

# 1 Einleitung

Die hohe Quanteneffizienz der Photosynthese bei der Bereitstellung elektrochemischer Energie hängt eng mit der Struktur der Proteinkomplexe zusammen, innerhalb derer der Primärprozeß, ein lichtinduzierter Elektronentransfer von einem Donator- zu einem Akzeptormolekül, stattfindet. Ziel meiner Arbeit ist, zur Aufklärung des Struktur-Funktionszusammenhangs der beteiligten Elektronentransferprozesse beizutragen. Dazu werden Strukturuntersuchungen an biomimetischen Modellsystemen durchgeführt. Als Methode wird die zeitaufgelöste Elektronenspinresonanz (transient EPR, TREPR) bei mittleren Magnetfeldern (0.34 T/9.5 GHz, X-Band) und hohen Magnetfeldern (3.4 T/95 GHz, W-Band) an den lichtinduzierten spinkorrelierten Radikalpaarzuständen der Modellsysteme angewandt. Für eine konsistente Beschreibung der zeitaufgelösten EPR-Messungen an den Radikalpaarzuständen bei mittleren und hohen Feldern muß das Modell für Correlated-Coupled-Radical-Pair (CCRP) um den Effekt anisotroper Spin-Gitter-Relaxation und starker Modulation der Austauschwechselwirkung erweitert werden. Um die Auflösung der experimentellen Methode an den Radikalpaarzuständen unorientierter Pulverproben zu erhöhen, wird die Hochfeld-EPR mit stochastischer Mikrowellenanregung entwickelt.

In den Reaktionszentren der Photosynthese und in den biomimetischen Modellsystemen findet nach Lichtanregung ein Elektronentransfer statt. In dem resultierenden Radikalpaarzustand sind zwei ungepaarte Elektronen auf verschiedenen Untereinheiten lokalisiert. Da ihre Spins eine magnetische Wechselwirkung aufeinander ausüben, werden sie spinkorrelierte Radikalpaarzustände genannt.

Im allgemeinen sind spinkorrelierte Radikalpaare bei chemischen Reaktionen ein Zwischenzustand vor der Dissoziation zu freien Radikalen. Zur Untersuchung der Reaktionsprodukte ist zeitaufgelöste EPR gut geeignet, da sie im Gegensatz zu optischen Methoden zwischen freien und korrelierten Radikalen unterscheiden kann. Bei frei diffundierenden Radikalen bewirkt die Modulation der abstandsabhängigen magnetischen Kopplung eine Elektronenspinpolarisation, d. h. eine Abweichung der Besetzungszahlen für die verschiedenen Energieniveaus von der des thermischen Gleichgewichts. Sie wird mit zeitaufgelöster EPR an den dissoziierten freien Radikalen nachgewiesen (Chemically-Induced-Dynamic-Electron-Polarization, CIDEP). Der zugrunde liegende Polarisationsmechanismus ist in der Literatur als Radikalpaarmechanismus (RPM) beschrieben [1, 2]. Ein

anderer wichtiger Polarisationsmechanismus ist der Triplett-Mechanismus (TM) [3, 4, 5]. Er tritt auf, wenn das Radikalpaar aus einem Triplettzustand, der durch Inter-System-Crossing aus dem angeregten Singulettzustand selektiv bevölkert wird, entsteht. Die Spinpolarisation wird auf das Radikalpaar übertragen, wenn der Elektronentransfer schneller erfolgt als durch Spin-Gitter-Relaxation die Polarisation zerstört wird.

1980 entdeckten Thurnauer und Norris [6] an photosynthetischen Algen eine Phasenverschiebung des Elektronenspinechos. Sie erklärten den Effekt damit, daß sich das System während des ersten Mikrowellenpulses noch in korreliertem Zustand befand und die Elektronenspinpolarisation eines Correlated-Coupled-Radical-Pairs (CCRP) trug. 1987 wurden CCRPs direkt beobachtet. Closs et al. [7] und Buckley et al. [8] erklärten die Polarisation, die kurz nach der Lichtanregung bei Radikalpaaren in Mizellen mit EPR detektiert wurde, mit dem CCRP-Modell, das in der Literatur auch unter dem Namen Spin-Correlated-Radical-Pair (SCRIP) Modell zu finden ist.

Die von Closs und Buckley beobachteten Radikale können zuerst in der Mizelle frei diffundieren und nach einiger Zeit aus der Mizelle entweichen. Im Gegensatz dazu sind die Radikalpaare, die in photosynthetischen Reaktionszentren nach Lichtanregung entstehen durch die Proteinmatrix, in die die Reaktionszentren eingebettet sind, fixiert. Es zeigte sich, daß sich das Radikalpaar des in die Proteinmatrix eingebetteten primären Donators mit dem sekundären Akzeptor der Elektronentransferkette photosynthetischer Reaktionszentren durch das CCRP-Modell gut beschreiben läßt [9]. Durch Simulation der spinpolarisierten Spektren konnten Strukturaussagen bezüglich der relativen Orientierung und des Abstands von Donator und Akzeptor gewonnen werden [10, 11]. Je höher das angelegte Magnetfeld ist, bei dem die zeitaufgelösten EPR-Messungen durchgeführt werden, desto besser werden die spektralen Anteile des Chinon-Akzeptors von denen des Chlorophyll-Donators getrennt, da die lokale magnetische Wechselwirkung ( $\bar{G}$ -Tensor) der beiden Elektronen magnetfeldabhängig ist, die Spin-Spin Kopplung jedoch nicht vom Magnetfeld abhängt. Deshalb konnte durch zeitaufgelöste W-Band-EPR-Messungen die Genauigkeit und Eindeutigkeit der Strukturaussagen erhöht werden [12, 13].

In den beobachteten spinkorrelierten Radikalpaaren der photosynthetischen Reaktionszentren und der Radikale in den Mizellen sind die beteiligten Elektronenspins nur schwach gekoppelt. Schwache Kopplung bedeutet, daß die elektronische Dipol-Dipol-Kopplung und die Austauschwechselwirkung klein gegenüber den sonstigen lokalen Wechselwirkungen der Elektronenspins wie Elektron-Zeeman- und Hyperfeinwechselwirkung sind. Hore und Hunter [14] unterscheiden

dagegen in einer theoretischen Studie über Radikalpaare in Mizellen drei prinzipiell beobachtbare Fälle, abhängig von dem Abstand der beiden Radikale: stark wechselwirkende (SI) Radikalpaare, schwach wechselwirkende (WI) Radikalpaare und nicht wechselwirkende (NI) Radikalpaare. Closs und Forbes [15] beobachteten an lichtangeregten flexiblen Acylalkyl Biradikalen in Lösung ein Radikalpaar, das zwar eine große Austauschwechselwirkung hat, für dessen Spinpolarisation jedoch immer noch eine durch große Hyperfeinstrukturwechselwirkung induzierte Mischung zwischen dem Singulett und allen drei Triplettzuständen verantwortlich ist. Diese Systeme sind deshalb eher im Übergangsbereich zu stark gekoppelten Systemen einzuordnen.

Die Arbeiten an Radikalpaaren (RP) sind zur Darstellung der Systematik in einem Schema geordnet, bei dem links diffundierende und rechts nicht diffundierende Radikalpaare dargestellt sind.

diffundierende Systeme		nicht diffundierende Systeme	
NI	in Lösung diffundierende RP		
WI/NI	in Mizellen kurzzeitig festgehaltene RP	WI	in Proteinmatrix in festem Abstand fixierte RP in Reaktionszentren
(SI)	Acylalkyl Biradikale	SI	kovalent verknüpfte Modellsysteme mit kurzem Abstand

Dabei ordnen sich die in meiner Arbeit untersuchten RP an kovalent verknüpften Modellsystemen als weiteres Glied ein. Mit den Modellsystemen wird in dieser Arbeit also direkt die Spindynamik des stark gekoppelten Radikalpaarzustandes untersucht, der bei den meisten anderen untersuchten Radikalpaaren zu schnell durch Diffusion oder weiteren Elektronentransfer zerfällt.

Meine Arbeit trägt in drei Feldern auf dem Gebiet der Strukturuntersuchung an den Radikalpaarzuständen bei:

1. In den stark gekoppelten, nicht diffundierenden Radikalpaaren ist die Elektronenspinpolarisation in besonderem Maße von Relaxationseffekten und Modulation der Austauschwechselwirkung bestimmt, deren Rolle deshalb eingehender untersucht werden muß.
2. Es wird die Spindynamik an den nicht diffundierenden, stark gekoppelten Modellsystemen für die photosynthetischen Reaktionszentren untersucht und diskutiert, welche Strukturaussagen getroffen werden können.
3. Die Entwicklung der stochastischen Hochfeld-EPR dient der genaueren

Strukturuntersuchung an den nicht diffundierenden, schwach gekoppelten Radikalpaaren der photosynthetischen Reaktionszentren.

Im folgenden werden diese drei Punkte und die Struktur der vorliegenden Arbeit erläutert.

## 1. Stark gekoppelte Radikalpaare mit schneller Spin-Gitter-Relaxation

In der Arbeit von Hore und Hunter werden Spin-Gitter ( $T_1$ )-Relaxationseffekte nicht berücksichtigt. Die Autoren nehmen an, daß die Elektronenspinpolarisation der stark wechselwirkenden diffundierenden Radikalpaare während des Diffusionsprozesses in Phasen schwacher Wechselwirkung durch  $ST_0$ -Mischung erzeugt wird.

Kanter et al. [16, 17] untersuchten dagegen systematisch den Einfluß der Modulation verschiedener elektronischer Wechselwirkungen auf die Relaxationspfade zwischen den vier elektronischen Niveaus in einem CCRP. Die Modulation von lokalen Wechselwirkungen, die für die beiden Elektronenspins verschieden sind, führt zu Übergängen zwischen allen Niveaus. Die Modulation der Austauschwechselwirkung führt dagegen nur zwischen dem S und  $T_0$  Zustand zu  $T_1$ -Relaxation. In Zusammenhang mit der Rekombinationswahrscheinlichkeit [18] und der Polarisation in Chemically-Induced-Dynamic-Nuclear-Polarization (CIDNP) Experimenten [19] für diffundierende Radikalpaare wurde das explizit berechnet. Für CIDEP an schwach gekoppelten Radikalpaaren mit langsamer Rekombination wurden Relaxationseffekte von Shushin [20] mit berücksichtigt. Für die lichtangeregten Biradikale in Lösung wurde die korrelierte  $T_1$ -Relaxation von Closs und Forbes [15], die unkorrelierte Relaxation von Avdievich und Forbes [21, 22] zur Analyse herangezogen. In diesen Systemen wird die beobachtete Spinpolarisation jedoch primär durch kohärente, von Hyperfeinstruktur induzierter Mischung erzeugt.

In den in meiner Arbeit untersuchten Modellsystemen tragen die bisher diskutierten Mechanismen nicht oder nur wenig zur Elektronenspinpolarisation bei. In **Kap. 2.4** wird deshalb ein Modell entwickelt, das unter Berücksichtigung von anisotropen Relaxationseffekten zusammen mit schneller Elektronenrekombination die Elektronenspinpolarisation in den stark gekoppelten, nicht diffundierenden Radikalpaaren der Modellsysteme beschreibt. Mit Hilfe dieses Modells können aus den experimentellen Ergebnissen Strukturaussagen gewonnen werden.

In **Kap. 2.5** wird ein allgemeineres Modell diskutiert, bei dem eine Lösung der stochastischen Liouville Gleichung für den Spezialfall gegeben wird, daß die Aus-

tauschwechselwirkung mit großer Amplitude durch Molekülbewegung in einem Potential moduliert wird. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Modellen [1, 2, 23] besteht hier eine untere Grenze für den absoluten Wert der Austauschwechselwirkung. Dadurch sind die Systeme durchgehend stark gekoppelt und die Singulett-Triplett-Mischung findet in ganz anderer Form statt. Hier wurden die Arbeiten von Salikhov und Schlüpmann [24] in enger Zusammenarbeit mit A. Osintsev, der insbesondere die analytischen Rechnungen durchgeführt hat, fortgeführt.

## 2. Strukturuntersuchung an kovalent verknüpften Porphyrin-Chinon-Modellsystemen

Neben den natürlichen Photosystemen werden seit einigen Jahren vereinfachte Modellsysteme für lichtinduzierten Elektronentransfer untersucht. Sessler [25] unterscheidet dabei zwei Wege: Zum einen wird versucht, mit einem mechanistischen Ansatz zu verstehen, wie der Elektronentransfer und die Photosynthese auf molekularer Ebene funktionieren. Zum anderen wird der Versuch gemacht, die Funktion der photosynthetischen Reaktionszentren zu modellieren und effizient einen ladungstrennten Zustand zu erzeugen, der wie in der Photosynthese für weitere Zwecke nutzbar ist. Bei dem mechanistischen Ansatz wird oft mit biomimetischen Modellsystemen gearbeitet, bei denen Porphyrine, und Chinone benutzt werden, die den Bacteriochlorophyll-Donatoren und Chinon-Akzeptoren der natürlichen Photosynthesysteme strukturell ähnlich sind. Zu diesem Themenbereich existieren umfangreiche Übersichtsartikel [26, 27, 28, 29, 30, 31].

Die im Rahmen meiner Arbeit mit EPR untersuchten und in der Arbeitsgruppe von Professor H. Kurreck (Institut für Organische Chemie, FU Berlin) entwickelten Porphyrin- (P) Chinon- (Quinone, Q) Modellsysteme folgen in erster Linie dem mechanistischen Ansatz. In Abb. 1.1 ist eines der Dyadensysteme gezeigt, bei dem ein Porphyrin über eine Cyclohexylenbrücke kovalent mit einem Trimethylchinon verbunden ist. Nach Lichtanregung des Porphyrins in den angeregten Singulettzustand  $P^{S1}$  findet ein Elektronentransfer zum Chinon statt, so daß sich im ladungstrennten Zustand ein ungepaartes Elektron auf dem dann einfach positiven  $P^+$  und eines auf dem einfach negativen  $Q^-$  befindet. Der mechanistische Ansatz zeichnet sich dadurch aus, daß gezielt einzelne Parameter des Donator-Akzeptor-Systems variiert und ihr Einfluß auf den Elektronentransfer untersucht werden. Dabei sind folgende Modifikationen durchgeführt worden:

- die Redoxpotentiale und elektronische Struktur von Porphyrin und Chinon wurden durch Substituenten variiert

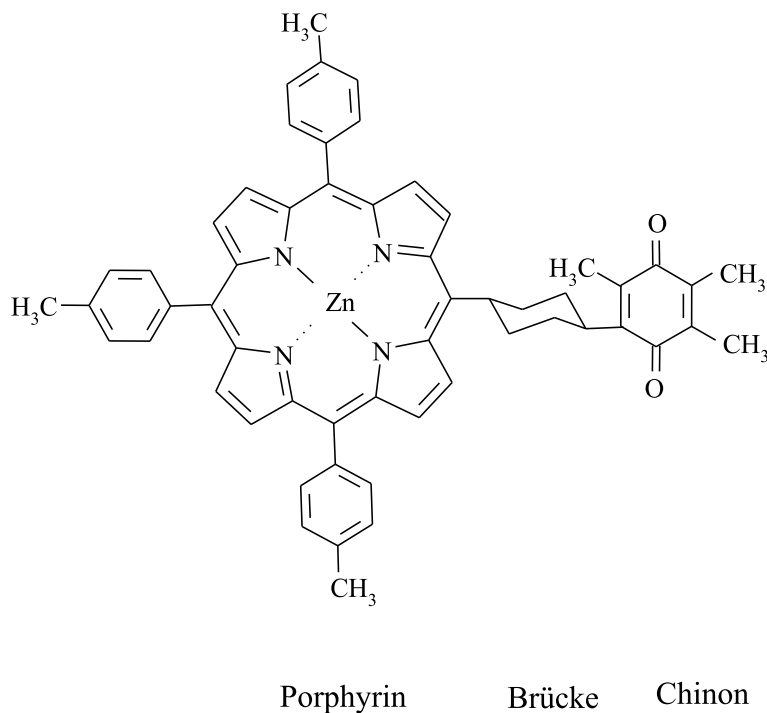


Abbildung 1.1: Modellsystem für photosynthetische Reaktionszentren: Porphyrin-*trans*Cyclohexylen-Trimethylchinon Dyade (P-*trans*CH-TMQ).

- die Beweglichkeit des Chinons wurde durch Substituenten variiert
- es wurden verschiedene Brücken eingebaut. Dadurch werden die Abstände und die elektronische Kopplung variiert.
- es wurden Triadensysteme synthetisiert, bei denen ein weiterer Elektronenakzeptor in größerer Entfernung zur Verfügung steht.

Am Ende der Studie soll ein Tetradensystem stehen, das mit einer dreistufigen Elektronentransferkette zu einem langlebigen ladungstrennten Zustand führt.

Der Ansatz meiner Arbeit war, den Einfluß der Molekülgeometrie auf den Ladungstransfer zu untersuchen. Das wurde insbesondere aktuell, als es Fajer et al. [32] gelungen war, mit Röntgenstrukturanalyse die Struktur des elektronischen Grundzustandes einiger Porphyrin-Chinon-Systeme zu untersuchen. Es stellte sich dann die Frage, ob es an diesen Systemen möglich ist, mit zeitaufgelöster Hochfeld-EPR wie bei den natürlichen Reaktionszentren die relative Orientierung von Donator- und Akzeptor-Molekül im ladungstrennten Zustand mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Damit wären Aussagen über eine eventuelle Umorientierung der Moleküle während des Ladungstransfers und deren Funktion auf eine Stabilisierung des ladungstrennten Zustandes möglich. Es zeigte sich jedoch bald, daß, anders als in den natürlichen Reaktionszentren, die beiden Elektronenspins der PQ-Radikalpaare stark gekoppelt sind und eine schnelle Elektronenrekombination und Spin-Gitter-Relaxation aufweisen, durch die die Form und Dynamik der Spektren bestimmt werden. Mit dem in **Kap. 3** vorgestellten

Modell für stark gekoppelte CCRP mit schneller  $T_1$ -Relaxation können die experimentellen Ergebnisse analysiert werden. Die daraus gewonnenen Informationen über die Struktur und insbesondere Moleküldynamik werden dann in **Kap. 4** diskutiert.

Wichtig für die Interpretation der zeitaufgelösten Hochfeld-EPR Messungen sind die umfangreichen X-Band-EPR-Arbeiten aus dem Kooperationsprojekt der Arbeitsgruppen von Prof. H. Kurreck, Prof. H. Levanon (Dep. Phys. Chem., Hebrew University of Jerusalem) und unserer AG von Prof. K. Möbius. Die Ergebnisse dieser ersten EPR-Arbeiten von F. Lenzian, J. Schlüpmann und K. Hasharoni [33, 34, 35, 36, 37, 24] werden in **Kap. 3.1** zusammengefaßt.

Meine Arbeit zu den PQ-Systemen und zu der Elektronenspinpolarisation in stark gekoppelten Radikalpaaren fand in enger Kooperation mit G. Elger, E. Johnen, M. Fuchs, J. Vriese und A. Osintsev statt. Ein besonders enger Zusammenhang besteht mit der Dissertation von G. Elger [38]. In seiner Arbeit findet sich eine vergleichende Untersuchung an vielen modifizierten PQ-Systemen mit cw- und gepulster zeitaufgelöster X-Band-EPR. Die interne Arbeitsteilung ergibt sich einerseits aus dem Konzept der weit angelegten Porphyrin-Chinon-Studie und andererseits aus den technischen Herausforderungen der Hochfeld-EPR. Das Konzept verlangt, daß eine große Anzahl an modifizierten Systemen untersucht und so genau wie möglich charakterisiert wird. Andererseits sind die Hochfeld-EPR-Messungen sehr zeitaufwendig und nur im Zusammenhang mit dem entwickelten Modell aussagekräftig, so daß für meine Arbeit eine enge Auswahl an Systemen getroffen und die Modellentwicklung vorangetrieben werden mußte.

### **3. Hochfeld-EPR mit stochastischer Mikrowellenanregung**

Im dritten Teil wird eine experimentelle Entwicklung vorgestellt, die direkt für die Untersuchung der schwach gekoppelten Radikalpaarzustände der natürlichen Photosynthesysteme interessant ist (**Kap. 5 - 7**).

Das Problem ist, daß die meisten Proben als ungeordnete Pulverproben vorliegen. Die Spektren entstehen deshalb aus der nicht aufgelösten Überlagerung der Einzelspektren von Molekülen aller möglichen Orientierungen zum äußeren Magnetfeld. Das erschwert die Interpretation und reduziert die Genauigkeit und Eindeutigkeit der getroffenen Aussagen, die in der Regel durch Simulation der Linienform gewonnen werden. Im Rahmen des Promotionsvorhabens stellt die Untersuchung teilgeordneter Filme des photosynthetischen Reaktionszentrums PS I zusammen mit A. Schnegg eine Möglichkeit dar, das Problem anzugehen. Für die Ergebnisse daran sei auf die Diplomarbeit von A. Schnegg verwiesen [39]. Die Entwicklung der stochastischen EPR ist ein anderer Ansatz, um den Informati-

onsgelalt bei Messungen an unorientierten Pulverproben zu erhöhen.

Die von der Kernspinresonanz (NMR) bekannte Correlation-Spectroscopy (COSY) [40, 41] kann zur Auflösung der Beiträge unterschiedlicher Orientierungen in den unorientierten Pulverproben angewandt werden. COSY ist eine Fourier-Transformations-Methode (FT-Methode), bei der die Antwort des Spinsystems auf eine zeitabhängige Anregung in der Zeitdomäne aufgenommen und dann fouriertransformiert wird.

Bei der FT-EPR (bzw. NMR) werden in der Regel zur Anregung des Spinsystems breitbandige Pulse benutzt, die aus einer kohärenten Überlagerung der benötigten Frequenzkomponenten bestehen. Im einfachsten Experiment wird das Spinsystem mit einem Puls angeregt und die darauffolgende Impulsantwort als Free-Induction-Decay (FID) gemessen. Die Empfindlichkeit ist gegenüber der konventionellen Continuous-Wave-EPR (cw-EPR) durch den Multiplex-Effekt erhöht. Mit Mehrpulsexperimenten wie dem COSY-Experiment werden nicht-lineare Anteile an der Signalantwort abgefragt.

Die Anwendung von FT-EPR im Hochfeld bei 95 GHz ist momentan noch Utopie. Wegen der begrenzten Leistung der Mikrowellenquellen sind die erzeugten Pulse in der Regel nicht breitbandig genug, die Spinsysteme der untersuchten Proben über ihren gesamten spektralen Bereich anzuregen. Der spektrale Bereich des sekundären Radikalpaares eines Photosystems erstreckt sich beispielweise über ca. 280 MHz oder 10 mT. Um es vollständig anzuregen, ist eine Pulslänge von ca. 4 ns notwendig. Die erforderliche Mikrowellenleistung bei den bestehenden Aufbauten ist 10 W am Resonator, wozu die Leistung der Quelle ca. 40 W betragen muß.

Um diese Schwierigkeit anzugehen, wird in dieser Arbeit mit der Entwicklung der stochastischen Hochfeld-EPR begonnen. Das Spinsystem wird mit inkohärenter breitbandiger Mikrowelleneinstrahlung („Rauschen“) angeregt. Die Signalantwort ist mit der Anregung korreliert und durch Kreuzkorrelation von Anregungs- und Antwortfunktion erhält man die Impulsantwortfunktion, die gleich dem FID ist. Ernst [42] und Kaiser [43] wandten diese Methode zuerst in der NMR an und zeigten, daß unter optimalen Bedingungen die Empfindlichkeit gleich der der Puls-FT-EPR ist. Dadurch, daß die Mikrowellenleistung über den gesamten Zeitbereich verteilt ist, ist die benötigte absolute Leistung jedoch kleiner als bei der Puls-FT-EPR. Lee et al. [44] zeigten, wie Kreuzkorrelationen höherer Ordnung die nichtlinearen Systemantworten ergeben. Diese Methode wurde von Blümich und Ziessow weiterentwickelt und zur mehrdimensionalen NMR eingesetzt. Referenzen dazu finden sich in dem Übersichtsartikel von Blümich [45]. X-Band-EPR (9.5 GHz) mit stochastischer Anregung wurde von Prisner et al. [46, 47] ent-



wickelt.

Es ist absehbar, daß mit den vorhandenen technischen Möglichkeiten auch die stochastische EPR nicht alle Vorteile bringt, die theoretisch vorhergesagt werden. Zum Beispiel stellt die Aufnahme der hochfrequenten Signalantwort in der Zeitdomäne eine große Schwierigkeit dar. Durch den begrenzten Duty-Cycle des Digitaloszilloskops geht ein großer Teil der Meßzeit und damit der Empfindlichkeit verloren. Die Limitationen sind aber abhängig von dem genauen Experiment und müssen im einzelnen diskutiert werden.

Ziel dieses Teils meiner Arbeit ist deshalb, die stochastische W-Band-EPR mit den vorhandenen technischen Möglichkeiten zu verwirklichen und das Potential der Methode für die Hochfeld-EPR abzuschätzen. Nach der Einführung in die stochastische Magnetische-Resonanz in **Kap. 5** werden in **Kap. 6** der Aufbau und die Messungen an Testproben vorgestellt. In **Kap. 7.1** werden die experimentellen Ergebnisse in Hinblick auf die Empfindlichkeit der eindimensionalen stochastischen Hochfeld-EPR diskutiert. In **Kap. 7.2** wird abgeschätzt, ob eine Anwendung der stochastischen EPR auf transiente Zustände, wie z.B. den sekundären Radikalkpaarzustand des PS I, möglich ist und ob ein COSY-Experiment mit Erfolg durchgeführt werden kann.