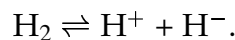


Kapitel 5

ELDOR an mehrkernigen Metallzentren

5.1 Hydrogenase

Hydrogenasen katalysieren reversibel die heterolytische Spaltung von Wasserstoffmolekülen



Hydrogenasen werden nach ihrer Funktion und der Art ihres katalytischen Zentrums eingeteilt. So wird zwischen [NiFe]-, [NiFeSe]-, [Fe]- und metallfreien Hydrogenasen unterschieden. Funktionell gibt es regulatorische Hydrogenasen, welche, abhängig vom Wasserstoffpartialdruck $p(\text{H}_2)$ der Umgebung, die Expression katalytisch aktiver Hydrogenasen steuern.

In dieser Arbeit wird die katalytisch aktive [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio (D.) vulgaris* Miyazaki F untersucht. Dieses sulfatreduzierende Bakterium spaltet molekularen Wasserstoff. Die dabei entstehenden Elektronen werden zum Aufbau eines Potentialgradienten benutzt, welcher die Energie zur ATP-Synthese liefert.

Die Struktur dieser "Standard"-Hydrogenase in der oxidierten wie der reduzierten Form sind aus der Röntgenstrukturanalyse mit 1.4 bzw. 1.8 Å Auflösung bekannt [12, 97]. Die Hydrogenase gleicht der aus *D. gigas*, für die die Struktur mit einer Auflösung von 2.85 Å gelöst wurde [98]. Aufgrund dieser Ähnlichkeit können spektroskopische Ergebnisse, die an *D. gigas* erzielt wurden, auch für die Interpretation von Experimenten an der Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F genutzt werden.

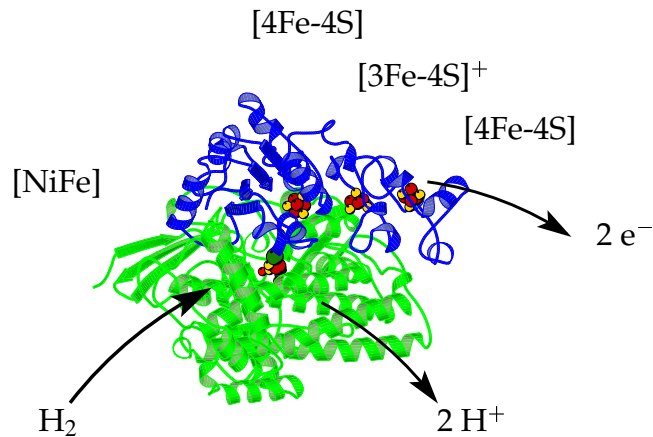


Abbildung 5.1: Röntgenstruktur der Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F. Gezeigt sind das redoxaktive [NiFe]-Zentrum in der großen Untereinheit (grün) und die Elektronentransferkette aus Eisen-Schwefel Clustern in der kleinen Untereinheit (blau).

Die Spaltung von Wasserstoff findet am [NiFe]-Zentrum in der großen Untereinheit des Proteins statt (Bild 5.1). Die Elektronen werden im weiteren über eine Elektronentransferkette an die Proteinoberfläche transferiert. Die Elektronentransferkette besteht aus einem [3Fe-4S]-Cluster und zwei [4Fe-4S]-Clustern. Der [4Fe-4S]-Cluster nahe dem [NiFe]-Zentrum wird als "proximaler", der nahe der Proteinoberfläche als "distaler" Cluster bezeichnet. Der [3Fe-4S]-Cluster befindet sich zwischen den beiden [4Fe-4S]-Clustern.

Im oxidierten Zustand enthält die Hydrogenase zwei paramagnetische Spezies, das [NiFe]-Zentrum und den [3Fe-4S]⁺-Cluster, wogegen beide [4Fe-4S]²⁺-Cluster in ihrem Grundzustand diamagnetisch sind. Das $S = 1/2$ Signal des [NiFe]-Zentrums besteht aus zwei paramagnetischen Zuständen, die Ni-A und Ni-B genannt werden (für Ni-A: $g_1 = 2.317, g_2 = 2.229, g_3 = 2.014$; für Ni-B: $g_1 = 2.333, g_2 = 2.163, g_3 = 2.010$). Nach Isolation enthält die Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F etwa 30% Ni-A und 70% Ni-B. Die Spindichteverteilung um das [NiFe]-Zentrum ist aus ¹H ENDOR [99], ⁶¹Ni EPR [100], ³³S EPR [101] und ⁵⁷Fe ENDOR [102] Messungen bekannt, wo die Hyperfeinkopplungen der entsprechenden Kerne gemessen wurden. Die Spindichten wurden daraus mit DFT-Methoden berechnet [103]. Es konnte gezeigt werden, daß die Spindichte des [NiFe]-Zentrums hauptsächlich auf dem Ni-Ion lokalisiert ist. Eine EPR Analyse von Hydrogenase Einkristallen ergab die Orientierung des g-Tensors des [NiFe]-Zentrums in der Molekülstruktur [33, 104].

Der $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster in der Hydrogenase aus *D. gigas* wurde mit EPR Spektroskopie charakterisiert [105]. Der Cluster besteht aus drei formalen Fe(III) Ionen mit Spins $S = 5/2$, welche antiferromagnetisch koppeln und das EPR Signal eines $S = 1/2$ Grundzustandes [106] mit $g_1 = 2.032, g_2 = 2.024$ und $g_3 = 2.016$ ergeben [105]. Eine Studie des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster in *D. vulgaris* Miyazaki F zeigte, daß die elektronischen Eigenschaften des Clusters ähnlich denen des in *D. gigas* sind, der rhombische g -Tensor wurde mit Hochfeld/Hochfrequenz-EPR charakterisiert ($g_1 = 2.0257, g_2 = 2.0174, g_3 = 2.0114$) [107]. ENDOR Experimente an Protonen in der Umgebung des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters zeigten, daß auch die Proteinumgebung der $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster in den beiden Hydrogenasen ähnlich sind [107, 108].

Mößbauerspektroskopie wurde benutzt, um die innere elektronische Struktur des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters der Hydrogenase aus *D. gigas* aufzuklären. Die Spinverteilung des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters wurde durch die Messung der Hyperfeinkopplung der Fe-Ionen analysiert, aus der Spinprojektionsfaktoren K_i von $+2.28, -0.28$ und -1.00 für die drei Fe-Ionen berechnet wurden [106, 109]. Eine Zuordnung der Spinprojektionsfaktor zu den individuellen Fe-Ionen ist durch Mößbauerspektroskopie jedoch nicht möglich.

Fragestellung

Mehrkernige Metallzentren treten in vielen Proteinen als paramagnetische Zentren auf. Sie werden jedoch selten als Spinzentren für Abstandsmessungen mittels EPR herangezogen. Eine Ausnahme bildet der Mn_4 -Cluster im Photosystem II für den die dipolare Kopplung mit umliegenden paramagnetischen Kofaktoren bestimmt wurden [11, 110].

In dieser Arbeit wurde mit gepulsten ELDOR-Messungen die dipolare Kopplung zwischen dem $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster und dem $[\text{NiFe}]$ -Zentrum in der Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F bestimmt. Die dabei ermittelte Kopplung entspricht nicht dem Wert für zwei Punkt-Dipol im Abstand der beiden Metallzentren. Es wird gezeigt, daß zur Analyse der dipolaren Wechselwirkung die Spinkopplung im Metallcluster berücksichtigt werden muß und so Aussagen über die innere Struktur des Clusters getroffen werden können. Weiterhin werden die Effekte von Spinverteilung und Orientierungsselektion auf ELDOR-Spektren diskutiert. An Experimenten mit Einkristallen soll gezeigt werden, wie ELDOR beitragen kann, die Lage eines g -Tensors in Molekülen mit mehreren paramagnetischen Zentren zu bestimmen.

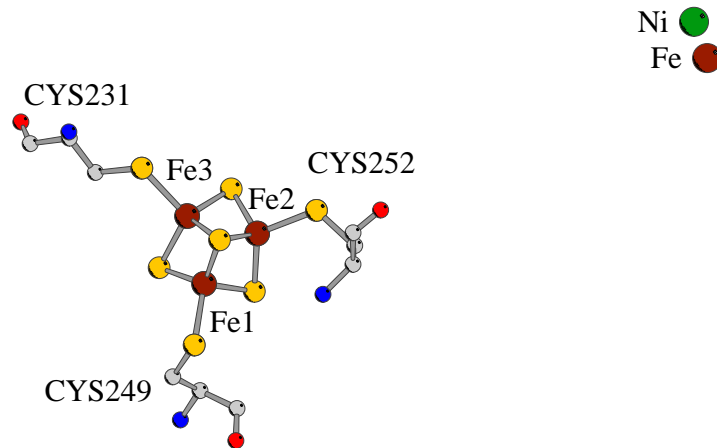


Abbildung 5.2: Kofaktoren in der Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F. Das [NiFe]-Zentrum und der [3Fe-4S]⁺-Cluster mit ligandierenden Cysteinen sind gezeigt. Die Numerierung der Fe Ionen wurde äquivalent zur Röntgenstruktur durchgeführt. Abstände der Fe Ionen zum Ni: $r(\text{Fe1}) = 2.229 \text{ nm}$, $r(\text{Fe2}) = 2.012 \text{ nm}$, $r(\text{Fe3}) = 2.172 \text{ nm}$.

5.2 Das erweiterte Spinkopplungsmodell

Gepulste Elektron-Elektron Doppelresonanz (ELDOR) Spektroskopie ist ein zwei-Frequenz EPR-Experiment, welches benutzt wird, um Abstände zwischen zwei Spinzentren zu bestimmen [1, 2, 111]. Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, kann aus der ELDOR-Modulation der Abstand zwischen den beiden Spinzentren mittels der Punkt-Dipol-Näherung berechnet werden.

$$\nu_d = \frac{g_{\text{det}} g_{\text{inv}} \mu_B^2 \mu_0}{4\pi h} \frac{3 \cos^2 \vartheta - 1}{r^3} \quad (5.1)$$

wobei g_{det} und g_{inv} die effektiven g -Werte sind, die durch die beiden Frequenzen ν_{det} und ν_{inv} angeregt werden, $r = |\vec{r}|$ die Länge des Vektors \vec{r} , der die beiden Spins verbindet, und ϑ der Winkel zwischen dem Verbindungsvektor \vec{r} und dem statischen äußeren Magnetfeld \vec{B} .

5.2.1 Theorie

In einem mehrkernigen paramagnetischen Zentrum ist das magnetische Moment über die Ionen des Clusters delokalisiert. Daher führt eine Beschreibung der dipolaren Kopplung zwischen einem solchen Metallcluster und einem zweiten Spin durch die Punkt-Dipol Näherung zu falschen Resultaten [112]. Es

müssen demnach die Wechselwirkungen zwischen allen Ionen des Metallzentrums und dem zweiten Spin explizit berücksichtigt werden [112]. Dieser Ansatz wurde erfolgreich auf die Berechnung von Hyperfeintensoren in ENDOR-Experimenten an mehrkernigen Metallzentren angewandt [113, 114, 115]. Im weiteren soll das Spin-Kopplungsmodell für die Interpretation von gepulsten ELDOR-Experimenten angepasst werden.

Die Energie des betrachteten Spinsystems in einem äußeren Magnetfeld \vec{B} wird durch den Hamiltonoperator

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_{\text{int}} + \hat{H}_{\text{ex}} + \hat{H}_{\text{dip}} \quad (5.2)$$

beschrieben, der die Zeemanwechselwirkungen \hat{H}_Z , die Spin-Spin Kopplung im $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster (Austausch- und dipolare Wechselwirkung) \hat{H}_{int} , die Austauschwechselwirkung \hat{H}_{ex} und die dipolare Wechselwirkung \hat{H}_{dip} des $[\text{NiFe}]$ -Zentrums mit dem $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster beinhaltet. Die dipolare Wechselwirkung wird durch

$$\hat{H}_{\text{dip}} = \frac{\mu_0}{4\pi} \sum_{i=1}^3 \frac{1}{r_{i,4}^3} (\vec{\mu}_i \vec{\mu}_4 - 3(\vec{\mu}_i \vec{n}_{i,4})(\vec{\mu}_4 \vec{n}_{i,4})) \quad (5.3)$$

beschrieben, wobei $\vec{\mu}_i = \mu_B g_i \vec{S}_i$; $\vec{n}_{i,4} = \vec{r}_{i,4}/r_{i,4}$ sind, $i = 1, 2, 3$ die drei $S = 5/2$ Spins des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters und 4 den Spin $S = 1/2$ des $[\text{NiFe}]$ -Zentrums bezeichnen. Die Austauschwechselwirkung zwischen dem proximalen $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster und dem $[\text{NiFe}]$ -Zentrum, die ein Abstand von etwa 1.2 nm trennt, wurde mit $J = 4 \times 10^{-3}/\text{cm}$ (≈ 120 MHz) ermittelt [116]. Aufgrund der exponentiellen Abstandsabhängigkeit der Austauschwechselwirkung [117] sollte diese zwischen dem um 9 Å weiter vom $[\text{NiFe}]$ -Zentrum entfernten $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster etwa sechs Größenordnungen kleiner sein, d.h. kleiner als 10^{-3} MHz und kann damit in der folgenden Auswertung vernachlässigt werden.

Der Hamiltonoperator (Gl. 5.2) wird von der intra-Cluster Spin-Spin Kopplung \hat{H}_{int} des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters dominiert. Daher koppeln die drei Spins $S_i = 5/2$ der Fe-Ionen zu einem effektiven Spin $\vec{S}_{\text{FeS}} = \vec{S}_1 + \vec{S}_2 + \vec{S}_3$ mit einem Grundzustand $\vec{S}_{\text{FeS}}^0 = 1/2$, der energetisch deutlich vom ersten angeregten Zustand separiert ist [22]. Der Gesamtspin des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster ist mit dem Spin-Kopplungs-Modell als Summe der drei einzelnen Fe-Spins beschreibbar. Daher können die individuellen Spins entsprechend dem Wigner-Eckart-Theorem ersetzt werden

$$\vec{S}_i = K_i \vec{S}_{\text{FeS}} \quad (5.4)$$

wobei K_i die Spinprojektionsfaktoren der einzelnen Metallionen im $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster sind [106]. Mit Gl. 5.4 kann die Zeemanwechselwirkung \hat{H}_z innerhalb

des S_{FeS}^0 Multiplets analytisch ersetzt werden und kann als

$$\hat{H}_z = \mu_B \vec{B} g_{\text{Ni}} \vec{S}_{\text{Ni}} + \mu_B \vec{B} g_{\text{FeS}} \vec{S}_{\text{FeS}} \quad (5.5)$$

mit $g_{\text{FeS}} = \sum_i K_i g_i$ zusammengefaßt werden. Im Gegensatz dazu ist es nicht möglich die dipolare Kopplung \hat{H}_{dip} zwischen einem Metallcluster und einem zweiten Spin durch einen Hamiltonoperator zu ersetzen, welcher allein von der Wechselwirkung zweier Punkt-Dipole abhängt. Jedes magnetische Moment $\vec{\mu}_i$, des gekoppelten Spinsystems muß, mit Hilfe der in Gl. 5.4 eingeführten Spinprojektionsfaktoren individuell berücksichtigt werden.

Die Spinprojektionsfaktoren K_i der drei Eisenionen wurden für den $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster durch Mößbauerspektroskopie und theoretische Methoden [106, 109] bestimmt, jedoch ist Mößbauer unempfindlich bezüglich der Lage der Eisenionen. Eine Zuordnung der Spinprojektionsfaktoren zu den individuellen Eisenionen ist prinzipiell mit Hilfe paramagnetischer NMR möglich [118]. Durch eine Analyse der Hyperfeinwechselwirkung der $\beta\text{-CH}_2$ Protonen der ligandierenden Cysteine sollte eine Zuordnung möglich sein. Jedoch wurde bislang an keinem Eisen-Schwefel Cluster aus Hydrogenase eine solche Zuordnung durchgeführt.

Im Folgenden soll gezeigt werden, daß die dipolare Kopplung, welche in einem gepulsten ELDOR-Experiment gemessen wird, für eine solche Zuordnung genutzt werden kann. Unter Benutzung von Gl. 5.4 kann \hat{H}_{dip} folgendermaßen formuliert werden:

$$\hat{H}_{\text{dip}} = \frac{\mu_0 \mu_B^2}{4\pi} \sum_{i=1}^3 \frac{g_i g_{\text{Ni}}}{r_{i,\text{Ni}}^3} K_i (\vec{S}_{\text{FeS}} \vec{S}_{\text{Ni}} - 3(\vec{S}_{\text{FeS}} \vec{n}_{i,\text{Ni}})(\vec{S}_{\text{Ni}} \vec{n}_{i,\text{Ni}})) \quad (5.6)$$

wobei i die drei Eisenionen des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters, FeS den $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster und Ni das $[\text{NiFe}]$ -Zentrum bezeichnen. Der g -Tensor des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters zeigt nur wenig Anisotropie. Daher kann angenommen werden, daß auch die g -Tensoren der einzelnen Eisenionen kleine und ähnliche Anisotropien aufweisen, $g_{\text{FeS}} = g_i$. Gleichung 5.6 zeigt, daß die dipolare Wechselwirkung die Summe der dipolaren Tensoren zwischen dem Ni-Ion und den einzelnen Ionen Fe_i des gekoppelten $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters, gewichtet mit den Spinprojektionen K_i , ist. Die individuellen dipolaren Tensoren sind im allgemeinen, durch ihre Abhängigkeit von \vec{r}_i in unterschiedlichen Hauptachsensystemen diagonal. Eventuelle Unterschiede sind zudem vernachlässigbar, wenn der Abstand zwischen den Eisenionen klein ist verglichen mit dem Abstand zwischen den

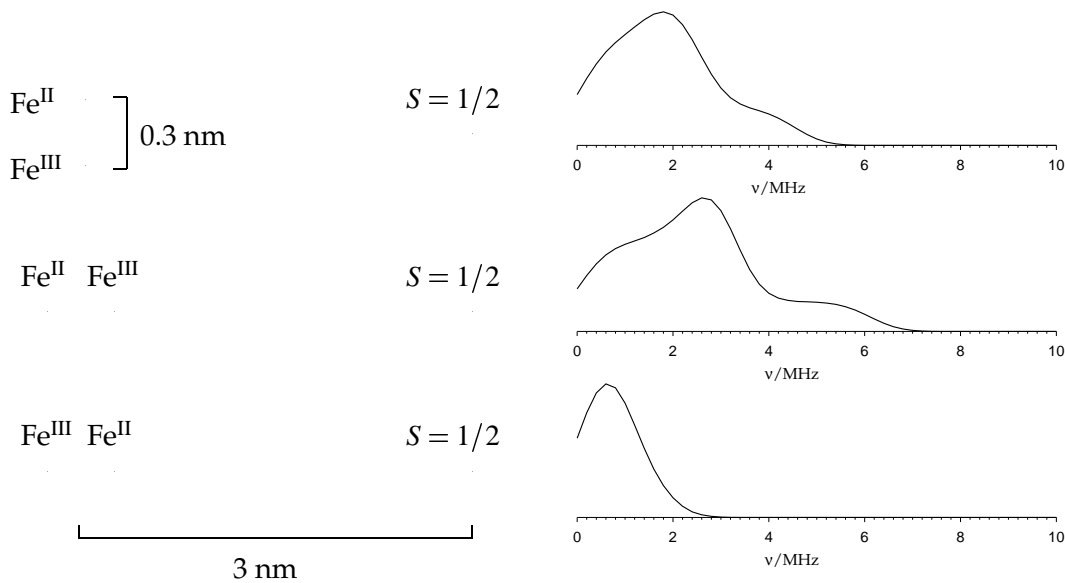


Abbildung 5.3: Berechnete Auswirkung der Spinkopplung eines Fe^{II}-Fe^{III} System mit einem effektiven Spin $S = 1/2$ auf ELDOR-Spektren. Geändert wird nur die Orientierung des Fe₂ bezüglich der Verbindungsachse zum zweiten Spin. Der Mittelpunkt des Fe₂ ist in konstantem Abstand (3 nm) zum Spin $S = 1/2$, auch der Abstand der beiden Fe-Ionen bleibt konstant.

beiden Spinzentren. Damit kann die dipolare Kopplung zu folgendem Ausdruck reduziert werden:

$$\nu_d = \frac{g_{\text{Ni}} g_{\text{Fe}} S \mu_B^2 \mu_0}{4\pi h} \sum_{i=1}^3 K_i \frac{3 \cos^2 \vartheta_i - 1}{r_{i,\text{Ni}}^3} \quad (5.7)$$

wobei ϑ_i die Winkel zwischen der Achse des magnetischen Feldes \vec{B} und den Vektoren $\vec{r}_{i,\text{Ni}}$ sind. Die dipolare Frequenz hängt von dem Abstand zwischen den einzelnen Eisenionen zu dem [NiFe]-Zentrum ab, jeweils gewichtet mit dem Spinprojektionsfaktor. Diese Gleichung kann benutzt werden, um die dipolare Kopplung zwischen einem Metallcluster, der durch das Spinkopplungsmodell beschrieben wird, und einem zweiten Spin zu berechnen. Sind die Positionen der Metallionen z.B. durch Röntgenkristallographie bekannt, hängt die dipolare Kopplung allein von der Spinkopplung im Metallcluster ab.

Effekte durch Spinkopplung Der Einfluß der Spinkopplung auf das ELDOR-Spektrum kann durch unterschiedliche Anordnung von Spinprojektionsfaktoren bei gleichem Abstand zweier Spinzentren verdeutlicht werden. In Bild

5.3 sind berechnete ELDOR-Frequenzspektren von einem punktförmigen Spin $S = 1/2$ gezeigt, welcher 3 nm von einem zweikernigen Spinzentrum entfernt ist. Für das gekoppelte System wurde ein $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ System mit einem Abstand von 0.3 nm (10% des Spin-Spin Abstands) gewählt. In einem Zweispinsystem lassen sich Spinprojektionsfaktoren analytisch berechnen. In einem $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ System mit einem Spin $S_{\text{eff}} = 1/2$ ergibt sich für das Fe^{III} mit einem Spin $S_1 = 5/2$ ein Spinprojektionsfaktor $K_1 = +7/3$, für das Fe^{II} mit einem Spin $S_2 = 2$ ein Spinprojektionsfaktor $K_2 = -4/3$. In Bild 5.3 ist gezeigt, wie die im ELDOR-Experiment meßbare dipolar Kopplung von der Anordnung der Fe-Ionen abhängt. Befinden sich Fe^{II} und Fe^{III} in gleichem Abstand zum Beobachterspin, beträgt die senkrechte Komponente der dipolaren Kopplung ca. 2 MHz. Bei einer Orientierung in der sich das Fe^{III} mit seinem großen positiven Spinprojektionsfaktor dicht am Spin $S = 1/2$ vergrößert sich die Kopplung zu ca. 3 MHz. Ist in dieser Anordnung der große Spinprojektionsfaktor jedoch in der maximalen Entfernung vom Spin $S = 1/2$, so nimmt die Kopplung ihren minimalen Wert von ca. 1 MHz an. Es zeigt sich, daß die Resultate eines ELDOR-Experiments empfindlich von der Anordnung der Fe-Ionen und der zugehörigen Spinprojektionsfaktoren abhängen und demnach für eine Zuordnung benutzt werden können.

Effekte durch Spindichteverteilung Der Einfluß einer Spindichteverteilung auf ein ELDOR-Spektrum soll im Folgenden abgeschätzt werden, da im [NiFe]-Zentrum nur etwa 52% der Spindichte auf dem Nickel liegen [119]. 34% der Spindichte sind auf dem verbrückenden Liganden lokalisiert, der Rest verteilt sich über weitere Liganden [120, 121, 122, 123]. Als Modell (Bild 5.4) wurde ein System von zwei Spins $S = 1/2$ gewählt und ELDOR-Spektren berechnet. Während der eine Spin als Punkt-Dipol angenommen wird, hat der andere unterschiedliche Verteilungen über einen Bereich von 0.3 nm, wobei das Zentrum der Spindichteverteilung stets im Abstand von 3 nm zum ersten Spin liegt. Die ELDOR-Spektren zeigen keine signifikante Abweichung, daher wurde in der weiteren Analyse die Delokalisation der Spindichte auf dem [NiFe]-Zentrum vernachlässigt und ein Punkt-Dipol auf dem Ni-Ion angenommen.

Gepulste ELDOR-Experimente an ein oder zwei Metallzentren unterscheiden sich in zwei wesentlichen Punkten von Experimenten an organischen Radikalen. Im Folgenden werden Unterschiede, die durch Relaxationsverhalten sowie deutliche g -Anisotropie entstehen, wie sie oft in Metallzentren auftreten,

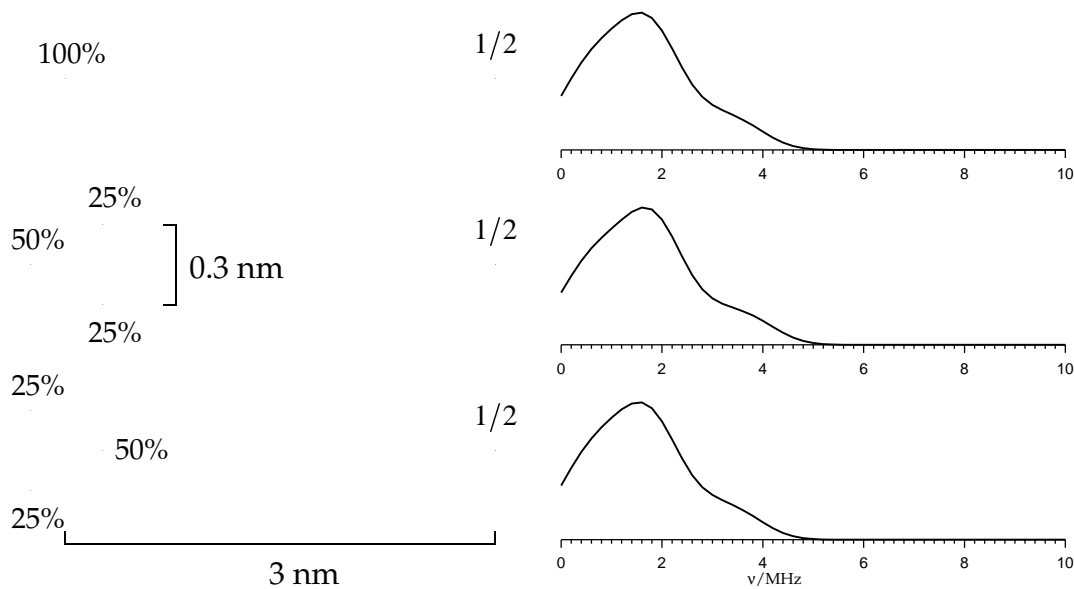


Abbildung 5.4: Der Effekt einer Spindichteverteilung auf ELDOR-Spektren wird durch ein Modellsystem von zwei Spins $S = 1/2$ simuliert. Der eine Spin nimmt unterschiedliche Verteilung der Spindichte an und koppelt mit einem Punkt-Dipol.

diskutiert.

Relaxation Das Messen dipolarer Wechselwirkungen zwischen zwei Spins wird stets durch die Relaxation, welche durch eben dieselbe Wechselwirkung beschleunigt sein kann, beschränkt. In Metallclustern tritt dieser Effekt verstärkt auf, da die einzelnen Ionen zu einem Gesamtspin koppeln und die Intra-Cluster Spin-Spin Wechselwirkung ein schneller Relaxationspfad ist. Bei 5 K hat der $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster eine Phasengedächtniszeit T_M von etwa 360 ns, das $[\text{NiFe}]$ -Zentrum von etwa 800 ns. Dies verkürzt die verfügbare Zeit zum Aufnehmen von Datenpunkten für das ELDOR-Experiment signifikant verglichen mit Experimenten an organischen Radikalen und reduziert die Frequenzauflösung.

g -Anisotropie Mit den Mikrowellenpulsen werden Moleküle in bestimmter Ausrichtung bezüglich des Magnetfelds \vec{B} selektiv angeregt. In einem Zweispinsystem, welches von den Mikrowellenpulsen vollständig angeregt werden kann, resultiert das ELDOR-Experiment in einem kompletten Pake-Pattern der dipolaren Kopplung, aus dem die Hauptwerte direkt ermittelt werden können.

Ist die g -Anisotropie größer als die Anregungsbandbreite der Pulse, werden nur bestimmte Orientierungen der Spins angeregt. In Bild 5.5 sind zwei Spins mit identischen g -Hauptwerten, aber mit unterschiedlichen Orientierungen gezeigt. Im EPR-Spektrum sind die g -Werte gekennzeichnet, die durch Detektion und Inversion angeregt werden. Die entsprechenden Orientierungen sind auf Kugeloberflächen dargestellt. Für eine ELDOR-Modulation muß das Molekül derart orientiert sein, daß beide Spinsysteme in Resonanz sind. Durch diese Korrelation kommt es zu einem multiplikativen Zusammenhang der beiden einzelnen Orientierungsselektionen. Die orientierungsselektive Anregung resultiert in einer Einkristall-artigen Auswahl einzelner Linien. Dieser Effekt kann manchmal sogar bei Systemen mit zwei organischen Radikalen beobachtet werden [124, 125, 126].

In der Hydrogenase zeigt das oxidierte [NiFe]-Zentrum eine g -Anisotropie über $\Delta g = 0.3$, wogegen die Anregungsbandbreite eines (32 ns) π -Pulses im X-Band etwa $\Delta g \approx 0.003$ (bei $g \approx 2$) beträgt. Hauptsächlich wegen der g -Anisotropie des [NiFe]-Zentrums ist es nicht möglich das komplette EPR-Spektrum anzuregen (Bild 5.5).

Dies führt zu Abweichungen des Frequenzspektrums vom vollständigen Pake-Pattern, da in diesem Spektrum nur dort Linien erscheinen, wenn beide Spinsysteme angeregt sind. Das gepulste ELDOR-Spektrum hängt von den Winkeln zwischen allen selektierten Orientierungen und der dipolaren Achse ab.

5.2.2 Analyse der Messungen

Das 2P-Echospektrum der Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F im oxidierten Zustand ist in Bild 5.6A gezeigt.

Das Signal auf der Hochfeldseite wird dem $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster zugeordnet und ist gegenüber dem breiten Signal auf der Niederfeldseite, welches mit dem [NiFe]-Cluster assoziiert ist, herunterskaliert. Um ein gepulstes ELDOR-Experiment durchzuführen, wurde eine Hahn-Echosequenz mit der Frequenz ν_{det} auf das [NiFe]-Zentrum angewandt. Die zweite Frequenz ν_{inv} wurde so gewählt, daß sie den Spin des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters invertiert. Es wurden gepulste ELDOR-Experimente an verschiedenen Feldpositionen und mit unterschiedlichen Frequenzdifferenzen in dem zugänglichen Bereich durchgeführt (repräsentative Spektren sind in den Bildern 5.6-5.8 gezeigt). Im 2P EPR-Spektrum ist das Paar von g -Werten für das ELDOR-Experiment in Bild 5.6C gekennzeichnet. Bild 5.6B zeigt die Zeitabhängigkeit der Zwei-Puls Echoamplitude

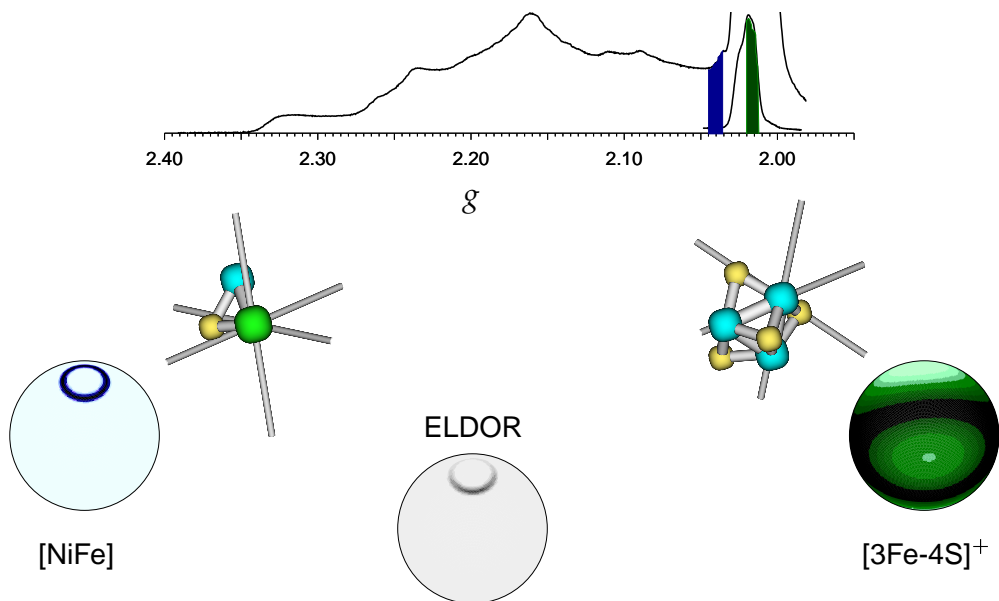
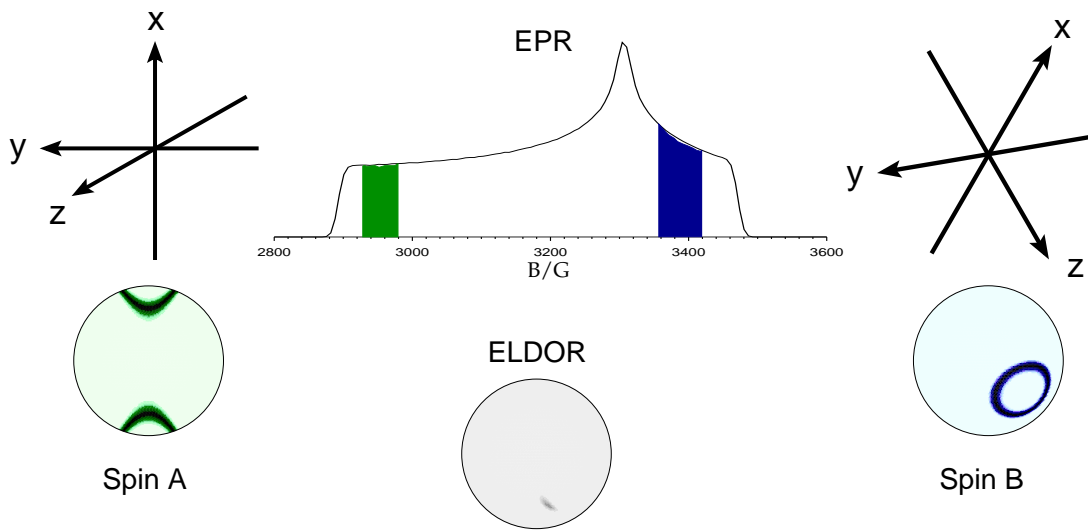


Abbildung 5.5: Oben: Orientierungsselektion in einem ELDOR-Experiment. Im EPR-Spektrum von identischen zwei Spins A, B, sind die von zwei Mikrowellenpulsen angeregten Feldbereiche simuliert. Durch Selektion der g -Werte werden unterschiedliche Orientierungen angeregt, welche auf den Kugeloberflächen dargestellt sind. Die mittlere Kugel stellt die am ELDOR-Experiment beteiligten Orientierungen dar. Unten: Orientierungsselektion in einem ELDOR-Experiment an Hydrogenase. Im EPR-Spektrum sind die Anregungsbandbreiten der beiden Pulse im ELDOR-Experiment markiert. Die relative Lage der beiden g -Tensoren in der Molekülstruktur und die angeregten Orientierungen der einzelnen Spins sowie die Selektion im ELDOR-Experiment sind dargestellt.

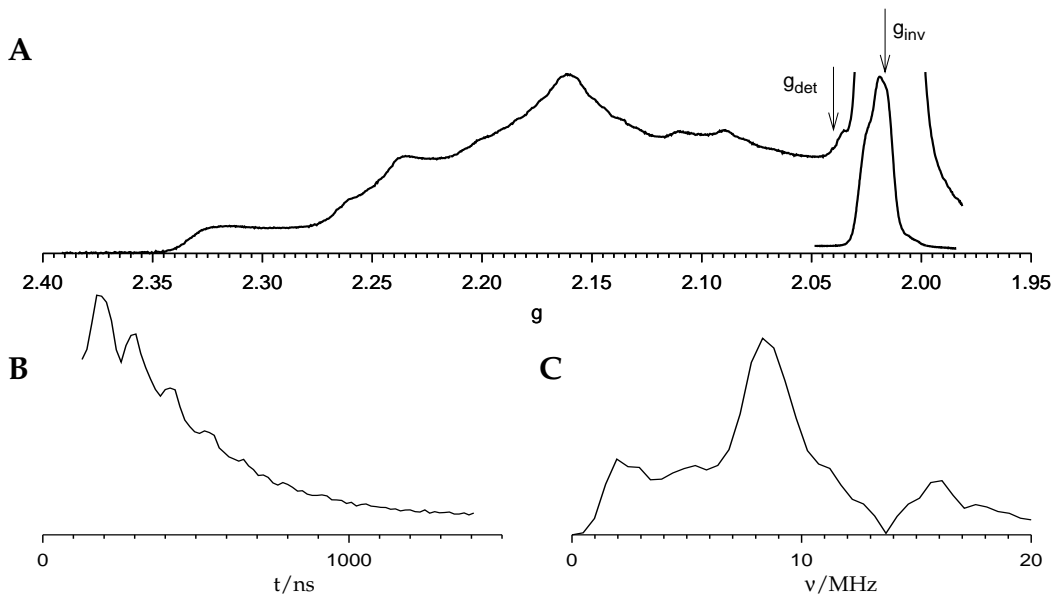


Abbildung 5.6: **A** 2P-FSE Spektrum der Hydrogenase ($\nu_{mw} = 9.7057$ GHz). Das Spektrum des $[3Fe-4S]^+$ -Clusters ist (ca. um einen Faktor 50) herunterskaliert, um das $[NiFe]$ -Signal sichtbar zu machen. **B** 3P-ELDOR Zeitspur, aufgenommen bei $B = 3400$ G mit einer Detektionsfrequenz $\nu_{det} = 9.7077$ GHz ($g_{det} = 2.040$) und einer Inversionsfrequenz $\nu_{inv} = 9.5983$ GHz ($g_{inv} = 2.017$), die g -Werte sind im 2P EPR-Spektrum markiert. **C** ELDOR-Frequenzspektrum

bei $B = 3400$ G, wobei der Pumpuls mit $\nu_{inv} = 9.5983$ GHz ($g_{inv} = 2.017$) in dem Zeitraum zwischen den beiden Pulsen mit der Detektionsfrequenz $\nu_{det} = 9.7077$ GHz ($g_{det} = 2.040$) verschoben wird.

Die Linie mit der größten Intensität in der Fouriertransformierten der ELDOR-Zeitspur bei 8.5 MHz wird der dipolaren Kopplung zwischen dem $[NiFe]$ -Zentrum und dem $[3Fe-4S]^+$ -Cluster zugeordnet, da diese Frequenz nicht in Experimenten vorkommt, bei denen die beiden ELDOR-Frequenzen so gewählt sind, daß die angeregten Spins ausserhalb des spektralen Bereiches des $[3Fe-4S]^+$ -Clusters befinden, z.B. bei $B = 3250$ G mit $\nu_{det} = 9.7077$ GHz ($g_{det} = 2.134$) und $\nu_{inv} = 9.6071$ GHz ($g_{inv} = 2.112$) (nicht gezeigt).

Es ist auch möglich gepulste ELDOR-Modulationen auf dem intensiven $[3Fe-4S]^+$ -Cluster Signal bei $B = 3380$ G mit $\nu_{det} = 9.7029$ GHz ($g_{det} = 2.015$) zu detektieren, wenn Teile des $[NiFe]$ -Signals invertiert werden. Eine entsprechende Zeitspur mit $\nu_{inv} = 9.8684$ GHz ($g_{inv} = 2.050$), ist in Bild 5.7B gezeigt. Die Modulationstiefe auf dem Echo ist in diesem Fall signifikant kleiner verglichen mit einer Detektion auf dem $[NiFe]$ -Zentrum. Dies ist darauf zurückzuführen, daß nur ein kleiner Teil des $[3Fe-4S]^+$ -Echos von der Inversion des orien-

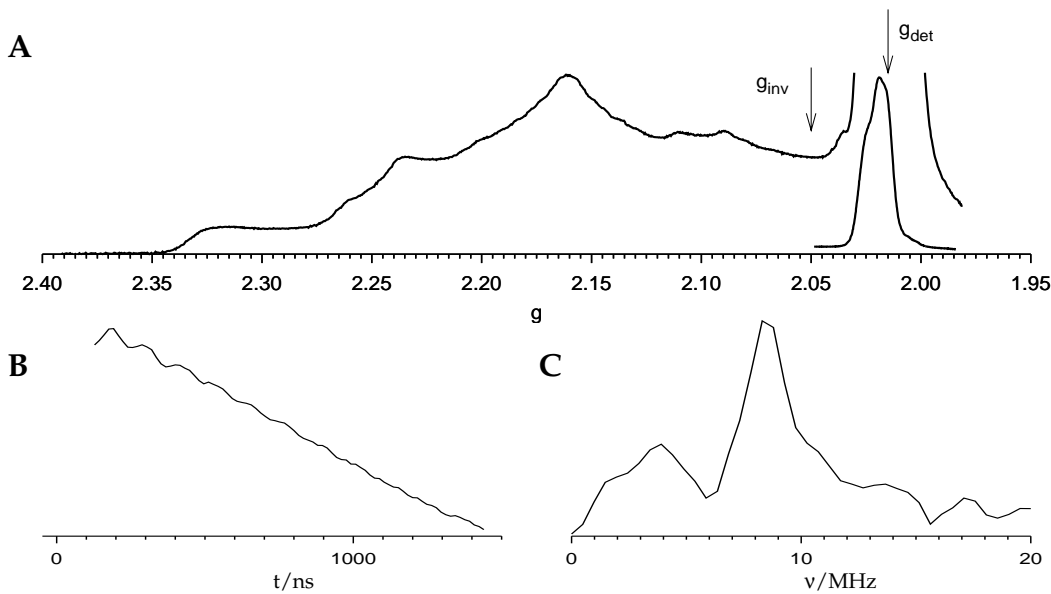


Abbildung 5.7: ELDOR bei Detektion auf dem $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster. **A** 2P-FSE Spektrum der Hydrogenase ($\nu_{\text{mw}} = 9.7057$ GHz). Siehe Bild 5.6 **B** 3P ELDOR-Zeitspur, aufgenommen bei $B = 3380$ G mit einer Detektionsfrequenz $\nu_{\text{det}} = 9.7029$ GHz ($g_{\text{det}} = 2.015$) und einer Inversionsfrequenz $\nu_{\text{inv}} = 9.8684$ GHz ($g_{\text{inv}} = 2.050$), die g -Werte sind im 2P EPR-Spektrum markiert. **C** ELDOR-Frequenzspektrum

tierungsselektierten Anteils der $[\text{NiFe}]$ -Spins, betroffen ist. Das Verhältnis der Modulationstiefen in den beiden Fällen stimmt mit den relativen Signalintensitäten, bei jeweils Detektion und Inversion, überein. Dieses Experiment ergibt ein ähnliches Frequenzspektrum verglichen mit einer Detektion auf dem $[\text{NiFe}]$ -Zentrum (Bild 5.6C).

Um ein Totzeit-freies Experiment durchzuführen wurde eine 4P ELDOR-Sequenz mit einem refokussierten Echo [24] durchgeführt (Bild 5.8) bei $B = 3440$ G, detektierend mit $\nu_{\text{det}} = 9.7015$ GHz ($g_{\text{det}} = 2.051$) und der Inversionspuls mit $\nu_{\text{inv}} = 9.5390$ GHz ($g_{\text{inv}} = 2.016$) den $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster anregend. Jedoch wird durch den erhöhten Zeitabstand zwischen erstem $\pi/2$ -Puls und der Detektion das erreichbare Signal/Rausch-Verhältnis deutlich reduziert.

Unter der Annahme, daß zwei $S = 1/2$ wie Punkt-Dipole wechselwirken (Gl. 5.1) sollte ein gepulstes ELDOR-Experiment aufgrund des aus der Kristallstruktur bekannten Abstands zwischen $[\text{NiFe}]$ -Zentrum und $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster von 2.01 nm eine Frequenz von 6.6 MHz zeigen, falls der Spin des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters auf dem Eisenion lokalisiert ist, welches dem $[\text{NiFe}]$ -Zentrum am nächsten ist (Fe2) und eine Frequenz von 4.8 MHz aufgrund eines Abstands von 2.23 nm, falls der Spin auf dem weitest entfernten Fe Ion (Fe1) locali-

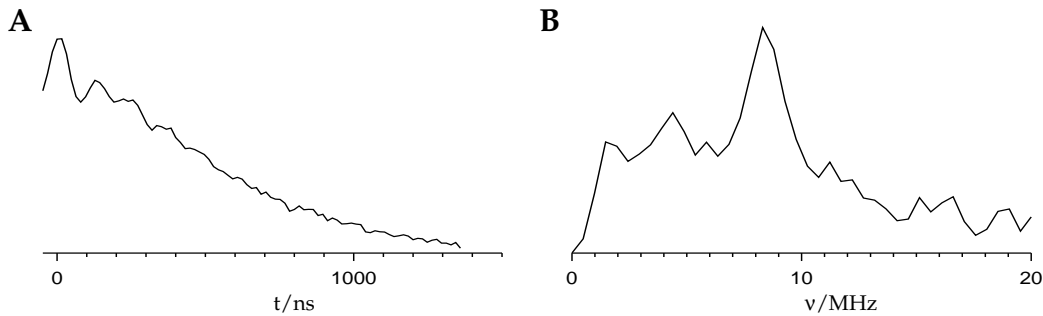


Abbildung 5.8: Asymmetrisches 4P ELDOR an der Hydrogenase. **A** 4P ELDOR-Zeitspur, aufgenommen bei $B = 3440$ G mit einer Detektionsfrequenz $\nu_{det} = 9.7015$ GHz ($g_{det} = 2.051$) und einer Inversionsfrequenz $\nu_{inv} = 9.5390$ GHz ($g_{inv} = 2.016$). **B** ELDOR-Frequenzspektrum.

siert wäre (die Numerierung der Fe Ionen erfolgt gemäß der Röntgenstruktur (PDB-Eintrag (<http://www.rcsb.org>): 1H2A) und ist in Bild 5.2 dargestellt). Bild 5.9 zeigt das berechnete Spektrum für zwei Spins $S = 1/2$ in einem Abstand von 2.14 nm (mittlerer Abstand von Fe_i und Ni) mit einem Maximum bei 5.2 MHz. Diese Frequenzen liegen deutlich unter den Frequenzen, welche in den diversen Experimenten gemessen wurden. Unter Annahme der Punkt-Dipol Näherung entspricht die gemessene Frequenz von 8.5 MHz in Bild 5.6C einem Abstand von 1.84 nm, welcher 0.3 nm unter dem mittleren Abstand zwischen [NiFe]-Zentrum und $[3Fe-4S]^+$ -Cluster liegt.

Wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben ist es notwendig die innere Struktur des $[3Fe-4S]^+$ -Clusters explizit durch die Spinprojektionsfaktoren K_i und die Abstände der einzelnen Fe-Ionen zum [NiFe]-Zentrum zu berücksichtigen. Da die Positionen der Ionen im $[3Fe-4S]^+$ -Cluster und im [NiFe]-Zentrum in der Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F aus der Röntgenstrukturanalyse bekannt sind, können Simulationen des gepulsten ELDOR-Spektrums benutzt werden, um die Spinprojektionsfaktoren den einzelnen Eisenionen zuzuordnen, indem für alle möglichen Permutationen der drei Spinprojektionsfaktoren die Spektren berechnet werden (Tabelle in Bild 5.9). Dort sind Simulationen eines experimentellen Spektrums (Bild 5.6) für alle möglichen Arrangements von Spinprojektionsfaktoren dargestellt. Es wurden die ELDOR-Spektren für Ni-A und Ni-B simuliert, deren g -Tensoren sich in Hauptwerten und Orientierung geringfügig unterscheiden (Kapitel 5.1). In den Simulationen 5.9B und 5.9C ist der größte Spinprojektionsfaktor ($K = 2.28$) auf dem Eisenion (Fe1) angeordnet, welches am weitesten vom [NiFe]-Zentrum entfernt ist; in den Simulationen 5.9D und 5.9E ist er auf dem mittleren Fe Ion (Fe3) angeordnet. Diese vier

Simulationen weisen keine Ähnlichkeit mit dem gemessenen Spektrum auf. In den Simulationen **5.9F** und **5.9G**, wo der größte Spinprojektionsfaktor auf dem Eisenion (Fe²⁺) angeordnet ist, welches dem [NiFe]-Zentrum am nächsten ist, wird die Struktur des experimentell bestimmten Spektrums gut wieder gegeben. Die Unterschiede zwischen den Simulationen **5.9F** und **5.9G** sind zu klein für eine eindeutige Zuordnung der beiden anderen Ionen Fe¹ und Fe³. Bei der Simulation des experimentellen Spektrums (Bild **5.10**) wurde, neben der Orientierungsselektion, auch berücksichtigt, daß die Hydrogenase 'as-isolated' Ni-A und Ni-B enthält. Die Simulation enthält entsprechende Anteile beider Spezies. Auch die anderen gemessenen Spektren konnten mit demselben Arrangement von Spinprojektionsfaktoren simuliert werden.

Für die Diskussion, welche Effekte die Verlässlichkeit der oben gemachten Zuordnung beeinflussen, berücksichtigen wir zuerst die Annahme für den Abstand zwischen den Spinzentren, welcher der Röntgenstruktur entnommen wurde. Geringe Änderungen in dem Abstand zwischen den beiden Spinzentren könnte eine Folge von unterschiedlichen Probenpräparationen für die Röntgenstrukturanalyse und der hier verwandten Probe sein. Wie zuvor erläutert, entspricht die gemessene ELDOR-Frequenz einem effektiven Punktdipol-Abstand von 1.8 nm. Die Zuordnung der Spinprojektionsfaktoren für die Simulationen **B-E** ergeben ELDOR-Frequenzen, welche gleich oder kleiner als die aus der Punkt-Dipol Näherung (Simulation **5.9A**) sind. Daher wäre eine Abstandsverringerung von wenigsten 0.3 nm nötig, um eine der Simulationen **B-E** mit den experimentellen Befunden in Übereinstimmung zu bringen. Wir halten Änderungen in der Proteinstruktur dieser Hydrogenase, welche zu einer Abstandsänderung von 0.3 nm bei einem Abstand von 2.1 nm führen, für extrem unwahrscheinlich.

Ein anderer wichtiger Parameter, welcher das berechnete Frequenzspektrum stark beeinflußt, ist der Winkel zwischen der g_3 -Achse des [NiFe] g -Tensors und dem Vektor, der die beiden Spinzentren verbindet. EPR Experimente an Einkristallen [104] und orientierungsselektive ENDOR Experimente an gefrorener Lösung [127] haben nahezu identische Orientierungen für die Lage der g_3 -Achse des [NiFe]-Zentrums gezeigt. Aus der Proteinstruktur läßt sich ein Winkel zwischen g_3 und dem Verbindungsvektor von etwa 90° entnehmen. Jegliche Abweichung von dieser fast senkrechten Anordnung der beiden Achsen würde zu einer Reduktion der berechneten dipolaren Frequenzen führen und damit eine andere Zuordnung als F und G noch weiter ausschließen. Aufgrund der geringen g -Anisotropie des [3Fe-4S]⁺-Clusters hat die Orientie-

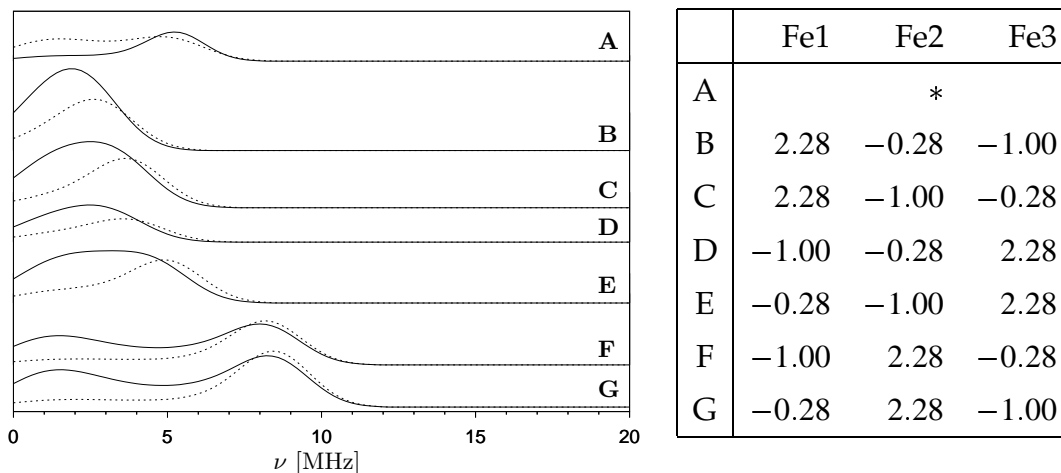


Abbildung 5.9: Simulationen des gepulsten ELDOR-Spektrums der Hydrogenase für unterschiedliche Anordnungen der Spinprojektionsfaktoren gemäß nebenstehender Tabelle. Durchgezogene Linie: Ni-A; unterbrochene Linie: Ni-B. In der Tabelle sind die Permutationen der Spinprojektionsfaktoren K_i (2.28, -0.28, -1.00) bezüglich der Fe Ionen dargestellt. Für die Numerierung der Fe Ionen siehe Bild 5.2. * Spin 1/2 bei einem mittleren Fe_i -Abstand von 2.14 nm.

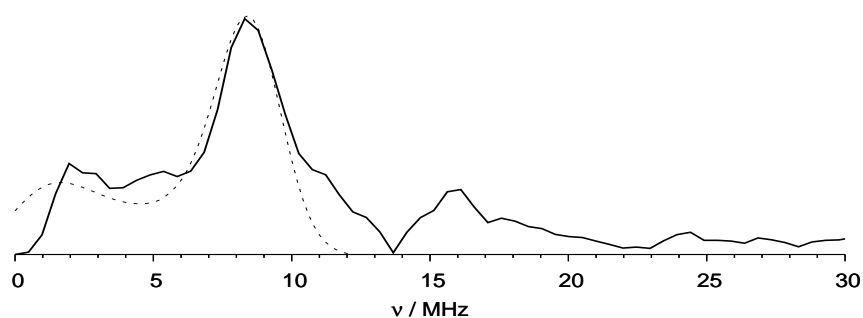


Abbildung 5.10: ELDOR-Spektrum und Simulation (gepunktete Linie) mit 30% Ni-A und 70% Ni-B und Berücksichtigung von Orientierungsselektion und Spinkopplung im $[3Fe-4S]^+$ -Cluster.

zung dieses g -Tensors wenig Einfluß auf das berechnete Frequenzspektrum, daher beeinflussen potentielle Fehler in dessen Orientierung nicht die oben getroffene Zuordnung.

5.2.3 Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit wurde die dipolare Kopplung zwischen zwei Metallzentren, einem [NiFe]-Zentrum und einem $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster, in einer Hydrogenase mittels gepulster ELDOR-Spektroskopie untersucht. Die hier gemessene dipolare Kopplung wurde unter Berücksichtigung der Metallionabstände aus der Röntgenstruktur und den Spinprojektionsfaktoren aus einer Mößbauanalyse ausgewertet und zeigte sich in guter Übereinstimmung mit den Daten.

Es wurde gezeigt, daß die Kopplung der magnetischen Momente im $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster, so behandelt werden muß, daß der Beitrag jedes einzelnen Spins zum Gesamtspin explizit durch den Spinprojektionsfaktor betrachtet wird. Die Frequenz der dipolaren Kopplung, die im ELDOR-Experiment beobachtet wird, hängt stark von der Anordnung der Spinprojektionsfaktoren im Cluster ab. Durch die Simulation experimenteller Spektren ist es möglich, Spinprojektionsfaktoren eines Clusters zu den einzelnen Ionen zuzuordnen. Für den $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster in Hydrogenase konnte gezeigt werden, daß der größte Spinprojektionsfaktor auf dem Fe-Ion lokalisiert ist, welches dem [NiFe]-Zentrum am nächsten ist. Aufgrund der Position des [NiFe]-Zentrums kann keine weitere Zuordnung getroffen werden. Um die anderen beiden Spinprojektionsfaktoren eindeutig zuordnen zu können, müßte der zweite Spin, idealerweise, auf der Verlängerung der Fe1-Fe3 Verbindungssachse lokalisiert sein. Gepulste ELDOR-Experimente zwischen dem $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster und dem zweiten Spin würden, abhängig vom Arrangement der Spinprojektionsfaktoren, unterschiedliche Resultate erzeugen und so die Zuordnung der Spinkopplung vervollständigen.

Die Abhängigkeit der dipolaren Kopplung zwischen einem mehrkernigen Metallcluster und einem zweiten Beobachterspin von der inneren Struktur des Metallclusters muß auch in anderen Systemen in Betracht gezogen werden, z. B. für den tetramerischen Mn-Cluster im Photosystem II. Dort werden Abstände vom Mn_4 -Cluster zu organischen Radikalen bestimmt, welche sich in unterschiedlichen Oxidationszuständen des Mn_4 -Clusters um bis zu 7 Å än-

den [128]. Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse sollten die ELDOR-Messungen am Photosystem unter Berücksichtigung der Änderung von Spinprojektionsfaktoren neu analysiert werden.

5.3 ELDOR am Einkristall

Die Lage der g -Matrix eines paramagnetischen Zentrums in einer molekularen Struktur wird zum Teil durch quantenmechanische Rechnungen oder durch EPR-Messungen am Einkristall und anschließender Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Auf diese Weise konnten die g -Hauptachsen des [NiFe]-Zentrums in der Hydrogenase bestimmt werden, die wurde Lage der Achsen im $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster jedoch nicht eindeutig ermittelt. Im folgenden Abschnitt soll gezeigt werden, wie dies eindeutig durch ELDOR-Messungen bestimmt werden kann.

Die Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F kristallisiert in der einfach-orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$. In der Elementarzelle liegen vier Moleküle (Einbaupositionen) vor, deren räumliche Orientierungen durch 180° -Rotationen um die drei zueinander senkrechten kristallographischen Achsen in Beziehung stehen. Für eine zufällige Orientierung des Kristalls bezüglich des Laborsystems sind die Moleküle magnetisch inäquivalent. Dies ist im EPR-Spektrum durch vier Linien pro paramagnetischer Spezies zu erkennen.

Bei speziellen Orientierungen reduziert sich die Zahl der inäquivalenten Einbaupositionen. Liegt der Kristall mit einer kristallographischen Achse parallel zu B_0 , so sind alle Moleküle magnetisch äquivalent, liegt eine Kristallebene parallel zu B_0 sind die Moleküle paarweise äquivalent.

Durch eine EPR-Analyse von Einkristallen der Hydrogenase und anschließender Strukturanalyse des Kristalls in identischer Orientierung konnte die Lage der g -Tensoren im [NiFe]-Zentrum (für Ni-A und Ni-B) sowie für den $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster auf vier Orientierungen reduziert werden. Die Mehrdeutigkeit kommt durch die vier Moleküle pro Einheitszelle zustande zwischen denen nicht unterschieden werden kann. Durch eine molekulare Betrachtung des [NiFe]-Zentrums und der Symmetrie seiner Ligandensphäre wurde der g -Tensor eindeutig festgelegt, die Zuordnung wurde durch DFT-Rechnungen bestätigt [129]. Beim $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster ist eine solche Analyse nicht möglich, da die C_{3v} -Symmetrie des Clusters nicht direkt mit einem rhombischen g -Tensor in Einklang zu bringen ist. Diese Spindichteverteilung kommt zustande, da

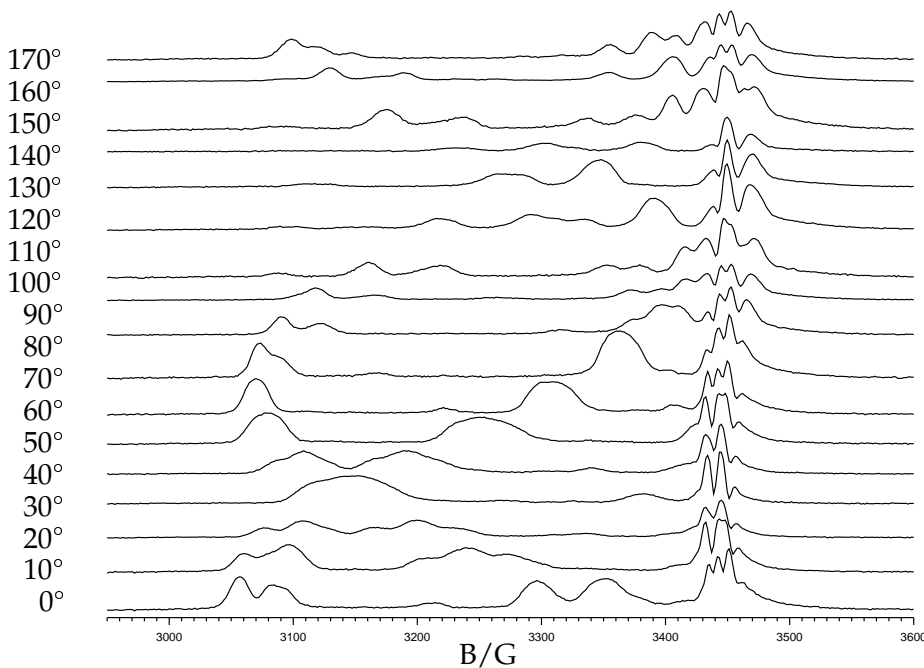


Abbildung 5.11: 2P-EPR Rotationsmuster eines Einkristalls von Hydrogenase. Es sind vier magnetisch inäquivalenten Einbaupositionen vorhanden, die im Ni-Spektrum gut unterscheidbar, aber im Spektrum des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters nur schlecht aufgelöst sind.

der g -Tensor aus den drei individuellen, nicht bekannten g -Tensoren der Fe-Ionen zusammengesetzt ist.

Durch die EPR-Messungen am Einkristall ist die relative Lage des $[3\text{Fe-4S}]^+$ g -Tensors zum g -Tensor des $[\text{NiFe}]$ -Zentrums bekannt. Da aber die Signale von $[\text{NiFe}]$ -Zentrum und $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster aus demselben Molekül nicht von denen aus anderen Einbaupositionen unterschieden werden können, bleibt die vierfache Mehrdeutigkeit des g -Tensors erhalten.

Eine Möglichkeit eine Zuordnung herzustellen, wäre die Kopplung beider Elektronenspins an einen Kernspin. Da die beiden paramagnetischen Zentren jedoch 1.8 nm entfernt liegen, sind solche Kopplungen nicht auflösbar.

Hier soll vorgestellt werden, wie mittels ELDOR eine Zuordnung der $[\text{NiFe}]$ -Einbaupositionen zu Einbaupositionen des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters möglich ist. Prinzipiell kann so die Orientierung des g -Tensors des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters eindeutig festgelegt werden. Im X-Band ist aufgrund geringer Auflösung der vier Einbaupositionen des FeS-Signals eine Zuordnung unsicher, eine Wiederholung der Experimente im Q-Band ist für eine vollständige Analyse notwendig. Mittels 2P-EPR wurde im X-Band das Rotationsmuster (Bild 5.11) eines

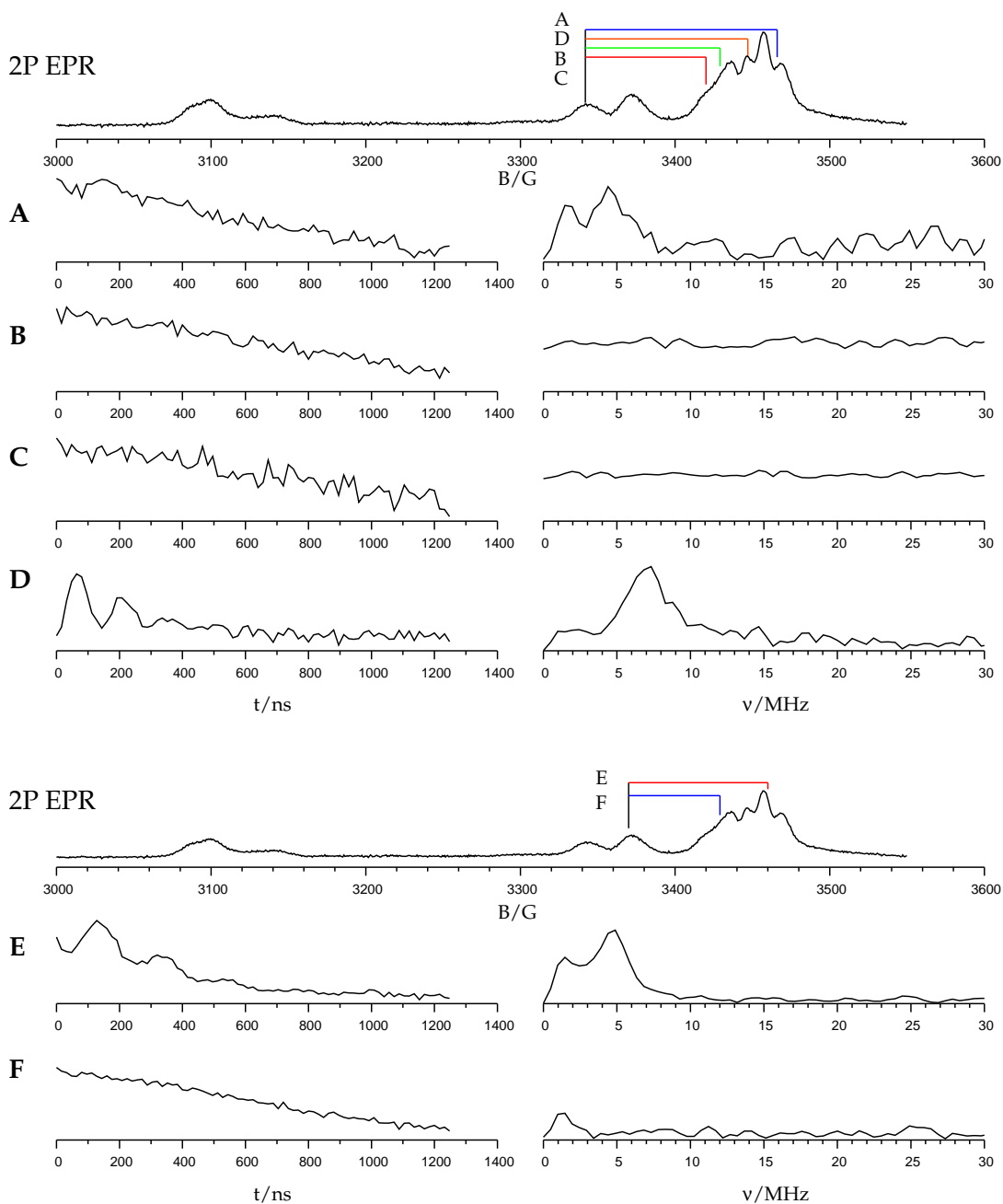


Abbildung 5.12: A-F 3P ELDOR-Messungen an Einkristallen der Hydrogenase. Bei einer Orientierung des Kristalls wurde jeweils auf einer Ni-Einbauposition detektiert und unterschiedlichen g -Werte im Bereich des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters invertiert. In den 2P EPR-Spektren sind die beteiligten Feldpositionen markiert, die exakten g -Werte und Frequenzen sind im Text gegeben.

Einkristalls von Hydrogenase aufgenommen. Die Ni-Einbaupositionen (in der folgenden Betrachtung werden nur die intensiveren Ni-B Signale berücksichtigt) verlaufen nahezu paarweise, die Signale sind aber deutlich separiert. Der Kristall liegt mit einer kristallographischen Ebene fast parallel zu B_0 . Es wurde eine Orientierung gewählt, bei der zwei der Ni-Signale nahe am FeS-Signal auftreten (Bild 0° in 5.11), daß mit zwei Frequenzen innerhalb einer üblichen Resonatorbandbreite beide Spins angeregt werden können. Eine Resonanz ist bei 3342 G, eine bei 3370 G erkennbar, die anderen beiden Resonanzen liegen bei 3100 G und 3120 G außerhalb des mit Zwei-Frequenz ELDOR zugänglichen Bereichs.

Im Feldbereich des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters zwischen 3400 G und 3500 G sind sechs Linien erkennbar. Aufgrund der geringen Auflösung des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster Signals können hier den einzelnen Linien nicht direkt Einbaupositionen zugeordnet werden. Auch ist es möglich das noch Ni-Linien in diesem Bereich auftreten. Die Zuordnung der Linien kann daher nur durch eine vollständige Analyse der Rotationsmuster erfolgen, welche für das Ni-Signal im X-Band möglich ist, für das FeS-Signal sind eigentlich W-Band Messungen notwendig, mit entsprechender Vorkenntnis aber Q-Band Messungen ausreichend. Es wurden ELDOR-Experimente durchgeführt, bei denen auf jeweils einer der Ni-Einbaupositionen detektiert wurde und an verschiedenen Stellen im Resonanzbereich des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters gepumpt wurde. Bei den Experimenten 5.12 A-D wurde bei einem Feld von 3342 G und einer Frequenz von $\nu_{det} = 9.74485$ GHz ($g_{det} = 2.0834$) detektiert. Wird ein Inversionspuls mit einer Frequenz von $\nu_{inv} = 9.4509$ GHz ($g_{inv} = 2.0205$) angewandt (Bild 5.12 D), so ist eindeutig eine ELDOR-Modulation erkennbar. Die Hauptfrequenz liegt bei 7.5 MHz, damit 1 MHz tiefer als in gefrorener Lösung. Diese Frequenzverschiebung kann durch die spezielle Orientierungsselektion auf beiden Signalen zustande kommen. Bei Inversionsfrequenzen von $\nu_{inv} = 9.5275$ GHz ($g_{inv} = 2.0369$, Bild 5.12 C) oder $\nu_{inv} = 9.5012$ GHz ($g_{inv} = 2.0313$, Bild 5.12 B) ist keine Modulation erkennbar. Eine schwache ELDOR-Modulation tritt bei einer Inversionsfrequenz von $\nu_{inv} = 9.3965$ GHz ($g_{inv} = 2.0089$, Bild 5.12 A) auf, deren Hauptfrequenz bei 4.4 MHz liegt. Bei den Experimenten (Bild 5.12 E-F) wurde bei einem Feld von 3370 G und einer Frequenz von $\nu_{det} = 9.74485$ GHz ($g_{det} = 2.0661$) detektiert. Wird das $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster Signal mit $\nu_{inv} = 9.4930$ GHz ($g_{inv} = 2.0127$) invertiert, so moduliert die Echoamplitude mit einer Frequenz von 5 MHz (Bild 5.12 E). Mit einer Inversionsfrequenz von $\nu_{inv} = 9.5801$ GHz ($g_{inv} = 2.0311$, Bild 5.12 F) ist eine Modulation mit geringer

Frequenz und geringer Amplitude erkennbar.

Für eine vollständige Auswertung müssen die Rotationsverläufe sämtlicher paramagnetischer Spezies (Ni-A, Ni-B, $[3\text{Fe-4S}]^+$) für die Ausrichtung des Kristalls im Laborsystem bekannt sein. Damit ist mittels ELDOR-Experimenten wie den oben gezeigten eine Zuordnung der vier $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster zu den $[\text{NiFe}]$ -Zentren im selben Moleküle möglich. Es muß beachtet werden, daß bei speziellen Orientierungen keine ELDOR-Modulationen auftreten, auch wenn die beiden paramagnetischen Spezies aus demselben Molekül stammen. Fehlinterpretationen durch die Messung intermolekularer Abstände können nur bei der Auswertung geringer Frequenzen (≤ 3 MHz) auftreten. Der Abstand eines $[\text{NiFe}]$ -Zentrums zu einem $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster beträgt 2.1 nm. Der Abstand zu den $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clustern in den benachbarten Molekülen beträgt mehr als 4 nm, selbst bei maximaler Frequenzerhöhung durch die Anordnung der Spinprojektionsfaktoren, beträgt die dipolare Frequenz höchstens 2.5 MHz.

Es wurde gezeigt, daß durch ELDOR-Experimente die Lage der g -Matrix im $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster prinzipiell bestimmt werden kann. Diese Zuordnung konnte hier jedoch nicht durchgeführt, da die g -Anisotropie des $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters im X-Band nicht groß genug ist, um die Linien der unterschiedlichen Einbaupositionen im Kristall genügend aufzulösen. Eine Durchführung der Experimente bei höherer Frequenz (z. B. im Q-Band) wäre nötig. Die hier vorgestellten Experimente zeigen, daß ELDOR eine Möglichkeit der Zuordnung identischer aber magnetisch inäquivalenter Moleküle bietet. Die Methode kann daher bei der Verknüpfung der Geometrie von Spinzentren mit kristallographischen Daten über die molekulare Geometrie behilflich sein.