

Kapitel 2

Theorie und Experimentelles

In diesem Kapitel sollen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verfahren erläutert werden. Im ersten Teil werden die theoretischen Grundlagen der magnetischen Resonanz und die verwendeten Experimente dargestellt. Vollständige Darstellungen der Methodik sind in Standardwerken [13, 14] ausgeführt. Im zweiten Teil sind Details der Experimente (Spektrometer und Probenpräparation) sowie die Auswertung der Meßergebnisse beschrieben.

2.1 Der Hamiltonoperator

Die Energie eines Systems wird durch dessen vollständigen Hamiltonoperator beschrieben. Zur Berechnung von Untersuchungen an Spinsystemen müssen nur die energetisch relevanten Terme berücksichtigt werden. Die Terme des resultierenden, statischen Spinhamiltonoperators,

$$\hat{H} = \sum_i \hat{H}_i^Z + \sum_j \hat{H}_j^{nZ} + \sum_{i,j} \hat{H}_{i,j}^{\text{hf}} + \sum_{(i-1)!} \hat{H}_i^{\text{dip}} + \sum_{(i-1)!} \hat{H}_i^{\text{ex}} \quad (2.1)$$

für i Elektronen und j Kerne, die für diese Arbeit von Relevanz sind, werden im Folgenden kurz erläutert.

2.1.1 Wechselwirkungen der Elektronenspins

Der Elektron-Zeeman Hamiltonoperator

$$\hat{H}_i^Z = \beta \vec{S}_i \cdot g_i \cdot \vec{B} \quad (2.2)$$

Der Elektron-Zeeman Hamiltonoperator \hat{H}_i^Z beschreibt die Energie des magnetischen Moments $\vec{\mu}_i$ eines Elektronenspins \vec{S}_i in einem äußeren Magnetfeld \vec{B} .

Der Operator enthält die g -Matrix, welche die Orientierungsabhängigkeit des effektiven g -Wertes bestimmt. Die Abweichung der g -Matrix vom isotropen g -Wert $g_e (= 2.0023\dots)$ eines freien Elektrons beschreibt die Kopplung des Spins mit dem Bahndrehimpuls und ist so mit der elektronischen Struktur der Umgebung und der Molekülstruktur direkt verknüpft.

Die dipolare Wechselwirkung

$$\hat{H} = \frac{\mu_0}{2h} g_i g_j \left(\frac{\vec{\mu}_i \vec{\mu}_j}{r_{ij}^3} - \frac{3(\vec{\mu}_i \vec{r}_{ij})(\vec{\mu}_j \vec{r}_{ij})}{r_{ij}^5} \right) \quad (2.3)$$

Der Hamiltonoperator der dipolaren Wechselwirkung \hat{H}^{dip} beschreibt die Energie eines magnetischen Moments im Feld eines anderen Elektronenspins, wobei die Spins aufgrund räumlicher Entfernung als Punkt-Dipole angenähert werden. Er leitet sich aus der räumlichen Verteilung eines magnetischen Dipolfeldes [15] ab und zeigt für Punkt-Dipole eine axiale Symmetrie, deren Hauptachse die Spin-Spin Verbindungsachse bildet. In der Hochfeldnäherung ($h\nu_{\text{mw}} \gg h\nu_{\text{dip}}$) können Terme, die nicht entlang der Hauptachse quantisiert sind, vernachlässigt werden und es ergibt sich

$$\hat{H} = \frac{1}{r_{ij}^3} \cdot \frac{\mu_0}{2h} g_i g_j \mu_B^2 (3 \cos^2 \vartheta - 1). \quad (2.4)$$

Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zeigt eine Abstandsabhängigkeit mit r^{-3} und kann daher zur Bestimmung von Abständen zwischen magnetischen Dipolen herangezogen werden.

In Systemen mit mehr als einem ungepaarten Elektron können die Spins zu einem Gesamtspin $\vec{S} = \sum \vec{S}_i$ koppeln. Zur Berechnung der dipolaren Kopplung wird die räumliche Verteilung der magnetischen Momente integriert. Die dipolare Wechselwirkung der einzelnen Elektronenspins führt zu einer Aufspaltung der Subniveaus des Gesamtspins \vec{S} bereits im Nullfeld, die sich im Nullfeldtensor D zusammenfassen lässt.

$$\begin{aligned} \hat{H}^{\text{dip}} &= \vec{S} \cdot D \cdot \vec{S} \\ &= D \left[S_z^2 - \frac{1}{3} S(S+1) \right] + E(S_x^2 - S_y^2) \end{aligned} \quad (2.5)$$

Bei nicht-kubischer Symmetrie wird die $(2S+1)$ -fache Entartung des Grundzustands auch ohne Feld aufgehoben.

Die Austauschwechselwirkung

$$\hat{H}^{\text{ex}} = -2 \sum_{i < j} J_{ij} \vec{S}_i \vec{S}_j \quad (2.6)$$

Der Hamiltonoperator der Austauschwechselwirkung \hat{H}^{ex} setzt sich zusammen aus der klassischen elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den Spins, welche durch das Coulombgesetz beschrieben wird. Der quantenmechanische Anteil ist eine Konsequenz des Pauli-Prinzips, nach dem die Gesamtwellenfunktion eines fermionischen Mehrteilchensystems antisymmetrisch gegen Austausch von Teilchen sein muß. Direkter Austausch findet statt, wenn zwei Elektronen im selben Orbital eine endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit haben. Im Fall von bindenden Wechselwirkungen über mehrere Bindungen wird indirekter Austausch relevant.

2.1.2 Wechselwirkungen der Kernspins

Der Kern-Zeeman Hamiltonoperator

$$\hat{H}^{\text{nz}} = \beta_n \vec{I} \cdot g_n \cdot \vec{B} \quad (2.7)$$

Der Kern-Zeeman Hamiltonoperator \hat{H}^{nz} beschreibt (analog zum Elektron-Zeeman Hamiltonoperator) die Energie eines Kernspins \vec{I} im äußeren Magnetfeld \vec{B} . Die nukleare g -Matrix wird mit den hier verwendeten Methoden nicht aufgelöst und wird daher im Weiteren als skalare Größe g_N betrachtet.

Die Hyperfeinwechselwirkung

$$\hat{H}^{\text{hf}} = \vec{S} \cdot A \cdot \vec{I} \quad (2.8)$$

$$= a_{\text{iso}} \vec{S} \cdot \vec{I} + \vec{S} \cdot A_{\text{dip}} \cdot \vec{I} \quad (2.9)$$

Der Hyperfein-Hamiltonoperator \hat{H}^{hf} beschreibt die Wechselwirkung eines Elektronenspins mit einem Kernspin. Der isotrope Anteil der Hyperfeinwechselwirkung kommt durch eine endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons am Kernort zustande. Bei einer Entwicklung in Wasserstoff-ähnliche Orbitale entspricht das dem Anteil an s-Charakter der Spindichte. Der anisotrope Anteil kommt durch eine Dipol-Dipol Wechselwirkung der magnetischen Momente des Elektrons und des Kerns zustande.

2.1.3 Die elektronische Struktur eines Spinlabels

Als Spinlabel werden sterisch geschützte Stickstoffoxyde verwendet. Das ungepaarte Elektron befindet sich im anti-bindenden π^* -Orbital der Nitrosogruppe und hat g -Hauptwerte nahe dem g -Wert eines freien Elektronenspins. Abweichungen von diesem Wert kommen hauptsächlich durch eine Kopplung $\zeta \vec{L} \vec{S}$ des Elektronenspins \vec{S} an den Bahndrehimpuls \vec{L} über die Spin-Bahn-Kopplungskonstante ζ des Sauerstoffzustande. Die g -Tensorhauptwerte können wie folgt angenähert werden [16, 17]

$$\begin{aligned} g_x &\approx g_e + 2 \frac{\zeta \rho_\pi^0 c_y^2}{\Delta E_{n \rightarrow \pi^*}} \\ g_y &\approx g_e + 2 \frac{\zeta \rho_\pi^0 c_x^2}{\Delta E_{n \rightarrow \pi^*}} \\ g_z &\approx g_e \end{aligned} \quad (2.10)$$

mit ρ_π^0 , der Spindichte im $2p_z$ π Orbital des Sauerstoffs, den Molekülorbitalkoeffizienten c_x, c_y , die den Beitrag von p_x, p_y zu den nicht-bindenden Orbitalen beschreiben und von der Anregungsenergie $\Delta E_{n \rightarrow \pi^*}$ des $n \rightarrow \pi^*$ Übergangs.

Die Werte von g_x und g_y weichen hauptsächlich durch Mischung des Dubletts mit den nicht-bindenden Orbitalen des Sauerstoffs und die resultierende Spin-Bahn Kopplung ab.

Die g -Tensorhauptwerte sind abhängig von der Lage der Orbitale, die Hauptwerte des Hyperfeintensors von der Spindichteverteilung. Dies sind Faktoren, die von der Polarität der Umgebung sowie von Wasserstoffbrückenbindungen beeinflusst werden. Experimentell wird beobachtet, daß insbesondere g_x und A_{zz} abhängig von der Umgebung sind. Lösemittel, die keine Wasserstoffbrückenbindungen zum Spinlabel ausbilden, können als kontinuierliches Medium mit einer Dielektrizitätskonstanten ϵ beschrieben werden [18]. Der Polaritätseffekt entsteht durch den permanenten Dipol entlang der NO-Bindung, der zu einer Polarisation des isotropen Mediums führt. Störungen dieser Art lassen sich durch ein mittleres elektrisches Feld E_x beschreiben [19], welches

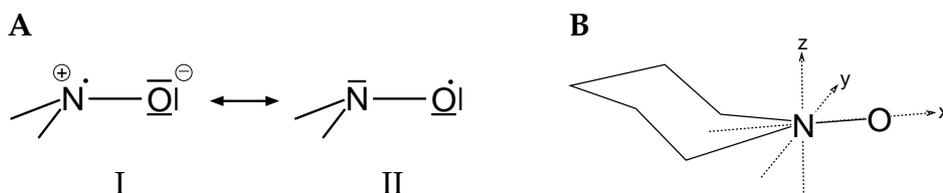


Abbildung 2.1: **A** Resonanzstrukturen eines Nitroxidradikals, **B** Lage des g -Tensors

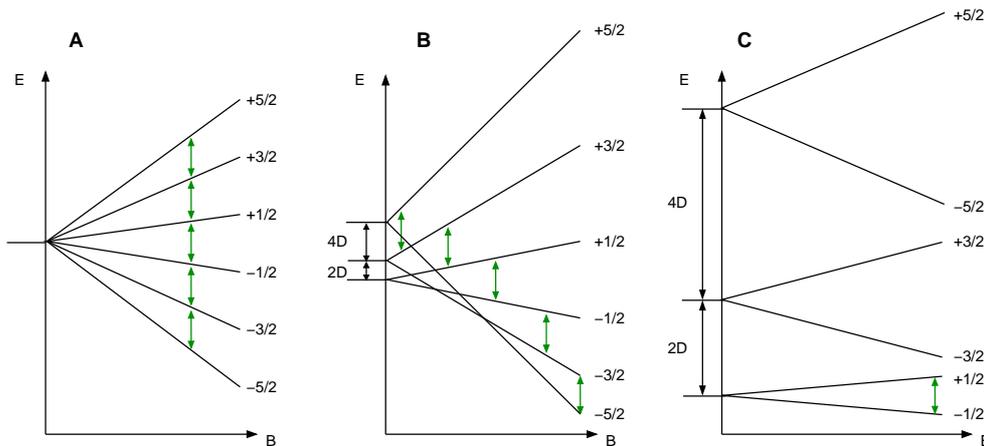


Abbildung 2.2: Feldabhängigkeit der M_s -Niveaus eines Spinsystems $S = 5/2$. A: $D = 0$, B: $D < hv$, C: $D > hv$

die Spindichte am Stickstoffkern ρ_N beeinflusst

$$\Delta\rho^N = c E_x \quad (2.11)$$

Die Auswirkung der Polarität der Umgebung auf die Hyperfeinkopplung läßt sich gut durch die Resonanzstruktur der Nitroxylgruppe veranschaulichen. In der neutralen Resonanzstruktur (II) ist die Spindichte auf dem Sauerstoffatom lokalisiert, in der ionischen Resonanzstruktur auf dem Stickstoffatom (I). Lösemittel, die die ionische Struktur stabilisieren erhöhen die Spindichte am Stickstoff und erhöhen damit die ^{14}N Hyperfeinaufspaltung. Änderungen in der Radikalgeometrie und die Bildung von Charge-Transfer Komplexen mit bestimmten Lösemitteln können als Folge haben, daß Spindichte von der gesamten Nitroxidgruppe abgezogen wird. Dieser Effekt wird in der Darstellung nicht berücksichtigt.

2.1.4 Die elektronische Struktur von Mn^{II}

Mangan tritt in den Oxidationsstufen $-III$ bis $+VII$ auf; hier soll insbesondere auf das Mn^{II} eingegangen werden. Mn^{II} hat die elektronische Konfiguration $3d^5$, die d-Schale ist halbgefüllt. Der Grundzustand dieser Konfiguration ist $^6S_{5/2}$. Ein *low-spin* Komplex (d^1 , $S=1/2$) wird gebildet, wenn die Energieaufspaltung der Orbitale die Spinpaarungsenergie übersteigt, dies ist nur bei oktaedrischen Koordination mit sehr starken Liganden ($(\text{CN}^-)_6$, $(\text{CNR})_6$) der Fall [20].

Die Gesamtenergie einer d^5 *high-spin* Konfiguration ist unabhängig von der

Symmetrie der koordinierenden Liganden und wird auch nicht durch Jahn-Teller Verzerrung stabilisiert. Daher bevorzugt Mn^{II} keine spezielle Koordinationssphäre, es kann von 4-8 Liganden koordiniert werden.

Mangan hat einen Kernspin $I = 5/2$ welcher durch eine Mischung des SOMOs mit den s-Orbitalen isotrop an den Elektronenspin koppelt und so zu einer Hyperfeinaufspaltung von ca. 90 G im oktaedrischen Ligandenfeld führt [21]. Als *high-spin* Komplex hat das Ion Kugelsymmetrie. Es besteht kein elektrischer Feldgradient am Kernort, so daß es kaum Quadrupolaufspaltung gibt. Da das magnetische Moment $\mu_{\text{mag}} = \sqrt{L(L+1) + 4S(S+1)}$ keine Beimischung durch den Bahndrehimpuls erfährt, liegt der isotrope g -Wert des Ions nahe dem Wert für das freie Elektron und hat einen sechsfach entarteten Grundzustand (${}^6A_{1g}$). Diese Entartung wird durch die Nullfeldaufspaltung aufgehoben (Abb. 2.2). Bei höherem Feld wird hauptsächlich der $| -1/2 \rangle \leftrightarrow | +1/2 \rangle$ Übergang beobachtet.

2.1.5 Die elektronische Struktur eines $[\text{3Fe-4S}]^+$ -Clusters

In proteinogenen Eisenschwefelclustern bilden die S^{2-} -Ionen und Thiolatgruppen von Cysteinen ein tetraedrisches Ligandenfeld für die Eisenionen. Schwefel ist ein schwacher Ligand [20], so daß die Fe^{III} -Ionen als *high-spin* $S = 5/2$ vorliegen. In mehrkernigen Metallclustern koppeln die Elektronenspins der Ionen zu einem Gesamtspin, dessen magnetisches Moment über die Ionen delokalisiert ist. Die Kopplung der drei Spins S_i im $[\text{3Fe-4S}]^+$ -Cluster kann durch das Wigner-Eckard-Theorem beschrieben werden und führt zu einem Gesamtspin $\vec{S} = \sum_i \vec{S}_i$ mit einem Grundzustand $S_{\text{FeS}}^0 = 1/2$, der vom ersten angeregten Zustand gut separiert ist [22]. Während die Spinkopplung in zweikernigen Clustern noch analytisch eindeutig beschrieben werden kann, gibt es in mehrkernigen Clustern mehrere Möglichkeiten die Spinfrustration zu verringern. Die vektorielle Kopplung der Spins wird über Spinprojektionsfaktoren K_i beschrieben, welche die Projektion des lokalen Spins $S(\text{Fe}_i)$ auf den Spins des Clusters S darstellen. Die Spinprojektionsfaktoren K_i sind folgendermaßen definiert:

$$K(\text{Fe}_i) = \frac{\langle S(\text{Fe}_i)_z \rangle}{\langle S_z \rangle} = \frac{\langle S(\text{Fe}_i) \cdot S \rangle}{S(S+1)}. \quad (2.12)$$

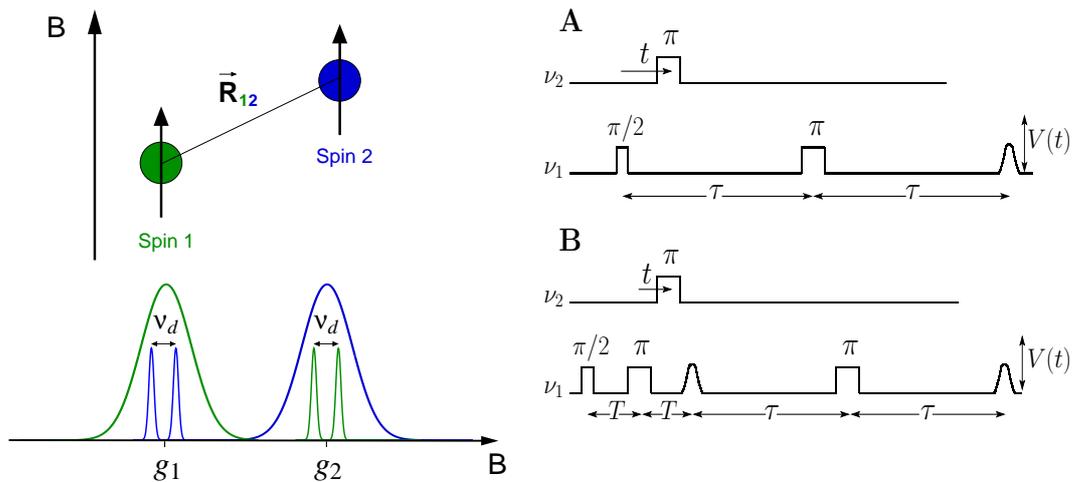


Abbildung 2.3: ELDOR. Links: Zwei Spins 1,2 im Abstand R_{12} mit unterschiedlichen Resonanzfrequenzen können selektiv angeregt werden. Ist die dipolare Kopplung ν_d in der cw-EPR (unten) nicht aufgelöst, kann sie bei Abständen $R_{12} > 1.5$ nm mittels gepulster ELDOR-Experimente bestimmt werden. Rechts: Pulssequenzen für 3P-ELDOR (A) und asymmetrisches 4P-ELDOR (B).

2.2 EPR-Experimente

Die Elektron-Paramagnetische-Resonanz dient der Untersuchung von Zuständen mit ungepaarten Elektronen. An dieser Stelle werden die hier verwandten Experimente kurz erklärt, für eine ausführlich Beschreibung wird auf die Literatur verwiesen [23].

Im cw-EPR Experiment werden durch resonantes Einstrahlen elektromagnetischer Strahlung Übergänge zwischen den Niveaus induziert. Die Energie der Niveaus wird durch den Spinhamiltonoperator (Gl. 2.1) beschrieben. Einige der Terme wie die g -Aufspaltung sind vom B -Feld abhängig, während Hyperfein- und dipolare Kopplung feldunabhängig sind. Durch Messungen bei unterschiedlichen Frequenzen können die Komponenten des Hamiltonoperators besser unterschieden werden. EPR-Experimente werden in dieser Arbeit bei 9 GHz (X-Band), 95 GHz (W-Band) und 360 GHz durchgeführt.

2.2.1 ELDOR

Abstandsmessungen in der EPR basieren auf der r^{-3} -Abstandsabhängigkeit der dipolaren Kopplung. In cw EPR-Experimenten ist Auflösung dipolarer

Kopplungen durch Linienverbreiterungen aufgrund anderer Effekte, wie un- aufgelöste Hyperfeinkopplungen und g -Anisotropie, limitiert (Bild 2.3 links). Abstände größer ca. 1.5 nm können selten noch bestimmt werden. Mittels Elektron-Elektron Doppelresonanz-Experimenten kann die dipolare Kopplung zwischen zwei Spins direkt bestimmt werden. Es sind Abstandsmessungen im Bereich von 1.5 nm – 8 nm möglich. Dabei wird auf der Resonanz eines Spinsystems mit der Detektionsfrequenz ν_1 eine Hahn-Echo-Sequenz mit festem Pulsabstand durchgeführt. Während der Evolutionszeit wird mit einem Puls bei einer zweiten Mikrowellenfrequenz ν_2 die Magnetisierung des anderen Spinzentriums invertiert, dieser Puls wird innerhalb der Hahn-Echosequenz verschoben (Bild 2.3A). In der Dreipuls-Sequenz ist wegen der Spektrometertotzeit der Anfang der Modulation nicht detektierbar. Diese Beschränkung wurde durch eine Variation des Experiments aufgehoben, bei dem die Detektion auf einem refokussierten Echo erfolgt (Bild 2.3B) [24].

Aufgrund der dipolaren Kopplung zwischen den beiden Spins moduliert die Amplitude des 2P-Echos mit der Frequenz der Kopplung. Aus der Frequenz ν_{ee} dieser Modulation wird der Abstand zwischen den beiden Spins üblicherweise mit der Punkt-Dipol Näherung berechnet,

$$\omega_{ee}(\vartheta) = \frac{g_1 g_2 \mu_B^2 \mu_0}{4\pi \hbar} \frac{1}{r^3} (3 \cos^2 \vartheta - 1) \quad (2.13)$$

wobei g_1, g_2 die effektiven g -Werte sind, welche durch die Frequenzen ν_1, ν_2 selektiert wurden, $r = |\vec{R}_{12}|$ ist die Länge des Vektors, welcher die beiden Spins verbindet und ϑ der Winkel zwischen dem Verbindungsvektor \vec{R}_{12} und dem statischen äußeren Magnetfeld \vec{B} .

2.2.2 Separation von EPR-Signalen

Enthält eine Probe mehrere paramagnetische Zentren, deren Signale sich überlagern, ist es für die Interpretation von Vorteil diese spektroskopisch zu trennen. Zur Trennung von EPR-Signalen werden experimentelle Parameter variiert, unter deren Einfluß sich die Signale der verschiedenen Spezies aufgrund ihrer Systemeigenschaften unterscheiden. Zu solchen Systemeigenschaften gehören Temperaturverhalten, Relaxationszeiten, Übergangswahrscheinlichkeiten und Spinmultiplizitäten.

Im Rahmen von Konformationsuntersuchungen an dem Protein 5'-Nucleotidase war es notwendig, überlagernde EPR-Signale von einem Mn^{II} ($S = 5/2$) und einem Spinlabel ($S = 1/2$) zu trennen. In diesem Kapitel soll daher auf die

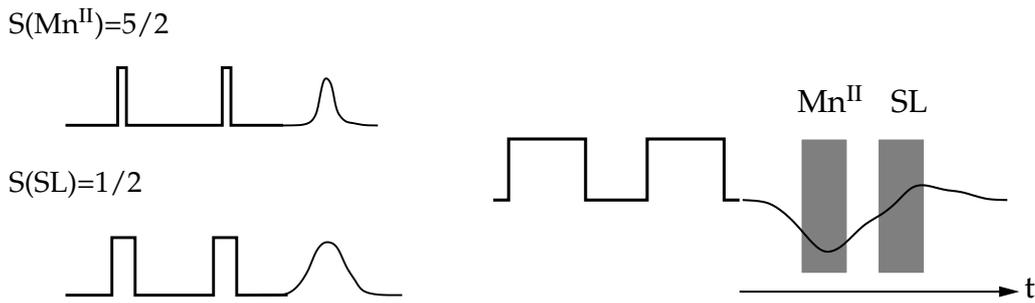


Abbildung 2.4: Spektrale Separation von Spins mit verschiedenen Übergangsmomenten (schematische Darstellungen). Links: Selektion über den Drehwinkel der Anregungspulse, Rechts: Separation durch unterschiedliche Formen und Zeitverzögerungen der Echos bei langen Pulsen.

hier verwandten Verfahren zur Separation von EPR-Signalen mit unterschiedlichen Spinmultiplizitäten eingegangen werden.

Kurze Pulse

In einem EPR-Experiment führt eine resonante Einstrahlung von Mikrowellen zu transienten Nutationen der Magnetisierung um die Achse des rotierenden Bezugssystems entlang der das B_1 -Feld eingestrahlt wird. Regt man für einen Spinzustand mit der Multiplizität $2S + 1$ selektiv den Übergang $m \leftrightarrow m + 1$ an, ist die Frequenz der Präzession

$$\omega_1 = \langle m | \gamma B_1 \hat{S}_x | m + 1 \rangle \quad (2.14)$$

$$= \gamma B_1 \frac{1}{2} (\hat{S}_+(m \rightarrow m + 1) + \hat{S}_-(m \leftarrow m + 1)) \quad (2.15)$$

$$= \gamma B_1 \sqrt{S(S + 1) - m(m + 1)} \quad (2.16)$$

von der Multiplizität abhängig. Bei gleichem B_1 -Feld hat der $| -\frac{1}{2} \rangle \leftrightarrow | +\frac{1}{2} \rangle$ -Übergang eines Spins $S = \frac{5}{2}$ eine höhere Rabi-Frequenz als derselbe Übergang eines Spins $S = \frac{1}{2}$. Gleiche Flipwinkel $\beta = \omega_1 t_p$ werden erreicht, wenn die Pulslängen t_p ein Verhältnis von $t_p(S = \frac{1}{2}) = 3 \cdot t_p(S = \frac{5}{2})$ haben. Unter den hier gegebenen Bedingungen konnten im W-Band (siehe Kapitel 2.3.3) für Mn^{II} Pulslängen $t_p(\pi/2) \approx 40$ ns erreicht werden, für das Spinlabel entsprechend $t_p(\pi/2) \approx 120$ ns. Dies kann genutzt werden, um das Signal des Mn^{II} ohne das Signal des Spinlabels aufzunehmen, da die ideale Pulslänge für das Mn^{II} die Magnetisierung des Spinlabels nur um 30° klappt. Das Signal des Spinlabels kann auf diese Weise nicht separiert werden, da ein $\pi/2$ -Puls für das Spinlabel einem $3\pi/2$ -Puls für das Mn^{II} entspricht. Die FIDs beider Spezies sind

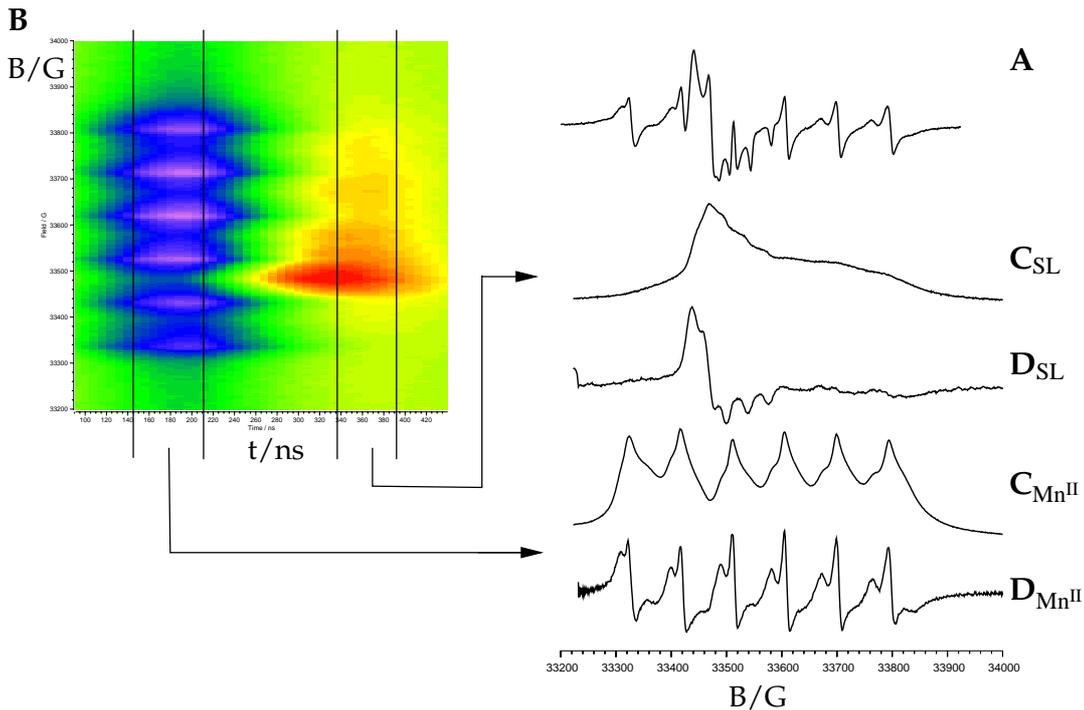


Abbildung 2.5: Veranschaulichung der Separation zweier Signale. **A** In der cw-EPR überlagern sich die beiden Signale. **B** Im 2D *soft pulse*-Experiment erscheinen die Spezies zeitlich separiert. **C** Integration über einen bestimmten Zeitbereich liefert die getrennten Signale in Absorption (SL - Spinlabel). **D** Pseudomodulierte Signale.

als monotonen Abklingen transversaler Magnetisierung beschreibbar. Damit verhalten sich auch die Echos nach einer Zwei-Pulssequenz analog. Sie unterscheiden sich im Vorzeichen, aber weder in Form noch Zeitverschiebung und können daher nicht separiert werden.

Weiche Pulse

Eine weitere Möglichkeit EPR-Signale von Spins unterschiedlicher Multiplizität zu trennen sind lange Pulse mit relativ geringer Mikrowellenleistung [25]. Während eines kurzen Pulses können alle Terme des Hamiltonoperators gegenüber dem angelegten Mikrowellenfeld vernachlässigt werden (Gl. 2.14). Diese Näherung ist bei einem weichen Puls nicht mehr gültig, die Spindynamik muß berücksichtigt werden. Der FID eines weichen Pulses ist nicht allein durch ein Abklingen der Magnetisierung zu beschreiben, insbesondere bei größeren Flipwinkeln ist auch nach Pulsende ein weiterer Aufbau transversaler Magnetisierung zu beobachten. Die Echoformen werden komplex, aber die Berechnungen von FIDs und Echos zeigen eine Abhängigkeit der Echoform

vom nominellen Flipwinkel der gesamten Pulssequenz [26].

Ein 2D *soft pulse*-Experiment (Abb. 2.5) zeigt die Echoform in Abhängigkeit vom Feld und veranschaulicht, daß die Signale der beiden Spezies zeitlich separiert sind. Das Mn^{II} -Echo erscheint mit negativer Amplitude im frühen Zeitbereich. Die Pulssequenz $100 \text{ ns} - \tau - 100 \text{ ns}$ stellt für den Spin $S = 5/2$ nominelle Flipwinkel von $225^\circ - \tau - 225^\circ$ dar. Die Magnetisierung des Spinlabels refokussiert nach einer nominellen $75^\circ - \tau - 75^\circ$ Sequenz zu einem späteren Zeitpunkt in positiver Richtung. Um die separierten Signale aufzuzeichnen, wird die Echointensität über einen geeigneten Zeitraum integriert (Abb. 2.5). Bei der anschließenden Pseudomodulation der Absorptionssignale kann das ungewollte Signal weiter unterdrückt werden indem die 'Modulationsamplitude' entsprechend der relativen Linienbreiten der beiden Spinsysteme gewählt wird. Durch Relaxationsprozesse kann sich die Form der pseudomodulierten Spektren von den jeweiligen cw-Spektren unterscheiden.

2.3 Spektrometer

2.3.1 EPR X-Band (9 GHz)

Die Puls- und cw-EPR X-Band Spektren in dieser Arbeit wurden mit zwei verschiedenen Spektrometern aufgenommen. Die Spektren von Hydrogenase sowie die *de novo* Peptide mr57-510 wurden mit einem FT-EPR-Spektrometer ESP 380E der Firma Bruker vermessen. Es wurde dabei ein dielektrischer Saphirring Resonator (Bruker ER 4118-MD5-W1-EN) benutzt, die Temperierung erfolgte mit einem Oxford Helium-Durchflußkryostaten (CF 935), der über einen Oxford ITC4 kontrolliert wurde. Die Pulse wurden durch einen Wanderfeldröhrenverstärker (Traveling Wave Tube Amplifier (TWT), Applied Systems Engineering 117X) verstärkt.

Die Spektren von Nukleotidase sowie die *de novo* Peptide mr17-19 wurden mit einem im Institut aufgebauten Spektrometer vermessen [27, 28]. Dabei wurde eine cw-Mikrowellenbrücke (Bruker ER 046 XK-T) mit Gunn-Diode zu einem gepulsten Spektrometer erweitert. Der Pulsteil der Brücke (Bild 2.6) wie bei Eilers beschrieben [28] wurde modifiziert und kompatibel für ELDOR-Messungen gestaltet (Kapitel 2.3.2). Der in [28] beschriebene Pin-Schalter mit fünf Ausgängen wurde ersetzt durch einerseits einen Wechselschalter mit dem zwischen cw- und Pulsbetrieb umgeschaltet werden kann. Zudem wurde in den Pulskanal ein Leistungsteiler mit 4 Ausgangskanälen und danach für je-

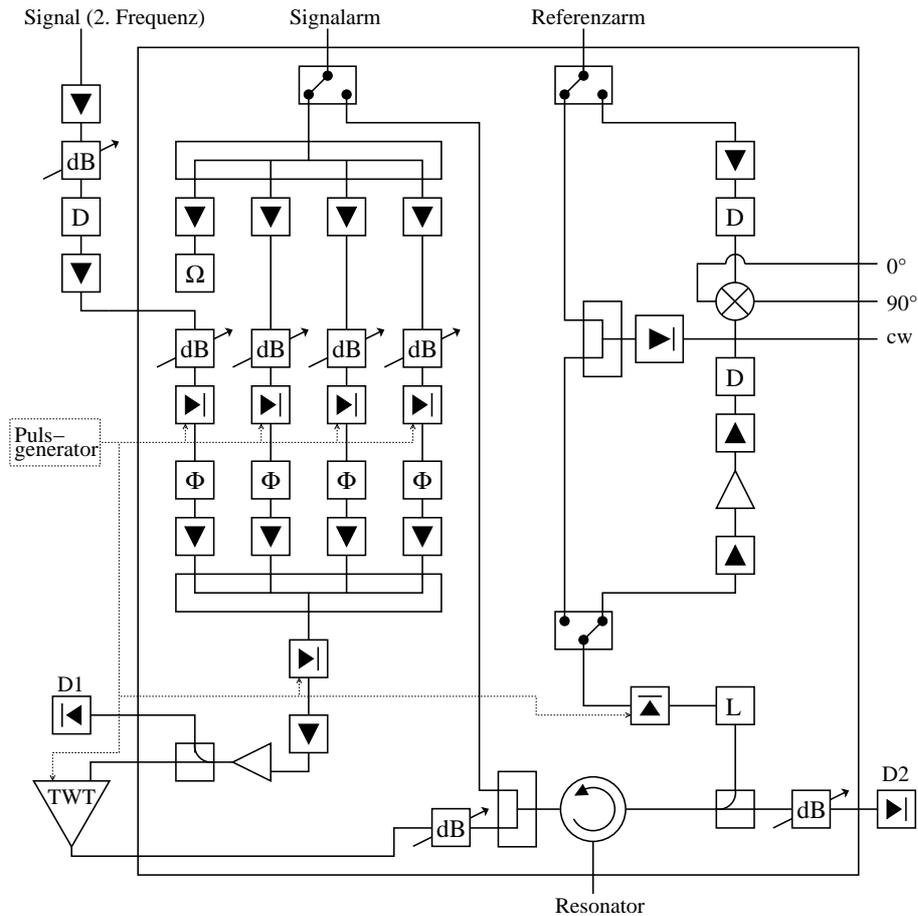


Abbildung 2.6: Schematisches Schaltbild der Eigenbaubrücke. D - Defense Diode; L - Limiter; D1, D2 - Kristalldioden; Ω - 50 Ω -Abschlußwiderstand; Φ - Phasenschieber;

den Kanal ein Pin-Schalter zum Formen der Pulse eingebaut. Die Pin-Schalter werden durch einen Pulsgenerator (Bruker EP 385) gesteuert und durch einen Wanderfeldröhrenverstärker (Applied Systems Engineering 117X-1) auf 1 kW verstärkt. Weiterhin wurden zwei Auskoppler eingebaut, an denen die Mikrowellenleistung mit Dioden (Hewlett-Packard, crystal detector 8472A) detektiert werden kann. Der erste Auskoppler befindet sich vor dem Mikrowellenverstärker. Es können auch die relativen Pulsleistungen in den verschiedenen Kanälen dem Experiment angepasst werden. Mit Hilfe der vom Resonator reflektierten Mikrowellenleistung läßt sich z. B. feststellen, ob die Frequenz der Mikrowelle innerhalb der Resonanz des Resonators liegt. Für die Messungen wurde ein dielektrischer Resonator (Bruker ER 4118X-MD-5W1) benutzt, der in einem Heliumdurchflußkryostaten (am Institut gefertigt) mit einem Tempe-

raturregler (Lake Shore Cryotronics 321) gekühlt wurde. Die Signale wurden mit einem Oszilloskop (Textronic TDS 520A) detektiert. Das Feld des Elektromagneten (AEG X-20) wurde mit einem Gaußmeter (Bruker ER035 MR NMR Gaußmeter) gemessen und kontrolliert, die Frequenz wurde mit einem Frequenzzähler (Milpitas EIR 548) gemessen.

2.3.2 Zwei-Frequenz Messungen im X-Band

Das Bruker ESP 380E Spektrometer wurde zu einem Zweifrequenzaufbau erweitert. Als zweite Mikrowellenquelle diente die Brücke eines weiteren Bruker 300E cw-Spektrometers. Der Mikrowellenausgang der Brücke wurde über einen Isolator und einen DC-Block mit dem Eingang einer Pulsform-Einheit der Pulsbrücke verbunden. Dabei wurde die Ausgangsleistung der cw-Brücke der Eingangsleistung der Pulsform-Einheit angepasst.

Beim Eigenbauspektrometer diente ein Synthesized Signal Generator (Hewlett-Packard 8672A) als zweite Frequenzquelle. Die Mikrowelle wurde über eine Isolator, 8 dB Abschwächer, DC-Block, Isolator-Kombination hinter dem Vier-Kanal Divider in den -y-Kanal der Pulsbrücke eingespeist (Bild 2.6). Der zweite Isolator erwies sich in diesem Aufbau als notwendig, um Stehwellen zu reduzieren. Durch die 8 dB Abschwächung wurde die maximale Ausgangsleistung des Signal Generators auf die Leistung angepasst, die von der Gunn-Diode bei maximal geöffneten Abschwächern an den Pin-Schaltern ankommt. So wird verhindert, daß eine zu große Leistung an den Pin-Schaltern und am Vorverstärker für den TWT angelegt wird.

2.3.3 W-Band (94 GHz)

Die cw- und Puls-EPR Experimente bei 94 GHz wurden mit einem Spektrometer (Bruker Elexsys E680) durchgeführt. Das heterodyne System hat eine variable 9 GHz Quelle, die mit einer feststehenden Frequenz von 84.5 GHz gemischt wird. Pulserzeugung und Signal-Detektion werden X-Band-seitig durchgeführt. Eine Beschreibung des Magneten, des Resonators und der Brücke findet sich in [29, 26]. Zur Bestimmung des Magnetfeldes wurde Li/LiF ($g = 2.002293$) [30] als Feldstandard benutzt.

2.3.4 360 GHz

Die Experimente bei 360 GHz wurden am Spektrometer der Gruppe Möbius, FU Berlin durchgeführt. Das Spektrometer hat einen quasi-optischen Aufbau mit Fabry-Perot Resonator und ist ausführlich in den Doktorarbeiten von A. Schnegg [31] und M. Fuchs [32] beschrieben.

2.4 Auswertung der Spektren

2.4.1 Auswertung der EPR-Spektren

Systeme mit einem Elektronenspin

Zur Auswertung von EPR-Spektren mit einem Elektronenspin ($S = 1/2$) und mehreren Kernspins wurde das Programm `spleen` von Christoph Geßner [33] verwendet. Es berücksichtigt für die Lage der EPR-Übergänge Effekte 2. Ordnung. Zur Simulation von Nitroxidspektren mit anisotroper Linienbreite wurde das Programm `SIMPOW6` von M. J. Nilges genutzt [34].

Systeme mit zwei Elektronenspins

Zur Simulation von EPR-Spektren mit zwei koppelnden Elektronenspins ($S \geq 1/2$) wurde das Programm `barley` von Kai-O. Schäfer [35] benutzt. Das Programm verwendet eine vollständige Matrixdiagonalisierung des Hamiltonoperators. Zum Fitten der X-Band Spektren von zwei dipolar koppelnden Spinlabeln wurde ein Programm von E. Kirilina [36] verwendet, welches auf Störungsrechnung zweiter Ordnung basiert.

2.4.2 Auswertung der ELDOR Spektren

An die gemessene ELDOR-Zeitspur wurde eine Funktion 3. Ordnung oder eine Exponentialfunktion angepaßt und abgezogen. Danach wurde die Zeitspur mit einer Hammingfunktion multipliziert und durch eine Fast Fourier Transformation in den Frequenzraum überführt.

Zur Auswertung des Frequenzspektrums wurde das Programm `sansibar` geschrieben (Programmcode im Anhang). Das Programm berechnet dipolare Kopplungen zwischen zwei spintragenden Systemen. Dabei kann das eine spintragende Zentrum aus bis zu vier stark gekoppelten Spins bestehen. Die

der Simulation zugrunde liegende Theorie ist in Kapitel 5.2 ausführlich beschrieben.

Es wird angenommen, daß die Orientierung der beiden g -Tensoren zueinander wohl definiert ist, d.h. durch drei Eulerwinkel zu beschreiben ist und die Lage der dipolaren Achse mit zwei Eulerwinkeln bezüglich eines g -Tensor Systems. Das ELDOR Spektrum wird berechnet indem gleichmäßig die Magnetfeldorientierungen für das Spinzentrum abgetastet werden, auf dem detektiert wird. Weiterhin wird eine Orientierungsselektion durch selektive Anregung berücksichtigt. Nur die Teile des Pulverspektrums werden berücksichtigt für die die g -Werte beider Spinsysteme innerhalb der Anregungsbandbreiten liegen. Die Bandbreite des anregenden Pulses wird mit einer Linienbreitenfunktion (Gaußfunktion) gefaltet, um unaufgelöste Hyperfeinwechselwirkungen g -Wertverbreiterungen durch heterogene Umgebung mitzuberücksichtigen. Die dipolare Kopplung für die ausgewählten Orientierungen wird unter Einbeziehung der Spinprojektionsfaktoren im spingekoppelten System, der einzelnen Abstände der koppelnden Spins zum zweiten Spin und den Winkeln, welche die Verbindungsvektoren mit dem Magnetfeld einschließen, berechnet. Daraus wird ein gewichtetes Frequenzhistogramm erstellt und zur Erzeugung einer inhomogen verbreiterten Linie mit einer Gaußfunktion gefaltet.

2.5 Proben

2.5.1 De novo Peptide

Design und Synthese der *de novo* Peptide erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Haehnel (Universität Freiburg) und wurde bereits beschrieben [37]. Die Sequenzen der Peptide sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Als Marker für die EPR-Messungen wurde die nicht-natürliche Aminosäure TOAC (4-Amino-2,2,6,6-tetra-methylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylic acid) [38] in die Primärstruktur eingebaut.

Die Peptide wurden in verschiedenen Lösemitteln und Lösemittelgemischen vermessen: H_2O , pH 7 (MOPS); H_2O /Glycerin (6:4 v/v), pH 7 (MOPS); Trifluorethanol; H_2O /Trifluorethanol (1:1 v/v); CHCl_3 ; DMSO; CHCl_3 /DMSO (7:3 v/v).

Verwendet wurden Trifluorethanol (99.5% NMR grade) der Firma Aldrich, CHCl_3 (Uvasol) der Firma Merck und DMSO (99.9%, A.C.S.) der Firma Sigma-Aldrich. Zur Herstellung des MOPS-Puffers: 3-Morpholinopropansulfonsäure

Tabelle 2.1: Namen und Sequenzen der sieben doppelt gespinlabelten *de novo* Peptide. Die artifizielle Aminosäure TOAC wird hier mit X abgekürzt

10

mr57	NH ₂ KKKLAEEXKXLQEA CONH ₂
mr58	NH ₂ KKKLAEEXKLXQEA CONH ₂
mr59	NH ₂ KKKLAEEXKLQXEA CONH ₂
mr510	NH ₂ KKKLAEEXKLQEXA CONH ₂
mr17	NH ₂ KKKLXEEAAKXLQEA CONH ₂
mr18	NH ₂ KKKLXEEAAKXQEA CONH ₂
mr19	NH ₂ KKKLXEEAAKQLXEA CONH ₂

(C₇H₁₅NO₄S) wurde 0.1 mol/l in *aq. bidest.* gelöst, mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt und sterilisiert.

2.5.2 5'-Nukleotidase

Die 5'-Nucleotidase und Mutanten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. N. Sträter (Universität Leipzig) hergestellt. Für die 5'-Nucleotidase aus *E. coli* ist ein Expressionssystem bekannt [8]. Die Klonierung, Mutagenese und Aufreinigung der Doppelmutanten ist bei Schultz-Heienbrok *et. al.* [39] beschrieben. Für die Messungen mit besetzter Bindungtasche wurde der Proteinlösung äquimolare MnCl₂- bzw. ZnCl₂-Lösung zugesetzt. Für die Messungen in Substratgegenwart wurde ein zehnfacher Überschuß an α - β -Methylen-ADP (AMPCP) zugesetzt. Die Proteinlösung wurde für Messungen bei 94 GHz in getemperte und einseitig abgeschmolzene Quarzkapillaren (VitroCom CV7087Q) mit 0.7 mm Innendurchmesser gefüllt.

2.5.3 Hydrogenase

Die Hydrogenase wurde von Prof. Y. Higushi (Kyoto, Tokyo) zur Verfügung gestellt. Die Präparation der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F wurde bereits beschrieben [40]. Die Proteinlösung wurde mit 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl und 0.05% NaN₃ auf pH 7.4 eingestellt. Für X-Band Messungen wurden ca. 150 μ l Proteinlösung in ein EPR-Röhrchen (Wilma 707SQ) gefüllt und schockgefroren.