

Kapitel 6

Relaxationszeitmessungen an $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ in *Rb. sphaeroides* R26

Im folgenden Kapitel wird eine Untersuchung der T_2 -Relaxationszeiten der Chinonkofaktoren $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ in bakteriellen Reaktionszentren (Rz) von *Rb. sphaeroides* R26 mit Hilfe von ESE (Elektronenspinecho, siehe Abb. 2.2) detektierter EPR bei 95 GHz/3.4 T (W-Band) und 180 GHz/6.3 T (G-Band) und bei verschiedenen Temperaturen (120 K, 140 K, 160 K und 180 K bzw. 190 K) dargestellt. Die folgenden beiden Abschnitte beschreiben jeweils die Funktion von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ im Rz sowie die für die Experimente notwendigen apparativen Voraussetzungen und Präparationen. Die Messungen sind in Abschnitt 6.4 zusammengefasst. Die EPR-Spektren zeigen mit zunehmendem Pulsabstand eine Veränderung der Linienform, die auf eine Orientierungsabhängigkeit¹ der Relaxation zurückzuführen ist. Die Orientierungsabhängigkeit hängt sowohl von der Temperatur als auch von der Mikrowellenfrequenz ab. Ziel der Messungen war es, aus der Orientierungsabhängigkeit der Relaxation die Bindungsstruktur von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ sowie Konformationsfluktuationen des Proteins mit Hilfe der Modulationen des g-Tensors zu untersuchen. In früheren Arbeiten [18, 143] wurden die 2D-ESE-Spektren durch stochastische g-Tensor-Modulationen im Rahmen der Redfield-Theorie [29] simuliert. Die aus meinen Simulationen gewonnenen Amplituden und Korrelationszeiten der g-Tensor-Modulationen sind in [18] veröffentlicht. Das dafür neu entwickelte Modell zur Relaxationszeitbestimmung ist in Abschnitt 2.3 dargestellt. Am Ende meiner Arbeit gelang es mir, in Kooperation mit der AG von Prof. Prisner (Goethe Universität Frankfurt/M.) Messungen bei 180 GHz durchzuführen. Die Ergebnisse dieser bis dahin aus apparativen Gründen nicht

¹Der Begriff Orientierungsabhängigkeit bezieht sich auf die durch den Mikrowellenpuls an einer bestimmten Feldposition selektierten Orientierungen des Moleküls relativ zum äußeren Feld (siehe Abb. 2.3).

möglichen Messungen stellen die bisherigen Simulationen in Frage und ergeben neue Erkenntnisse über die Relaxationsmechanismen in Rzn, die in Abschnitt 6.5 diskutiert werden.

6.1 Einleitung

Molekülbewegungen in Festkörpern, Gläsern oder Proteinen können hervorragend mit ESE-Spektroskopie untersucht werden (eine Übersicht über verschiedene Verfahren und die untersuchten Molekülklassen wird u.a. in [24, 144, 145] gegeben). Besonders zur Untersuchung orientierungsabhängiger dynamischer Linienverbreiterungen durch die Resonanzfrequenz modulierende Molekülfuktuationen wurden mit Erfolg ESE-Untersuchungen durchgeführt [38, 143, 146–148]. Je nach den das EPR-Spektrum dominierenden Linienverbreiterungsmechanismen wurde dabei entweder die Modulation des Hyperfeintensors [146–148] oder des g-Tensors [7, 143, 149] als Sonden der Bewegung benutzt. Für die Untersuchung von Modulationen des g-Tensors ist wegen ihrer erhöhten spektralen Auflösung kleiner g-Tensor-Anisotropien vor allem die Hochfeld-ESE geeignet. Eine Einführung in die Methode des 2D-ESE findet sich in Unterabschnitt 2.5.3.

Da die Anisotropie des g-Tensors von $UQ_{10}^{\bullet-}$ nur $\approx 4 \times 10^{-3}$ beträgt², bedarf es Feldern von mehr als drei Tesla, um das Spektrum auf fast 10 mT zu verbreitern und so die XX-, YY-, und ZZ- Komponenten des g-Tensors spektral zu trennen (Abb. 6.4). Auf diese Weise kann man im ESE-Experiment Moleküle selektieren, die eine bestimmte Orientierung zum äußeren Feld haben (siehe Abb. 2.3) und Relaxationszeitmessungen an diesen Orientierungen durchführen. Orientierungsabhängige Relaxation bedeutet, dass die Modulation des Hamiltonoperators von der Orientierung des Moleküls zum äußeren Feld abhängt, also anisotrop ist. Durch eine quantitative Analyse dieser Richtungsabhängigkeit lassen sich prinzipiell die Amplituden $\delta\omega$ und Korrelationszeiten τ_c der Modulationen der magnetischen Wechselwirkungen und damit dynamische Eigenschaften des Moleküls bestimmen. Dies setzt voraus, dass die Echozerfallsfunktion von $\delta\omega$ und τ_c bekannt ist. Das entscheidende Problem bei der Bestimmung dieser Parameter ist, dass die Echozerfälle keine unabhängige Bestimmung von $\delta\omega$ und τ_c erlauben. Das Verhältnis von Amplitude und Korrelationszeit entscheidet aber darüber, ob die Bewegung im *fast motion* oder *slow motion limit*³ erfolgt, was zu unterschied-

²Die g-Tensor-Hauptwerte von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ weichen nur geringfügig von denen von $UQ_{10}^{\bullet-}$ in Lösung ab [34].

³schnell und langsam bezieht sich hier auf die aus der Redfield-Theorie gewonnene Beziehung $\overline{\delta\omega^2}\tau_c \ll 1$, siehe Abschnitt 2.3

lichen Zerfallsfunktionen führt (siehe z.B. [144] Kapitel 8). Zusätzliche Informationen lassen sich durch Relaxationsexperimente bei unterschiedlichen Frequenzen/Feldern gewinnen. Auf diese Weise lassen sich feldabhängige Wechselwirkungen von feldunabhängigen unterscheiden sowie Aussagen über die Zeitskalen der Bewegung machen. Vorausgesetzt die Larmorfrequenz wird durch eine schnelle g-Tensor Fluktuation moduliert, wächst $\delta\omega$ quadratisch mit dem äußeren Feld, während τ_c konstant bleibt. Für Multifrequenzuntersuchungen an Chinonen sind neben den W-Band-Messungen auch Messungen bei deutlich höheren Frequenzen/Feldern notwendig, um den Vorteil der Orientierungsselektivität zu erhalten und die Relaxationsmechanismen zu beeinflussen. Solche Messungen sind seit kurzem durch die Konstruktion eines 180-GHz-Spektrometers in der AG Prisner [13] möglich. In einer früheren Studie bei 95 GHz wendeten Rohrer *et al.* [143] die 2D-ESE-Methode an, um stochastische Fluktuationen von $Q_A^{\bullet-}$ und $UQ_{10}^{\bullet-}$ in Iso-propanollösung bei 120 K miteinander zu vergleichen. Rohrer *et al.* führten die für beide Systeme sehr unterschiedliche Orientierungsabhängigkeit der 2D-ESE Spektren auf stochastische Fluktuationen um Wasserstoffbrücken, in Richtung der $g_{xx}(Q_A^{\bullet-})$ - und $g_{zz}(UQ_{10}^{\bullet-})$ -Achsen des g-Tensors, zurück. Die Orientierungsabhängigkeit der Echozerfälle von $Q_A^{\bullet-}$ und $UQ_{10}^{\bullet-}$ wurde mit Hilfe eines aus der Redfield-Theorie [29] entwickelten Modells simuliert. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Studie durch einen Vergleich der Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ und Messungen bei verschiedenen Temperaturen fortgeführt. Um weiteren Aufschluss über den Relaxationsmechanismus zu erhalten, wurden neben den Messungen bei 95 GHz erstmals gepulste Messungen an $Q_A^{\bullet-}$ bei 180 GHz durchgeführt.

6.2 Die Chinonakzeptoren Q_A und Q_B

Q_A und Q_B sind Kofaktoren des Elektronentransfers in *Rb. sphaeroides* R26. Ausgelöst wird der Elektronentransfer entweder durch Resonanzanregung von einem Antennenkomplex oder durch Lichtanregung. Abb. 4.1 zeigt die einzelnen Elektronentransferschritte [90] sowie die räumliche Anordnung der Kofaktoren [89]. Nach der Anregung des primären Donors, P_{865} , ein Bakteriochlorophyll *a*-Dimer (BChl *a* 2), wird ein Elektron über ein weiteres Bakteriochlorophyll *a* an ein Bakteriopheophytin (Φ *a*) abgegeben. Das Elektron wandert innerhalb von 250 ps weiter zu Q_A und von dort nach etwa 100 μs zu Q_B [90]. Sowohl Q_A als auch Q_B sind Ubichinon-10 Moleküle. Das photooxidierte $P_{865}^{\bullet+}$ wird vom Zytocrom c_2 auf der periplasmatischen Seite des Reaktionszentrums reduziert, bevor es in einem zweiten Photozyklus wieder ein Elektron abgeben kann, welches nach dem Elektronentransfer über die oben genannten Kofaktoren Q_B doppelt reduziert.

Neben der zweifachen Reduktion wird das Chinon von der zytoplasmatischen Membranseite noch doppelt protoniert und verlässt als Hydrochinon (Q_BH_2) das Reaktionszentrum. Das reduzierte Q_BH_2 wandert zum Zytocrom bc_1 -Komplex (innerhalb der Membran) und gibt seine Elektronen und Protonen ab.

In einer Reihe von wichtigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der

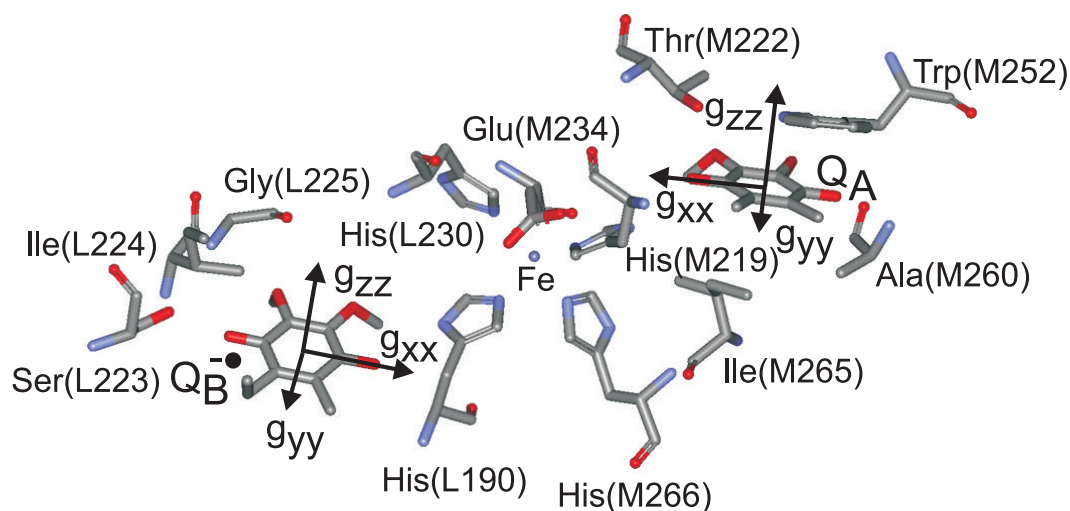


Abbildung 6.1: Struktur der Bindungstasche von Q_A und $Q_B^{\bullet-}$ im photosynthetischen Reaktionszentrum von *Rb. sphaeroides* im ladungstrennten Zustand $P_{865}^{\bullet+}Q_AQ_B^{\bullet-}$ ([33] PDB-Eintrag: 1aig). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Isoprenoidketten der beiden Ubichinone (UQ-10) nicht dargestellt. Zusätzlich sind die g -Tensoren der Chinone schematisch dargestellt, ihre relative Lage zueinander ergab eine W-Band-EPR-Studie [150]. In der vorliegenden Arbeit wurde das Fe^{2+} in der Bindungstasche durch Zn^{2+} ersetzt.

Elektronentransfer in photosynthetischen Reaktionszentren nicht nur von der im Dunklen ermittelten Struktur [78–81], sondern auch von dynamischen Eigenschaften der Rzn abhängt [151–155]. Proteine stellen hoch geordnete Strukturen dar, die verschiedene Konformationen annähernd gleicher Energie erlauben. Im Reaktionszentrum R26 ist der Übergang zwischen verschiedenen Konformationen entscheidend für die Funktion. Reaktionszentren, die im Hellen eingefroren werden, zeigen bei gleichen Temperaturen eine andere Elektronentransferkinetik als Rzn, die im Dunklen eingefroren wurden [151, 152]. Anhand eines Vergleiches der Röntgenstrukturen des unbeleuchteten Zustands von *Rb. sphaeroides* R26 [78–81] und dem beleuchteten Zustand $P_{865}^{\bullet+}Q_A^{\bullet-}$ [156] und $P_{865}^{\bullet+}Q_AQ_B^{\bullet-}$ [33] wurde gezeigt, dass Q_B nach Lichtanregung seine Lage in der Bindungstasche um 4.5 \AA verändert und dabei eine Drehung um 180° vollzieht, wenn es vom unreduzierten in den einfach reduzierten Zustand übergeht (Die Röntgenstruktur der Bindungstasche des Zu-

stands $P_{865}^{\bullet+} Q_A Q_B^{\bullet-}$ ist in Abbildung 6.1 [33] dargestellt). Der Übergang zwischen den beiden Zuständen erfordert eine ausreichende Flexibilität der Proteinumgebung. Quantenmechanische Rechnungen zeigen, dass im unbeleuchteten Zustand der Elektrontransfer von $Q_A^{\bullet-}$ zu Q_B wegen einer positiven Reaktionsenergie unterbunden wird, während die Konformation nach der Beleuchtung eine negative Energie aufweist [157]. Damit konnte der empirische Befund erklärt werden, dass die Dynamik des Elektronentransfers von $Q_A^{\bullet-}$ zu Q_B entscheidend davon abhängt, ob das Protein eingefroren oder bei Raumtemperatur beleuchtet wird [151, 152]. Außerdem wurde eine Abnahme der Effizienz des Elektronentransfers mit abnehmender Temperatur beobachtet; dies gilt sowohl für im Hellen als auch im Dunklen eingefrorene Rzn. Diese Temperaturabhängigkeit wurde mit einem Einfrieren von Fluktuationen des Moleküls zwischen verschiedenen Konformationen in Verbindung gebracht [153–155]. Mit Hilfe von Mößbauer-Spektroskopie wurde sowohl für das bakterielle Reaktionszentrum [153] als auch für das pflanzliche PS II [154] nachgewiesen, dass Fluktuationen der Proteinstruktur den Elektronentransfer optimieren. Parak *et al.* beobachteten, dass das Einfrieren von Fluktuationen zwischen verschiedenen Proteinkonformationen die Effizienz des Elektronentransfers stark reduziert [154]. Dies bedeutet, dass nicht nur die statische Anordnung der Kofaktoren zueinander den Elektronentransfer ermöglicht, sondern auch die energetische Anregung der Kofaktoren durch Molekülfluktuationen. Eine Untersuchung dieser Fluktuationen des Moleküls war das Ziel gepulster EPR Messungen an stabilen Radikalen $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$. Diese Ergebnisse zeigen, dass für das Verständnis von Elektronentransferreaktionen in Proteinen die aus der Röntgenstruktur gewonnenen Strukturinformationen nicht ausreichen. Die Bestimmung dynamischer Parameter von Kofaktoren mit Hilfe von Relaxationszeitmessungen in Proteinen hat gegenüber anderen Methoden, wie zum Beispiel der Mößbauer-Spektroskopie, den Vorteil, dass tatsächlich nur den Kofaktor beeinflussende Fluktuationen zur Relaxation beitragen. Trotzdem misst man eine Überlagerung von intra- (nur den Kofaktor betreffende)- und inter-molekularen (die unmittelbare Proteinumgebung beeinflussende) Bewegungen. Eine Trennung dieser Beiträge ist sehr schwierig. Unter bestimmten Umständen kann die Trennung durch Messungen bei verschiedenen Temperaturen und Frequenzen, sowie einem Vergleich mit der Bindungsstruktur vollzogen werden. In der Diskussion (Absch. 6.5) wird diese Möglichkeit ausführlich diskutiert, weshalb ich die aus der Literatur bekannte Bindungsstruktur von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ wiedergebe. Die Akzeptorquinone sind im Proteingerüst durch Wasserstoffbrücken gebunden. Aus Vergleichen der Röntgenstruktur mit den Ergebnissen von EPR- und ENDOR-Experimenten [34] konnten Wasserstoffbrücken unterschiedlicher Stärke und Richtung ermittelt werden. Die-

se Wasserstoffbrücken bilden sich zwischen den Carbonylgruppen von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ und ihrer Proteinumgebung aus [34, 158, 159] (siehe Abbildung 6.1). Für $Q_A^{\bullet-}$ wurde eine starke Wasserstoffbrücke von O_4 zum N_δ des His(M219) und eine schwächere von O_1 zu einem NH des Peptidgerüsts von Ala(M260) ermittelt. Im Zustand $Q_B^{\bullet-}$ bilden beide Karbonsäuregruppen Wasserstoffbrücken mit der Proteinumgebung aus. Während O_4 an His(L190) gebunden ist, ist O_1 im Kontakt mit drei wasserstoffbrückenbildenden Atomen: dem Sauerstoff des Ser(L223) und den Stickstoffatomen in den Aminosäuren Ile(L224) und Gly(L225).

6.3 Präparation von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$

Die verwendeten Reaktionszentren wurden aus Purpurbakterien des Stamms *Rb. sphaeroides* R26 gewonnen. Eine Voraussetzung für die Messungen ist, dass die Wechselwirkung der Chinone mit dem Eisen, Fe^{2+} mit $S = 2$, in der Nähe der Chinone abgeschaltet wird, um die g-Tensor-Anisotropie überhaupt zum Liniennform bestimmenden Effekt zu machen. Dies wurde durch Austausch des Eisens mit diamagnetischem Zn^{2+} ($S = 0$), entsprechend dem Verfahren von Debus *et al.* [114], erreicht. Atomabsorptionsspektroskopie ergab einen Zn^{2+} Anteil von $\geq 90\%$. Die Zytochrom *c* Photooxidationsprobe [160] ergab 1.7 ± 0.2 Ubichinon-10-Moleküle/Zn-Rz. Die Zn-Rzn wurden mit Hilfe von Ultrafiltration (Amicon centricon 30) zu $\sim 100 \mu\text{M}$ einkonzentriert und dann in Quarzkapillaren abgefüllt (0.84 mm Außendurchmesser, 0.6 mm Innendurchmesser für die W-Band-Messungen bzw. 0.4 mm Ad. / 0.3 Id. für die G-Band-Messungen). Die Anionradikale des primären Chinons $Q_A^{\bullet-}$ wurden bei einem zehnfachen Überschuss von Zytochrom *c* durch eine mehrere Sekunden dauernde Bestrahlung der Zn-Rz Probe mit weißem Licht ($T \approx 15^\circ\text{C}$) erzeugt. Anschließend wurde die Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die verwendete 1000 W Wolfram Lampe war mit einem Wasserfilter (8 cm Weglänge) und Wärme absorbierenden Filtergläsern ausgestattet. $Q_B^{\bullet-}$ wurde ebenfalls in Zn-Rzn erzeugt, allerdings wurde zur Erzeugung des radikalischen Zustands nur ein einziger 3 ns dauernder Laserblitz eines NdYAG Lasers ($50 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) [114]) verwendet. Sehr wichtig für den Vergleich der beiden Radikale ist die Gewissheit, wirklich jeweils nur eines der beiden Radikale, $Q_A^{\bullet-}$ oder $Q_B^{\bullet-}$, erzeugt zu haben. Da es sich bei Q_A und Q_B um identische Ubichinone handelt, ist eine sehr große spektroskopische Auflösung notwendig, um sie an Hand ihrer EPR-Spektren unterscheiden zu können. Sowohl die Hyperfeintensoren als auch die g-Tensoren ändern sich geringfügig auf Grund der unterschiedlichen Lage im Protein. Erst durch die Auflösung bei 95 GHz lassen sich die Radikale an Hand ihrer unterschiedlichen g-Tensoren unterschei-

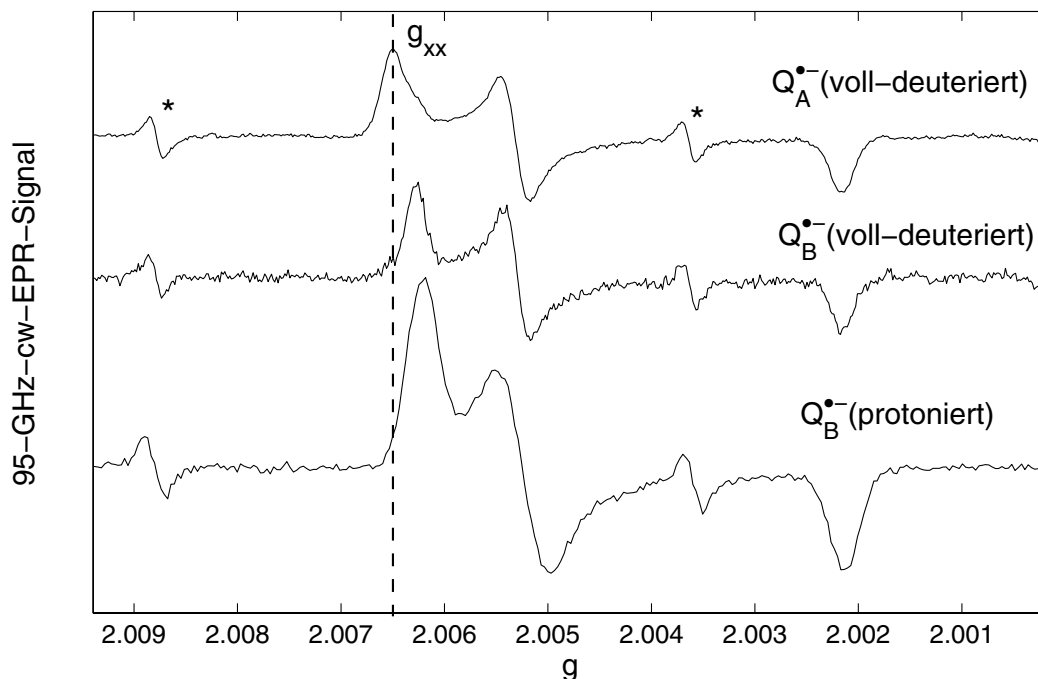


Abbildung 6.2: 95-GHz-cw-Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ in volldeuterierten Reaktionszentren sowie von $Q_B^{\bullet-}$ in protonierten Reaktionszentren von *Rb. sphaeroides* R26. Das Spektrum der protonierten Probe stammt von der selben Probe an der auch die ENDOR- und Relaxationszeitmessungen durchgeführt wurden. Am cw-Spektrum erkennt man, dass es sich hierbei tatsächlich um $Q_B^{\bullet-}$ handelt. Die Eichlinien des Manganstandards sind mit Sternchen versehen.

den⁴ (siehe Abbildung 6.2 [34]). Zusätzlich haben wir noch an den Positionen der g -Tensor-Hauptwerte ENDOR-Spektren aufgenommen, die, wie unabhängige Messungen zeigten [161], ebenfalls eine Unterscheidung von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ erlauben. Abbildung 6.3 zeigt die an der g_{zz} -Position des Spektrums aufgenommenen Protonen-ENDOR-Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$, bei 95 GHz/145 MHz(W-Band). Da g_{zz} von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$, im Rahmen der Auflösung des W-Band-Spektrums, gleich sind, würden sich die ENDOR-Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ in einer verunreinigten Probe überlappen. Für $Q_B^{\bullet-}$ beobachtet man deutliche Verschiebungen der Resonanzpositionen des Protonen-ENDOR-Spektrums gegenüber dem aus der Literatur bekannten Spektrum [162] von $Q_A^{\bullet-}$. Damit bestätigen die ENDOR-Spektren den aus den cw-Spektren gewonnen Befund, dass die Proben jeweils nur $Q_A^{\bullet-}$ oder $Q_B^{\bullet-}$ enthalten. Ein apparatives Problem stellt das Einführen der sehr dünnen Quarzkapillaren mit den gefrorenen Proben in den Resonator dar. Die Proben dürfen dabei nicht auftauen. Die $Q_B^{\bullet-}$ -Proben dürfen keinem zusätzlichen

⁴Sowohl $Q_A^{\bullet-}$ als auch $Q_B^{\bullet-}$ sind $UQ_{10}^{\bullet-}$ -Moleküle, trotzdem haben sie unterschiedliche g_{xx} -Werte. Der Grund dafür sind unterschiedliche Wasserstoffbrücken mit der Umgebung.

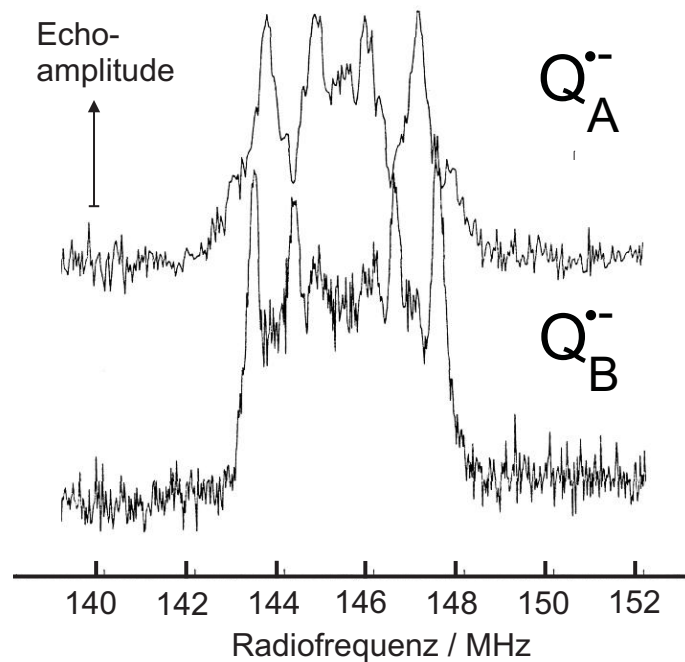


Abbildung 6.3: W-Band Davies ENDOR Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ (oberes Spektrum [162]) und $Q_B^{\bullet-}$ (unteres Spektrum [163]). Die Spektren wurden an der g_{zz} -Position des EPR Spektrums aufgenommen ($T=160$ K).

Streulicht ausgesetzt werden. Um dies zu erreichen, wird der Resonator in der Bohrung des Magneten vorgekühlt; dann muss der Resonator im Dunklen wieder aus der Bohrung des Magneten herausgenommen werden, um die Probe gefroren einbauen zu können. Für den Einbau der $Q_B^{\bullet-}$ Probe wurde der Raum vollständig abgedunkelt und nur mit einer mit grüner Folie abgeschwächten, Taschenlampe (3 W) beleuchtet.

6.4 Ergebnisse

Anisotrope Relaxation

Abbildung 6.4 zeigt die 2D-ESE-W-Band-Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$, bei $T = 120$ K. Die Punkte der Spektren wurden mit einer Puls-Sequenz aus zwei $2/3\pi$ -Pulsen (100 ns) aufgenommen, wobei die Pulsseparationszeit τ und das äußere Feld B_0 schrittweise verändert wurden. Wegen des Verlusts der Phasenkohärenz haben die Spektren mit längerem τ kleinere Amplituden. Außerdem beobachtet man auf Grund der Orientierungsabhängigkeit der Spin-Spin-Relaxationszeit eine Abhängigkeit der Linienform von τ .

Misst man den Zerfall der Echoamplitude in Abhängigkeit vom Pulsabstand über das ganze Spektrum, lassen sich den so gewonnenen Relaxationszeiten Orientierungen der Moleküle zuordnen. In den 2D-Spektren in Abbildung 6.4 sind die Zerfälle an den g_{XX} , g_{YY} und g_{ZZ} -Positionen des Spektrums fett hervorgehoben. Ebenfalls hervorgehoben sind die Spektren für $\tau = 900$ ns. In Abbildung 6.5 sind ESE-Spektren für unterschiedliche Pulsseparationszeiten wiedergegeben. Deutlich zu erkennen ist die veränderte Linienform für $\tau = 900$ ns gegenüber $\tau = 100$

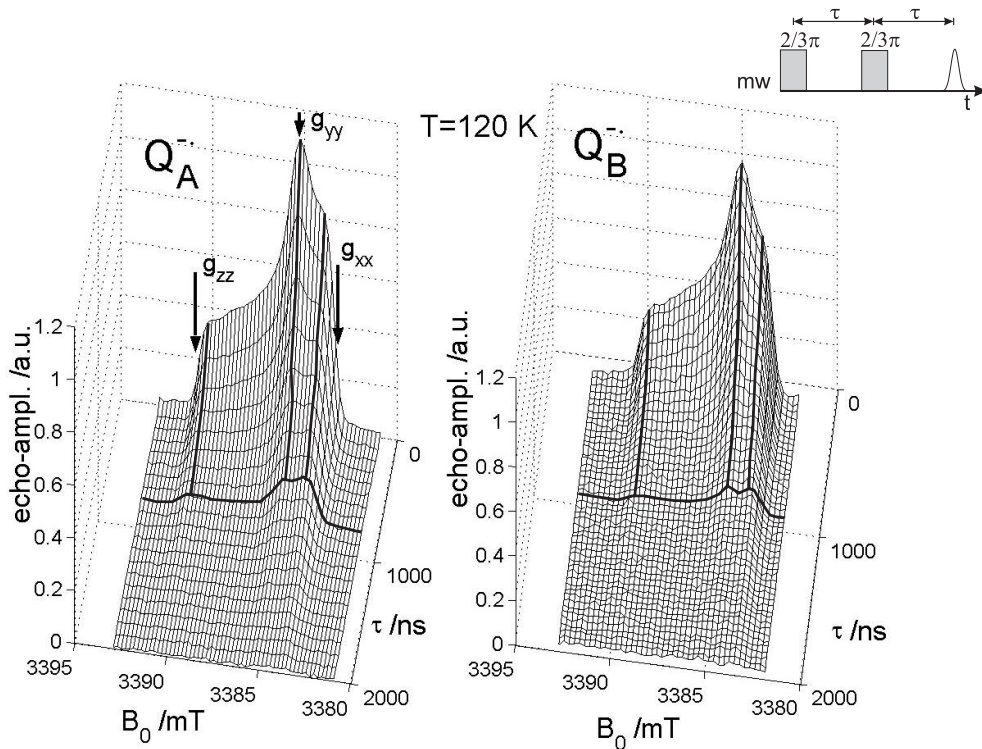


Abbildung 6.4: Zwei-dimensionale ESE-Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ ($T = 120$ K), Pulssequenz: $2/3\pi - \tau - 2/3\pi - \tau$, Pulslängen = 100 ns, $\Delta\tau(Q_A^{\bullet-}) = 100$ ns bzw. $\Delta\tau(Q_B^{\bullet-}) = 40$ ns, $\Delta B_0 = 2.5$ mT.

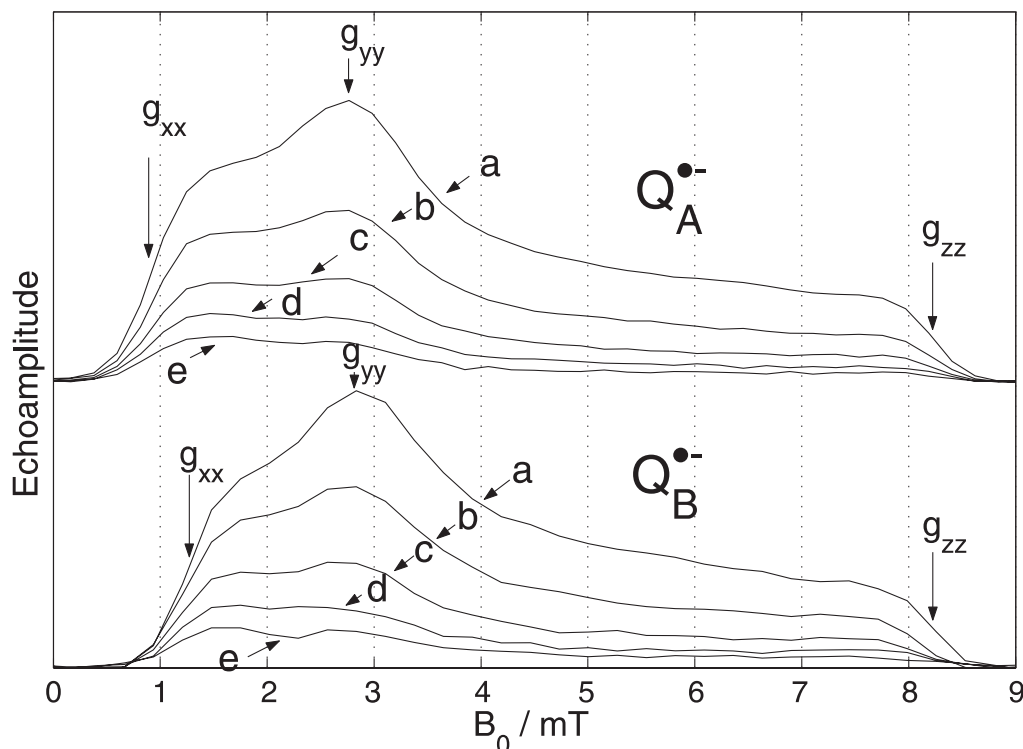


Abbildung 6.5: W-Band ESE-Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ in Zn-Rz aus *Rb. sph-aeroides* R26 bei 120 K. Pulssequenz: $2/3\pi - \tau - 2/3\pi - \tau$ mit $\tau = 100$ ns (a), 300 ns (b), 500 ns (c), 700 ns (d) und 900 ns (e). Die Spektren sind entlang B_0 mit einem Offset von 3.34 Tesla dargestellt.

ns (erstes Spektrum). Bei $\tau = 100$ ns entspricht das Spektrum noch weitgehend der Linienform des integrierten cw-Spektrums, das Maximum der Echoamplitude misst man an der Resonanzposition g_{YY} . Bei $\tau = 900$ ns ist dagegen die Echoamplitude an der g_{XX} -Position des Spektrums am größten. Um die Veränderung der Linienform besser sichtbar zu machen, sind in Abbildung 6.5 einzelne Schnitte durch das 2D-Spektrum dargestellt. Die Spektren wurden mit $\tau = 100$ ns (a), 300 ns (b), 500 ns (c), 700 ns (d) und 900 ns (e) aufgenommen. Die Pfeile in Abbildung 6.5 bezeichnen die Resonanzpositionen der g-Tensor-Hauptwerte g_{XX} , g_{YY} und g_{ZZ} für $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$. Bei diesen Feldpositionen tragen hauptsächlich solche Moleküle zum Spektrum bei, deren jeweilige g-Tensor-Hauptachsen parallel zu B_0 sind. Allerdings ist die Orientierungsselektion abhängig von der jeweiligen Lage der Resonanzposition im Pulverspektrum (siehe Abbildung 2.3). Ebenso wie im cw-Spektrum können die Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ an Hand ihrer unterschiedlichen g_{XX} -Werte unterschieden werden [34, 164]⁵. Die τ -Abhängigkeit für

⁵Die Bestimmung von g-Werten aus gepulsten Spektren ist mit grösseren Fehlern behaftet, weil die zur Feldeichung der cw-Spektren verwendeten Manganlinien (siehe z.B. Abbildung 6.2)

$Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ ist sehr ähnlich, in beiden Chinonen ist die langsamste Relaxation an der Position g_{XX} zu beobachten, alle anderen Positionen im Spektrum relaxieren schneller. Damit sind die Unterschiede zwischen $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ wesentlich geringer als zwischen $Q_A^{\bullet-}$ und $UQ_{10}^{\bullet-}$ in Isopropanol [143]. Zusätzlich wurden die Messungen an $Q_B^{\bullet-}$ in volldeuterten Reaktionszentren bei 160 K wiederholt. Die gemessenen Relaxationszeiten stimmen mit denen von $Q_B^{\bullet-}$ in protonierten Reaktionszentren sowohl in ihren Beträgen als auch in ihrer Richtungsabhängigkeit überein.

In allen bisher untersuchten Fällen wurden, im Rahmen des nicht immer optimalen Signal/Rausch-Verhältnisses, monoexponentielle Echozerfallsfunktionen beobachtet. Um die beobachtete Orientierungsabhängigkeit der Relaxation zu quantifizieren, wurden die 2D-ESE-Spektren mit einer monoexponentiellen Funktion (Gl. 6.1), mit $T_{2\text{eff}}$ als Zeitkonstante, angefitet. Die Abhängigkeit der Elektronenspinchoamplitude $S(\tau, B_0)$ von τ und $T_{2\text{eff}}$ aus Gleichung 2.38 wird damit durch folgende Gleichung wiedergegeben [145]:

$$S(2\tau, B_0) = S(0) e^{-2\tau / T_{2\text{eff}}(B_0)} \quad (6.1)$$

Temperaturabhängigkeit

Die so ermittelten Spin-Spin-Relaxationszeiten $T_{2\text{eff}}$ von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ sind in Abbildung 6.6 in Abhängigkeit von ihrer spektralen Lage dargestellt. Tabelle 6.1 enthält die an den Hauptwerten gemessenen Relaxationszeiten in Abhängigkeit von Temperatur und Resonanzfrequenz. Vergleicht man die experimentell bestimmten Relaxationszeiten von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ in Abhängigkeit von der Temperatur, ergibt sich zusammengefasst folgendes Bild:

Bei 120 K sind sowohl die Absolutwerte als auch die Orientierungsabhängigkeit von $T_{2\text{eff}}$ für $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ nahezu gleich (die Relaxationszeiten liegen für $Q_A^{\bullet-}$ zwischen $(1.1 \pm 0.1) \mu\text{s}$ und $(0.7 \pm 0.1) \mu\text{s}$, sowie zwischen $(1.3 \pm 0.1) \mu\text{s}$ und $(0.6 \pm 0.1) \mu\text{s}$ für $Q_B^{\bullet-}$). Das Maximum von $T_{2\text{eff}}$ beobachtet man für $T_{2\text{eff}}^X$ an der g_{XX} -Position des Spektrums, während das Minimum zwischen g_{YY} und g_{ZZ} liegt; die Relaxation an den kanonischen Positionen $g_{YY}(T_{2\text{eff}}^Y)$ und $g_{ZZ}(T_{2\text{eff}}^Z)$ selbst unterscheidet sich kaum vom Minimum und ist gegenüber $T_{2\text{eff}}^X$ ungefähr um einen Faktor 2 beschleunigt. Geht man zu höheren Temperaturen, nehmen die Unterschiede zwischen den Relaxationszeiten $T_{2\text{eff}}^Y$ und $T_{2\text{eff}}^Z$ gegenüber $T_{2\text{eff}}^X$ ab, bis sie bei 180 K ($Q_B^{\bullet-}$) und 190 K ($Q_A^{\bullet-}$) nahezu gleich sind. Im Vergleich zu den Relaxationszeiten an den kanonischen Positionen von $\hat{\mathbf{g}}$ ist $T_{2\text{eff}}$ an den Positionen

oberhalb von 100 K nicht im Spektrum zu erkennen sind und die anisotrope Relaxation bei der Simulation der Spektren mitberücksichtigt werden muss.

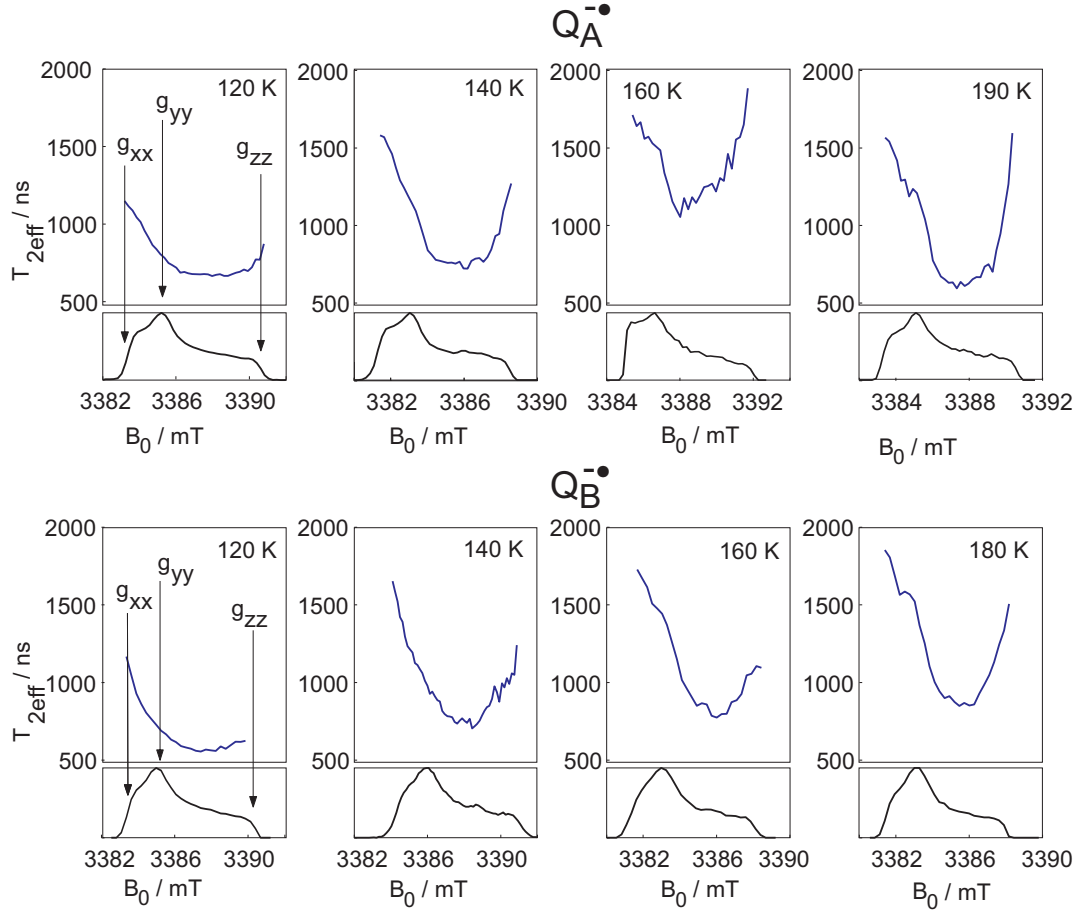


Abbildung 6.6: Temperaturabhängigkeit von $T_{2\text{eff}}$ für $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ bei 120 K, 140 K, 160 K und 180 K/190 K. Im oberen Teil der Abbildungen ist jeweils die mit Gleichung 6.1 aus den Echozerfällen gewonnene Spin-Spin Relaxationszeit $T_{2\text{eff}}$ dargestellt. Im unteren Teil der Abbildungen sind die Echo-detektierten Spektren der Chinone (für $\tau = 100$ ns) zu sehen.

dazwischen, vor allem in der gut aufgelösten Region zwischen g_{YY} und g_{ZZ} , deutlich verkürzt. Zwischen 120 K und 160 K ist für beide Chinone ein Anstieg der Relaxationszeiten unabhängig von der Orientierung zu beobachten. Oberhalb von 160 K wachsen die Relaxationszeiten von $Q_B^{\bullet-}$ weiter an, $T_{2\text{eff}}$ von $Q_A^{\bullet-}$ sinkt bei 190 K zwischen g_{YY} und g_{ZZ} unter den Wert bei 120 K⁶. Während sich also die Orientierungsabhängigkeit und die Beträge von $T_{2\text{eff}}$ mit der Temperatur deutlich ändern, weisen die Relaxationszeiten von, $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ erst ab 160 K signifikante Unterschiede auf.

⁶Aus apparativen Gründen konnten bei 180 K für $Q_A^{\bullet-}$ keine Relaxationszerfälle aufgenommen werden. Ein Vergleich der bei 175 K gemessenen Werte [165] legt den Schluss nahe, dass die Relaxationszeiten bei etwa 180 K durch ein Maximum gehen und dann wieder kürzer werden.

Frequenzabhängigkeit

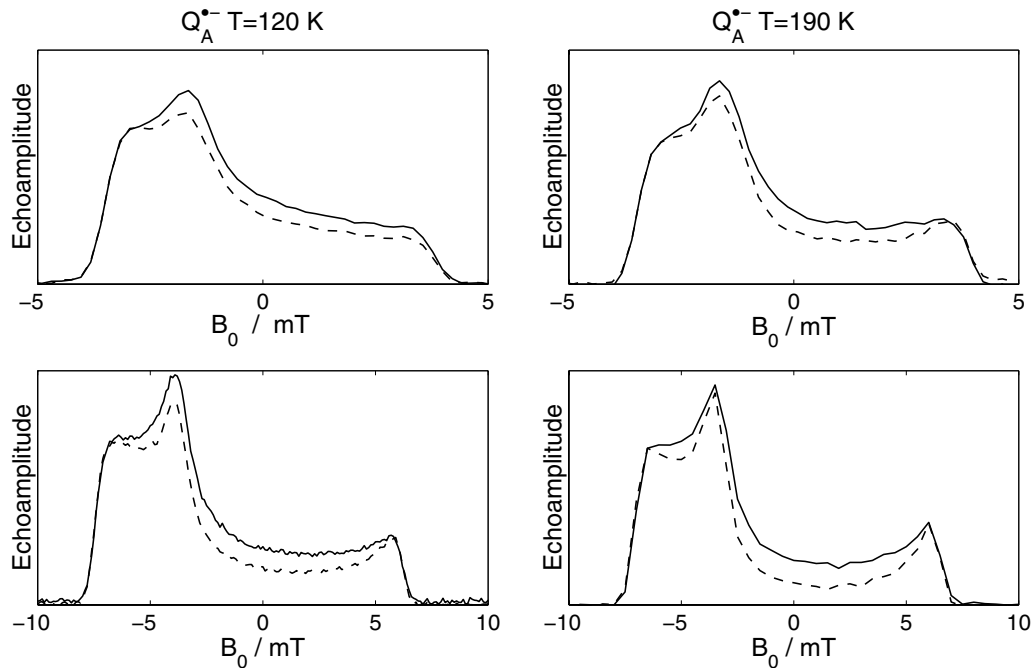


Abbildung 6.7: ESE-Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ bei 95 GHz (oben) und 180 GHz (unten), bei zwei verschiedenen Pulsseparationstzeiten ($\tau = 200$ ns (durchgezogene Linien) und $\tau = 400$ ns (unterbrochene Linien)) und Temperaturen ($T = 120$ K (links) und $T = 190$ K (rechts)). Die Spektren sind mit der Echoamplitude an der Resonanzposition von g_{XX} (Position 1) normiert, von der Feldachse wurde ein Offset von 3.34 T (W-Band) bzw. 6.3 T (G-Band) subtrahiert.

Abbildung 6.7 zeigt einen Vergleich der gepulsten Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ im W-Band (95 GHz / 3.34 T) und im G-Band (180 GHz / 6.3 T) bei 120 K bzw. 190 K. Dargestellt sind Spektren für $\tau = 200$ ns und $\tau = 400$ ns. Auf Grund des doppelt so hohen Resonanzfeldes ist das G-Band-Spektrum doppelt so breit. Zur besseren Vergleichbarkeit der Spektren ist die Feldachse der G-Band-Spektren gestaucht. Das G-Band-Spektrum zeigt, wie erwartet, die Charakteristika eines durch g -Tensor-Anisotropie verbreiterten Pulverspektrums. Trotz der verbesserten Auflösung der g -Tensor-Hauptwerte ergeben sich durch das höhere Feld kaum zusätzliche Informationen. Entscheidende Unterschiede beobachtet man aber bei der Relaxationsanisotropie der G-Band und W-Band-Spektren. Bei 120 K relaxiert die g_{XX} -Position im W-Band langsamer als alle anderen spektralen Positionen. Im G-Band beobachtet man dagegen eine verlangsamte Relaxation an allen drei g -Tensor-Hauptwerten gegenüber den Positionen dazwischen. Entsprechend Tabelle 6.1 ist die Relaxation an den g -Tensor-Hauptwerten mit $T_{2\text{eff}} \approx 1\mu\text{s}$ etwa

Probe	T	ν -MW	$T_{2\text{eff}}^X$	$T_{2\text{eff}}^Y$	$T_{2\text{eff}}^Y - T_{2\text{eff}}^Z$	$T_{2\text{eff}}^Z$	Quelle
	K	GHz	μs				
$\text{Q}_A^{\bullet-}$	120	95	1.1	0.8	0.7	0.8	hier ^a
$\text{Q}_A^{\bullet-}$	140	95	1.6	1.2	0.8	1.2	hier ^a
$\text{Q}_A^{\bullet-}$	160	95	1.7	1.5	1	1.5	hier ^a
$\text{Q}_A^{\bullet-}$	190	95	1.5	1.2	0.6	1.7	hier ^a
$\text{Q}_A^{\bullet-}$	115	95	1.3	0.8	0.7	0.8	[132]
$\text{Q}_A^{\bullet-}$	175	95	1.8	1.8	0.8	2	[132]
$\text{Q}_A^{\bullet-}$	120	180	1	0.9	0.5	1.1	hier
$\text{Q}_A^{\bullet-}$	190	180	0.8	0.8	0.4	1.3	hier
$\text{Q}_B^{\bullet-}$	120	95	1.3	0.7	0.6	0.6	hier
$\text{Q}_B^{\bullet-}$	140	95	1.6	1	0.7	1.1	hier
$\text{Q}_B^{\bullet-}$	160	95	1.8	1.4	0.8	1.4	hier
$\text{Q}_B^{\bullet-}$	180	95	1.8	1.5	0.9	1.5	hier

^a Diese Daten wurden aus von Thomas Prisner durchgeführten, und von mir ausgewerteten Messungen gewonnen.

Tabelle 6.1: $T_{2\text{eff}}$ von $\text{Q}_A^{\bullet-}$ bei 180 GHz und 95 GHz und $\text{Q}_B^{\bullet-}$ bei 95 GHz, in protonierten Rzn. Pulssequenz: $2/3\pi - \tau - 2/3\pi - \tau$. Die Absolutwerte der aus den W-Band-Messungen ermittelten Relaxationszeiten sind mit einem Fehler von 150 ns behaftet, während die G-Band-Messungen Fehler von 300 ns haben.

doppelt so lang wie zwischen g_{YY} und g_{ZZ} mit $T_{2\text{eff}} \approx 0.5\mu\text{s}$. Bei 190 K zeigen sowohl das W-Band-Spektrum als auch das G-Band-Spektrum eine verlangsamte Relaxation an den g-Tensor-Hauptwerten gegenüber den Zwischenpositionen, besonders in der gut aufgelösten Region zwischen g_{YY} und g_{ZZ} . Zusätzlich wurden bei 120 K und 190 K Echozerfälle aufgenommen und daraus mit Formel 6.1 $T_{2\text{eff}}$ bestimmt. Die so bestimmten Relaxationszeiten sind in Tabelle 6.1 zusammen mit den bei 95 GHz bestimmten Werten gegen die Temperatur aufgetragen. Hervorzuheben bleibt, dass die aus den G-Band-Messungen ermittelten Relaxationszeiten aus apparativen Gründen mit großen Fehlern behaftet sind.

Die Frequenzabhängigkeit der Relaxation in $\text{Q}_A^{\bullet-}$ lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: Anders als im W-Band sind $T_{2\text{eff}}^X$ und $T_{2\text{eff}}^Z$ im G-Band bei 120 K im Rahmen des Fehlers die längsten Relaxationszeiten. Man beobachtet eine Ver-

langsamung der Relaxation an den g-Tensor-Hauptwerten gegenüber den Werten dazwischen, mit $T_{2_{\text{eff}}}^{\text{X}} \approx T_{2_{\text{eff}}}^{\text{Y}} \approx T_{2_{\text{eff}}}^{\text{Z}}$. Hervorzuheben ist, dass die Relaxationszeiten $T_{2_{\text{eff}}}^{\text{Y}}$ und $T_{2_{\text{eff}}}^{\text{Z}}$ länger sind als bei den W-Band-Messungen bei 120 K. Erhöht man die Temperatur auf 190 K, sind nach wie vor die Relaxationszeiten an den g-Tensor-Hauptwerten gegenüber den Zwischenpositionen deutlich verlangsamt. Wie im W-Band ist bei 190 K $T_{2_{\text{eff}}}^{\text{Z}}$ die längste Relaxationszeit. g_{ZZ} ist auch die einzige Resonanzposition, an der $T_{2_{\text{eff}}}$ mit steigender Temperatur größer wird, die anderen Relaxationszeiten nehmen mit größer werdender Temperatur ab. Dies ist ebenfalls ein bemerkenswerter Unterschied zum W-Band, wo alle Relaxationszeiten, außer im Minimum zwischen g_{YY} und g_{ZZ} , bei 190 K länger sind als bei 120 K.

6.5 Diskussion

Im folgenden Abschnitt diskutiere ich Ansätze, aus den gemessenen Relaxationszeiten Informationen über die Bewegungsmoden der Kofaktoren und ihrer Proteinumgebung zu gewinnen.

Dabei stehen die folgenden Fragen im Mittelpunkt: Welche Wechselwirkung des Spins verursacht die richtungsabhängige Relaxation? Vollzieht sich die Bewegung im *slow motion* oder im *fast motion limit*? Welche Informationen über das Protein lassen sich aus den Relaxationszeituntersuchungen gewinnen? Diese Diskussion stellt eine Weiterentwicklung der von mir in [18] vorgenommenen Interpretation dar.

g-Tensor-Modulationen

Der Ausgangspunkt der Diskussion ist die Annahme, dass die Relaxation von einer Auslenkung des g-Tensors herrührt, die die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung moduliert, aber die g-Tensor-Hauptwerte, als Eigenschaft des Moleküls, nicht verändert. Dies ist nicht der einzige Mechanismus, der zu anisotroper Relaxation führen kann. Messungen an Nitroxiden zeigten, dass z.B. stochastische Fluktuationen der Hyperfeinstruktur [36,38] oder der g-Tensor-Hauptwerte [149] zu einer starken Richtungsabhängigkeit von T_2 führen können. Beide Effekte konnten experimentell weitgehend ausgeschlossen werden: Messungen der g-Tensor-Hauptwerte von Chinonen in unterschiedlichen Lösungsmitteln [136] zeigten, dass vor allem g_{XX} empfindlich auf Umgebungseinflüsse ist. Aus diesem Grund führen molekulare Fluktuationen vor allem zu einer Beschleunigung der Relaxation an der g_{XX} -Position des Spektrums [149]. Im Gegensatz dazu zeigen die Experimente bei fast allen Temperaturen, $T_{2\text{eff}}^X > T_{2\text{eff}}^Y, T_{2\text{eff}}^Z$. Daher kann eine Modulation der g-Tensor-Hauptwerte im vorliegenden Fall nicht der relaxationsbestimmende Einfluss sein. Anisotrope Relaxation als Folge von dynamischen Protonen-Hyperfeinkopplungen konnte durch Messungen an volldeuterten Reaktionszentren ausgeschlossen werden. T_2 -Messungen im W-Band an lichtangeregten spinpolarisierten Radikalpaaren $P_{865}^{\bullet+} Q_A^{\bullet-}$ und an stabilem $Q_B^{\bullet-}$ in volldeuterten Rzn (T = 160 K) ergaben die gleichen Anisotropien und absoluten Relaxationszeiten wie die Messungen an protonierten Chinonen. Vor allem aber zeigen die W-Band ($Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ bei 160 K und 180 K bzw. 190 K) und G-Band-Messungen ($Q_A^{\bullet-}$ bei 120 K und 190 K) an den g-Tensor-Hauptwerten deutlich verlangsamte Relaxationszeiten gegenüber den Positionen dazwischen (Abb. 6.6). Dies ist ein deutliches Zeichen dafür, dass die Relaxation die Folge einer g-Tensor Auslenkung ist. An den Positionen g_{XX} , g_{YY} und g_{ZZ} haben die g-Wert-Fluktuationen die kleinsten

Gradienten und deshalb sind die Relaxationszeiten hier lang, während an den Positionen dazwischen die Gradienten größer und damit die Relaxationszeiten schneller sind. Das gleiche Argument gilt für die Unterschiede zwischen $T_{2\text{eff}}^X, T_{2\text{eff}}^Y$ und $T_{2\text{eff}}^Z$. In Chinonen gilt $g_{XX} - g_{YY} < g_{XX} - g_{ZZ}$, weshalb die Änderung des effektiven g-Werts bei einer isotropen Auslenkung des Moleküls bei g_{ZZ} kleiner ist als bei g_{XX} und g_{YY} . Das in flüssiger gefrorener Lösung beobachtete $T_{2\text{eff}}^Y$ ist zusätzlich durch die Tatsache beschleunigt, dass an der Resonanzposition von g_{YY} noch andere Orientierungen mit schnelleren Relaxationszeiten selektiert werden. Deshalb beobachtet man im isotropen Fall $T_{2\text{eff}}^Z > T_{2\text{eff}}^X > T_{2\text{eff}}^Y$. Für die Relaxation in einem durch g-Tensor-Anisotropie verbreiterten Spektrum gilt daher, dass auch eine isotrope Bewegung zu einer orientierungsabhängigen Relaxation führt.

Schnelle und langsame Fluktuationen

Um die beobachteten Echozerfälle durch Auslenkungen des g-Tensors zu beschreiben, wurden mit Hilfe des in Abschnitt 2.3 dargestellten Modells Zerfallsfunktionen simuliert und diese an die 2D-ESE-Spektren angefitet. Auf Grund der in den W-Band-Spektren beobachteten Orientierungsabhängigkeit von $T_{2\text{eff}}$ bei 120 K und der von Rohrer *et al.* [143] postulierten Auslenkung des Moleküls um die X-Achse des g-Tensors wurde ebenfalls eine Auslenkung um diese Achse angenommen. Die Veränderung der Echozerfälle bei höheren Temperaturen wurde durch die Bewegung der Librationsachse auf dem Mantel eines Konus modelliert [18]. In Abbildung 2.1 sind die Auslenkungen des Moleküls und damit des g-Tensors dargestellt. In die Berechnungen der Relaxationszeiten mit Gleichung 2.34 gehen jeweils die Amplituden der Auslenkungen, eine Korrelationszeit, sowie $T_{2\text{iso}}$ ein. In diesem Modell wurde angenommen, dass sich sowohl die Auslenkung um g_{XX} als auch die Bewegung auf dem Konus im *fast motion limit* vollziehen. Mit diesem Modell konnte ich die 2D-ESE-W-Band-Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ zwischen 120 K und 190 K bzw. 180 K simulieren⁷. Die Simulationsparameter sind in [18] veröffentlicht. Zusammengefasst ergibt sich aus den gewonnenen Parametern folgendes Bild: Bei 120 K lassen sich die 2D-Spektren von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ mit einer Bewegung um g_{XX} simulieren, geht man zu höheren Temperaturen, ergeben die Simulationen eine größere Öffnung des Konus.

Entsprechend den bisher gemachten Annahmen müßten sich auch die G-Band-Spektren und Echozerfälle mit den aus den W-Band-Spektren gewonnenen Parametern simulieren lassen. Da die Korrelationszeiten und die Amplituden der

⁷Es ist schwierig, für die Qualität dieser Simulationen ein Kriterium anzugeben. Entscheidend war für uns, dass sowohl die Orientierungsabhängigkeit als auch die Temperaturabhängigkeit in allen Fällen reproduziert werden konnte.

Auslenkung des Moleküls vor allem temperaturabhängig sind, ist davon auszugehen, dass die für eine bestimmte Temperatur in Gleichung 2.34 eingehende Korrelationszeit τ_c gleich bleibt, während $\delta\omega^2$ beim Übergang von 95 GHz zu 180 GHz um den Faktor 3.6 zunimmt, wodurch die Relaxation entsprechend verkürzt wird. Dies wurde weder bei 120 K noch bei 190 K bestätigt (siehe Tabelle 6.1). Das heißt, Gleichung 2.34 ist in diesem Fall keine ausreichende Beschreibung der Relaxation.

Die Diskrepanz zwischen Theorie und Experiment kann folgende Gründe haben: 1) Die Bewegung vollzieht sich nicht im *fast motion limit*, weshalb die aus der Redfield-Theorie hergeleitete Beziehung 2.34 nicht gilt. 2) die Annahme, dass nur eine Korrelationszeit zur anisotropen Relaxationszeit beiträgt, ist eine unzureichende Vereinfachung. 3) die Relaxation wird neben der g-Tensor-Modulation noch von einem weiteren orientierungsabhängigen feldunabhängigen Mechanismus beeinflusst. Im Folgenden sollen diese Fragen durch einen Vergleich der Feld- und Temperaturabhängigkeit soweit wie möglich geklärt werden. Was man be-

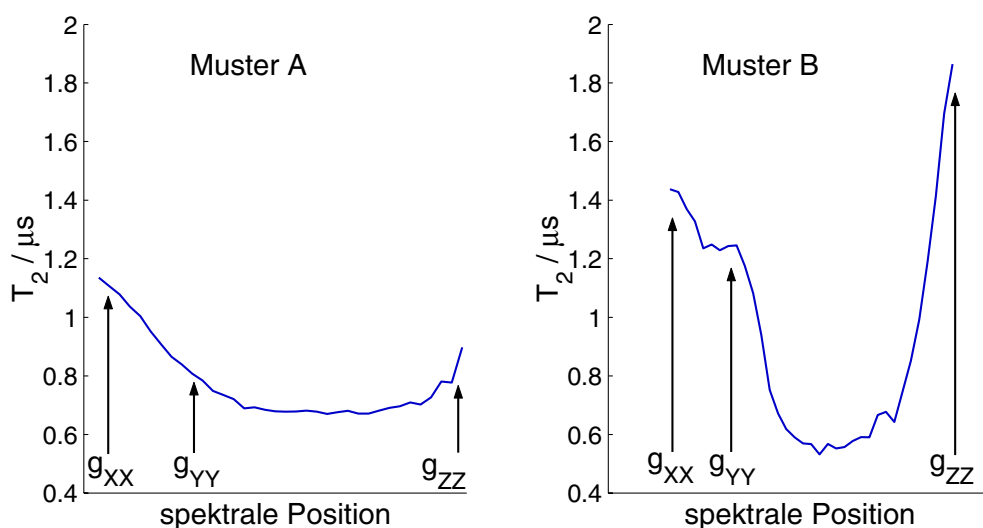


Abbildung 6.8: Darstellung der Relaxationszeiten von $Q_A^{\bullet-}$ bei $T = 120$ K (links) und 190 K (rechts) im W-Band gegen ihre Position im Spektrum. Bei 120 K beobachtet man bei g_{XX} eine gegenüber allen anderen spektralen Positionen verlangsamte Relaxation (Muster A). Bei 190 K sind $T_{2_{\text{eff}}}^X$, $T_{2_{\text{eff}}}^Y$ und $T_{2_{\text{eff}}}^Z$ wesentlich länger als die Relaxationszeiten an den spektralen Positionen dazwischen (Muster B).

reits an den gepulsten Spektren erkennen kann, ist, dass es zwei verschiedene Relaxationsmuster gibt: Muster A, mit einer gegenüber allen anderen spektralen Positionen stark verlangsamten Relaxationszeit an der Position g_{XX} . Diese Ori-

entierungsabhängigkeit beobachtet man für $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ bei 120 K im W-Band (siehe Abbildung 6.6). Bei höheren Temperaturen im W-Band und im G-Band bei 120 K und 190 K beobachtet man Muster B, bei dem g_{XX} , g_{YY} und g_{ZZ} deutlich langsamer relaxieren als die Positionen dazwischen (siehe ebenfalls Abbildung 6.6). Die orientierungsabhängige Relaxation von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ bei 140 K und bei 160 K, ist eine Überlagerung dieser beiden Muster. Bei 190 K beobachtet man sowohl im W-Band als auch im G-Band Muster B. Dieses Muster kann unschwer einer isotropen Fluktuation des g -Tensors um seine Hauptwerte zugeordnet werden. Sowohl aus der Frequenz- als auch aus der Temperaturabhängigkeit der Relaxation folgt, dass die Korrelationszeit dieses Prozesses langsam ist. Beim Übergang von 95 GHz auf 180 GHz nehmen zwar die Relaxationszeiten leicht ab, aber wesentlich weniger, als im Rahmen der Redfield-Theorie zu erwarten wäre. Ein langsamer Relaxationsprozess wird auch durch die Temperaturabhängigkeit der Relaxation von $Q_A^{\bullet-}$ zwischen 160 K und 190 K im W-Band bestätigt. Während die Relaxationszeiten bis 160 K länger werden, nehmen sie für größere Temperaturen wieder ab. Für schnelle Fluktuationen gilt: $T_2 \propto \tau_c^{-1}$ [29], während für langsame Fluktuationen $T_2 \propto \tau_c^a$ ($1 < a < 1/2$) [166] beobachtet wurde. Deshalb führt eine Verkürzung der Korrelationszeit bei einem schnellen Prozess zu längerem T_2 , während bei einem langsamen Prozess mit abnehmender Korrelationszeit T_2 kürzer wird. Die Korrelationszeiten der Bewegung werden in der Regel mit größer werdenden Temperatur kürzer, weshalb eine Verkürzung von T_2 mit größer werdenden Temperaturen auf einen langsamen Prozess schließen läßt. Damit konnte das Relaxationsverhalten bei hohen Temperaturen erklärt werden. Auf Grund der Richtungsabhängigkeit der Relaxation läßt sich aber die Relaxation bei tiefen Temperaturen nicht einfach durch eine langsame isotrope Bewegung erklären, wogegen auch die Temperaturabhängigkeit bei tieferen Temperaturen spricht. Bei den bisherigen Berechnungen der Relaxationszeiten [18, 143] wurde immer von einem Relaxationsprozess mit einer einzigen isotropen Korrelationszeit ausgegangen, im vorliegenden Fall scheinen im W-Band und im G-Band zwischen 120 K und 190 K mindestens zwei Prozesse zu wirken. Entsprechend den weiter oben beschriebenen Relaxationsmustern werde ich diese Prozesse im weiteren als Prozess A und Prozess B bezeichnen. Für zwei unabhängige Prozesse addieren sich die reziproken Relaxationszeiten zu einem einzigen T_2 in Gleichung 6.1:

$$\frac{1}{T_{2\text{eff}}} = \frac{1}{T_{2(A)}} + \frac{1}{T_{2(B)}} + \frac{1}{T_{2(\text{iso})}} \quad (6.2)$$

Während Prozess B eindeutig charakterisiert werden kann, ist eine eindeutige Bestimmung von Prozess A schwierig. Bisher wurde Prozess A immer mit einer schnellen Fluktuation des g -Tensors um die g_{XX} -Achse in Verbindung gebracht.

Dagegen, dass der Prozess schnell ist, spricht die Veränderung der Relaxationszeiten beim Übergang von 95 GHz auf 180 GHz. Die Differenz der Extrema der Relaxationszeiten bleiben im Rahmen des Fehlers gleich⁸. Obwohl diese Fehler für die Messungen bei 180 GHz groß sind, wird deutlich, dass sich die Unterschiede zwischen Relaxationszeiten nicht um den Faktor vier vergrößern wie durch eine schnelle Libration um g_{XX} vorhergesagt wird. Das heißt, aus der Frequenzabhängigkeit folgt, dass es sich bei diesem Prozess möglicherweise um eine langsame Auslenkung um g_{XX} handelt. Im Widerspruch dazu scheint zu stehen, dass die Relaxationszeiten von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ zwischen 120 K und 160 K länger werden. Mit der weiter oben gemachten Annahme für kürzere Relaxationszeiten bei einer Erhöhung der Temperatur, würde daraus folgen, dass die Korrelationszeiten schnell sind. Handelt es sich tatsächlich um einen schnellen Mechanismus, könnte der Widerspruch zu den Messungen bei verschiedenen Frequenzen nur durch die Annahme ausgeräumt werden, dass Prozess A feldunabhängig, also keine Modulation des g -Tensors, ist. Kirilina *et al.* beobachteten allerdings für den ähnlichen Fall von Librationen in Nitroxiden mit zunehmender Temperatur größer werdende Korrelationszeiten [148], weshalb langsame Auslenkungen des Moleküls um seine g_{XX} -Achse nach wie vor ein möglicher Relaxationsmechanismus für Prozess A sind. Ein vollständigeres Bild werden zukünftige Messungen bei 180 GHz über einen grösseren Temperaturbereich bringen.

Rückschlüsse auf Dynamik und Struktur der Reaktionszentren

Die Struktur der Bindungstasche von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ legt eine Fluktuation der Akzeptorchinone um g_{XX} und eine damit verbundene Verlangsamung der Relaxation an Position g_{XX} , wie sie im W-Band bei 120 K beobachtet wurde, nahe. ENDOR-Messungen an $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ zeigten [34], dass die wichtigsten Wasserstoffbrücken der Akzeptorchinone in etwa entlang g_{XX} ausgerichtet sind. Um diese Achse können die Kofaktoren also am leichtesten ausgelenkt werden. Prinzipiell können die Bewegungen von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ auch durch stochastische Fluktuationen der Umgebung der Chinone verursacht werden [153, 154, 167]. Dieser Effekt könnte die Relaxation oberhalb 160 K im W-Band und im G-Band dominieren. Für die Relaxationszerfälle der Chinone bei 120 K im W-Band kann dies aber ausgeschlossen werden, da die Fluktuationen des Proteins gleichzeitig sowohl $Q_A^{\bullet-}$ als auch $Q_B^{\bullet-}$ um die X-Achsen ihrer jeweiligen g -Tensoren auslenken müssten. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da g_{XX} von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ nicht parallel sind [150]. Bei höheren Temperaturen geht diese richtungsabhängige Be-

⁸Bei den Messungen bei 180 GHz handelt es sich um vorläufige Messungen, die mit großen Fehlern behaftet sind.

wegung in eine isotrope Bewegung über. Mit Mößbauer-Spektroskopie wurde gezeigt, dass sich in bakteriellen Reaktionszentren [153] und PS II [154] zwischen 150 K und 200 K ein Übergang in den Bewegungsmoden der Umgebung von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$ vollzieht. In diesen Arbeiten wurde ein Anstieg der Fluktuationen zwischen Konformationszuständen bei Temperaturen oberhalb von 150 K, der mit einem Anstieg der Effizienz des Elektronentransfers korreliert ist, beobachtet. Es ist daher naheliegend anzunehmen, dass die Bewegung des Chinons um seine Bindungsachse von langsamen Fluktuationen im Protein überlagert wird. Es ist allerdings fraglich, ob solche Fluktuationen mit nur einer Korrelationszeit ausreichend beschrieben werden können. Wahrscheinlicher ist es anzunehmen, dass sich die anisotropen Fluktuationen der Proteinumgebung mit unterschiedlichen Korrelationszeiten vollziehen. Durch die Entwicklung entsprechender theoretischer Modelle können aus den Relaxationszerfällen Bewegungsmoden in einem für die Funktion des Proteins relevanten Zeitfenster über einen breiten Temperaturbereich untersucht werden.

