ($i = 0-4$: Zahl gespeicherter Oxidationsäquivalente).^[1] Nach Erreichen des S₄-Zustands wird unter Zurückbildung von S₀ spontan O₂ gebildet. Am gründlichsten untersucht ist der S₂-Zustand, der ein Multilinien-Signal (MLS) bei $g = 2.0$ im EPR-Spektrum zeigt. Dieses Signal belegt, dass der Grundzustand einen Gesamtspin von $S = 1/2$ hat.^[2] Zusätzlich zu diesem MLS findet man unter verschiedenen Präparationsbedingungen Signale bei $g \geq 4.1$, die zu höheren Spinzuständen gehören.^[3] Diese Signale werden Konfigurationen des OEC mit höherer Spinmultiplizität ($S \geq 5/2$) zugeordnet. Sie repräsentieren elektronische Grundzustandskonfigurationen und keine Zustände derselben Spinmannigfaltigkeit, da in diesem Fall auch das MLS zu sehen wäre. Die beiden Formen von S₂ können bei tiefer Temperatur durch Bestrahlung im Nah-Infrarot (NIR)-Bereich ineinander umgewandelt werden.^[3c-e]

Eine Erklärung dieser Phänomene ist wichtig zum Verständnis des Magnetismus und der Struktur-Funktions-Beziehungen des OEC sowie zur Aufklärung mechanistischer Details der Wasserspaltung auf Basis spektroskopisch verifizierter Strukturen. Wir bauen hier auf den Daten der neuesten Kristallstruktur des PSII^[4] auf und nutzen Quantenmechanik und theoretische Spektroskopie, um zu zeigen, dass die beiden fundamentalen EPR-Signale des S₂-Zustands – $g = 2.0$ (MLS) und $g \geq 4.1$ – auf zwei energetisch ähnliche und ineinander umwandelbare Strukturen zurückzuführen sind.

In den letzten zehn Jahren haben Kristallstruktur^[5] und Röntgenabsorptionsfeinstruktur-Studien (EXAFS)^[6] wichtige Informationen über die Struktur des OEC und seiner direkten Umgebung geliefert.^[7] Besonders seit der Veröffentlichung der PSII-Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1.9 Å durch Umena et al.^[4] können das anorganische Zen-

trum des OEC und seine Proteinumgebung als definiert betrachtet werden. Laut Umena et al. hat das Mn₄O₅Ca-Zentrum die Form eines Stuhls, dessen Beine von einem verzerrten Mn₃O₄Ca-Würfel („Cuban“) gebildet werden und dessen Lehne aus einer weiteren OxoBrücke und dem vierten Mn-Atom besteht. Die Kristallstruktur sollte dem ohne Lichteinwirkung stabilen S₁-Zustand des OEC entsprechen, in dem die Mn-Atome nach gängiger Auffassung als Mn^{III}₂Mn^{IV}₂ vorliegen. Neuere Studien^[7,8] haben allerdings wichtige Hinweise darauf geliefert, dass das anorganische Zentrum durch photochemische Reduktion der Mn-Atome verändert wurde. Aufgrund der bekannten Dosis der verwendeten Röntgenstrahlung wird ein signifikanter Anteil von Mn^{II}-Atomen erwartet.^[9] Zwar wurde die mögliche Reduktion in der Studie von Umena et al. sehr viel besser kontrolliert als bei früheren Röntgenstrukturanalysen, jedoch fand man unerwartet lange – für Mn^{III/IV} chemisch nicht stimmige^[10] – Mn-O-Bindungen und eine ungewöhnliche, nichtbindende Position der postulierten μ_4 -OxoBrücke (O5). Diese Position würde im Widerspruch zu experimentellen Befunden zu einer signifikanten Spindichte am O5 führen (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen [SI]).^[8b] Luber et al. schlugen vor, dass das Mn₄O₅Ca-Zentrum der neuesten Kristallstruktur nicht dem S₁-Zustand, sondern einer Mischung aus stärker reduzierten Formen entspricht, die physiologisch im Kok-Zyklus nicht zugänglich sind.^[8a] Dau und Grundmeier^[7] sowie Knapp et al.^[8c] folgerten, dass die Kristallstruktur hauptsächlich dem reduzierten S₋₃-Zustand zuordnen ist.

Trotz dieses Problems bleibt die Struktur mit 1.9 Å Auflösung der beste Ausgangspunkt zur Entwicklung von Modellen, die eine Verbindung zwischen strukturellen und spektroskopischen Eigenschaften herstellen können. Hier wird die Kristallstruktur dazu verwendet, große Clustermodelle des OEC mit 238 Atomen zu konstruieren (Abbildung 1). Basierend auf den energieminierten Strukturen dieser Modelle werden die Eigenschaften des spektroskopisch gut charakterisierten S₂-Zustands (Mn^{III}Mn^{IV}₃) berechnet. Die Modelle enthalten die sieben direkt koordinierenden Aminosäuren (aus der Kette D1, sofern nicht anders angegeben) Asp170, Glu189, His332, Glu333, Asp342, Ala344 und CP43-Glu354, sowie zwei Wassermoleküle am Ca²⁺ und je einen Wasser- und Hydroxyliganden am terminalen Mn (Mn4 nach der Kristallstruktornomenklatur). Außerdem enthalten die Modelle die Aminosäuren Asp61, Tyr161 (Y_Z), His190 und His337, die über H-Brücken mit Mn-gebundenen Liganden (Asp61), Ca-gebundenen bzw. vicinalen Wassermolekülen (Tyr161 bzw. His190) oder einer μ_3 -OxoBrücke des

[*] Dr. D. A. Pantazis, Dr. W. Ames, Dr. N. Cox, Prof. Dr. W. Lubitz, Prof. Dr. F. Neese
Max-Planck-Institut für chemische Energiekonversion
Stiftstraße 34–36, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
E-Mail: dimitrios.pantazis@cec.mpg.de
frank.neese@cec.mpg.de

[**] Wir danken der MPG für finanzielle Unterstützung.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204705> zu finden.

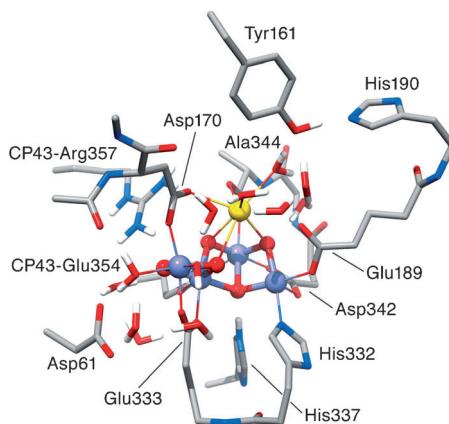


Abbildung 1. OEC-Cluster-Modell mit 238 Atomen (Struktur A); weiß H, grau C, blau N, rot O, violett Mn, gelb Ca. Nur wichtige H-Atome sind gezeigt.

Clusters (His337) verbunden sind. CP-Arg357 ist eine positiv geladene Seitenkette aus der zweiten Koordinationssphäre, die wegen der wichtigen Wechselwirkung mit dem Cluster auch berücksichtigt wurde. Acht Kristallwassermoleküle, die mit den genannten Ionen und Aminosäuren wechselwirken, sind ebenfalls enthalten. Die Hauptkette von Leu343 und Teile der Hauptketten von Ser169 und Gly171 sind strukturelle Ankerpunkte für die Kristallwassermoleküle. Die Protonierungen wurden gemäß eines Vergleichs von experimentellen und berechneten ^{55}Mn -Hyperfeinkopplungskonstanten vorgenommen.^[8b] Fixierungen von Hauptkettenatomen in den Positionen der Kristallstruktur dienten zur bestmöglichen Berücksichtigung der strukturellen Auswirkungen der Sekundärstruktur des Proteins.^[11]

Bei der Energieminimierung wurden viele Trajektorien mit dispersionskorrigierter,^[12] skalar-relativistischer^[13] Dichtefunktionaltheorie (DFT) unter Verwendung von All-Elektronen-Basisätzen,^[14] wie im Programm ORCA^[15] implementiert, ausgewertet (Details siehe SI). Diese unterscheiden sich in den Ausgangspositionen der $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -Atome und der Liganden, um einen ausreichend großen Konformationsraum zu erproben. Diese Rechnungen konvergierten alle zu einem von zwei fast isoenergetischen Isomeren **A** und **B**, die die gleiche Koordinationssphäre haben (Abbildung 1), aber innerhalb des anorganischen Zentrums fundamentale Unterschiede aufweisen (Abbildung 2). **A** und **B** haben lokalisierte Valenzelektronen (Tabelle S1 [SI]), wobei das einzige Mn^{III} -Ion jeweils an gegenüberliegenden Stellen im Cluster zu finden ist. Sie unterscheiden sich von der Kristallstruktur hauptsächlich in der Art der Mn-Mn-Konnektivität, die durch die Position der Brücke O5 gesteuert wird: Diese Position hat entscheidende Auswirkungen auf die Elektronenstruktur und die zu erwartenden spektroskopischen Eigenschaften des OEC (siehe unten).

A ist mit 1 kcal mol^{-1} das nur geringfügig stabilere Isomer. Dieser Energieunterschied hängt nur wenig vom verwendeten Dichtefunktional ab, wird jedoch stärker von der gewählten Dispersionskorrektur beeinflusst (Methodenvergleich siehe Tabelle S2 [SI]). Die Limitierungen in der Genauigkeit von DFT und der Näherungen, die bei der Kon-

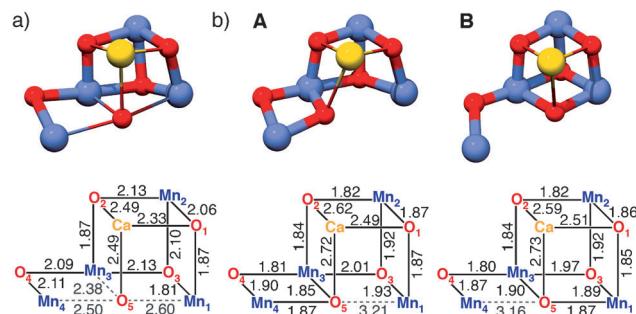


Abbildung 2. $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -Cluster und Metall-O-Abstände (in Å): a) 1.9-Å-Kristallstruktur, b) energieminierte Strukturen der Modelle **A** und **B** des S_2 -Zustands.

struktion und Behandlung der Modelle verwendet werden (wie die Vernachlässigung von Dynamik), lassen keine quantitative Fehlerabschätzung zu. Trotzdem kann angesichts der Unabhängigkeit der erhaltenen Strukturen von der Wahl des Dichtefunktionalen als gesichert gelten, dass beide Strukturformen experimentell beobachtbar sein sollten.

Weitere Rechnungen, die innerhalb der relaxierten Proteintasche das anorganische Zentrum aus der Kristallstruktur mit den durch die Energieminimierung erhaltenen Strukturen energetisch vergleichen, zeigen, dass letztere ca. 107 kcal mol^{-1} stabiler sind. Nur ungefähr ein Fünftel der Stabilisierungsenergie kann Änderungen in den Mn-Positionen zugeordnet werden, die nach der Energieminimierung eine geringere Abweichung von den EXAFS-Ergebnissen^[6a] aufweisen als die in der Kristallstruktur (Tabelle 1). Der größte

Tabelle 1: Metall-Metall-Abstände (in Å) von **A** und **B**, der 1.9-Å-Kristallstruktur (XRD) und der EXAFS-Daten.

	A	B	XRD ^[a]	EXAFS
Mn1-Mn2	2.81	2.75	2.84/2.76	
Mn1-Mn3	3.38	2.89	3.29/3.30	2.7, 2.8, 3.3
Mn2-Mn3	2.80	2.76	2.89/2.91	(2:1:1)
Mn3-Mn4	2.76	3.13	2.97/2.91	
Mn1-Ca	3.70	3.48	3.51/3.46	
Mn2-Ca	3.43	3.48	3.36/3.29	3.4, 3.9
Mn3-Ca	3.58	3.52	3.41/3.44	(2:2 oder 3:1)
Mn4-Ca	3.99	4.17	3.79/3.80	

[a] Werte aus den Hauptketten A/a des PSII-Dimers.

Anteil der Stabilisierungsenergie (86 kcal mol^{-1}) stammt aus der Verschiebung der Oxobrücken (Abbildung 2), wobei mehr als die Hälfte dieses Energiebetrags (46 kcal mol^{-1}) aus der Bewegung des „Quasiradikals“ O5 hin zu einer chemisch angemessenen Länge für die Bindung mit einem der beiden terminalen Mn-Ionen, Mn1 oder Mn4, resultiert. **A** wird erhalten, wenn O5 eine Bindung mit Mn4 bildet: Dabei ist der würfelartige Teil des Zentrums geöffnet, und Mn1 bleibt als das Mn^{III} -Atom pentakoordiniert. Dieser Strukturtyp ist der energetisch günstigere und im Wesentlichen identisch mit dem von Siegbahn^[16] vorgeschlagenen Modell, das schon spektroskopisch verifiziert wurde.^[2k] Siegbahn zufolge ist diese Form auch die katalytisch aktive Spezies.^[16] In der alternativen Struktur **B** liegt ein vollständiges $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{Ca}$ -Cuban

vor, an welches das pentakoordinierte Mn^{III} -Ion über eine Oxo-brücke gebunden ist. **B** ist dem von Barber und Murray^[17] als Überarbeitung der ursprünglichen „Londoner“ Kristallstruktur^[5c] präsentierten Modell sehr ähnlich.

Für beide Strukturen wurden die magnetischen Kopplungskonstanten J_{ij} (Abbildung 3) mit dem Broken-Symmetry-

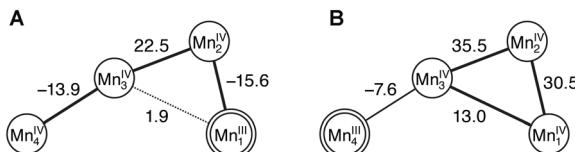


Abbildung 3. Berechnete Austauschkopplungskonstanten (in cm^{-1}) für benachbarte Mn-Zentren und Verteilung der Oxidationsstufen in **A** und **B**.

try-Ansatz berechnet. Die sechs Paare von J -Werten wurden aus der High-Spin- und den sieben Broken-Symmetry-Determinanten bestimmt, wozu ein literaturbekanntes Verfahren verwendet wurde.^[18] Der Heisenberg-Dirac-van-Vleck-Hamilton-Operator mit den sechs J -Werten für jede Struktur wurde diagonalisiert, um das vollständige Spektrum der 320 magnetischen Zustände zu erhalten, das aus den Kopplungen der High-Spin-Mn-Ionen entsteht. **A** hat einen $S = 1/2$ -Grundzustand, während der erste angeregte Zustand mit $S = 3/2$ 23 cm^{-1} höher liegt, in Einklang mit zuvor untersuchten Modellen und auch mit experimentellen Untersuchungen des MLS des S_2 -Zustands. Des Weiteren ist die Übereinstimmung der berechneten isotropen ^{55}Mn -Hyperfeinkopplungen ($-212, 201, 176$ und -280 MHz für Mn1–Mn4) mit zuvor für diesen Strukturtyp publizierten sowie experimentellen Werten sehr gut.^[21k] Abbildung 4 zeigt ein simuliertes EPR-Spektrum mit Hyperfein- und g -Anisotropie auf Basis der DFT-berechneten Parameter.

B unterscheidet sich von **A** durch die ferromagnetische Kopplung der drei Mn^{IV} -Ionen in der Mn_3Ca -Cuban-Untereinheit. Die Winkel an den Oxo-Ecken des Cubans verhindern jeglichen Antiferromagnetismus,^[19] wodurch diese Untereinheit intrinsisch einen High-Spin-Grundzustand mit $S = 9/2$ haben muss. Eine Bestätigung dieser Befunde ergibt sich aus der Charakterisierung eines synthetischen Cubans durch Christou et al.^[20] Messungen der magnetischen Suszeptibilität dieser Substanz belegen einen Spingrundzustand von $9/2$, der durch die dominanten ferromagnetischen Kopplungen zwischen Paaren von Mn-Atomen verursacht wird. Weitere Rechnungen in unserer Gruppe reproduzieren diese Daten und sagen voraus, dass der gleiche Kopplungsmechanismus auch beim synthetischen $\text{Mn}^{\text{IV}}_3\text{O}_4\text{Ca}$ -Cuban von Agapie et al. vorliegt.^[21]

Der Gesamtspin für **B** resultiert somit aus der Kombination der ferromagnetischen Wechselwirkungen in der Cubaneinheit und der einzigen antiferromagnetischen Kopplung der μ -oxo-verbrückten Atome Mn3 und Mn4 ($J_{34} = -7.6 \text{ cm}^{-1}$). Diese Kombination sorgt hier für einen Gesamtspin von $5/2$ im Grundzustand und einen energetisch nahegelegenen angeregten Zustand mit $S = 7/2$, in guter Übereinstimmung mit dem erwarteten Spin einer High-Spin-Spezies, die die Signale mit $g \geq 4.1$ ergibt. Unter Verwendung

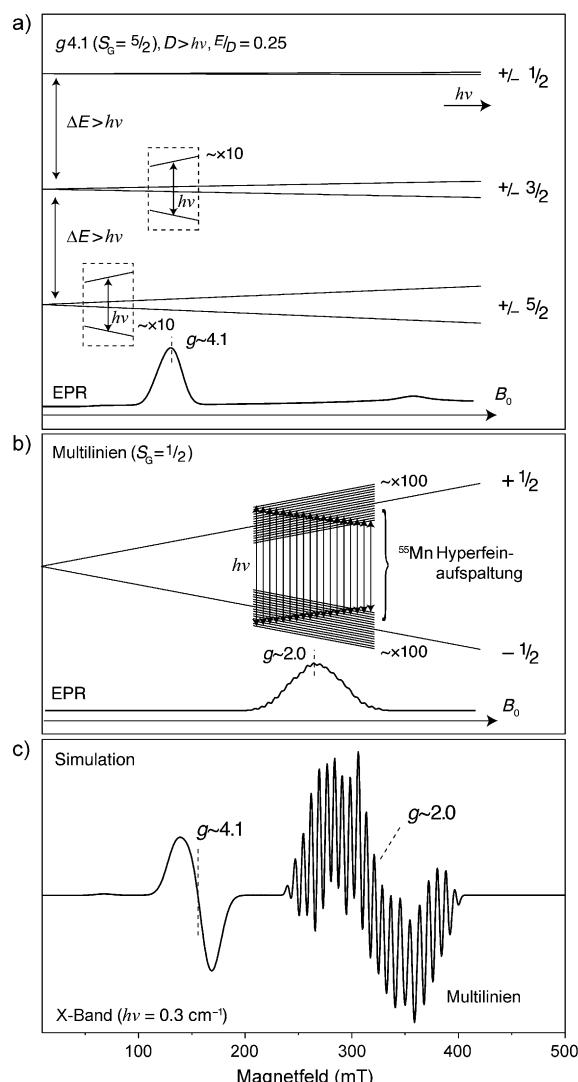


Abbildung 4. X-Band-EPR-Simulationen (9 GHz) der beiden elektronischen Konfigurationen des S_2 -Zustands unter Verwendung der DFT-berechneten Parameter in Tabelle S3 [SI]. a) Energieniveaus der $\text{S}_1(\text{GS}) = 5/2$ -Konfiguration ($g \approx 4.1$) und entsprechendes simuliertes Pulver-EPR-Spektrum. Es wurde ein Wert von $D = 0.59 \text{ cm}^{-1}$ angenommen, entsprechend einem lokalen Feinstrukturparameter von 3 cm^{-1} für Mn^{III} . Das dominante schmale Signal des EPR-Spektrums bei $g \approx 4.1$ stammt aus dem Spin-erlaubten Übergang zwischen den Niveaus des $\pm 3/2$ -Kramers-Dubletts; der $\pm 3/2$ -Übergang befindet sich für alle Pulverorientierungen bei ungefähr denselben g -Werten. b) Energieniveaus der $\text{S}_1(\text{GS}) = 1/2$ (MLS)-Konfiguration und entsprechendes simuliertes Pulver-EPR-Spektrum. c) Simulation des EPR-Spektrums (1. Ableitung) der MLS- und $g \approx 4.1$ -Konfigurationen.

typischer g -Werte und Nullfeldaufspaltungen für die Mn^{III} ($g = 2$, d zwischen -1 und -6 cm^{-1}) und Mn^{IV} -Ionen ($g = 2$, $d = 0 \text{ cm}^{-1}$) wird ein breites X-Band-EPR-Spektrum mit Tieffeldwendepunkten in der Region $g = 4$ – 10 erhalten (Details siehe SI). Die Linienform ähnelt denen der High-Spin-Signale von Proben aus *T. elongatus* und höheren Pflanzen, die bei tiefer Temperatur ($T > 65 \text{ K}$) nach Anregung mit Infrarotstrahlung erhalten werden, zuvor aber das S_2 -MLS zeigten.^[3d] Da die Gesamt-Nullfeldaufspaltung des durch die Spinfunktionen des elektronischen Grundzustands aufge-

spannten Unterraums größer ist als die Resonanzbedingung bzw. das Mikrowellenquantum ($D > h\nu$; Abbildung 4a), werden von $g=2.0$ entfernt liegende Spektrallinien beobachtet. Zu beachten ist außerdem, dass die berechneten Hyperfeinkopplungen (HFCs) für **B** eine mittlere berechnete Hyperfeinaufspaltung von 87 MHz (31 G) ergeben, was ungefähr den Werten entspricht, die beim $g=4.1$ -Signal von NH₃-behandelten Pflanzenproben gemessen wurden.^[22] Diese Aufspaltung ähnelt den Daten für Christous Mn^{IV}₃O₄Ca-Komplex: Für **B** wurden isotrope lokale HFCs von -150 bis -180 MHz berechnet und für die synthetische Mn^{IV}₃O₄Ca-Struktur ca. -180 MHz gemessen.^[20]

Die Energieleiter für Modell **B** weist kleinere Abstände auf als die für Modell **A**, woraus sich sehr kleine Energiedifferenzen zwischen Grundzustand und erstem angeregten Zustand ergeben. Dadurch wird diese Energiedifferenz durch Störungen, wie die Reorganisation des H-Brückennetzwerks mit verschiedenen Protonorientierungen der OH⁻/H₂O-Liganden, leicht beeinflusst. Auch unterschiedliche Vorgehensweisen bei den Rechnungen ergeben Änderungen dieser Energiedifferenz von 1 bis 6 cm⁻¹ für **B**. Diese Beobachtungen werden durch experimentelle Befunde gestützt. Die Art des durch NIR-Anregung des MLS generierten Signals bei $g \geq 4.1$ aus Proben höherer Pflanzen variiert mit der Bestrahlungstemperatur. Bei tiefen Temperaturen werden Signale bei höheren g -Werten (5–9) gefunden, während bei 100–150 K ein Signal bei $g \approx 4.1$ beobachtet wird. Signale bei höheren g -Werten können durch Erwärmung auf 150 K in die ≈ 4.1 -Signale umgewandelt werden. Diese Beobachtungen wurden als Beleg für mindestens zwei High-Spin-Konfigurationen mit $S=5/2$ interpretiert, die sich in der Gesamtnullfeldaufspaltung im Grundzustand unterscheiden. Eine Variation in der Nullfeldaufspaltung kann erreicht werden durch: 1) eine Änderung der lokalen Feinstrukturparameter, was jedoch unwahrscheinlich ist, da die Mn-Ionen weder Koordinationssphäre noch Oxidationsstufe ändern (unter der Annahme, dass beide Signale mit hohen g -Werten **B** entsprechen), oder 2) eine Änderung der Energiedifferenzen der durch Spinfunktionen des elektronischen Grundzustands aufgespannten Unterraums, wie oben beschrieben. Eine Vergrößerung (Verringerung) dieser Energiedifferenzen führt zu einer Verlängerung (Verkürzung) der gesamten Leiter und somit zu einer Änderung der Nullfeldaufspaltung der Grundzustandsmenge.

In der Tat kann der Grundzustand einer Spinleiter mit Energieabständen zwischen Grundzustand und erstem angeregten Zustand in der Größenordnung von ca. 10 cm⁻¹ nicht als energetisch isoliert betrachtet werden. Daher werden breite EPR-Signale von signifikanter Komplexität erwartet, auch wenn die lokalen Feinstrukturparameter groß sind ($d \gg h\nu$; Abbildungen S3–S5 [SI]). Daraus ergeben sich bei höheren Pflanzen und Cyanobakterien Signale bei hohen g -Werten. Dagegen geht die Komplexität des Signals bei $g \geq 4.1$ bei Spinleitern mit großen Energieabständen (Größenordnung 100 cm⁻¹) verloren. Unter diesen Umständen ist die Nullfeldaufspaltung der Grundzustandsmenge wohldefiniert, und nur ein einziger Wendepunkt bei $g \approx 4.1$ wird im EPR-Spektrum (bei X-Band-Frequenzen) beobachtet. Die Annahme, dass der Grundzustand einer High-Spin-Spezies

energetisch gut isoliert ist, ermöglicht eine theoretische Abschätzung der Größe der Nullfeldaufspaltung für den Grundzustand (siehe SI). Für **B** wird eine Nullfeldaufspaltung (D) zwischen -0.2 und -1.2 cm⁻¹ vorhergesagt, in guter Übereinstimmung mit der experimentellen Abschätzung von $|D| \approx 0.5$ cm⁻¹.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Kopplung von Elektronen- und Protonentransfer (PCET) bei tiefen Temperaturen unterbunden werden kann. Ein gutes Beispiel dafür ist die photoinduzierte Oxidation des redoxaktiven Tyrosins (Y_D) des PSII.^[23] Wird dieses bei Temperaturen des flüssigen Heliums gebildet, wird die Protonenbewegung zum benachbarten Histidin, das als Base agiert, unterbunden. Erst bei Erwärmung auf 100 K wird das Proton verschoben. Daraus ergibt sich, dass der exakte Protonierungszustand des High-Spin-Systems, der unter NIR-Bestrahlung bei 65 K gebildet wird, in der Tat ein anderer sein könnte als der desselben Zustands, der bei 150 K gebildet wird. Damit wären die obigen Beobachtungen zu erklären.

Der Übergangszustand (ÜZ) für die Umwandlung der Clustermodelle **A** und **B**, und somit der Umwandlung des MLS und des Signals bei $g \geq 4.1$, wurde durch zwei Ansätze angenähert. Zunächst wurden schrittweise Energieminimierungen entlang der Isomerisierungskoordinate zwischen **A** und **B** mit Schrittgrößen von 0.0625 Å durchgeführt, die eine maximale Energiebarriere von 9.0 kcal mol⁻¹ ergaben. Dieser Energiebetrag kann als Obergrenze für die wahre Übergangsenergie der Interkonversion von **A** und **B** im OEC betrachtet werden, da dieser angenäherte ÜZ in Bezug auf die Übergangszustandsmode nicht energieminiert ist und außerdem den geometrischen Randbedingungen in der Hauptkette unterworfen ist. Der zweite Ansatz arbeitet mit kleineren 120-Atom-Modellen von **A** und **B** und mit ähnlichen geometrischen Randbedingungen wie in den größeren Modellen. Mit schrittweisen Energieminimierungen wurde eine ÜZ-ähnliche Struktur gefunden, die mit der in ORCA implementierten Hybrid-Hessian-Option zum entsprechenden wahren ÜZ optimiert wurde. Die Lokalisierung des ÜZ war schwierig, hauptsächlich wegen des Oxidationsstufenwechsels, der an beiden terminalen Mn-Ionen erfolgen muss. Der erfolgreiche Ansatz verwendete einen ersten Hybrid-Hessian mit 51 Atomen, um die Übergangszustandsmode zu identifizieren und dann die Optimierung in Richtung des gewünschten Sattelpunkts zu steuern. Die vollständige Analyse der numerischen Frequenzen am stationären Punkt bestätigte, dass der wahre ÜZ erhalten wurde. Die imaginäre Frequenz der entsprechenden Mode ist -141 cm⁻¹. Dieser ÜZ (Abbildung S6 [SI]) ergibt einen geringeren genäherten Wert für die Aktivierungsenergie von 6.4 kcal mol⁻¹. Ungeachtet gewisser Unsicherheiten der verwendeten Methode lässt sich schließen, dass die Aktivierungsenergie ausreichend klein ist, um eine Umwandlung der beiden Strukturen unter physiologischen Bedingungen zu ermöglichen.

Das wichtigste Ergebnis der ÜZ-Lokalisierung ist, dass entlang der Umwandlungskoordinate eine signifikante Verringerung des Mn1–Mn4-Abstands erfolgt, für die 120-Atom-Modelle von ca. 4.7 Å in **A** und **B** bis zu weniger als 4.2 Å im ÜZ. Durch den so ermöglichten sanften „Valenztausch“ zwischen den terminalen Mn-Ionen ergibt sich die

niedrige Aktivierungsenergie für die Konversion der beiden Strukturen. Im ÜZ zwischen den Minima **A** und **B** ist der ausgetauschte Spin fast gleich verteilt (berechnete Mulliken-Spinpopulationen von 3.42 und 3.46 für Mn1 bzw. Mn4). Gleichzeitig vermeidet dieser ÜZ die Bildung von Radikalcharakter an O5 (Spinpopulation –0.04). Wie erwähnt, könnte die Aktivierungsenergie für den Austausch von O5 ohne die beobachtete Kontraktion des Mn-Mn-Abstands bis zu 46 kcal mol^{–1} betragen, entsprechend der Relaxationsenergie für die O5-Position in der aktuellen Kristallstruktur.

Das Potenzial für Strukturflexibilität in Mn-Oxo-Clustern wurde schon zuvor in Studien stark vereinfachter Modelle anderer Stöchiometrie und Mn-Oxidationsstufen als in den hier untersuchten Komplexen festgestellt.^[24] Mit Blick auf die aktuellere Kristallstruktur ist die Feststellung Kusunokis, dass im Prinzip mehrere, in der Protonenanordnung verschiedene Strukturen ähnlicher Energie im S₁-Zustand existieren können, von größerer Relevanz für unsere Arbeit.^[25] Die hier vorgestellten Ergebnisse, die eine Verfeinerung der Kristallstrukturdaten mit der Analyse ihrer magnetischen Eigenschaften kombinieren, zeigen zum ersten Mal, dass im S₂-Zustand zwei ineinander umwandelbare Strukturen des OEC-Zentrums existieren und verbinden diese mit den beiden bekannten EPR-Signalen. Somit ist eine solide strukturelle Basis zur weitergehenden Untersuchung der Spektroskopie des S₂-Zustands wie auch der in den letzten 30 Jahren gemachten spektroskopischen Beobachtungen geschaffen. Ein Beispiel dafür ist das Intensitätsverhältnis der Signale bei $g = 2.0$ und $g \geq 4.1$, das sich durch die Zugabe von kleinen Molekülen wie Ethanol, Methanol oder Ammoniak beeinflussen lässt.^[2g,j,3a] Diese spektroskopische Beobachtung ist weniger überraschend und sogar auf atomarer Basis verständlich, wenn die hier vorgestellte Änderung der Koordinationssphäre und Oxidationsstufe des für Lösungsmittel leicht zugänglichen Mn4 entlang der Isomerisierungscoordinate berücksichtigt wird.^[2g,j,3a]

Außer für die Elektronenstruktur haben die Resultate auch Implikationen für Substrataustausch- und Wasseroxidations-Mechanismen. Beide Modelle zeigen lokalisierte Valenzelektronen mit einer offenen Koordinationsstelle, die wahrscheinlich ein zusätzliches Wassermolekül aufnehmen kann. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass durch die isoenergetische Natur von **B** relativ zu **A** der S₂-S₃-Übergang über mehrere Reaktionswege ablaufen kann. Dies wäre mit einem kürzlich für diesen Übergang präsentierten Mechanismus kompatibel,^[26] der ein zusätzliches Wassermolekül an Mn1 in **A** bindet, aber im Prinzip weitere Möglichkeiten lässt, falls eine nur aus **B** ableitbare Struktur im S₃-Zustand vorliegt. Die offene Koordinationsstelle auf der Mn^{III}-pseudo-Jahn-Teller-Achse in **A** und **B** ist ein zwangsläufiges Ergebnis der Energieminimierung der photoreduzierten Kristallstruktur und erscheint als fundamentales Strukturelement des S₂-Zustands des OEC bei katalytischen Temperaturen. Koordinativ ungesättigte Mn-Ionen wurden schon bei einer Reihe von Manganoxiden als Voraussetzung für katalytische Aktivität identifiziert.^[27]

In Bezug auf den Wasserspaltungsmechanismus stützen unsere Resultate die mögliche Identifikation eines der Wassersubstrate. Es wurde schon vermutet, dass die O5- μ -Oxo-

Brücke austauschbar ist und möglicherweise eines der beiden O-Atome ist, die im S₄-Zustand das O₂-Molekül bilden. Diese beiden Substratmoleküle des OEC weisen sehr unterschiedliche Bindungskinetiken auf.^[28] Das früh gebundene, langsam austauschende Substrat (genannt W_{slow}) ist wahrscheinlich an das OEC-Zentrum koordiniert, möglicherweise sogar als Oxoligand des Mn₄O₅Ca-Clusters. Die Bindungskinetik des schnell austauschenden Substrats (W_{fast}) ist bis zum S₃-Zustand unbekannt, woraus geschlussfolgert werden kann, dass es vor der O-O-Bindungsknüpfung nur leicht mit dem OEC assoziiert ist. Eine wichtige Beobachtung für W_{slow} ist, dass es in allen S-Zuständen austauschbar ist. Der langsamste Austausch ist mit einer Halbwertszeit von Sekunden relativ schnell, anders als bei allen anderen bekannten Komplexen mit Mn^{III/IV}-Ionen, die insgesamt viel niedrigere Austauschgeschwindigkeiten der μ -Oxo-Brücken mit dem Lösungsmittel zeigen (Halbwertszeiten bei 10⁴–10⁵ s).^[29] Demnach muss das OEC ein Strukturelement aufweisen, das in den Modellkomplexen nicht vorhanden ist, damit in S₁/S₂ eine μ -Oxo-Brücke als Substrat betrachtet werden kann. Die vorliegende Studie bietet einen neuen Ansatz, mit dem diese unvereinbaren Beobachtungen verknüpft werden können: Die leichte Konversion zwischen den beiden geometrischen Formen **A** und **B** durch die einfache Verschiebbarkeit des O5-Liganden ist ein wichtiger Faktor für den Substrataustausch im S₂-Zustand. Diese große molekulare Bewegung, die in Modelldimeren nicht vorhanden ist, könnte für den beschleunigten Brückenaustausch mit umgebenden OH[–]/H₂O Liganden oder Lösungsmittel sorgen. Wir führen derzeit experimentelle und theoretische Studien durch, um diese These zu überprüfen.

Eingegangen am 15. Juni 2012

Online veröffentlicht am 21. August 2012

Stichwörter: Dichtefunktionalrechnungen · EPR-Spektroskopie · Photosystem II · Wasseroxidase · Wasserspaltung

- [1] B. Kok, B. Forbush, M. McGloin, *Photochem. Photobiol.* **1970**, *11*, 457–475.
- [2] a) A. Haddy, *Photosynth. Res.* **2007**, *92*, 357–368; b) G. C. Dismukes, Y. Siderer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 274–278; c) O. Hansson, L. E. Andreasson, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1982**, *679*, 261–268; d) J. C. De Paula, G. W. Brudvig, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2643–2648; e) W. F. Beck, J. C. De Paula, G. W. Brudvig, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4018–4022; f) D. W. Randall, B. E. Sturgeon, J. A. Ball, G. A. Lorigan, M. K. Chan, M. P. Klein, W. H. Armstrong, R. D. Britt, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11780–11789; g) J. M. Peloquin, K. A. Campbell, D. W. Randall, M. A. Evanchik, V. L. Pecoraro, W. H. Armstrong, R. D. Britt, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10926–10942; h) M.-F. Charlot, A. Boussac, G. Blondin, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2005**, *1708*, 120–132; i) L. V. Kulik, B. Epel, W. Lubitz, J. Messinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13421–13435; j) 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, J. Messinger, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2011**, *1807*, 829–840; k) 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, J. Messinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3635–3648.

- [3] a) A. Haddy, K. V. Lakshmi, G. W. Brudvig, H. A. Frank, *Bioophys. J.* **2004**, *87*, 2885–2896; b) P. J. Smith, R. J. Pace, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1996**, *1275*, 213–220; c) A. Boussac, J.-J. Girerd, A. W. Rutherford, *Biochemistry* **1996**, *35*, 6984–6989; d) A. Boussac, S. Un, O. Horner, A. W. Rutherford, *Biochemistry* **1998**, *37*, 4001–4007; e) A. Boussac, H. Kuhl, S. Un, M. Rögner, A. W. Rutherford, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8995–9000; f) J. M. Peloquin, R. D. Britt, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2001**, *1503*, 96–111.
- [4] Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, *Nature* **2011**, *473*, 55–60.
- [5] a) A. Zouni, H. T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger, P. Orth, *Nature* **2001**, *409*, 739–743; b) N. Kamiya, J.-R. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 98–103; c) K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, S. Iwata, *Science* **2004**, *303*, 1831–1838; d) B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, J. Biesiadka, *Nature* **2005**, *438*, 1040–1044.
- [6] a) Y. Pushkar, J. Yano, K. Sauer, A. Boussac, V. K. Yachandra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 1879–1884; b) H. Dau, A. Grundmeier, P. Loja, M. Haumann, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2008**, *363*, 1237–1243.
- [7] A. Grundmeier, H. Dau, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2012**, *1817*, 88–105.
- [8] a) S. Luber, I. Rivalta, Y. Umena, K. Kawakami, J. R. Shen, N. Kamiya, G. W. Brudvig, V. S. Batista, *Biochemistry* **2011**, *50*, 6308–6311; b) W. Ames, D. A. Pantazis, V. Krewald, N. Cox, J. Messinger, W. Lubitz, F. Neese, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19743–19757; c) A. Galstyan, A. Robertazzi, E. W. Knapp, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7442–7449.
- [9] 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, V. K. Yachandra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12047–12052.
- [10] A. Robertazzi, A. Galstyan, E. W. Knapp, *CrystEngComm* **2011**, *13*, 6369–6372.
- [11] P. E. M. Siegbahn, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 3274–3280.
- [12] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104–154119.
- [13] E. van Lenthe, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.* **1994**, *101*, 9783–9792.
- [14] D. A. Pantazis, X. Y. Chen, C. R. Landis, F. Neese, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 908–919.
- [15] F. Neese, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 73–78.
- [16] a) P. E. M. Siegbahn, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 8290–8302; b) P. E. M. Siegbahn, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1871–1880.
- [17] J. Barber, J. W. Murray, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2008**, *363*, 1129–1137.
- [18] a) D. A. Pantazis, M. Orio, T. Petrenko, S. Zein, E. Bill, W. Lubitz, J. Messinger, F. Neese, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 5108–5123; b) D. A. Pantazis, M. Orio, T. Petrenko, S. Zein, W. Lubitz, J. Messinger, F. Neese, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 6788–6798.
- [19] D. A. Pantazis, V. Krewald, M. Orio, F. Neese, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 4959–4967.
- [20] S. Mukherjee, J. A. Stull, J. Yano, T. C. Stamatatos, K. Pringouri, T. A. Stich, K. A. Abboud, R. D. Britt, V. K. Yachandra, G. Christou, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 2257–2262.
- [21] J. S. Kanady, E. Y. Tsui, M. W. Day, T. Agapie, *Science* **2011**, *333*, 733–736.
- [22] D. H. Kim, R. D. Britt, M. P. Klein, K. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9389–9391.
- [23] P. Faller, C. Goussias, A. W. Rutherford, S. Un, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8732–8735.
- [24] S. Petrie, R. Stranger, P. Gatt, R. J. Pace, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 5082–5089.
- [25] M. Kusunoki, *J. Photochem. Photobiol. B* **2011**, *104*, 100–110.
- [26] P. E. M. Siegbahn, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 4849–4856.
- [27] I. Zaharieva, M. M. Najafpour, M. Wiechen, M. Haumann, P. Kurz, H. Dau, *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4*, 2400–2408.
- [28] W. Hillier, J. Messinger, T. Wydrzynski, *Biochemistry* **1998**, *37*, 16908–16914.
- [29] R. Tagore, H. Chen, R. H. Crabtree, G. W. Brudvig, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9457–9465.