

# Die lichtinduzierte Antwort des Photorezeptors in *Arabidopsis thaliana* Cryptochrom-1

Im Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin  
zur Erlangung der Würde eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
eingereichte Dissertation

vorgelegt von

**Ringo Wenzel**

aus Dresden



Institut für Experimentalphysik der Freien Universität Berlin

2011

Erster Gutachter: Prof. Dr. Robert Bittl

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Möglich

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2011

## Zusammenfassung

Cryptochrome sind blaulichtsensitive Photorezeptoren, welche eine hohe sequenzielle und strukturelle Ähnlichkeit zur Proteinklasse der DNA-Schäden reparierenden Photolyasen, sowie den selben Flavin-Kofaktor aufweisen. Vertreter dieser Gruppe konnten in vielen Organismen, beginnend bei Pflanzen, über Tiere, bis hin zum Menschen, nachgewiesen werden, wobei Cryptochrome üblicherweise jedoch keine DNA-Reparaturfunktion besitzen. Die Bedeutung sowie der Wirkmechanismus dieser Proteine ist noch zu großen Teilen unverstanden, allerdings ist bekannt, daß der unter Dunkelbedingungen als voll oxidiertes Flavin vorliegende Kofaktor durch die Beleuchtung mit blauem Licht in seine Radikalform überführt werden kann.

Da Elektronenspinresonanzexperimente ausschließlich paramagnetische Zentren detektieren, ist es mit Hilfe dieser Methode möglich, den semireduzierten Zustand des Flavins spezifisch zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde *Arabidopsis thaliana* Cryptochrom-1 (AtCry-1) als typischer Vertreter aus der Unterklasse der pflanzlichen Cryptochrome betrachtet. Die dabei durchgeführten Experimente beleuchten die Fragestellungen bezüglich des Mechanismus' von AtCry-1 aus zwei unterschiedlichen Blickwinkeln.

Zuerst wurde die Kinetik der Photoaktivierung und Dunkeladaption des Proteins *in intakten Wirtszellen* analysiert und der Einfluß von blauem und grünem Licht auf das erzeugte Flavinradikal beobachtet. Diese Messungen liefern wichtige physiologische Informationen, welche durch Versuche an aufgereinigtem Protein nicht ermittelt werden können. Vergleiche der Ganzzellexperimente mit Messungen an reinem Protein weisen zudem auf kleine strukturelle Unterschiede in der Orientierung des Kofaktors hin.

Weiterhin konnten Messungen zum Elektronentransfer in direkter Folge der Aktivierung des Flavins durchgeführt werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse weisen klare Unterschiede zu Beobachtungen an strukturell sehr ähnlichen Vertretern aus der Gruppe der Cry-DASH-Proteine und Photolyasen auf. Hier wird eindrucksvoll deutlich, daß bereits geringe Variationen in der Sequenz eines Proteins zu einem signifikant veränderten Verhalten führen können.



## Summary

Cryptochromes are blue-light sensing photoreceptors found in plants, animals and humans, that share a high degree of structural and sequence homology with photolyases, and contain the same flavine cofactor. Yet, in contrast to photolyases, cryptochromes usually do not show a DNA-repair function and their mechanism of action is basically unknown. However, it could be shown, that blue light irradiation leads to an accumulation of the semi-reduced flavin radical state, while the fully oxidized flavin was found to be the dark stable ground state.

For measuring the cryptochrome activation, electron paramagnetic resonance (EPR) provides a powerful tool. Since EPR-experiments are sensitive to radicals only, the semi-reduced flavin state can be probed exclusively. As a typical representative of plant-cryptochromes, this work focuses on *Arabidopsis thaliana* Cryptochrome-1 (AtCry-1). The survey is thereby dealing with the following two aspects, to approach the questions associated with AtCry-1's light-correlated mechanism from different points of view.

Firstly, the kinetics of photo-activation and dark adaption of AtCry-1 was measured in intact host cells. Also, an influence of green and blue light on the flavin radical state could be observed. This results yield important physiological information that can not be extractet out of experiments on protein alone. Finally, a comparison of ENDOR-measurements done on both, purified protein and overexpressing cells, suggests the existence of small structural differences in the conformation of the flavin cofactor.

Secondly, measurements on the electron-transfer process after flavin-activation could be performed. Those experiments show remarkable differences to published results on photolyases and cry-DASH-proteins. Since all these proteins share a very high structural similarity, this illustrates the possibly strong influence on physiological properties due to slight variations in sequence.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Motivation und Ziele der Arbeit</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Biologische und photochemische Charakterisierung des untersuchten Proteins</b>	<b>3</b>
2.1	Cryptochrome und Photolyasen - Familienübersicht . . . . .	3
2.1.1	Photolyasen . . . . .	5
2.1.2	Cryptochrome . . . . .	5
2.1.3	Der Kofaktor FAD . . . . .	8
2.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> Cryptochrom-1 . . . . .	12
2.2.1	Struktur der PHR-Domäne . . . . .	13
2.2.2	Lichtreaktion des Proteins . . . . .	13
2.2.3	Wechselwirkungen und Bindungen . . . . .	16
2.2.4	Zusammenstellung wichtiger ESR-Parameter . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Einführung in die ESR-Spektroskopie</b>	<b>20</b>
3.1	Das freie Elektron im magnetischen Feld . . . . .	20
3.1.1	Der Spin eines Elektrons . . . . .	20
3.1.2	Grundprinzip der ESR . . . . .	21
3.2	Spinhamiltonoperator, g-Matrix und relevante Wechselwirkungen . . . . .	22
3.2.1	Orientierungsabhängigkeit von g . . . . .	23
3.2.2	Spin-Spin-Kopplung zwischen mehreren Elektronen . . . . .	25
3.2.3	Hyperfine Wechselwirkung zwischen Elektron und Atomkern . . . . .	27
3.2.4	Zusammenfassung . . . . .	29
3.3	Relaxation . . . . .	29
3.4	Theoretische Beschreibung . . . . .	30
3.4.1	Das Vektorbild . . . . .	30
3.4.2	Der Dichteoperatorformalismus . . . . .	33
3.5	Theorie der spinkorrelierten Radikalpaare . . . . .	34
3.5.1	Eigenwerte und Eigenvektoren . . . . .	34
3.5.2	Übergangsfrequenzen und Signalstärken . . . . .	36
3.6	Das <i>cw</i> -ESR-Experiment . . . . .	38
3.6.1	Aufbau des Spektrometers . . . . .	38
3.6.2	Theorie . . . . .	40

3.7	Pulsfolgen und induziertes Echo . . . . .	41
3.7.1	Das Hahn-Echo Experiment . . . . .	42
3.8	Elektron-Kern-Doppelresonanz (ENDOR) . . . . .	44
3.8.1	Davies-ENDOR . . . . .	45
3.8.2	Orientierungsselektivität . . . . .	47
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>48</b>
4.1	Biochemische Grundlagen und Probenpräparation . . . . .	48
4.1.1	Expression von AtCry-1 über das Sf21/Baculovirussystem . . . . .	48
4.1.2	Präparation der Proben . . . . .	48
4.2	Aufbau und Durchführung der Experimente; Aufbereitung der Rohdaten . . . . .	52
4.2.1	<i>cw</i> -ESR . . . . .	52
4.2.2	ENDOR . . . . .	57
4.2.3	Transiente ESR . . . . .	57
4.3	Benutzte Programme für Berechnungen und Simulationen . . . . .	60
4.3.1	DFT-Berechnungen . . . . .	60
4.3.2	Nachbildung der Absorptions- und ENDOR-Spektren . . . . .	61
4.3.3	Simulation der spinpolarisierten Spektren . . . . .	61
<b>5</b>	<b>Durchführung und Ergebnisse der Ganzzelleexperimente</b>	<b>63</b>
5.1	Motivation und Fragestellung . . . . .	63
5.2	Grundlegende Experimente und Charakterisierung des Radikals . . . . .	65
5.2.1	Radikalkonzentration in den Zellen . . . . .	66
5.3	Kinetiken . . . . .	67
5.3.1	Erste Messungen . . . . .	67
5.3.2	Reproduktionsproblem der Dunkeladaption und Schlußfolgerungen daraus . . . . .	69
5.3.3	Ergebnisse . . . . .	72
5.4	Vergleich von Zellprobe und aufgereinigtem Protein . . . . .	78
5.4.1	X-Band ENDOR-Messungen . . . . .	78
5.4.2	Analyse des W-Band-Absorptionsspektrums . . . . .	81
5.4.3	W-Band ENDOR-Messungen . . . . .	82
5.4.4	Auswertung und Simulation der ENDOR-Spektren am W-Band . . . . .	82
5.4.5	Strukturelle Interpretation der Meßergebnisse . . . . .	87
5.4.6	Test verschiedenener Hypothesen zur Ursache der Reorientierung . . . . .	92
<b>6</b>	<b>Untersuchungen zum Elektronentransfer mittels transienter ESR-Spektroskopie</b>	<b>94</b>
6.1	Überblick . . . . .	94
6.2	Transiente ESR-Messungen an Wildtyp-AtCry-1 . . . . .	95
6.2.1	Isolation der spektralen Anteile . . . . .	98
6.2.2	Analyse und Simulation der spektralen Komponenten . . . . .	99



6.2.3	Vorläufige Interpretation . . . . .	105
6.3	Messungen an den Mutanten W324F und W400F, Vergleich mit dem Wildtyp	106
6.3.1	Untersuchungen zu den Spektren der W324F-Mutante . . . . .	111
6.4	Interpretation der Ergebnisse . . . . .	114
6.4.1	Zuordnung der Radikalpaarpartner . . . . .	115
6.4.2	Transferpfad und Temperaturabhängigkeit . . . . .	117
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Diskussion</b>	<b>120</b>
7.1	Messungen an ganzen Zellen . . . . .	120
7.2	Unterschiede zwischen Zellen und aufgereinigtem Protein . . . . .	122
7.3	Untersuchungen zur Bildung des transienten Dublettpears . . . . .	124
7.4	Abschließende Bemerkungen . . . . .	128
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>129</b>
	<b>A Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>140</b>
	<b>B Herleitungen</b>	<b>141</b>
B.1	Erläuterung zur Phasenkorrektur mit Hilfe der Hilberttransformation . . . . .	141
B.2	Abschätzen des Wirkungsquerschnittes . . . . .	142
B.3	Abschätzen der Sauerstoffdiffusion während der Reoxidation . . . . .	143
B.4	Berechnung der Reaktionsraten . . . . .	145
	<b>C Kontaktinformationen der Firmen</b>	<b>147</b>

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Photolyasen/Cryptochrome: Molekularer Stammbaum . . . . .	4
2.2	Konservierte Trp-Kette . . . . .	7
2.3	Struktur des FAD . . . . .	8
2.4	Oxidationszustände des Flavin . . . . .	9
2.5	Absorptionsspektrum des Flavin . . . . .	9
2.6	Spindichteverteilung und $g$ -Matrix-Orientierung in FADH <sup>o</sup> . . . . .	10
2.7	ESR-Signal des lichtinduzierten Flavintripletts . . . . .	12
2.8	Kristallstruktur von AtCry-1 . . . . .	14
2.9	Reaktionsschema der Lichtreaktion . . . . .	15
2.10	Magnetische Eigenschaften des Trp-Radikals . . . . .	18
3.1	Spektrum einer $g$ -Matrix . . . . .	24
3.2	Singulett-Triplett-Mischung eines Dublett-paars . . . . .	35
3.3	Beispielspektrum eines spin-korrelierten Dublett-paars . . . . .	37
3.4	Schematische Darstellung eines ESR-Spektrometers . . . . .	38
3.5	Magnetisierungsvektoren und Pulssequenz während der Hahn-Echo-Sequenz	43
3.6	Schematische Darstellung des Davies-ENDOR-Experiments . . . . .	46
4.1	X-Band <i>cw</i> -Messungen: Signalstärke als Funktion der Leistung . . . . .	54
4.2	X-Band <i>cw</i> -Messungen: typische Spektren . . . . .	55
4.3	X-Band <i>cw</i> -Messungen: Aufbereitung der Spektren . . . . .	55
4.4	Transiente ESR . . . . .	58
4.5	Aufbereitung der transienten Spektren . . . . .	60
5.1	<i>cw</i> -Beispielspektren . . . . .	65
5.2	Zellkinetiken Mai 2008 . . . . .	68
5.3	Fluoreszenzspektren von Sf21-Zellen . . . . .	69
5.4	Dunkelkinetiken ohne Reoxidation . . . . .	70
5.5	Kinetiken zur Signalerzeugung und Dunkeladaption . . . . .	73
5.6	Kinetiken bei unterdrückter Reoxidation . . . . .	73
5.7	Effekt von grünem Licht auf das Radikal . . . . .	75
5.8	X-Band ENDOR an Zellen . . . . .	78
5.9	X-Band ENDOR: Vergleich Protein/Zelle . . . . .	79

5.10	W-Band Absorptionsspektren . . . . .	80
5.11	W-Band: Transversale Relaxationszeiten . . . . .	81
5.12	W-Band ENODR: Vergleich Protein/Zelle . . . . .	83
5.13	Simulation der orientierungsselektiven ENDOR-Spektren . . . . .	85
5.14	Struktur des Flavins; Veranschaulichung der Diederwinkel . . . . .	87
5.15	Variation des Diederwinkels $\varphi$ . . . . .	88
5.16	Variation des Kippwinkels $\theta$ . . . . .	89
5.17	Variation des Kippwinkels $\chi$ . . . . .	90
5.18	W-Band ENDOR: Vergleich verschiedener Proteinzusätze . . . . .	92
6.1	Transiente ESR-Spektren des Wildtyp bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	96
6.2	Schnitte in den transienten Spektren des Wildtyp bei 80 K und 160 K . . . . .	97
6.3	Komponenten des transienten Wildtypspektrums . . . . .	98
6.4	Lebensdauern der Signalkomponenten . . . . .	99
6.5	Abhängigkeit des spinpolarisierten ESR-Spektrums von $J$ und $D$ . . . . .	100
6.6	Abhängigkeit des spinpolarisierten ESR-Spektrums von $J$ und $\beta$ . . . . .	101
6.7	Simulation von TT-(0,5) . . . . .	102
6.8	Simulation von TT-(1,0) . . . . .	103
6.9	Darstellung von TT-(1,0) als Linearkombination von TT-(0,5) und HT-(0,5) . . . . .	103
6.10	Simulation von HT . . . . .	104
6.11	Transiente Spektren der beiden Mutanten W324F und W400F . . . . .	107
6.12	Schnitte in den transienten Spektren der W324F-Mutante . . . . .	108
6.13	Schnitte in den transienten Spektren der W400F-Mutante . . . . .	109
6.14	Transiente Spektren der untersuchten Protein über einen weiten Feldbereich . . . . .	110
6.15	Singulärwertzerlegung für die Spektren der W324F-Mutante . . . . .	112
6.16	Linearkombination der Singulärwertvektoren . . . . .	113
6.17	Konservierte Trp-Kette und W379 . . . . .	114
7.1	Simulation der ENDOR-Spektren aus Kay2005 . . . . .	122
7.2	Vorgeschlagenes Elektronentransferschema . . . . .	124



# Kapitel 1

## Motivation und Ziele der Arbeit

Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung des Cryptochrom-1 aus *Arabidopsis thaliana* (AtCry-1), eines zu Beginn der 1990er Jahre entdeckten blaulichtaktiven Flavoproteins. Zusammen mit den Photolyasen bilden die Cryptochrome eine Gruppe sequenziell und strukturell sehr ähnlicher blaulichtsensitiver Proteine. Vertreter dieser Familie sind in Organismen aus allen großen Taxa des Lebens zu finden, dies beginnt bei Archaea, geht über Bakterien, Pilze und Insekten, bis hin zu höheren Pflanzen und Wirbeltieren. Alle diese Proteine besitzen dabei einen Flavin-Kofaktor, dessen Redoxchemie für die Funktionsweise des Systems essentiell ist. Während die Aufgabe und Funktionsweise der Photolyasen als blaulichtgetriebene Reparatureinheiten für strahlungsgeschädigte DNA inzwischen weitestgehend bekannt ist, bestehen noch erhebliche Unklarheiten in Reaktionsmechanismus und Funktion der Cryptochrome.

Es ist bekannt, daß der Flavin-Kofaktor von AtCry-1 durch die Absorption von blauem Licht in seinen angeregten Zustand überführt wird, wobei sich eine schnelle Elektronenaufnahme aus der umgebenden Proteinstruktur innerhalb weniger Pikosekunden (im Falle der Photolyase aus *E.coli*) anschließt. Das so gebildete Flavinradikal ist hinreichend lange stabil, um es mittels verschiedener spektroskopischer Methoden zu betrachten. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsspektren der verschiedenen Oxidationszustände des Kofaktors kann die Untersuchung des Proteins zum Beispiel mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie erfolgen. Auch Fluoreszenzmessungen sind möglich und können zur Beantwortung der offenen Fragen bezüglich der Photochemie des Proteins benutzt werden. Allerdings sind all diese Untersuchungen im Wesentlichen auf Messungen an aufgereinigten Cryptochromproben beschränkt, da die zelluläre Umgebung zu einer Veränderung des optischen Absorptionsverhaltens der Probe führt.

Nachdem die Photoaktivierung des Flavins in Cryptochromen jedoch mit der Bildung eines paramagnetischen Zustandes einhergeht, bietet sich eine weitere Möglichkeit an: Mittels Elektronenspinresonanz (ESR) können Informationen über die Struktur und Kinetik des Flavinradikals erhalten werden. Dies ist insbesondere darum hilfreich, weil die natürliche Radikalkonzentration in biologischen Systemen häufig sehr klein ist. Bei entsprechender Überexpression des zu untersuchenden Proteins kann die Messung daher nicht nur an aufge-

reinigtem Protein, sondern sogar innerhalb der Wirtszellen erfolgen. Darüber hinaus bietet die ESR auch Möglichkeiten zur Untersuchung des Elektronentransferprozesses durch das Protein, der direkt nach erfolgter Photoaktivierung des Kofaktors auftritt. Dieser Transport erfolgt mutmaßlich über eine Reihe transienter Tryptophanradikale, wobei optische Methoden nur die Art und (in einigen speziellen Fällen) relative Orientierung der beteiligten Radikalpartner feststellen können. Spinresonanzuntersuchungen erreichen zwar nicht die zeitliche Auflösung schneller Lichtabsorptionsexperimente, können aber dafür eine zusätzliche Aussage über die Umgebung der beteiligten Aminosäuren und ihren Abstand zum Flavinradikal treffen. Desweiteren ist es nur über ESR-Messungen möglich das spin-korrelierte *Dublettpaar* direkt zu vermessen, um Informationen über Kopplungsparameter und Polarisation zu extrahieren.

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit ist es somit AtCry-1 als Modellsystem der Cryptochromfamilie mit Hilfe der ESR hinsichtlich seiner photoinduzierten Radikalzustände zu untersuchen um Informationen über den Mechanismus der blaublichtsensitiven Funktion des Proteins zu erhalten. Dabei werden zwei Teilaspekte behandelt:

- Um möglichst nah an der nativen Umgebung des Proteins zu arbeiten, soll das durch Blaulichtabsorption entstehende, (bei niedrigen Temperaturen) stabile Flavinradikal in AtCry1 in überexprimierenden Zellen untersucht werden. Dabei sind die Zeitdauern der Photoaktivierung und Dunkeladaptation ebenso zu betrachten, wie eventuelle Unterschiede der Radikaleigenschaften im Vergleich zu isoliertem Protein.
- Zur Analyse des direkt auf die Photoaktivierung des Flavinradikals folgenden Elektronentransfers wird zeitaufgelöste ESR-Spektroskopie benutzt, um das transiente Dublettpaar, welches während der Wanderung des Elektronenloches vom Flavinradikal hin zur Oberfläche des Proteins vorliegt, zu beobachten.

Zuerst erfolgt dabei eine Darstellung der bisher bekannten biologischen und photochemischen Eigenschaften des untersuchten AtCry-1 (Kapitel 2). Im Anschluß daran wird die Meßmethode der ESR sowie die praktische Funktionsweise der Experimente erläutert (Kapitel 3). Es folgt die Vorstellung der Probenpräparation, experimentellen Aufbauten, Auswertungsalgorithmen und Simulationsprogramme (Kapitel 4). Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente schließlich sind auf zwei Abschnitte verteilt. Kapitel 5 behandelt die Messungen an ganzen Zellen, sowie den Vergleich zwischen Zellproben und aufgereinigtem Protein, während die Resultate der Untersuchungen zum Elektronentransfer (nach erfolgter Reduktion des photoangeregten Flavins) in Kapitel 6 dargelegt werden. Eine Zusammenfassung und Diskussion der gefundenen Resultate beendet die Arbeit (Kapitel 7).

# Kapitel 2

## Biologische und photochemische Charakterisierung des untersuchten Proteins

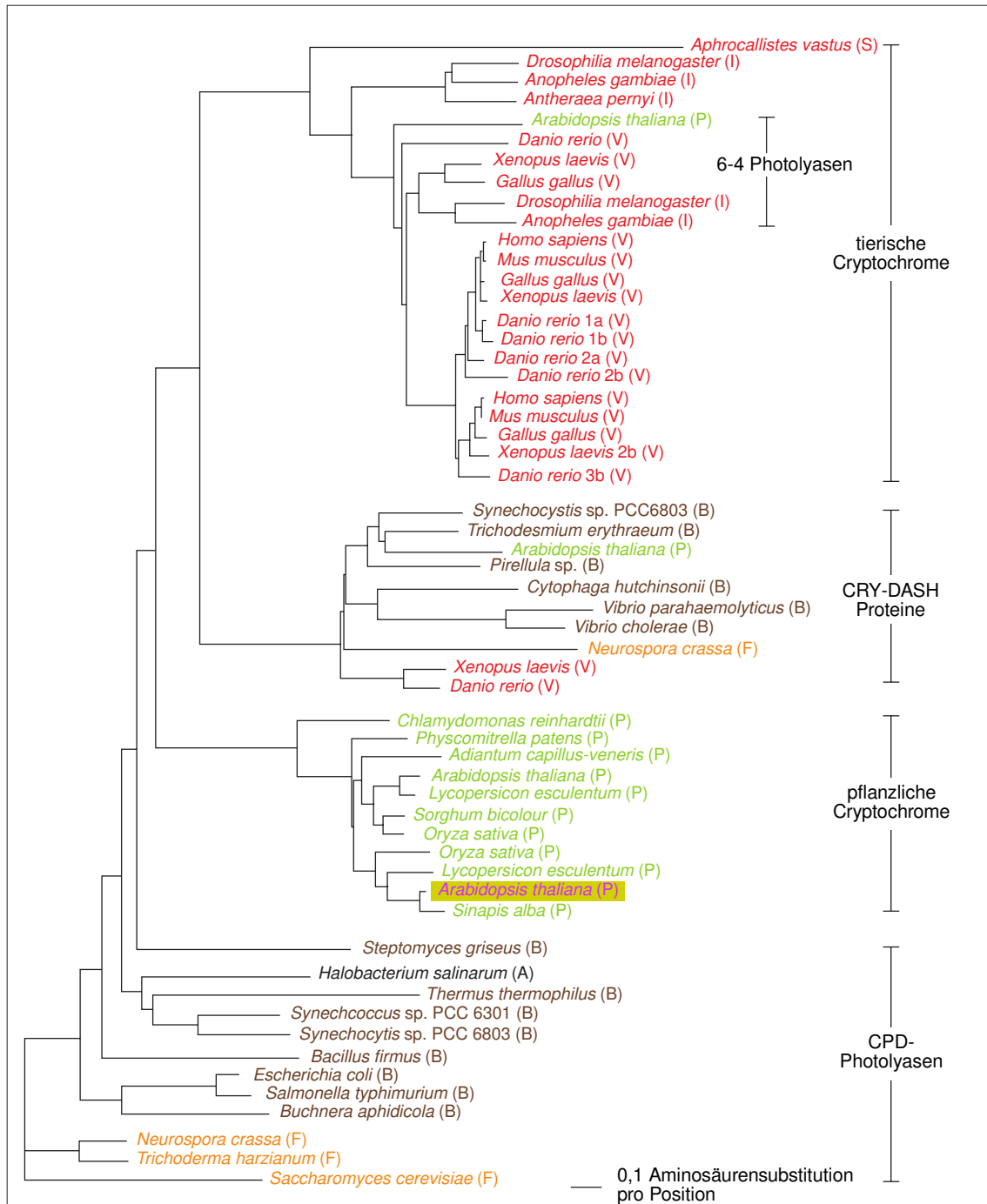
Die hier vorgestellten Arbeiten wurden alle an Cryptochrom-1 von *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Dieses Protein gehört zur Familie der *Cryptochrome und Photolyasen*, einer Gruppe blaulichtaktiver Flavoproteine.

### 2.1 Cryptochrome und Photolyasen - Familienübersicht

Bei allen Cryptochromen und Photolyasen handelt es sich um strukturell sehr ähnliche Proteine mit mindestens 25%-40% Sequenzidentität und nahezu deckungsgleicher Tertiärstruktur. Alle Mitglieder der Familie besitzen einen FAD-Kofaktor (Flavin-Adenin-Dinukleotid), der in einer einmaligen und für diese Klasse charakteristischen U-förmigen Konformation vorliegt sowie häufig noch entweder MTHF (Methylentetrahydrofolat) oder 8-HDF (8-Hydroxy-5-Deazariboflavin) als einen zweiten Chromophor.<sup>1</sup> Während Flavin die photoreaktive Komponente darstellt, fungiert der zusätzliche Kofaktor als Antennenmolekül, welches seine Anregungsenergie auf das FAD überträgt, um die Bandbreite und Empfindlichkeit der Lichtabsorption zu erhöhen. Die Aktivierung des Proteins erfolgt dann durch den Übergang des Flavins in einen zur dunkeladaptierten Situation verschiedenen Redoxzustand.

---

<sup>1</sup>Als Ausnahme zu dieser allgemeinen Beobachtung existieren Hinweise auf ein FAD als zweiten Kofaktor in der Photolyase aus *Sulfolobus tokadaei* [1].



**Abbildung 2.1:** Molekularer Stammbaum der Photolyase/Cryptochrom-Proteinfamilie. Die entsprechenden Unterfamilien sind rechts angegeben. Das in dieser Arbeit untersuchte Cryptochrom-1 aus *Arabidopsis thaliana* ist hervorgehoben. Die Abkürzungen bedeuten: A... Archaeobakterien, B... Bakterien, F... Pilze, I... Insekten; P... Pflanzen, V... Vertebraten (Wirbeltiere). (Verändert übernommen aus [2].)



### 2.1.1 Photolyasen

Photolyasen sind in vielen Organismen, verteilt auf alle Gruppen von Lebewesen (mit Ausnahme plazentaler Säugetiere), anzutreffende Enzyme, die in der Lage sind die beiden wichtigsten durch UV-Licht erzeugten DNA-Schäden zu reparieren. Dabei werden zwei Gruppen unterschieden:

1. CPD-Photolyasen, welche Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (Pyr <> Pyr) in der geschädigten DNA aufbrechen können.
2. (6-4)-Photolyasen, die Pyrimidin-Pyrimidon (6-4)-Photoprodukte (Pyr [6-4] Pyr) reparieren.

Der Funktionsmechanismus der Photolyasen ist weitgehend verstanden [3, 4].

### 2.1.2 Cryptochrome

Der Name „Cryptochrom“ ist ein generischer Begriff, welcher ursprünglich von Pflanzenbiologen in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts benutzt wurde, um hypothetische Rezeptoren der spezifischen Blaulichtantwort (Phototropismus) in höheren Pflanzen zu beschreiben [5]. In den 1990er Jahren wurden schließlich tatsächlich blaulicht-photoaktive Pigmente in *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* entdeckt und entsprechend „Cryptochrome“ genannt [6–9].<sup>2</sup> Es zeigte sich, daß diese in Pflanzen gefundenen Proteine eine hohe Sequenzgleichheit zu Photolyasen aufweisen. Entsprechend wurden etwas später im menschlichen Genom isolierte Rezeptoren, welche zwar keine DNA-Reparaturfunktion besitzen, aber ansonsten eine starke Homologie zu Photolyasen besitzen, ebenfalls mit Cryptochrom-1 bzw. Cryptochrom-2 bezeichnet [13, 14].

Aufbauend darauf lautet die inzwischen akzeptierte Definition für Cryptochrome:

Unter Cryptochromen versteht man Proteine mit einer strukturellen und sequenziellen Homologie zu Photolyasen, welche aber keine DNA-Reparaturaktivität zeigen.

Allerdings konnte für einige Vertreter der Cryptochrom-DASH-Untergruppe (*Arabidopsis thaliana* Cry-3, *Vibrio cholerae* Cry) gezeigt werden, daß sie einzelsträngige DNA reparieren können [15, 16] und dies in Einzelfällen sogar bei Doppelstrang-DNA gelingt, sofern sich das CPD in einer Schleife befindet [16]. Die Effektivität dieses Reparaturvorganges liegt in jedem bekannten Fall jedoch deutlich unterhalb derjenigen von Photolyasen.

Vertreter der Cryptochrom-Proteinklasse finden sich in vielen Pflanzen, Tieren und Bakterien. Sie zeigen im Allgemeinen eine etwas höhere Ähnlichkeit zu (6-4)-Photolyasen als

---

<sup>2</sup>Erst später stellte sich heraus, daß der ursprünglich mit diesem Namen assoziierte Phototropismus hauptsächlich durch eine weitere Klasse von Proteinen vermittelt wird, für welche dann ein anderer Name („Phototropin“) eingeführt werden mußte [10–12].

zu CPD-Photolyasen und können grob in die folgenden drei Gruppen eingeteilt werden (vergleiche auch Abbildung 2.1):

- tierische Cryptochrome
- pflanzliche Cryptochrome
- Cry-DASH-Proteine<sup>3</sup>

## Struktur

Eine auffallende Eigenschaft vieler Cryptochrome (außer Cry-DASH), insbesondere solcher aus pflanzlichen Organismen, ist die Existenz einer zusätzlichen, nicht bei Photolyasen anzutreffenden, C-terminalen Erweiterung von 50-250 Aminosäuren. Da eine isolierte Überexpression dieses Abschnittes in *Arabidopsis* selbst unter vollständiger Rotlichtbeleuchtung zu einem für Blaulichtexposition typischen Phänotyp führt [18], wird davon ausgegangen, daß diese Erweiterung für die Vermittlung des Blaulichtsignals von Bedeutung ist.

Außer der insgesamt sehr ähnlichen Struktur besitzen alle bisher strukturell charakterisierten Cryptochrome/Photolyasen eine konservierte Kette von drei Tryptophanresten, welche die Bindungstasche des Flavins mit der Proteinoberfläche verbinden (siehe Abbildung 2.2).

## Bedeutung und Mechanismus

Die katalytische Funktion der Cryptochrome ist teilweise bekannt, während der Wirkungsmechanismus noch nahezu unklar ist. Die folgenden Funktionen wurden bisher bestätigt oder vorgeschlagen:

- Circadianer Rhythmus:

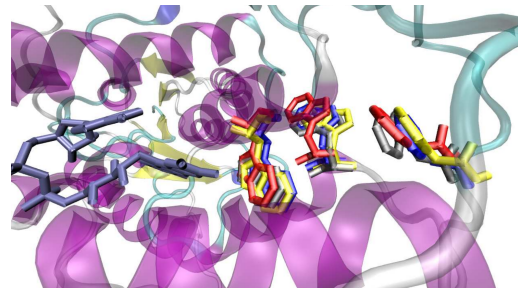
Bei der circadianen Rhythmik handelt es sich um ein biologisches Oszillatorsystem, wodurch Genexpression, Aktivität, Wachstum etc. auch ohne äußere Einflüsse im tageszeitlichen Rhythmus gesteuert werden. Es besteht aus einer transkriptionalen Rückkopplungsschleife, in welcher mehrere Proteine gekoppelt sind. Cryptochrome sind ein Teil dieses Systems, wobei mindestens zwei Funktionen diskutiert werden.

1. Cryptochrome werden in allen Organen exprimiert und regulieren die Genexpression in Wechselwirkung mit den anderen Zeitsteuerproteinen (z.B. „PP5“,

---

<sup>3</sup>DASH steht für *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Human*; Mit dieser Bezeichnung soll auf die hohe Ähnlichkeit der Proteingruppe mit den aus *Homo sapiens* und *Drosophila* bekannten tierischen Cryptochromen hingewiesen werden [17]. Es ist zu bemerken, daß gegenwärtig kein Cry-DASH-Protein in *Drosophila* oder dem Menschen bekannt ist. DASH-Cryptochrome zeigen nicht nur einige strukturelle Besonderheiten, sondern sind in gewissem Maße auch in der Lage DNA-CPD zu reparieren [15, 16]. Ihre Klassifizierung als Cryptochrome ist somit diskussionswürdig, sie können als „Übergangsgruppe“ zwischen Photolyasen und „echten“ Cryptochromen angesehen werden.

SCry-DASH	316	KN	FP	QEDQ							
AtCry1	308	KF	FP	AVDE							
At(6-4)	322	MQ	IP	QEHP							
ThermusDNA	270	QA	FP	QEDE							
369		LG	ID	WR	GAE		392	NW	GN	NY	TA
361		LQ	LP	WR	GMK		384	DA	LG	WQ	YIT
376		LW	IS	WE	GQR		399	NA	GN	MM	WLS
323		LL	LP	WK	RCEE		346	NL	QG	WQ	WAG



**Abbildung 2.2:** Ausschnitt der Sequenz (links) und Visualisierung der konservierten Tryptophan-kette für verschiedene Proteine (rechts). Im rechten Bild wurde das FAD mit hellblau eingezeichnet. Dargestellt sind: das DASH-Cryptochrom aus *Synechocystis sp.* (grau, pdb-ID: 1NP7 [17]), das Cryptochrom-1 aus *A. thaliana* (blau, 1U3C [33]), die (6-4)-Photolyase aus *A. thaliana* (rot, 3FY4 [34]) und die DNA-Photolyase aus *Thermus thermophilus* (gelb, 2J07 [35]).

„Bmal“, „Clock“, „Per1“) auf zellulärer Ebene [19–21]. Untersuchungen an Mäusen, bei denen die Cryptochromexpression genetisch unterdrückt wurde, zeigen, daß diese lichtunabhängige Funktion der Cryptochrome essentiell für den zentralen circadianen Oszillator ist [22].

2. Aufgrund ihrer Lichtempfindlichkeit sind Cryptochrome zusätzlich in der Lage den circadianen Oszillator mit der Anwesenheit von Tageslicht abzugleichen. Allerdings scheinen höhere Tiere weitere, in dieser Funktion wenigstens redundant wirkende, Photorezeptoren zu besitzen [22].

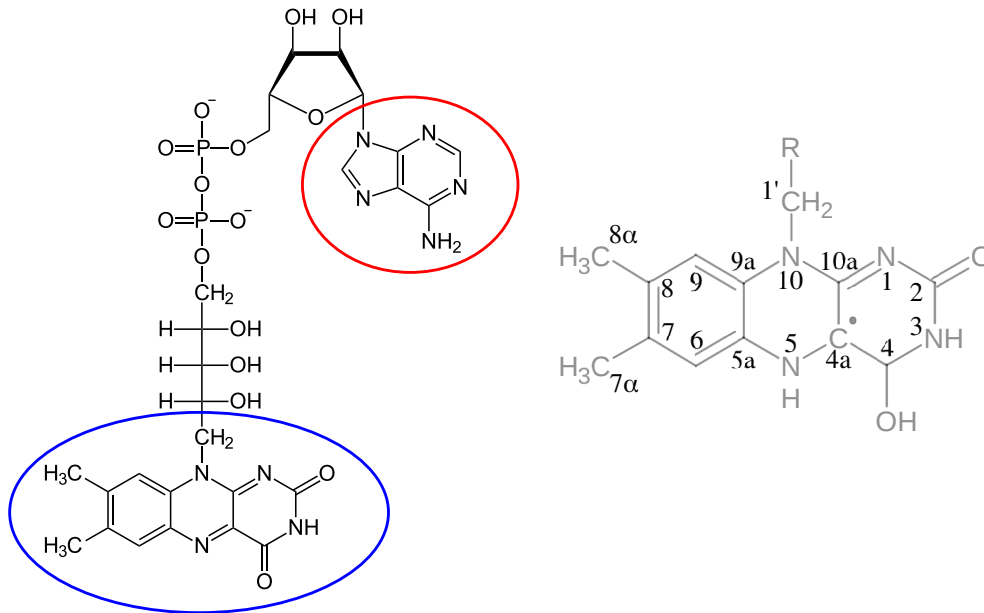
- Keimung und Wachstum in Pflanzen:

Pflanzencryptochrome spielen eine wichtige Rolle bei der Photomorphogenese, wie beispielsweise der Blattentfaltung, der Keimung oder dem lichtgesteuerten Öffnen der Blütenknospe [23,24].

- Magnetfeldrezeptor:

Da die Singulett-Triplett-Übergangsrate eines Radikalpaars grundsätzlich von externen Magnetfeldern beeinflusst werden kann [25–27], könnten Cryptochrome prinzipiell als Magnetfeldsensor dienen. Es wird darüber spekuliert, daß insbesondere der biologische Kompaß bei Zugvögeln auf Cryptochromen im Auge der Tiere aufbaut [28,29]. Zwischenzeitlich publizierte Ergebnisse, nach denen auch das Wachstum von Pflanzen unter Blaulicht magnetfeldabhängig sei, konnten bisher nicht reproduziert werden [30–32].

Auch der Mechanismus der Aktivierung von Cryptochromen ist bisher nur in Ansätzen bekannt. Arbeiten der letzten Jahre zeigen, daß die Bildung des Flavinradikals in Cry-DASH über ein transientes FAD-Trp-Radikalpaar geschieht [36]. Dabei wird das gekoppelte Elektron-Loch-Paar des angeregten Flavins über eine Kette von drei konservierten



**Abbildung 2.3:** Links: Chemische Struktur des Flavin-Adenin-Dinucleotids (FAD) (Blau: Isoalloxazinring des Flavin; Rot: Adenin); Rechts: IUPAC-Nummerierung der einzelnen Atome des Isoalloxazinrings im Flavinneutralradikal.

Tryptophanen getrennt, indem die positive Ladung zur Außenseite des Proteins geleitet wird (siehe Abbildung 2.2). Für *Arabidopsis* Cryptochrom-1 konnte ebenfalls eine Photo-reduktion des Flavins über diese Tryptophankette gezeigt werden [37–39].

### 2.1.3 Der Kofaktor FAD

Alle Photolyasen und Cryptochrome besitzen ein FAD als Kofaktor. Seine Struktur ist in Abbildung 2.3 gezeigt. Der photochemisch wichtige Abschnitt ist dabei das Flavin (7,8-Dimethyl-10-Alkylisoalloxazin), insbesondere dessen Isoalloxazinregion.

Flavin hat die Eigenschaft in drei verschiedenen Redoxzuständen vorkommen zu können: voll reduziert, radikalisch und voll oxidiert. Außerdem existieren für jeden Oxidationszustand drei mögliche Protonierungsrealisationen (siehe Abbildung 2.4). Diese Zustände unterscheiden sich in ihrem Absorptionsspektrum (Abbildung 2.5) und können zumindest teilweise durch Beleuchtung ineinander überführt werden. Die Eigenschaft des Flavins sowohl an Ein- als auch an Zwei-Elektronen-Prozessen teilnehmen zu können und zusätzlich als Protonenakzeptor oder -donor zu fungieren, ist die Ursache für seine weite Verbreitung als Kofaktor in funktional sehr unterschiedlichen Proteinen. Tatsächlich sind inzwischen mehrere tausend Flavoproteine bekannt, welche sich nach Massey und Hemmerich grob in zwei Gruppen einteilen lassen [41]:<sup>4</sup>

<sup>4</sup>Detailliertere Klassifikationen existieren, siehe zum Beispiel [42].

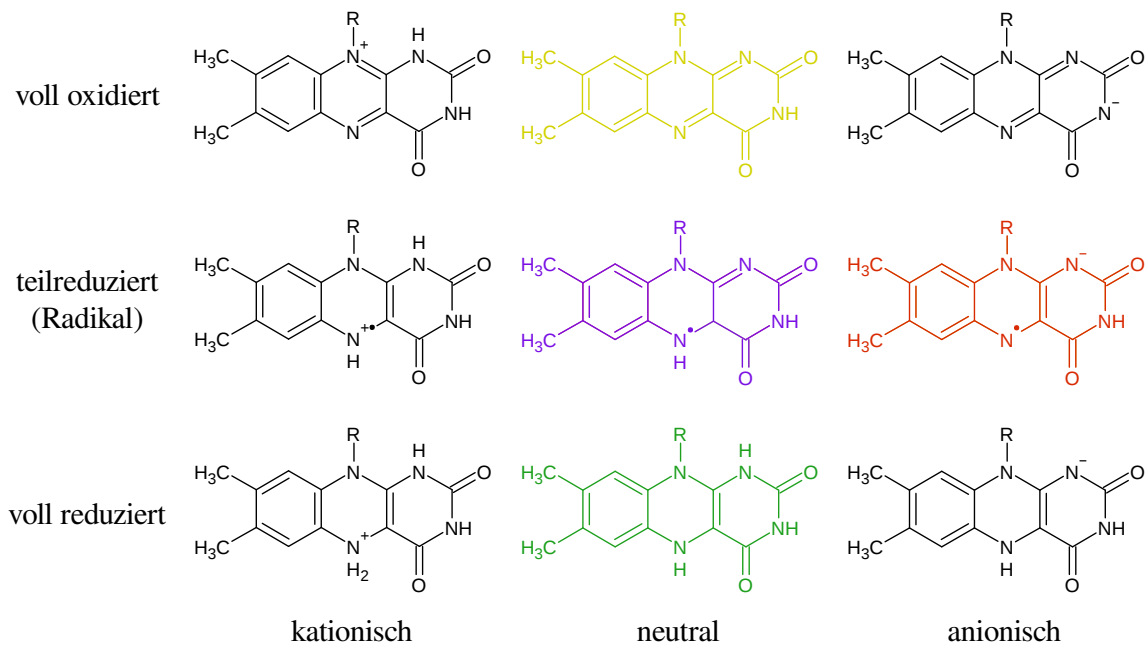


Abbildung 2.4: Mögliche Zustände des Flavins aufgeteilt nach Oxidationszustand (Ordinate) und Ladung (Abszisse). Folgende Abkürzungen sind üblich:  $FAD_{ox}$  (voll oxidiert; gelb),  $FAD^{\bullet-}$  (Anionradikal; rot),  $FADH^{\bullet}$  (Neutralradikal; blau),  $FADH$  (voll reduziert, grün).

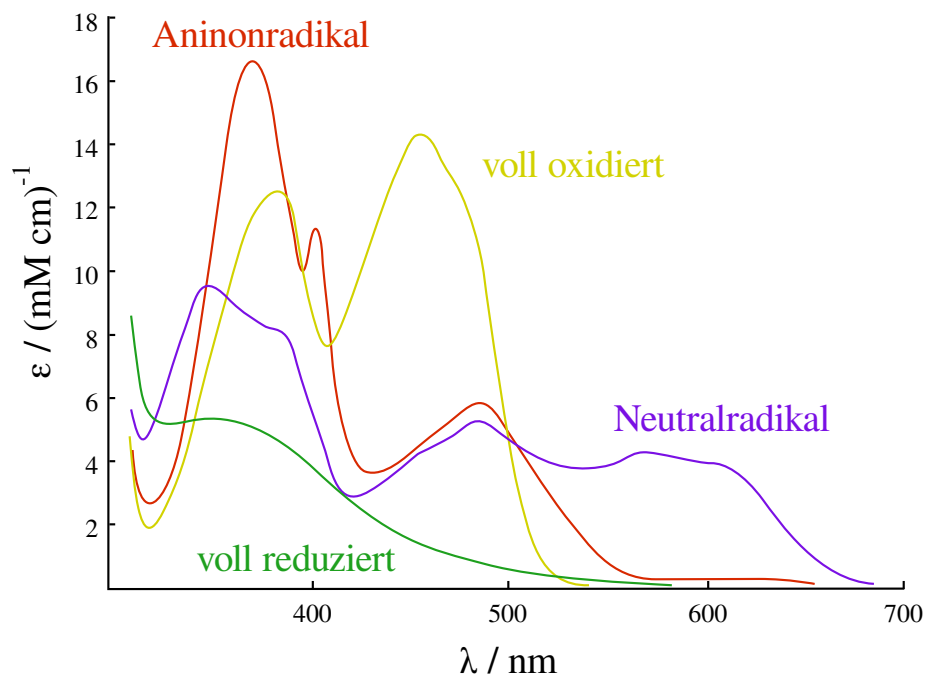
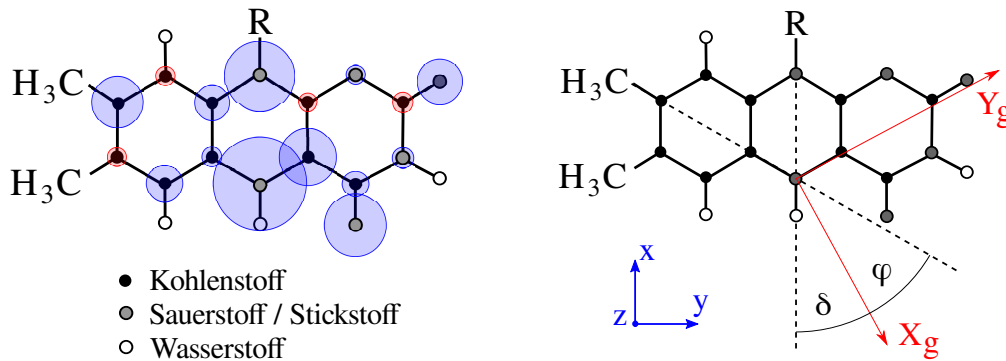


Abbildung 2.5: UV/Vis-Absorptionsspektren für vier Flavinzustände. Verändert übernommen aus [40].



**Abbildung 2.6:** Eigenschaften des neutralen Flavinradikals: Spindichteverteilung (links; rot. . . negative Werte) [44] und Orientierung der Hauptachsen der  $g$ -Matrix (rechts). Bezüglich des molekularen Basissystems (blau), welches durch die Achsen des Hyperfeinkopplungstensors des N(5) definiert wird, liegt die  $z$ -Achse in identischer Richtung. Für *Xenopus laevis* (6-4)-Photolyase wurde die Verdrehung mit  $\delta = -29^\circ$  bzw.  $\varphi = 31^\circ$  publiziert [45].

**Flavine als Dehydrogenasen/Oxidasen** liegen als „rotes“, anionisches Semichinonradikal vor, besitzen eine gebogene Raumstruktur der reduzierten Form und eine Wasserstoffbindung am N(1). Die Aktivierung läuft über das N(5).

**Flavine als Elektrontransferasen** sind als „blaues“, neutrales Semichinonradikal charakterisiert, liegen als reduzierte Form in einer Ebene und haben an der Position N(5) einen Wasserstoff gebunden. Die Aktivierung erfolgt über C(4 $\alpha$ ).

Aufgrund der biologischen Relevanz sowie der relativ guten spektroskopischen Zugänglichkeit (UV/Vis-Absorptionsspektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie, ESR), existiert eine große Anzahl von Untersuchungen zu Flavoproteinen. Da die direkte Umgebung des Kofaktors (stabilisierende Bindungen, Lösemittel, pH-Wert) aber einen erheblichen Einfluss auf die Photo- und Biochemie des Radikals hat,<sup>5</sup> ist es nicht ohne weiteres möglich, die Ergebnisse von einem Protein auf ein anderes zu übertragen.

### Magnetische Eigenschaften des Radikals

Bei Beleuchtung mit blauem Licht wird das in den Cryptochromen/Photolyasen gebundene Flavin aus dem voll oxidierten (Cryptochrome) oder voll reduzierten (Photolyasen) Zustand in seinen Radikalzustand überführt. Im Falle der Cryptochrome entsteht dabei zuerst ein angeregtes Singulett, von welchem ein Elektron, mutmaßlich über die konservierte Tryptophankette (vergleiche Abschnitt 2.1.2), aufgenommen wird [36,38,46,47]. Bei Photolyasen dagegen erfolgt eine Elektronenabgabe vom angeregten Flavin aus auf die zu

<sup>5</sup>Das Redoxpotential für die Zweielektronenreduktion in freiem Riboflavin beträgt rund  $-200$  mV, kann in Abhängigkeit von der Proteinumgebung des gebundenen Kofaktors aber zwischen  $-400$  mV und  $+60$  mV schwanken [43].

reparierende DNA, wodurch das FAD in seinen radikalischen Zustand übergeht [3, 4, 48]. Die Geschwindigkeit dieser Vorgänge, ebenso wie die Stabilität des gebildeten Semichinons, ist stark abhängig vom konkreten Protein. Außerdem wurden bisher sowohl Vertreter beobachtet, in welchen das neutrale Radikal gebildet wird (Pflanzencryptochrome) als auch solche, in welchen das Flavin als anionisches Radikal vorliegt (Insekten- und menschliches Cryptochrom).

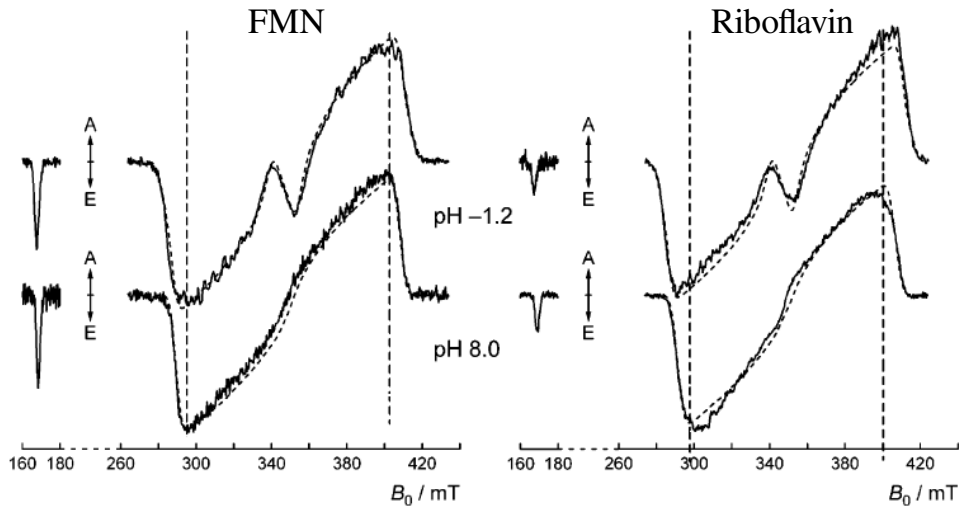
Gegenwärtig existiert eine Reihe von Untersuchungen, in denen ESR-Parameter an Flavinradikalen vermessen wurden. Insbesondere konnte die vollständige  $\mathbf{g}$ -Matrix, inklusive ihrer Orientierung innerhalb des molekularen Koordinatensystems, für das Neutralradikal der (6-4)-Photolyase von *Xenopus laevis* (Abbildung 2.6, rechts) [45, 49] und der DNA-Photolyase von *E. coli* [50] bestimmt werden. Dabei zeigte sich, daß trotz der im Allgemeinen guten Übereinstimmung der  $g$ -Werte für  $g_{yy}$  ein leichter Unterschied beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu konnten Okafuji *et al.* bei Vergleichen des Flavinradikals in neutraler und anionischer Form in der Glucose-Oxidase von *Aspergillus niger* zeigen, daß zwar die vermessenen Hyperfeinwechselwirkungen stark vom Protonierungszustand des Flavinradikals abhängen, die Hauptwerte der  $\mathbf{g}$ -Matrix aber nicht [51].

Für das stabile Flavinneutralradikal wurden zwei Arbeiten zu Simulation der Elektronendichteverteilung publiziert, sowohl mit einer Modellumgebung als auch in *E. coli* DNA-Photolyase [44, 52]. In beiden Fällen wurde das B3LYP-Hybridfunktional in Verbindung mit der EPR-II Zustandsbasis benutzt und die erhaltenen Ergebnisse mit experimentell verfügbaren Hyperfeinkopplungsparametern verifiziert. Es zeigt sich, daß die unterschiedlichen Umgebungen des FAD keinen wesentlichen Einfluß auf die Elektronendichteverteilung des Neutralradikals haben. Aus dieser in Abbildung 2.6 dargestellten Verteilung lassen sich die mutmaßlich starken Hyperfeinkopplungspartner des Elektrons ableiten. Für Protonen sind dies die H(8 $\alpha$ ) sowie die H(1'), das H(5) und das H(6). Insbesondere die hohe Elektronendichte auf N(5) ermöglicht eine Unterscheidung des Radikals nach neutralem oder anionischem Zustand mittels des Nachweises der Existenz einer starken Protonenkopplung mit erheblicher Asymmetrie durch das H(5). Dieser Kopplungstensor wurde 2005 von Weber *et al.* mittels Deuteriumaustauschexperimenten identifiziert und für *E. coli*-DNA-Photolyase vollständig vermessen [53]. Untersuchungen von Schleicher *et al.* an einer großen Anzahl unterschiedlicher Proteine der Photolyase/Cryptochrom-Familie zeigen zwar teilweise deutlich sichtbare Unterschiede in den isotropen Hyperfeinkopplungen der dominanten Protonen, selbst dann, wenn das Flavin immer als Neutralradikal vorliegt<sup>6</sup>, die allgemeine Form des Spektrums ist aber erhalten. Daher ist eine Zuordnung der einzelnen Kopplungen zu den koppelnden Protonen möglich, nachdem diese mittels Deuteriumaustausch für einen Vertreter der Proteinfamilie identifiziert wurden [54].

Wenn das angeregte Elektron-Loch-Paar des initialen Singulettzustandes nicht schnell genug getrennt wird, kann neben der Fluoreszenzrekombination, welche zur Abregung des

---

<sup>6</sup>H(8 $\alpha$ ):  $A_{\text{iso}} = 6,96 \text{ MHz} \dots 7,91 \text{ MHz}$ ; H(1'):  $A_{\text{iso}} = 8,62 \text{ MHz} \dots 9,82 \text{ MHz}$



**Abbildung 2.7:** ESR-Signal des lichtinduzierten Flavintripletts für FMN und Riboflavin im protonierten ( $pH = -1,2$ ) und nichtprotonierten ( $pH = 8,0$ ) Zustand. Übernommen aus [55].

angeregten Flavins führt, ein Singulett-Triplett-Übergang stattfinden. Das derart gebildete Flavintriplett ist ebenfalls ESR-aktiv und kann prinzipiell detektiert werden (Abbildung 2.7). Dies ist besonders dann zu erwarten, wenn die Kinetik zur Trennung des angeregten Flavins, z.B. aufgrund eines fehlenden Redoxpartners, eingeschränkt ist. Der Effekt der Bildung eines Flavintripletts ist zwar nur für eine gewisse Zeit nach der Beleuchtung relevant, da das Tripletttrradikal selbst bei sehr tiefen Temperaturen (80 K) nicht stabil ist und innerhalb einiger hundert Mikrosekunden zerfällt, diese Zeitspanne ist jedoch groß gegen die durchschnittliche Lebensdauer der mittels transients ESR direkt detektierten Spinpolarisation der Dublettpaare. Das beobachtete Spektrum ist dabei abhängig vom Protonierungszustand des Flavins [55], so daß es prinzipiell möglich ist diesen aus dem ESR-Signal des Flavintripletts zu bestimmen.

## 2.2 *Arabidopsis thaliana* Cryptochrom-1

Die Acker-Schmalwand *Arabidopsis thaliana* ist eine Schaumkresse aus der Familie der Kreuzblütengewächse. Die im ausgewachsenen Zustand etwa 30 cm hohe Pflanze wächst in den gemäßigten Klimazonen auf der ganzen Erde und wird aufgrund ihres einfachen Genoms (nur 5 Chromosomenpaare; 125 Mio Basenpaare; kaum nicht kodierende Introns), des kurzen Generationszyklus' (8 Wochen) und der leichten Kultivierbarkeit auch auf kleinem Raum häufig als Modellorganismus für höhere Pflanzen benutzt. Im Jahr 1993 konnten Ahmad und Cashmore im Genom von *Arabidopsis* erstmalig die Existenz eines Blaulichtrezeptors in Pflanzen direkt nachweisen [6]. Das dort identifizierte und charakterisierte Protein besitzt eine Masse von rund 75 kDa und wurde mit „Cryptochrom-1“ (AtCry-1)



bezeichnet.

Wie alle Cryptochrome besitzt AtCry-1 eine den Photolyasen sehr ähnliche sogenannte PHR-Domäne<sup>7</sup> und darüber hinaus eine C-terminale Erweiterung von 181 Aminosäuren. Die Struktur der PHR-Region konnte 2004 von Brautigam *et al.* ermittelt werden [33] (siehe Abbildung 2.8), während die räumliche Anordnung des C-Terminus weiterhin unklar ist.<sup>8</sup>

### 2.2.1 Struktur der PHR-Domäne

Die PHR-Region von Cry-1 läßt sich in zwei Bereiche teilen: eine N-terminale  $\alpha/\beta$ -Domäne (Aminosäuren 13 bis 139) und eine C-terminale  $\alpha$ -helikale Domäne (Aminosäuren 217 bis 495). Diese sind mittels einer beweglichen Schleife, die sich um die  $\alpha/\beta$ -Domäne windet, verbunden. Die  $\alpha/\beta$ -Domäne wird durch fünf parallele  $\beta$ -Faltblätter, welche an den Seiten von insgesamt vier  $\alpha$ -Helizes und einer  $3_{10}$ -Helix flankiert werden, gebildet. Der Kofaktor befindet sich im Protein versteckt inmitten der helikalen Domäne, wobei der Zugang über eine durch zwei Kanten der Domäne erzeugte Kavität ermöglicht wird. Das FAD ist nicht-kovalent und in einer für diese Proteinfamilie charakteristischen U-förmigen Konformation im Protein gebunden, so daß der Isoalloxazinring und des Adenin übereinander liegen.

Die Oberfläche der PHR-Domäne ist, mit Ausnahme einiger positiver Ladungen in der Nähe der FAD-Bindungstasche, hauptsächlich negativ geladen. Gegenüber Photolyasen fehlt insbesondere die positive Oberflächenladung im Bereich der DNA-Bindungsregion.

Während Malhotra *et al.* als zweiten gebundenen Kofaktor ein MTHF beobachten konnten [8], war es in der publizierten Kristallstruktur nicht möglich diesen zu identifizieren. Allerdings ist MTHF in allen bekannten Cryptochromen und Photolyasen nur schwach gebunden und liegt relativ nah an der Oberfläche des Proteins, so daß es durch die Aufreinigungsschritte vor der Kristallisation leicht ausgewaschen worden sein kann. Da die aus Photolyasen bekannte Bindungstasche für MTHF in AtCry-1 jedoch zu großen Teilen mit den Seitenketten der umliegenden Aminosäuren gefüllt ist, ist die Art und Weise der Bindung von MTHF an das Protein unklar.

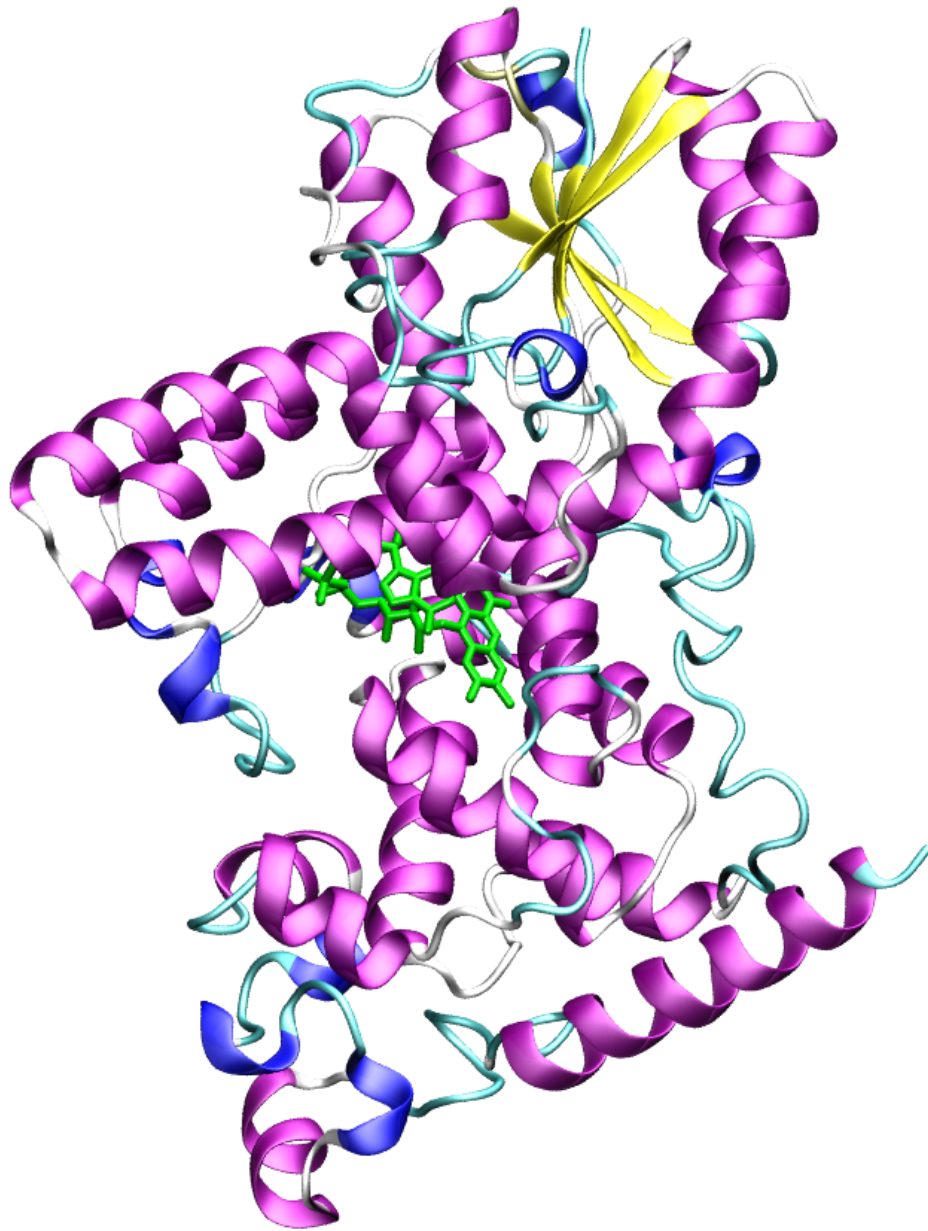
### 2.2.2 Lichtreaktion des Proteins

Das Flavin in aufgereinigtem AtCry ist üblicherweise voll oxidiert. Allerdings läßt sich der Redoxzustand durch die Zugabe von Reduktions- oder Oxidationsmitteln variieren. Die Beleuchtung des Proteins mit Licht aus dem blauen Spektralbereich führt zu einer (Photo-)Reduktion des Kofaktors. Das dabei entstehende Flavinradikal läßt sich auch in unaufgereinigter Form (also in den überexprimierenden Zellen) detektieren [58].

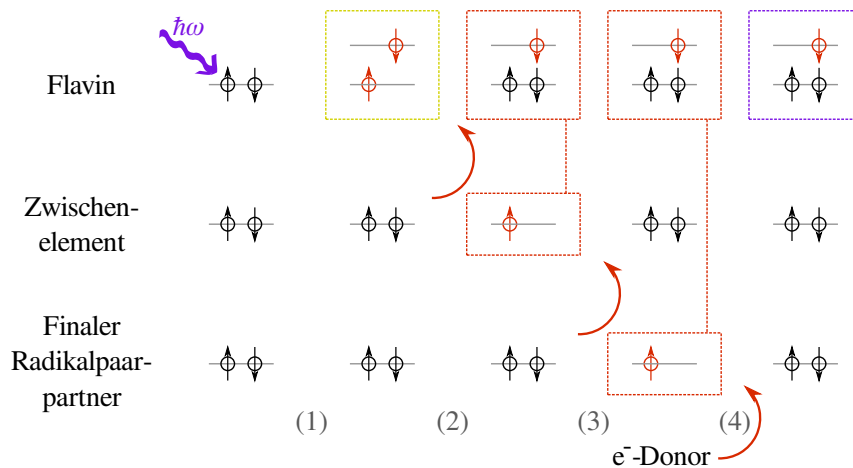
---

<sup>7</sup>Photolyase homology region

<sup>8</sup>Sancar *et al.* gehen gar von einem „intrinsisch unstrukturierten“ C-Terminus in Pflanzencryptochromen aus [56]. In diesem Fall wäre es prinzipiell unmöglich die Struktur zu bestimmen.



**Abbildung 2.8:** *Kristallstruktur der PHR-Domäne von AtCry-1 [33]. Im Zentrum ist die U-förmige Konformation des FAD-Kofaktors zu erkennen (grün). Erstellt mit VMD [57].*



**Abbildung 2.9:** Schema der Lichtreaktion. Nach Absorption eines blauen Lichtquanten wird das Flavin in den photoangeregten Zustand (gelb) überführt (1). Das angeregte Flavin oxidiert das erste Glied der Transferkette und bildet mit diesem ein transientes Dublett (rot) (2). Durch sukzessive Oxidation wandert das Radikal durch die Kette, bis ein Endzustand erreicht wird (3). Nachdem der letzte Radikalpaarpartner des Flavins aus der Lösung reduziert wird (4), bleibt ein stabiles Flavinradikal (blau) solange bestehen, bis eine Oxidation des Kofaktors erfolgt.

Sowohl in AtCry-1 als auch dem sehr ähnlichen AtCry-2 erfolgt eine Phosphorylierung der C-terminalen Domäne unter Blau- oder Rotlichtbestrahlung [59–61]. Die Bedeutung dieses Mechanismus' ist unbekannt, aber die Art und Weise der Phosphorylierung beweist eine direkte Wechselwirkung zwischen Cryptochrom-1 und Phytochrom A [59].<sup>9</sup>

Die Photoreduktion des Flavins erfolgt wahrscheinlich über die in allen bisher strukturell charakterisierten Cryptochromen/Photolyasen konservierte Tryptophankette [3,36,37,62–64]. In *Arabidopsis* Cry-1 wurden dafür die Aminosäuren Trp-400, Trp-377 und Trp-324 identifiziert (vergleiche Abbildung 2.2 auf Seite 7). Zeugner *et al.* konnten zeigen, daß eine Mutation von entweder der proximalen oder der terminalen Aminosäure dieser Kette zu redoxinertem Phenylalanin sowohl zu einer reduzierten Phosphorylierung des C-Terminus als auch zu einem Hypokotylwachstum unter Blaulichtbedingungen, welches vergleichbar zu Pflanzen ohne Cryptochromexpression ist, führt [39].

Die auf die Anregung des Flavins folgenden Vorgänge sind schematisch in Abbildung 2.9 dargestellt. Nach der Photoaktivierung des FAD findet eine sukzessive Elektronenwanderung hin zu einem finalen Radikalpaarpartner statt. Die Geschwindigkeit dieses Vorganges kann aus Experimenten an Photolyasen zu einigen zehn Pikosekunden unter Raumtemperatur abgeschätzt werden [63,65,66]. Bevor die Reduktion des finalen Kettengliedes aus der umgebenden Lösung abgeschlossen ist, besteht zwischen diesem und dem FAD-Radikal

<sup>9</sup>Phytochrom A ist ein im rot/infrarot-Bereich absorbierender Photorezeptor. Man geht davon aus, daß es sich bei der Interaktion von Phytochrom und Cryptochrom um einen Effekt handelt, mit dem sich die beiden Rezeptoren teilweise untereinander „abgleichen“.

eine Wechselwirkung, so daß für einige Millisekunden [37] ein System gekoppelter Radikalpaarpartner vorliegt. Im Anschluß an die Elektronenaufnahme aus der Proteinumgebung bricht die Wechselwirkung des Dublett-paars zusammen und das Flavinradikal bleibt bis zu seiner Oxidation stabil und detektierbar.

### 2.2.3 Wechselwirkungen und Bindungen

Aufgrund der Experimente von Yang *et al.* [18] ist bekannt, daß die C-terminalen Erweiterungen von *Arabidopsis* Cryptochrom-1 und -2 unabhängig von der Beleuchtungssituation genügen, um die typische Blaulichtantwort der behandelten Pflanzen auszulösen. Dies impliziert einen Reaktionsmechanismus, bei dem der C-Terminus für die Bindung und Aktivierung der nachfolgenden Proteine verantwortlich ist, in Abwesenheit von Licht aber von der PHR-Domäne des Cryptochroms inaktiv gehalten wird. Da die Kristallstruktur für die C-terminale Region nicht vorliegt, läßt sich über den genauen Mechanismus leider nur spekulieren. Wenn der Elektronentransfer tatsächlich über die vorgeschlagene Tryptophankette erfolgt, dann ist eine Kontaktwechselwirkung zwischen dem finalen Trp-324 und dem C-Terminus zumindest denkbar.

Während für andere Cryptochrome eine Reihe von lichtunabhängigen Bindungspartnern ermittelt werden konnte (siehe Abschnitt 2.1.2), wurden für AtCry-1 bisher noch keine wechselwirkenden Proteine einer Signalkaskade nachgewiesen. Lediglich die weiter oben angesprochene Wechselwirkung mit Phytochrom A im Zuge der Phosphorylierung in der C-terminalen Region ist bekannt.

2003 konnten Bouly *et al.* bei Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  eine stöchiometrische Bindung von ATP an AtCry-1 zeigen [67]. Aus der Kristallstruktur ist zudem bekannt, daß ATP in der Kavität, welche zum FAD führt, gebunden wird, wobei die Phosphate im Bereich der Proteinoberfläche zu liegen kommen. Eine durch die Bindung hervorgerufene Änderung in der Kristallstruktur konnte jedoch nicht beobachtet werden [33], obwohl Burney *et al.* für aufgereinigtes Protein Hinweise auf eine lichtunabhängige Konformationsänderung von Cry-1 nach der Bindung von ATP publiziert haben [68]. In der gleichen Veröffentlichung wurde zudem gezeigt, daß gebundenes ATP *in vitro* zu einer Stabilisierung des Flavinradikals führt. Dieses Ergebnis zeigt Übereinstimmung mit den Beobachtungen an *Chlamydomonas* Cryptochrom, bei dem ebenfalls eine Erhöhung der Radikallebensdauer während der Reoxidation im Rahmen der Dunkeladaptation beobachtet wurde [69].

Eine Bindung von DNA-Fragmenten an das Protein ist möglich, erfolgt aber mit niedriger Affinität und ist unabhängig von der Existenz eventueller UV-Schäden [70].

	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	$\phi$	$\theta$	$\chi$	
H(1')	8,99	8,99	11,49	8°	96°	-3°	AtCry-1 *
H(8 $\alpha$ )	6,85	7,90	9,00	120°	–	–	AtCry-1
H(5)	–	25,00	37,02	–	–	–	AtCry-1
H(6)	$A_{\text{iso}} \approx 5 \text{ MHz}$			–	–	–	AtCry-1
N(5)	$\approx 0$	$\approx 0$	51 $\pm$ 2	–	–	–	Xl(6-4)
N(10)	$\approx 0$	$\approx 0$	27 $\pm$ 2	–	–	–	Xl(6-4)

**Tabelle 2.1:** Hyperfeinkopplungen für ein neutrales Flavinradikal. Angaben in MHz. Die angegebenen Drehwinkel entsprechen den Eulerwinkeln, um das Hauptachsensystem der Hyperfeinkopplungen in das Basissystem des Isoalloxazinringes zu drehen. Die Kopplungen der mit „Xl(6-4)“ markierten Einträge wurden in [45] für *X. laevis* (6-4)-Photolyase abgeschätzt. Alle anderen Werte stammen aus [54]. Nicht explizit angegebene Fehler der Hyperfeinkopplungen betragen 0,04 MHz. Die Drehwinkel für H(1') (\*) entstammen der Simulation mit Gaussian (siehe Abschnitt 4.3.1), alle anderen Orientierungen lassen sich leicht aus der Struktur des FAD ableiten.

## 2.2.4 Zusammenstellung wichtiger ESR-Parameter

Innerhalb der vorliegenden Arbeit erfolgte eine ESR-spektroskopische Untersuchung sowohl stabiler Flavinradikale als auch transienter Flavin-Tryptophan-Radikalpaare in AtCry-1. Es ist daher hilfreich die zum Verständnis und zur Simulation dieser Spektren benötigten Eigenschaften des Proteins gesondert zusammenzufassen.

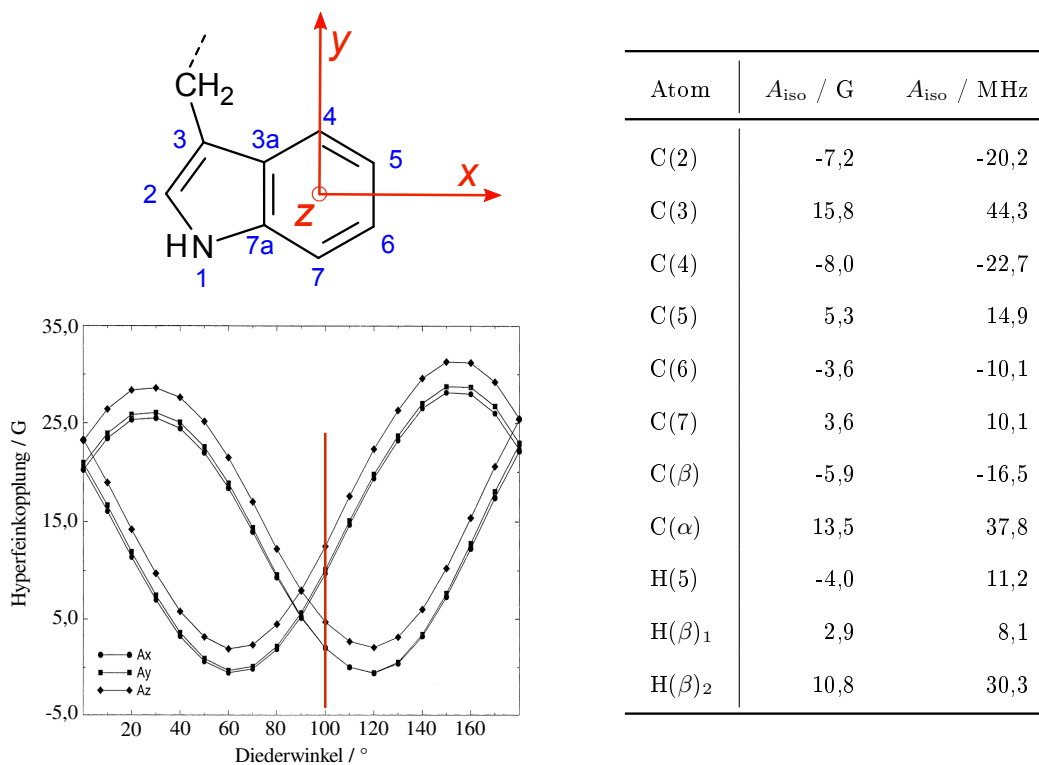
### A: Flavinneutralradikal

Wie in [54] gezeigt wurde, liegt das blaulichtaktivierte Flavin in AtCry-1 wenigstens in aufgereinigtem Zustand in seiner neutralen Radikalform vor. In Abschnitt 2.1.3 wurde bereits die Spindichteverteilung des Flavinneutralradikals sowie die Lage der Hauptachsen der  $\mathbf{g}$ -Matrix vorgestellt. Die entsprechenden Hauptwerte sowie die Größe des Drehwinkels  $\delta^{10}$  wurde bisher für mehrere proteingebundene Flavinneutralradikale bestimmt [45, 49, 50]. Im Folgenden werden die Werte

$$g_{xx} = 2,0043; \quad g_{yy} = 2,0037; \quad g_{zz} = 2,0022; \quad \delta = -29^\circ$$

benutzt. Diese wurden von Kay *et al.* an *X. laevis* (6-4)-Photolyase gemessen. Mit Ausnahme des Drehwinkels unterscheiden sich die publizierten Eigenschaften der  $\mathbf{g}$ -Matrix

<sup>10</sup>Siehe Abbildung 2.6 auf Seite 10.  $\delta$  ist der Eulerwinkel, der die Basis des Eigensystems von  $\mathbf{g}$  mittels Rotation um die  $z$ -Achse in das durch die H(5)-Hyperfeinkopplung definierte molekulare Basissystem des Isoalloxazinringes überführt.



**Abbildung 2.10:** Orientierung des  $g$ -Tensors (links oben), Abhängigkeit der  $H(\beta)$ -Kopplung vom Diederwinkel (links unten) und Zusammenfassung der isotropen Hyperfeinkopplungen (rechts) des neutralen Tryptophanradikals. Die Darstellung der Winkelabhängigkeit wurde aus [71] übernommen, rot markiert ist der Winkel niedrigster Energie. In der Tabelle wurden, mit Ausnahme der beiden  $\beta$ -Protonen, nur Kopplungen  $> 10 \text{ MHz}$  aufgeführt.

insgesamt jedoch nur wenig, so daß auch für das hier vorliegende System keine großen Abweichungen zu erwarten sind.

In Tabelle 2.1 sind die erwarteten Hyperfeinkopplungen des neutralen Flavinradikals zusammengefaßt. Aufgrund der Geometrie des Flavins liegen alle auftretenden Kopplungstensoren, mit Ausnahme der Wechselwirkung des H(1'), in der Ebene des Isoalloxazinringes, und nur die Hyperfeinwechselwirkung zu H(8 $\alpha$ ) weist eine Verdrehung gegenüber der durch die Hyperfeinachse des N(5) definierten Basis auf. Da in den folgenden Experimenten keine Unterscheidung der Vorzeichen von  $A$  möglich ist, ist es unerheblich, ob Parallelität oder Antiparallelität der Achsen des Basissystems vorliegt.

## B: Tryptophan-Radikal

Der erwartete Radikalpaarpartner des Flavins im Rahmen der transienten Untersuchungen ist ein Tryptophan aus der konservierten Kette W400/W377/W324 [3, 36, 37, 62–64]. Nach der Erzeugung des entsprechenden Radikals mittels Elektronenabgabe an das Fla-

vin entsteht dabei natürlicherweise vorerst ein positiv geladenes Kation. Allerdings erfolgt die Deprotonierung auf einer Zeitskala von 300 ns [72].<sup>11</sup> Durch diesen Prozeß wird das Tryptophanradikal stabilisiert, da nun keine Rekombination mit dem Flavin mehr möglich ist.

Für die Hauptwerte der  $\mathbf{g}$ -Matrix werden benutzt [73]:

$$g_{xx} = 2,0037 \quad g_{yy} = 2,00285 \quad g_{zz} = 2,00246$$

Die  $y$ -Achse des Basissystems liegt dabei parallel zur Verbindungslinie von C(7) nach C(4) und  $z$  weist senkrecht aus der Ringebene hinaus [74]. Eine Veranschaulichung der Geometrie im neutralen Tryptophanradikal sowie bedeutende Hyperfeinkopplungen sind in Abbildung 2.10 gezeigt. Das auftretende Hyperfeinmuster wird deutlich dominiert von den beiden Protonen an C( $\beta$ ), deren Kopplungen wiederum stark vom Diederwinkel auf der C( $\beta$ )-C(3)-Achse abhängt [71, 73].

---

<sup>11</sup>Der angegebene Wert stammt aus Untersuchungen an *E. coli* DNA-Photolyase, von den Autoren wird aber eine vergleichbare Zeit für alle photolyaseähnlichen Blaulichtrezeptoren angenommen.

# Kapitel 3

## Einführung in die ESR-Spektroskopie

Bei der Elektronsenspinresonanz (ESR) handelt es sich um eine spektroskopische Methode zur Untersuchung ungepaarter Elektronen. Seit der ersten experimentellen Beobachtung 1944 durch Zavoisky [75] führten kontinuierliche Weiterentwicklungen auf theoretischer und praktischer Seite zu einer Erweiterung des Anwendungsbereiches auf ein breites Spektrum von Systemen mit nicht verschwindendem Gesamtelektronenspin [76, 77].

Im vorliegenden Kapitel werden die Grundlagen der ESR vorgestellt, beeinflussende Parameter diskutiert und die Theorie der in dieser Arbeit benutzten Experimente herausgearbeitet.

### 3.1 Das freie Elektron im magnetischen Feld

#### 3.1.1 Der Spin eines Elektrons

Zusätzlich zum Drehimpuls, den ein Elektron aufgrund seiner Bewegung um den Kern besitzt, wurde es Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts notwendig, eine weitere drehimpulsartige Quantenzahl zu postulieren, um spektroskopische Ergebnisse, wie zum Beispiel die Feinstrukturaufspaltung der atomaren Übergangslinien, erklären zu können [78]. Diese Größe wird *Spin* genannt und ist ein reiner Quanteneffekt, welcher kein klassisches Analogon besitzt, auch wenn sie häufig als „intrinsischer Drehimpuls“ eines Elementarteilchens veranschaulicht wird.

Theoretisch folgen die Existenz und Eigenschaften des Spins aus der Lösung der Dirac-Gleichung, dem relativistischen Analogon der Hamiltongleichung für Fermionen. Für ein freies Elektronen gilt demnach:

$$i\hbar \frac{\partial \Psi}{\partial t} = (c\vec{\alpha}\vec{p} + mc^2\beta) \Psi \quad (3.1)$$

Hierbei müssen die  $\alpha_i$  und  $\beta$  einer Algebra genügen, welche in der einfachsten Repräsentation 4-komponentige Matrizen erzwingt.

Die Lösung dieser Gleichung ergibt für die Wellenfunktion  $\Psi$  ein vierkomponentiges Konstrukt, welches *nicht* den Transformationsbedingungen eines Vektors genügt. Außer



den beiden Eigenzuständen mit positiver und negativer Energie (Teilchen und Antiteilchen) ist also noch eine weitere Eigenschaft notwendig, welche zwei Eigenwerte besitzt. Im Falle freier Elektronen spricht man dabei von der *Helizität*, im Falle wechselwirkender Elektronen entsteht daraus der Spin.

Da der Helizitäts- oder Spinoperator mit dem Operator der Gesamtenergie  $\widehat{\mathcal{H}}$  kommutiert, besitzen diese beiden Operatoren gemeinsame Eigenfunktionen. Insbesondere kann die Gesamtwellenfunktion  $\Psi$  des Elektrons in das (Tensor-)Produkt einer „Ortsfunktion“  $\phi$  und einer „Spinfunktion“  $\psi$  aufgespalten werden:

$$\Psi(\vec{r}, \vec{s}) = \phi(\vec{r}) \otimes \psi(\vec{s}) \quad (3.2)$$

Innerhalb des Spinanteils der Wellenfunktion ist es möglich, einen Übergang zwischen den beiden Eigenzuständen zu vermitteln. Da  $\psi$  formal die Eigenschaften eines Drehimpulses besitzt ist bei derartigen Experimenten aber in jedem Fall die Gesamtdrehimpulserhaltung zu beachten. Desweiteren ist anzumerken, daß die Existenz eines Spins nicht nur für Elektronen relevant ist, sondern im Allgemeinen alle Elementarteilchen betrifft, auch wenn diese Quantenzahl in speziellen Fällen Null sein kann.<sup>1</sup>

### 3.1.2 Grundprinzip der ESR

Sofern ein Teilchen mit nicht verschwindendem Spin eine elektrische Ladung ungleich Null besitzt, wird gemäß den Regeln der Quantenelektrodynamik ein magnetisches Moment  $\mu$  erzeugt.<sup>2</sup> Für ein freies Elektron gilt:

$$\mu_e = -g_e \beta m_s \quad (3.3)$$

Hierbei ist  $\beta = \frac{e\hbar}{2m_e}$  das *Bohr'sche Magneton*,  $m_s$  der Erwartungswert von  $\widehat{S}_z$  und  $g_e$  der sogenannte *g-Faktor* des freien Elektrons, welcher  $-2,00231930436146(56)$  beträgt [79].

Befindet sich das Elektron in einem externen magnetischen Feld  $B_0$ , so führt die Wechselwirkung von  $\mu_e$  mit  $B_0$  zu einer Aufhebung der energetischen Entartung zwischen den Zuständen mit  $m_s = +1/2$  und  $m_s = -1/2$ . Dieser Effekt konnte erstmals 1922 in dem berühmten Versuch von Stern und Gerlach [80] gezeigt werden und ergibt einen energetischen Unterschied von:

$$\Delta E = E_{(m_s=+\frac{1}{2})} - E_{(m_s=-\frac{1}{2})} = g_e \beta B_0 \quad (3.4)$$

<sup>1</sup>Es gibt, mit Ausnahme des hypothetischen Higgs-Bosons, keine punktförmigen, massebehafteten Spin-0-Teilchen. Allerdings können gekoppelte Teilchen einen effektiven Spin von Null besitzen, was bei Atomkernen oder Mesonen häufig auftritt.

<sup>2</sup>Dies ist auch dann der Fall, wenn das Teilchen selbst zwar keine Ladung und/oder keinen Spin besitzt, aber aus Untereinheiten besteht, für welche die Bedingung erfüllt ist. So kann beispielsweise auch für ein Neutron mit  $q = 0$  ein magnetisches Moment  $\mu_n = -0,96623641(23) \cdot 10^{-26} J/T$  gemessen werden, welches dadurch entsteht, daß die Konstituenden (drei Quarks: udd) ihrerseits sowohl einen Spin als auch eine Ladung aufweisen.

Da ein Übergang zwischen diesen Zuständen der Auswahlregel  $\Delta m_s = \pm 1$  genügen muß, kann er durch Photonen ( $S = 1$ ) geeigneter Energie induziert werden. Die Resonanzbedingung dafür lautet:

$$\Delta E = g_e \beta B_0 = h\nu = \hbar\omega \quad (3.5)$$

Die hier angegebene Formel gilt nur für *freie* Elektronen. Sobald zusätzliche Einflüsse auftreten, verschiebt sich  $g_e$  und weitere Terme zur Beschreibung der Wechselwirkung müssen hinzugefügt werden (siehe Abschnitt 3.2). In ESR-Experimenten wird diese Tatsache benutzt, um aus dem äußeren Magnetfeld, welches zur Resonanz der elektronischen Übergänge mit den eingestrahlten Photonen einer bekannten Energie notwendig ist, Rückschlüsse auf die Umgebung des spektroskopierten Elektrons zu ziehen. Die benutzten Frequenzen liegen dabei häufig im Bereich von (1 ... 360) GHz, die dafür nötigen Magnetfelder also zwischen (0,03 ... 14) T.

## 3.2 Spinhamiltonoperator, g-Matrix und relevante Wechselwirkungen

Die elektronischen Eigenschaften in Molekülen lassen sich vollständig im Rahmen der Quantenelektromechanik beschreiben. Um eine einfachere Behandlung des Problems zu ermöglichen, erweist es sich als hilfreich, alle orts- oder bewegungsabhängigen Terme des Hamiltonoperators zu entfernen, so daß ein allein *spinabhängiger* Hamiltonian entsteht. Da der spinabhängige Anteil der in Gleichung 3.2 dargestellten Wellenfunktion des Elektrons seinerseits unabhängig von dem ortsabhängigen Anteil ist, genügt es zur quantenmechanischen Beschreibung von ESR-Experimenten demnach die Spinwellenfunktion  $\psi$  in Kombination mit dem derart konstruierten *Spinhamiltonoperator* zu betrachten. Dabei ist allerdings zu beachten, daß die elektromagnetischen Wechselwirkungen des Elektrons bekanntermaßen *nicht* ortsunabhängig sind. Die Arbeit mit einem rein spinabhängigen Hamiltonoperator vereinfacht die Berechnung erheblich, erzwingt damit aber gleichzeitig die Einführung phänomenologischer Konstanten ( $\mathbf{g}$ ,  $\mathbf{A}$ , ...), um die realen Einflüsse korrekt zu beschreiben.

Die Aufgabe besteht nun darin, alle möglichen Energiezustände des Elektrons im äußeren magnetischen Feld zu bestimmen, um daraus die experimentell zu beobachtenden induzierten Übergänge zu berechnen. Im einfachen Fall zeitlich stabiler Radikale ist dafür die zeitunabhängige (Spin-)Hamiltonfunktion

$$\hat{\mathcal{H}} |\psi\rangle = E |\psi\rangle \quad (3.6)$$

zu lösen. Dabei gilt für den Hamiltonoperator der Wechselwirkung eines freien Elektrons mit einem konstant anliegenden äußeren Magnetfeld (die sogenannte *Elektron-Zeeman-*

Wechselwirkung):

$$\hat{\mathcal{H}} = \beta \vec{B} \mathbf{g} \hat{\vec{S}} \quad (3.7)$$

Hier bezeichnet  $\hat{\vec{S}} = (\hat{S}_x, \hat{S}_y, \hat{S}_z)$  den Spinoperator und  $\mathbf{g}$  die sogenannte ***g**-Matrix des Elektrons*<sup>3</sup>.

Der Bahndrehimpuls des Elektrons führt ebenso wie sein Spin zu einem magnetischen Moment ( $\mu_L = -\frac{e}{2m}\hat{L}$ ), welches die Energieeigenwerte des Spinhamiltonoperators beeinflusst. Nur wenn das innere elektrische Feld des Atoms, Ions oder Radikals die Kopplung zwischen  $S$  und  $L$  vollständig aufhebt<sup>4</sup> oder sich das Bahnmoment zu null ausmittelt, weil das Orbital mit zwei Elektronen besetzt ist, sind die magnetischen Eigenschaften eines freien Elektrons beobachtbar. Häufig aber existiert ein nichtverschwindendes Bahndrehmoment, so daß die Einflüsse der Spin-Bahn-Kopplung sichtbar werden. Diese Effekte sind in den Abweichungen der **g**-Matrix vom  $g$ -Wert des freien Elektrons  $g_e$  absorbiert.

### 3.2.1 Orientierungsabhängigkeit von **g**

Da die **g**-Matrix Einflüsse auf die magnetischen Eigenschaften des Elektrons beinhaltet, welche durch den Bahndrehimpuls der Orbitale verursacht werden, ist sie nicht nur empfindlich auf eventuell vorhandene Wechselwirkungen mit anderen Atomen (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen), sondern wird auch von der räumlichen Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Orbitals, welches das ungepaarte Elektron trägt, beeinflusst. Die Energieeigenwerte des Spinhamiltonoperators sind somit im Allgemeinen orientierungsabhängig. Da **g** in den reellen Zahlen diagonalisierbar ist,<sup>5</sup> läßt sich eine Koordinatentransformation  $K$  finden, mit der  $K^{-1}\mathbf{g}K$  diagonal und damit durch seine drei Hauptwerte eindeutig bestimmt ist. Im Allgemeinen ist das entsprechende *Eigensystem von **g*** jedoch nicht mit dem molekularen Basissystem oder dem Laborsystem identisch. Daher werden zur vollständigen Beschreibung neben den Eigenwerten  $g_{xx}$ ,  $g_{yy}$  und  $g_{zz}$  noch die drei Eulerwinkel  $\psi$ ,  $\theta$ ,  $\phi$  benötigt, um die Orientierung der **g**-Eigenbasis im Raum festzulegen.

Wenn das externe Magnetfeld  $\vec{B}_0$  in einer festen Richtung angelegt wird, läßt sich der effektive  $g$ -Wert berechnen aus:

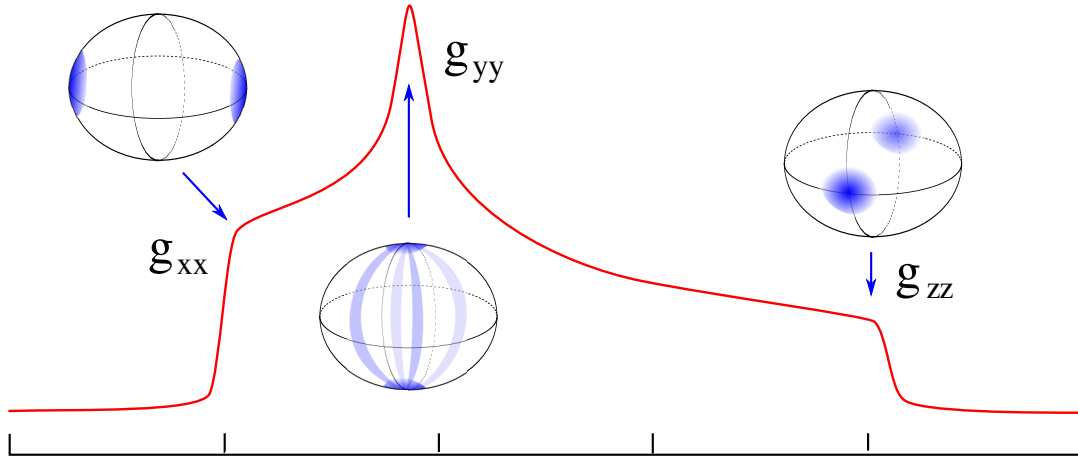
$$g_{\text{eff}} = \sqrt{\vec{e}_B \mathbf{g} \mathbf{g}^T \vec{e}_B} \quad (3.8)$$

wobei  $\vec{e}_B$  der Einheitsvektor in Richtung von  $\vec{B}_0$  ist.

<sup>3</sup>Bei **g** handelt es sich um eine  $3 \times 3$ -Matrix. Obwohl diese formal nicht die Transformationsbedingungen eines Tensors zweiter Stufe erfüllt, wird in der Literatur häufig die Bezeichnung ***g**-Tensor* benutzt; mathematisch korrekt ist erst  $\mathbf{g}^T \mathbf{g}$  ein Tensor.

<sup>4</sup>Man spricht von *orbitaler Unterdrückung*, englisch „*orbital quenching*“.

<sup>5</sup>Die **g**-Matrix vermittelt Energieeigenwerte. Aufgrund der Energieerhaltung muß **g** demnach unitär sein, da der Übergang aus einem Zustand A in einen Zustand B sonst eine andere Energie benötigt, als für den umgekehrten Übergang  $B \rightarrow A$  frei wird. Jede Unitäre Matrix ist diagonalisierbar.



**Abbildung 3.1:** ESR-Spektrum für eine anisotrope  $\mathbf{g}$ -Matrix. Je nach anliegendem Magnetfeld befinden sich andere Subpopulationen der vermessenen Probe in Resonanz. Abhängig von der Orientierung der  $\mathbf{g}$ -Matrix liegen unterschiedliche effektive  $g$ -Werte vor, die herausragenden Fülle sind dabei  $g_{\text{eff}} = g_{xx}$ ,  $g_{yy}$  oder  $g_{zz}$ . Es ist zu beachten, daß (in Abwesenheit von zusätzlichen Kopplungen)  $g_{xx}$  und  $g_{zz}$  isoliert werden können, während an der Feldposition für  $g_{yy}$  immer auch andere Orientierungen Beiträge liefern.

Die Eigenwerte des Hamiltonoperators  $\hat{\mathcal{H}}$  in Gleichung 3.7 lassen sich in der Basis des Operators  $\hat{S}_z$  leicht ermitteln:

$$E_+ = +\frac{1}{2}g_{\text{eff}}\beta B_0 \quad \text{bzw.} \quad E_- = -\frac{1}{2}g_{\text{eff}}\beta B_0 \quad (3.9)$$

Für den Fall, daß die  $\mathbf{g}$ -Eigenwerte zusammenfallen, spricht man von einer *isotropen*  $\mathbf{g}$ -Matrix für  $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$  beziehungsweise von einer *achsialen* Matrix, wenn dies nur für zwei der drei Werte zutrifft. In letzterem Fall wird das Eigensystem per Konvention derart gewählt, daß  $g_{xx} = g_{yy} \neq g_{zz}$  gilt.

In gefrorenen Lösungen oder Pulvern liegt normalerweise eine zufällige Verteilung aller möglichen Orientierungen des untersuchten Moleküls, und damit auch der  $\mathbf{g}$ -Matrix, vor. Die gemessenen Spektren entstehen demnach als Superposition aller effektiven  $g$ -Werte, wobei die beobachteten Übergänge mit ihrer Phasenraumdichte gewichtet sind (vergleiche Abbildung 3.1). Im Falle der schnellen Bewegung des Radikals werden sich die Beiträge der Nebendiagonalelemente ausmitteln, wodurch einzig der isotrope  $g$ -Wert

$$g_{\text{iso}} = \frac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad (3.10)$$

einen Beitrag liefert.<sup>6</sup> Dies ist bei Flüssigkeiten im Bereich der Raumtemperatur häufig der Fall.

<sup>6</sup>„Schnell“ ist hierbei bezüglich der ESR-Zeitskala zu sehen. Die Rotationskorrelationszeit der Bewegung sollte kleiner als der Kehrwert der (magnetfeldabhängigen) Präzessionsfrequenz des Elektrons sein.

### 3.2.2 Spin-Spin-Kopplung zwischen mehreren Elektronen

Für eine vollständige Beschreibung des realen Elektrons im magnetischen Feld ist es notwendig, außer dem bisher diskutierten Elektron-Zeemann-Hamiltonoperator noch weitere Einflüsse zu betrachten. Insbesondere die Wechselwirkung mit zusätzlichen magnetischen Momenten dritter Teilchen und quantenmechanische Austauschsterme sind geeignet die Energieeigenwerte zu verschieben. In einem ersten Schritt ist dabei zu untersuchen, inwieweit die Existenz eines anderen als des detektierten Elektrons das System beeinflusst. Im Allgemeinen sind dabei zwei Wechselwirkungen zu betrachten: Die (anisotrope) *dipolare Wechselwirkung* zwischen den magnetischen Momenten der Elektronen und die rein quantenmechanische (isotrope) *Austauschwechselwirkung* zwischen ihnen.

Bei der Kopplung zweier Elektronen mit den jeweiligen Spinquantenzahlen  $m_{s,i} = \pm 1/2$  können gemäß  $|m_{s,1}\rangle \otimes |m_{s,2}\rangle = |m_{s,1}m_{s,2}\rangle$  insgesamt vier verschiedene Zustände gebildet werden (der Faktor  $1/2$  wird im Folgenden weggelassen):

$$|++\rangle \quad |+-\rangle \quad |-+\rangle \quad |--\rangle \quad (3.11)$$

Sofern zwischen den einzelnen Spins keinerlei Kopplung vorliegt, handelt es sich dabei gleichzeitig um die Eigenfunktionen des Systems. Im Falle gekoppelter Elektronen ist es notwendig, daß die Eigenzustände der Gesamtspinwellenfunktion entweder symmetrisch oder total antisymmetrisch sind. Aus den in Gleichung 3.11 vorgestellten Vektoren läßt sich unter dieser Maßgabe mittels Linearkombination eine neue Basis konstruieren:

$$\begin{aligned} |T_+\rangle &= |++\rangle \\ |T_0\rangle &= \frac{1}{\sqrt{2}}[|+-\rangle + |-+\rangle] \\ |T_-\rangle &= |--\rangle \\ |S\rangle &= \frac{1}{\sqrt{2}}[|+-\rangle - |-+\rangle] \end{aligned} \quad (3.12)$$

Die drei Zustände mit einem Gesamtspin von  $+1$  bilden das unter Vertauschung der Teilchen symmetrische Triplett  $T_{(+,0,-)}$ ; der Zustand mit dem Gesamtspin 0 entsprechend das antisymmetrische Singulett  $S$ .

#### Dipolare Wechselwirkung

Die dipolare Kopplung zweier Elektronen entsteht aus der klassischen Dipol-Dipol-Wechselwirkung der beiden magnetischen Momente und führt selbst im Falle der Abwesenheit eines externen magnetischen Feldes zur Aufhebung der Entartung der Eigenzustände des Triplettsystems. Ausgehend von der klassischen Elektrodynamik läßt sich der dipolare

Anteil der Hamiltonfunktion für zwei magnetische Momente im Abstand  $\vec{r}$  schreiben als:

$$\hat{\mathcal{H}}_{\text{Dip}} = \mu_0\pi \left( \frac{\hat{\vec{\mu}}_1^T \hat{\vec{\mu}}_2}{r^3} - \frac{3(\hat{\vec{\mu}}_1^T \vec{r})(\hat{\vec{\mu}}_2^T \vec{r})}{r^5} \right) \quad (3.13)$$

Wenn als Ursprung der magnetischen Momente Elektronen mit  $\hat{\vec{\mu}}_i = -\beta \mathbf{g}_i \hat{\vec{S}}_i$  angenommen werden, dann vereinfacht sich der Hamiltonoperator zu:

$$\hat{\mathcal{H}}_{\text{Dip}} = \frac{2}{g_1 g_2} \hat{\vec{S}}_1^T \mathbf{g}_1^T \mathbf{D} \mathbf{g}_2 \hat{\vec{S}}_2 \quad (3.14)$$

Hierbei sind  $g_1$  und  $g_2$  die nach Gleichung 3.8 definierten effektiven  $g$ -Werte, und alle auftretenden Anisotropien wurden in dem Tensor  $\mathbf{D}$  zusammengefaßt.

Wenn die Anisotropie der  $\mathbf{g}$ -Matrizen vernachlässigbar klein ist, was für organische Radikale häufig zutrifft, vereinfacht sich dies wegen  $\mathbf{g}_i/g_i \approx \mathbf{1}$  weiter zu:

$$\hat{\mathcal{H}}_{\text{Dip}} = 2\hat{\vec{S}}_1^T \mathbf{D} \hat{\vec{S}}_2 = \hat{\vec{S}}^T \mathbf{D} \hat{\vec{S}} \quad (3.15)$$

Dabei wurde im letzten Schritt noch der Operator des Gesamtspins des gekoppelten Zweielektronensystems  $\hat{\vec{S}} = \hat{\vec{S}}_1 + \hat{\vec{S}}_2$  eingeführt.

Der dipolare Tensor  $\mathbf{D}$  läßt sich in seinem Eigensystem mittels seiner Diagonalelemente  $D_{xx}$ ,  $D_{yy}$ ,  $D_{zz}$  vollständig beschreiben. Da  $\mathbf{D}$  zudem *spurfrei* ist ( $\text{Tr}\{\mathbf{D}\} = 0$ ), gibt es nur zwei linear unabhängige, so genannte *Nullfeldparameter*. Diese sind üblicherweise definiert als:

$$D := \frac{3}{2}D_{zz} \quad E := \frac{1}{2}(D_{xx} - D_{yy}) \quad (3.16)$$

Für große Abstände über 10 Å kann die Punktdipolnäherung durchgeführt werden, so daß  $E$  verschwindet und sich  $\mathbf{D}$  auf einen axialen Tensor reduziert [28], welcher gemäß Gleichung 3.13 direkt vom Abstand der beiden Spins abhängt:

$$\mathbf{D} = \begin{pmatrix} -\frac{1}{3}D & 0 & 0 \\ 0 & -\frac{1}{3}D & 0 \\ 0 & 0 & \frac{2}{3}D \end{pmatrix} \quad \text{mit} \quad D = -\frac{3g_e\beta\mu_0}{8\pi} \frac{1}{r^3} \quad \text{für} \quad g_1 = g_2 = g_e \quad (3.17)$$

Wenn die Richtung des externen Magnetfeldes mit  $\vec{e}_B$  bezeichnet wird, beträgt die eigentlich beobachtete dipolare Kopplung:

$$d = \vec{e}_B^T \mathbf{D} \vec{e}_B = \frac{1}{3}D (\cos^2 \theta - 1) \quad (3.18)$$

Hierbei ist  $\theta$  der Winkel zwischen der Richtung der dipolaren Kopplung (also  $D_{zz}$ ) und dem magnetischen Feld  $\vec{B}_0$ . Der Hamiltonoperator läßt sich damit schreiben als:

$$\hat{\mathcal{H}}_{\text{Dip}} = \frac{3}{2}d \left( \hat{S}_z^2 - \frac{1}{3}\hat{S}^2 \right) \quad (3.19)$$

## Austauschwechselwirkung

Bei der Austauschwechselwirkung  $J$  handelt es sich um eine Energieabsenkung des Zustandes zweier wechselwirkender Fermionen aufgrund der Forderung nach einer total antisymmetrischen Gesamtwellenfunktion. Die Gesamtwellenfunktion zweier Elektronen läßt sich als Produkt eines Orts- und eines Spinanteils darstellen:

$$\Psi(e_1, e_2) = \phi(r_1, r_2) \cdot \psi(S_1, S_2) \quad (3.20)$$

Wenn die beiden Spins parallel im Magnetfeld ausgerichtet sind, ist  $\psi(S_1, S_2) = \psi(S_2, S_1)$  und die Ortswellenfunktion muß antisymmetrisch gegen die Vertauschung der Elektronen sein:  $\phi(r_1, r_2) = -\phi(r_2, r_1)$ . Analoges gilt mit umgekehrtem Vorzeichen für antiparallele Spins.

Im Falle gleichartig geladener Teilchen wirkt zwischen diesen eine Coulombabstoßung, so daß die Energie des Zustandes mit symmetrischer Ortswellenfunktion aufgrund des geringeren Abstandes der Punkte mit hoher Aufenthaltswahrscheinlichkeit erhöht wird. Entsprechend sinkt die Energie des Zustandes mit symmetrischer Spinwellenfunktion, also parallel ausgerichteten Spins. Im Falle zweier Elektronen gilt:

$$\hat{\mathcal{H}}_{\text{Ex}} = -2J\hat{S}_1\hat{S}_2 \quad (3.21)$$

Die Austauschwechselwirkung führt also zu einer Anhebung oder Absenkung des Energieniveaus eines gekoppelten Mehrelektronensystems in Abhängigkeit von der Orientierung der Spins im Magnetfeld und dem Überlapp ihrer Wellenfunktionen.  $J$  ist damit stark abstandsabhängig und kann innerhalb von Proteinen durch einem exponentiell abfallenden Ansatz

$$J(r) = J_0 \cdot e^{-\beta r} \quad \text{mit} \quad \beta = (14 \pm 2) \text{ nm}^{-1} \quad (3.22)$$

angenähert werden [81, 82].

### 3.2.3 Hyperfeinwechselwirkung zwischen Elektron und Atomkern

Da auch Atomkerne im Allgemeinen ein nicht verschwindendes magnetisches Moment besitzen, kann eine Kopplung zu einem untersuchten, ungepaarten Elektron bestehen, welche dessen Energieeigenwerte verschiebt. Prinzipiell läßt sich die Hyperfeinwechselwirkung  $A$  zwischen Elektron und Kern ähnlich wie die Wechselwirkung zweier Elektronen betrachten. Auch hier kann der dipolare Kopplungstensor in einen isotropen Teil  $A_{\text{iso}}$  (Fermi-Kontaktwechselwirkung) und einen anisotropen Anteil  $\mathbf{A}'$  aufgespalten werden:

$$\hat{\mathcal{H}}_{\text{HF}} = \hat{\mathbf{S}}\mathbf{A}'\hat{\mathbf{I}} = \hat{\mathbf{S}}\mathbf{A}'\hat{\mathbf{I}} + A_{\text{iso}}\hat{\mathbf{S}}\hat{\mathbf{I}} \quad (3.23)$$

Dabei bezeichnet  $\hat{\mathbf{S}}$  den Spinoperator des Elektrons und  $\hat{\mathbf{I}}$  den entsprechenden Operator des Atomkerns. Der anisotrope Anteil  $\mathbf{A}'$  ist wiederum abhängig vom Abstand der beiden

Spins, während die isotrope Kopplung  $A_{\text{iso}}$  direkt proportional zur Aufenthaltswahrscheinlichkeit  $|\phi(r_I)|^2$  des Elektrons am Ort des Kerns ist:

$$A_{\text{iso}} = \frac{2}{3} \mu_0 \beta_N \beta g_N g |\phi(r_I)|^2 \quad (3.24)$$

Die Kenntnis des Kopplungstensors der Hyperfeinwechselwirkung für mehrere Kerne ermöglicht es demnach, die Spindichte an verschiedenen Punkten des Moleküls zu bestimmen. Damit läßt sich die Wellenfunktion des Elektrons orts aufgelöst rekonstruieren, was seinerseits strukturelle Informationen über das untersuchte Molekül liefert.

Die Kopplung eines Elektrons an ein einzelnes Proton mit  $I = \frac{1}{2}$  führt aufgrund der genannten Hyperfeinwechselwirkung zu einer Aufspaltung des elektronischen Energieniveaus in zwei Unterzustände, abhängig davon, ob der Spin des Protons parallel oder antiparallel zu demjenigen des Elektrons im äußeren Magnetfeld liegt. Eine größere Anzahl äquivalent koppelnder Kerne resultiert dann in einer weiteren Aufspaltung in insgesamt  $2nI + 1$  Linien, deren Intensitäten binomialverteilt sind ( $n$  ist die Anzahl der Kerne mit äquivalenter Hyperfeinkopplung). In biologischen Makromolekülen liegt gewöhnlich eine Kopplung an viele verschiedene Kerne mit unterschiedlichen Hyperfeinwechselwirkungen vor. Die Anzahl der erwarteten Linien, in die ein einzelner elektronischer Übergang aufspaltet, berechnet sich dann zu:

$$n_{\text{HF}} = \prod_{i=1}^m (2n_i I_i + 1) \quad (3.25)$$

Hierbei ist  $m$  die Anzahl der Kernpopulationen, welche jeweils  $n$  äquivalent koppelnde Kerne umfassen.

Die große Anzahl an unterschiedlichen Hyperfeinkopplungen führt, zusammen mit der anisotropen dipolaren Wechselwirkung, dazu, daß die Hyperfeinkopplung im ESR-Spektrum häufig stark verschmiert. Deshalb wird oft lediglich eine nicht aufgelöste gaussförmige Linienverbreiterung des Signals festgestellt.

Bei der Untersuchung von Proteinen kann die Hyperfeinaufspaltung nur in Ausnahmefällen direkt im ESR-Spektrum beobachtet werden. Daher ist es im Allgemeinen nicht trivial die Hyperfeinkopplungswerte aus dem gemessenen Spektrum zu errechnen. Allerdings ist es durch Elektron-Kern-Doppelresonanzexperimente (ENDOR: „electron nuclear double resonance“) möglich die Spektren soweit zu vereinfachen, daß  $m$  nichtäquivalent koppelnde Kernpopulationen nur noch  $2m$  Signale liefern. Mit dieser Methode können die Hyperfeinwechselwirkungen zumindest für die dominanten Kopplungen bestimmt werden (siehe Abschnitt 3.8.1 auf Seite 45).



### 3.2.4 Zusammenfassung

Aus den Ergebnissen der letzten Abschnitte läßt sich der zeitunabhängige Spinhamiltonoperator des Elektrons zusammenfassen als:

$$\hat{\mathcal{H}} = \hat{\mathcal{H}}_{\text{EZ}} + \hat{\mathcal{H}}_{\text{Dip}} + \hat{\mathcal{H}}_{\text{Ex}} + \hat{\mathcal{H}}_{\text{HF}} \quad (3.26)$$

wobei

$$\begin{aligned} \hat{\mathcal{H}}_{\text{EZ}} &= \beta \vec{B} g \hat{S} && \dots \text{ Elektron-Zeeman-Wechselwirkung} \\ \hat{\mathcal{H}}_{\text{Dip}} &= \frac{3}{2} d \left( \hat{S}_z^2 - \frac{1}{3} \hat{S}^2 \right) && \dots \text{ dipolare Elektron-Elektron-Wechselwirkung} \\ \hat{\mathcal{H}}_{\text{Ex}} &= -2J \hat{S}_1 \hat{S}_2 && \dots \text{ Austauschwechselwirkung} \\ \hat{\mathcal{H}}_{\text{HF}} &= \hat{S} A \hat{I} && \dots \text{ Hyperfeinkopplung} \end{aligned} \quad (3.27)$$

Im allgemeinen Fall existieren weitere Terme höherer Ordnung (z.B. Kopplungen über das Kernquadrupolmoment). Diese wurden nicht betrachtet, weil sie aufgrund ihrer geringen Größe für die vorliegende Arbeit keine Relevanz besitzen.

Die Eigenwerte dieses Hamiltonoperators liefern die möglichen Energiezustände des Elektrons, ein tatsächliches Signal wird jedoch nur detektiert, wenn sich Absorption und induzierte Emission beim Einstrahlen resonanter Mikrowelle nicht gegenseitig aufheben. Dies ist der Fall, sobald ein Besetzungszahlunterschied zwischen den durch diesen Übergang verknüpften Energieniveaus besteht. Im thermischen Gleichgewicht wird die Population verschiedener Energiezustände durch eine Boltzmannverteilung (Formel 3.29) beschrieben. Das beobachtete Signal ist direkt proportional zu diesem Besetzungszahlverhältnis und damit stark temperaturabhängig.

## 3.3 Relaxation

Das thermische Gleichgewicht der Besetzung verschiedener Energiezustände wird bei der Absorption von Mikrowelle zwischenzeitlich gestört, beginnt aber wieder sich einzustellen, sobald alle auftretenden Störungen abgeklungen sind. Die Rückkehr des gestörten Systems in den Zustand des themischen Gleichgewichtes wird durch die *Spinrelaxation* beschrieben. Allgemein werden dabei zwei Effekte mit üblicherweise unterschiedlichen Zeitkonstanten betrachtet. Die *Spin-Gitter-Relaxation* oder *Longitudinale Relaxation* mit der Zeitkonstante  $T_1$  und die *Spin-Spin-Relaxation* oder *Transversale Relaxation* mit  $T_2$ .

Unter der Spin-Gitter-Relaxation versteht man die Rückkehr der Besetzung der Energieniveaus in diejenige des thermischen Gleichgewichtes. Die Ursache dafür liegt in schwachen Wechselwirkungen zwischen dem Spinsystem und seiner Umgebung. Typische Werte der

longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$  für organische Radikale liegen in der Größenordnung von einigen Mikrosekunden bei 80 K, sind aber naturgemäß sehr stark temperaturabhängig.

Die Spin-Spin-Relaxation dagegen hat ihre Ursache in statistischen Schwankungen und Wechselwirkungen der angeregten Spins untereinander. Der stochastischen Natur des Prozesses folgend strebt das System somit einen Zustand höchster Entropie an: Während alle angeregten Elektronen direkt nach der Mikrowellenabsorption phasenkohärent präzessieren, wird diese Kohärenz mit der Zeit zerstört. Für organische Radikale ist die transversale Relaxation  $T_2$  üblicherweise mindestens eine Größenordnung kleiner als  $T_1$ .

Durch die Existenz relaxierender Effekte ist die Lebensdauer des angeregten Zustandes begrenzt. Da Energie und Zeit über die Fouriertransformation verknüpft sind, führt dies zu einer homogenen Lorenz-Verbreiterung des beobachteten Signals mit der Halbwertsbreite  $\Delta\nu_L$  um das Signalzentrum  $\nu_0$ :

$$f(\nu) = \frac{1}{\pi\Delta\nu_L} \cdot \frac{\Delta\nu_L^2}{\Delta\nu_L^2 + (\nu - \nu_0)^2} \quad (3.28)$$

Dies ist, neben der inhomogenen Linienverbreiterungen durch Ungleichmäßigkeiten des magnetischen Feldes und nicht aufgelöste Hyperfeinwechselwirkungen (siehe oben), ein weiterer Effekt, welcher die beobachtete Linienform verwischt.

## 3.4 Theoretische Beschreibung

### 3.4.1 Das Vektorbild

Viele Beobachtungen und Experimente in der Elektronenspinresonanz lassen sich mit Hilfe des klassischen Magnetisierungsvektorbildes verstehen, selbst wenn für eine korrekte quantenmechanische Beschreibung der Dichteoperatorformalismus notwendig ist. Das Vektorbild ist dabei insbesondere für die Beschreibung einzelner ungekoppelter Spins geeignet, während bei gekoppelten Systemen immer auch Effekte auftreten, welche sich so nicht darstellen lassen.<sup>7</sup>

In einem Ensemble von Elektronen findet eine Superposition aller magnetischen Momente der einzelnen Elektronen statt ( $\vec{\mu} = \sum \vec{\mu}_i$ ). Für  $T = 0\text{ K}$  befinden sich all die vorhandenen Teilchen in den niedrigst-energetischen, quantenmechanisch erlaubten Zuständen, in Anwesenheit eines externen magnetischen Feldes  $\vec{B}_0$  also antiparallel zu diesem. Die einzelnen magnetischen Momente bilden dann eine makroskopische Gesamtmagnetisierung

---

<sup>7</sup>Dies wird bereits bei der Betrachtung der Variablen in der korrespondierenden Dichtematrix deutlich. Während die Dichtematrix eines einzelnen Elektrons vier Einträge und eine Randbedingung besitzt (= 3 unabhängige Variablen), so daß ein Vektor im dreidimensionalen Raum zur Darstellung genügt, weist die Dichtematrix eines Zweispinsystems bereits bis zu 15 unabhängige Größen aus, welche nicht alle durch zwei Vektoren repräsentiert werden können.

$\vec{M} = \vec{e}_{B_0} \cdot \sum |\vec{\mu}|$ . Für  $T > 0$  K erfolgt die Besetzung höherenergetischer Zustände im thermischen Gleichgewicht gemäß der Boltzmannverteilung. Wenn die beiden Niveaus  $|+\rangle$  und  $|-\rangle$  aufgrund ihrer Wechselwirkung mit  $B_0$  eine Energiedifferenz von  $\Delta E$  besitzen, so folgt für die Aufteilung von  $N$  Elektronen auf diese Zustände:

$$\frac{N_+}{N_-} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) \quad \text{mit} \quad N = N_+ + N_- \quad (3.29)$$

Die resultierende Nettomagnetisierung reduziert sich dann, weil sich die magnetischen Momente entgegengesetzt ausgerichteter Spins aufheben. Für  $N$  Elektronen mit jeweils  $\mu_e$  gilt also:

$$\vec{M} = \vec{e}_{B_0} \cdot \mu_e (N_+ - N_-) \quad (3.30)$$

Solange Relaxationseffekte vernachlässigt werden, kann die Bewegung von  $\vec{M}$  wie diejenige eines klassischen magnetischen Momentes betrachtet werden. Dafür wird das Laborsystem derart definiert, daß  $\vec{z}$  parallel zum äußeren Magnetfeld  $\vec{B}_0$  liegt.

In Gegenwart eines beliebigen magnetischen Feldes  $\vec{B}$  läßt sich die Wechselwirkung von  $\vec{M}$  beschreiben mit:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \times \frac{-g_e\beta_e}{\hbar} \vec{B} \quad (3.31)$$

Für das anliegende Magnetfeld  $\vec{B}_0 = B_0 \cdot \vec{e}_z$  ergibt sich daraus eine Drehung von  $\vec{M}$  um  $z$ , sofern  $\vec{M}$  eine zu  $z$  senkrechte Komponente besitzt. Diese Rotation eines magnetischen Moments um ein anliegendes Magnetfeld wird *Präzession* genannt. Die Winkelgeschwindigkeit der Bewegung heißt *Larmorfrequenz*:

$$\vec{\omega}_L = \frac{g_e\beta_e}{\hbar} \vec{B} \quad (3.32)$$

Zu bemerken ist hierbei, daß sich mehrere wirkende Magnetfelder ungestört überlagern, weshalb die Präzession von Richtung und Stärke des effektiven (aus vektorieller Addition entstandenen) Magnetfeldes  $\vec{B}_{\text{eff}}$  abhängt.

Alle in dieser Arbeit benutzten ESR-Experimente wurden immer in der Anwesenheit des konstanten äußeren Magnetfeldes  $\vec{B}_0$ , welches groß gegen sämtliche inneren Wechselwirkungen des Systems ist, durchgeführt. Daher ist es zur weiteren Beschreibung sinnvoll, ein mit  $\omega_0 := \omega_L(B_0)$  um  $\vec{e}_z$  rotierendes Koordinatensystem  $\mathcal{R}$  einzuführen:

$$\begin{aligned} \vec{x}_{\mathcal{R}} &= \cos(\omega_0 t) \vec{e}_x + \sin(\omega_0 t) \vec{e}_y \\ \vec{y}_{\mathcal{R}} &= -\sin(\omega_0 t) \vec{e}_x + \cos(\omega_0 t) \vec{e}_y \\ \vec{z}_{\mathcal{R}} &= \vec{e}_z \end{aligned} \quad (3.33)$$

In diesem System ruht die makroskopische Magnetisierung  $\vec{M}$ , selbst wenn sie eine nicht verschwindende  $x$ - und/oder  $y$ -Komponente besitzt. Es wirkt kein Magnetfeld und damit keine Kraft auf  $\vec{M}$ , da der Einfluß von  $\vec{B}_0$  bereits in die Bewegung des Koordinatensystems absorbiert wurde.

Die während der Messung in das System eingebrachte Mikrowellenstrahlung ist üblicherweise linear polarisiert, und zwar derart, daß das mit ihr verknüpfte Magnetfeld  $\vec{B}_1$  in der  $x/y$ -Ebene des Laborsystems (und damit auch des soeben definierten Systems  $\mathcal{R}$ ) liegt. Die lineare Polarisation läßt sich als Superposition einer linkszirkular und einer rechtszirkular polarisierten Teilwelle betrachten.  $\vec{B}_1$  dreht sich dann mit der Kreisfrequenz  $\omega_1$  der Mikrowelle in der  $x/y$ -Ebene. Dabei ist die Richtung der Drehung für den linkszirkular polarisierten Anteil identisch mit der Larmorfrequenz  $\omega_0$  des präzedierenden Magnetisierungsvektors im Laborsystem, bzw. mit der Drehrichtung von  $\mathcal{R}$ . Wenn  $\omega_0 = \omega_1$  gilt, so erscheint in dem bisher feldfreien  $\mathcal{R}$  ein konstantes Magnetfeld  $\vec{B}_{1,\mathcal{R}}$ , welches ohne Beschränkung der Allgemeinheit in Richtung  $\vec{x}_{\mathcal{R}}$  zeigt.<sup>8</sup>

Gemäß Gleichung 3.31 beginnt  $\vec{M}$  nun in  $\mathcal{R}$  mit der Winkelgeschwindigkeit  $\omega_{B1}$  um  $\vec{B}_{1,\mathcal{R}}$  zu präzedieren. Dadurch verläßt  $\vec{M}$  die Kolinearität mit  $\vec{e}_z = \vec{z}_{\mathcal{R}}$  und bewegt sich auf der  $y/z$ -Ebene in Richtung  $\vec{y}_{\mathcal{R}}$ . Nach einer Zeit  $t$  gilt für  $\vec{M}$  in  $\mathcal{R}$ :

$$\vec{M}_{\mathcal{R}} = \begin{pmatrix} 0 \\ \sin(\omega_{B1}t) \\ \cos(\omega_{B1}t) \end{pmatrix} \quad (3.34)$$

Wenn die Mikrowelleneinstrahlung beendet wird, wodurch  $B_{1,\mathcal{R}}$  verschwindet, so behält  $\vec{M}$  seine dann bestehende Orientierung in  $\mathcal{R}$  bei, solange die Zeit kurz genug ist um Relaxationsprozesse zu vernachlässigen.

Für lange Zeiten läßt sich die Magnetisierung durch die Bloch-Gleichungen beschreiben. Diese lauten :

$$\frac{d\vec{M}_{\mathcal{R}}}{dt} = \begin{pmatrix} -\Omega M_y - \frac{M_x}{T_2} \\ \Omega M_x - \omega_1 M_z - \frac{M_y}{T_2} \\ \omega_1 M_y - \frac{M_z - M_0}{T_1} \end{pmatrix} \quad (3.35)$$

Hierbei ist  $M_0$  die Magnetisierung in  $z$ -Richtung im thermischen Gleichgewicht und  $T_1$  bzw.  $T_2$  beschreiben als charakteristische Systemkonstanten die longitudinale und transversale Relaxation. Das *Resonanzoffset*  $\Omega = \omega_1 - \omega_{\text{MW}}$  ist der Unterschied zwischen Resonanzfrequenz und Mikrowellenfrequenz. Wenn die Resonanzbedingung nicht exakt gegeben ist (also  $\Omega \neq 0$ ), so ist die Orientierung von  $\vec{B}_1$  in  $\mathcal{R}$  nicht vollkommen konstant, sondern dreht sich langsam um die Quantisierungsachse. Dies führt zu den zusätzlichen Komponenten in den Bloch-Gleichungen, welche einen Magnetisierungstransfer von  $M_x$  nach  $M_y$  und umgekehrt beschreiben.

<sup>8</sup>Die Bedingung des in  $\mathcal{R}$  statischen Magnetfeldes  $\vec{B}_1$  ist wegen  $\omega_1 \equiv \omega_L = \frac{g_e \beta_e}{\hbar} \vec{B}$  gleichbedeutend mit der in Gleichung 3.5 angegebenen Resonanzbedingung. Für den rechtszirkular polarisierten Anteil gilt ebenso wie für Mikrowellen mit abweichenden Frequenzen, daß die in  $\mathcal{R}$  beobachtete Feldorientierung mit der Zeit variiert und sich der daraus resultierende Einfluß auf  $\vec{M}$  zu Null herausmittelt.

Tatsächlich detektiert wird in einem ESR-Experiment die transversale Magnetisierung (also  $\vec{M}_x$  und/oder  $\vec{M}_y$ ). Entsprechend der gezeigten Überlegungen läßt sich der Einfluß verschiedener Mikrowellenpulse unterschiedlicher Stärke und Länge auf  $\vec{M}$  veranschaulichen und leicht nachvollziehen (siehe Abschnitt 3.7.1 auf Seite 42).

### 3.4.2 Der Dichteoperatorformalismus

Die meisten der in dieser Arbeit vorgestellten Erläuterungen werden sich des Magnetisierungsvektorbildes bedienen, der Vollständigkeit halber soll im Folgenden aber kurz die Idee des Dichteoperatorformalismus' eingeführt werden, welcher benötigt wird, wenn eine korrekte quantenmechanische Beschreibung des Spinsystems unumgänglich ist.<sup>9</sup>

Eine beliebige Spinwellenfunktion  $|\psi\rangle$  läßt sich immer in eine orthonormale Basis entwickeln, indem die Projektion der Wellenfunktion auf die einzelnen Basisvektoren  $|i\rangle$  als Koeffizienten benutzt wird:

$$|\psi\rangle = \sum_i |i\rangle \langle i|\psi\rangle = \sum_i c_i |\psi\rangle \quad (3.36)$$

Da  $|\psi\rangle$  sich im Laufe der Zeit verändert, sind die Koeffizienten zeitabhängig.<sup>10</sup> Der Erwartungswert eines Operators, beispielsweise  $\hat{S}_x$ , berechnet sich damit als:

$$\begin{aligned} \langle \hat{S}_x \rangle &= \langle \psi | \hat{S}_x | \psi \rangle \\ &= \sum_{i,j} \langle \psi | i \rangle \langle i | \hat{S}_x | j \rangle \langle j | \psi \rangle \\ &= \sum_{i,j} c_i^* c_j \langle i | \hat{S}_x | j \rangle \end{aligned} \quad (3.37)$$

Hierbei ist festzustellen, daß die Erwartungswerte  $\langle i | \hat{S}_x | i \rangle$  sowohl zeitlich, als auch für verschiedene behandelte Systeme, gleich bleiben. Sämtliche relevanten Informationen zum Zustand des Spinsystems befinden sich demnach in den Koeffizienten  $c_i^* c_j$ , welche ihrerseits als Elemente einer Matrix  $\hat{\rho}$  mit  $\hat{\rho}_{ij} = \langle i | \hat{\rho} | j \rangle = c_i^* c_j$  aufgefaßt werden können. Für den Erwartungswert des Operators ergibt sich dann:

$$\langle \hat{S}_x \rangle = \sum_{i,j} \langle j | \hat{\rho} | i \rangle \langle i | \hat{S}_x | j \rangle = \text{Tr} \left( \hat{\rho} \hat{S}_x \right) \quad (3.38)$$

$\hat{\rho}$  wird *Dichtematrix* genannt. Die zeitliche Entwicklung eines Systems kann nun allein durch die Zeitentwicklung der zugehörigen Dichtematrix durchgeführt werden. Dafür ergibt

<sup>9</sup>Beispielsweise zur Herleitung der „Null-Quanten-Kohärenz“-Oszillation in spinkorrelierten Radikalpaaren.

<sup>10</sup>Dies entspricht dem sogenannten *Schrödinger-Bild*. Es ist alternativ auch möglich die Wellenfunktionen konstant zu halten und alle Zeitentwicklung in den Operatoren zu absorbieren (*Heisenberg-Bild*), oder eine Mischung beider Ansätze.

sich aus der Lösung der zeitabhängigen Schrödingergleichung die Liouville-von-Neumann-Gleichung:

$$\frac{\partial \hat{\rho}}{\partial t} = -\frac{i}{\hbar} [\hat{\mathcal{H}}_0, \hat{\rho}] \quad (3.39)$$

Für zeitunabhängige Hamiltonfunktionen kann nun  $\hat{\rho}(t)$  durch Integration gewonnen werden:

$$\hat{\rho}(t) = e^{-i\hat{\mathcal{H}}_0 t} \hat{\rho}(0) e^{i\hat{\mathcal{H}}_0 t} \quad (3.40)$$

Wenn alle auf das System wirkenden Einflüsse (z.B. Mikrowellenstrahlung) bekannt sind, so läßt sich der wirkende Hamiltonoperator  $\hat{\mathcal{H}}_0$  angeben und die Evolution der Dichtematrix berechnen. Das detektierte Signal entspricht der Projektion der Polarisation auf die  $x$ - oder  $y$ -Achse.

## 3.5 Theorie der spinkorrelierten Radikalpaare

Im Folgenden wird vermittelt, mit welchem Mechanismus die Erzeugung von detektierbarer Polarisation im Falle eines Systems zweier gekoppelter Radikale, eines sogenannten *Radikalpaars* oder *Dublettpaars*, beschrieben werden kann. Von einem spingekoppelten oder spinkorrelierten Radikalpaar wird gesprochen, wenn zwischen zwei beobachteten Elektronen eine nicht verschwindende Kopplung besteht, diese aber andererseits klein genug ist um als Störung behandelt werden zu können. Radikalpaare können beispielsweise entstehen, wenn die Konstituenten eines Biradikals räumlich getrennt werden, wodurch sich die Wechselwirkungen zwischen ihnen entsprechend reduzieren. Der Anfangszustand des derart erzeugten Dublettpaars ist aufgrund der Drehimpulserhaltung durch die Spinkonfiguration des Vorläufermoleküls entweder auf den Triplett- oder den Singulettzustand festgelegt.

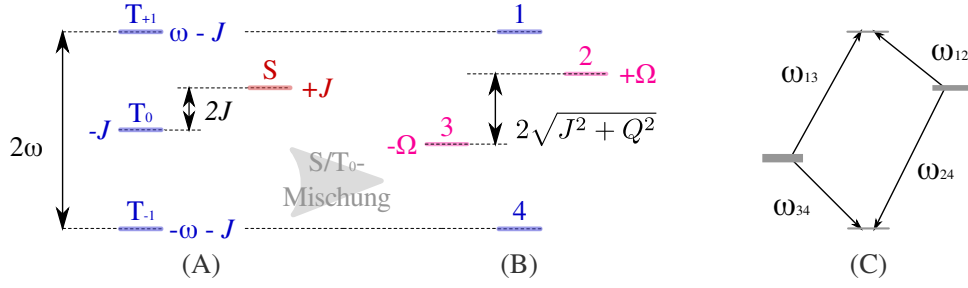
Die folgende Darstellung folgt im Wesentlichen der in [83] vorgestellten Argumentation.

### 3.5.1 Eigenwerte und Eigenvektoren

Es werden zwei Radikale  $A$  und  $B$  mit einer zwischen ihnen wirkenden Austauschwechselwirkung und dipolarer Wechselwirkung betrachtet. Da typische Radikalpaare nur kurze Lebensdauern besitzen, werden sämtliche Relaxationsprozesse vernachlässigt. Der Hamiltonoperator des Systems ist dann gegeben durch:

$$\begin{aligned} \hat{\mathcal{H}} &= \hat{\mathcal{H}}_{\text{EZ},A} + \hat{\mathcal{H}}_{\text{EZ},B} + \hat{\mathcal{H}}_{\text{Ex},AB} + \hat{\mathcal{H}}_{\text{Dip},AB} \\ &= \omega_A \hat{S}_{A,z} + \omega_B \hat{S}_{B,z} - J \left( \hat{S}^2 - 1 \right) + \frac{3}{2} d \left( \hat{S}_z^2 - \frac{1}{3} \hat{S}^2 \right) \end{aligned} \quad (3.41)$$

Dabei sind  $\hat{S}_i$  die Spinoperatoren der einzelnen Elektronen und  $\hat{S} = \hat{S}_A + \hat{S}_B$  der Spinoperator des Gesamtsystems.  $J$  und  $d$  bezeichnen die in Abschnitt 3.2.2 vorgestellten Parameter



**Abbildung 3.2:** Energie der Zustände eines gekoppelten Dublett-paars in der Singulett/Triplett-Basis (A) und nach Beachtung der  $S/T_0$ -Mischung (B). Außerdem sind die erlaubten ESR-Übergänge bei einer Erzeugung des Systems im reinen Singulettzustand dargestellt (C). Zur Definition von  $\omega$  und  $\Omega$  siehe die Erläuterungen im Text.

der Austauschwechselwirkung bzw. der dipolaren Kopplung und  $\omega_A$  sowie  $\omega_B$  sind die ESR-Frequenzen der ungestörten Radikale und beinhalten damit sowohl die Zeemanwechselwirkung, als auch eventuelle Hyperfeinanteile:

$$\begin{aligned}\omega_1 &= g_1\beta B_0 + \sum_i A_{i,1}m_i \\ \omega_2 &= g_2\beta B_0 + \sum_j A_{j,2}m_j\end{aligned}\quad (3.42)$$

Analog zu dem Vorgehen in Abschnitt 3.2.2 kann nun mit  $|T_+\rangle$ ,  $|S\rangle$ ,  $|T_0\rangle$  und  $|T_-\rangle$  die Basis des Produktraumes definiert werden. Die Repräsentation des Hamiltonoperators in dieser Basis ist dann:

$$\hat{\mathcal{H}} = \begin{pmatrix} \omega - J + \frac{1}{2}d & 0 & 0 & 0 \\ 0 & J & Q & 0 \\ 0 & Q & -J - d & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -\omega - J + \frac{1}{2}d \end{pmatrix} \quad \text{mit} \quad \begin{aligned} \omega &= \frac{1}{2}(\omega_A + \omega_B) \\ Q &= \frac{1}{2}(\omega_A - \omega_B) \end{aligned} \quad (3.43)$$

Durch Diagonalisierung von  $\hat{\mathcal{H}}$  lassen sich die Eigenvektoren  $|i\rangle$  und Energieeigenwerte  $\omega_i$  des Systems bestimmen:

$$\begin{aligned}|1\rangle &= |T_+\rangle & \omega_1 &= \omega - J + \frac{1}{2}d \\ |2\rangle &= \cos\psi |S\rangle + \sin\psi |T_0\rangle & \omega_2 &= \Omega - \frac{1}{2}d \\ |3\rangle &= -\sin\psi |S\rangle + \cos\psi |T_0\rangle & \omega_3 &= -\Omega - \frac{1}{2}d \\ |4\rangle &= |T_-\rangle & \omega_4 &= -\omega - J + \frac{1}{2}d\end{aligned}\quad (3.44)$$

Hier ist insbesondere zu beachten, daß durch die Wechselwirkung der Kerne miteinander eine Singulett-Triplett-Mischung stattfindet. Der entsprechenden Mischungswinkel  $\psi$  läßt

sich über  $\tan \psi = \frac{2Q}{(2J+d)}$  definieren. Daher kann  $\Omega = (J + \frac{1}{2}d)^2$  auch als Singulett-Triplett-Mischungsfrequenz interpretiert werden.

Direkt nach der Erzeugung eines Dublett-paars liegt dieses, abhängig vom Spinzustand des Vorläufermoleküls, entweder vollständig in der Singulett- oder vollständig in der Triplettkonfiguration vor, da dies die Eigenzustände des stark gekoppelten Biradikals sind. Damit entsteht für die Energieniveaus  $\omega_{1...4}$  initial eine Populationsverteilung, welche *nicht* der thermischen Boltzmannverteilung entspricht. Für den Fall, daß ein Dublett-paar im Singulettzustand erzeugt wird, sind beispielsweise ausschließlich die beiden „mittleren“ Energieniveaus 2 und 3 besetzt.

### 3.5.2 Übergangsfrequenzen und Signalstärken

Da alle der in Formel 3.44 angegebenen Eigenzustände des Radikalpaars zumindest teilweise Triplettcharakter aufweisen, ist es möglich zwischen ihnen mittels Mikrowelleneinstrahlung Übergänge zu induzieren. Aufgrund der durch die Drehimpulserhaltung geforderten Auswahlregeln ( $\Delta S = \pm 1$ ) sind dabei prinzipiell die folgenden Paarungen möglich:

$$\omega_1 \leftrightarrow \omega_2 \quad \omega_1 \leftrightarrow \omega_3 \quad \omega_2 \leftrightarrow \omega_4 \quad \omega_3 \leftrightarrow \omega_4 \quad (3.45)$$

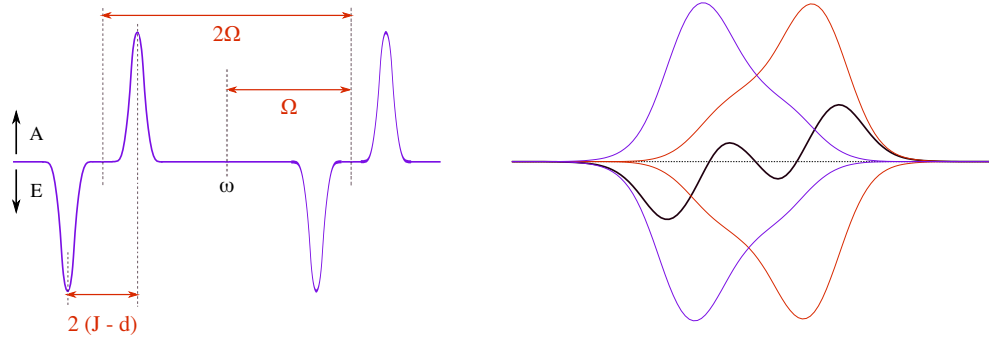
Welches Spektrum tatsächlich experimentell beobachtet werden kann, hängt entscheidend von der Art der ESR-Anregung und Detektion ab. Im Folgenden wird davon ausgegangen, daß die Intensität  $I_{ij}$  einer gemessenen Übergangsfrequenz zwischen zwei Zuständen  $i$  und  $j$  proportional zu der entsprechenden Übergangswahrscheinlichkeit *und* der Besetzungszahldifferenz der Zustände ist:

$$I_{ij} \sim (n_j - n_i) \langle i | \hat{\mathcal{H}}_1 | j \rangle^2 \quad (3.46)$$

Der Operator  $\hat{\mathcal{H}}_1$  beinhaltet das magnetische Feld der übergangsinduzierenden Mikrowellenstrahlung, welche ohne Beschränkung der Allgemeinheit in  $x$ -Richtung des rotierenden Koordinatensystems polarisiert sei. Dann gilt für den wirksamen Teil des Hamiltonoperators  $\hat{\mathcal{H}}_1 = g\beta B_1 \hat{S}_x$ , wobei  $B_1$  die Feldstärke des magnetischen Anteils der Mikrowellenstrahlung und  $\hat{S}_x$  die  $x$ -Komponente des Gesamtspinoperators bezeichnet. Da  $\hat{S}_x$  nur Übergänge zwischen Triplettzuständen erzeugt ( $S(\text{Singulett}) = 0$ ), ist die Übergangswahrscheinlichkeit proportional zum Anteil des Triplettcharakters in den beteiligten Zuständen:

$$\begin{aligned} \langle 1 | \hat{\mathcal{H}}_1 | 2 \rangle^2 &\sim \langle 1 | \hat{S}_x | 2 \rangle^2 \sim \sin^2 \psi \\ \langle 1 | \hat{\mathcal{H}}_1 | 3 \rangle^2 &\sim \langle 1 | \hat{S}_x | 3 \rangle^2 \sim \cos^2 \psi \\ \langle 2 | \hat{\mathcal{H}}_1 | 4 \rangle^2 &\sim \langle 2 | \hat{S}_x | 4 \rangle^2 \sim \sin^2 \psi \\ \langle 4 | \hat{\mathcal{H}}_1 | 4 \rangle^2 &\sim \langle 3 | \hat{S}_x | 4 \rangle^2 \sim \cos^2 \psi \end{aligned} \quad (3.47)$$





**Abbildung 3.3:** *Linienpektrum eines spinkorrelierten Dublettpears ohne Hyperfeinwechselwirkung und g-Anisotropie (links), sowie Simulation eines Spektrums mit einem FADH<sup>•</sup> und Trp<sup>•</sup> als Radikalpaarpartner unter Berücksichtigung der Anisotropie und Hyperfeinkopplungen (rechts). Im rechten Bild sind die Anteile der einzelnen Übergänge farblich eingezeichnet, während das durch Summation entstehende, experimentell zugängliche Spektrum in schwarz dargestellt ist. A: Absorption; E: Emission*

Direkt nach der Erzeugung eines Dublettpears im Singulettzustand läßt sich die Besetzung  $n_i$  der Energieniveaus  $\omega_1$  leicht angeben:

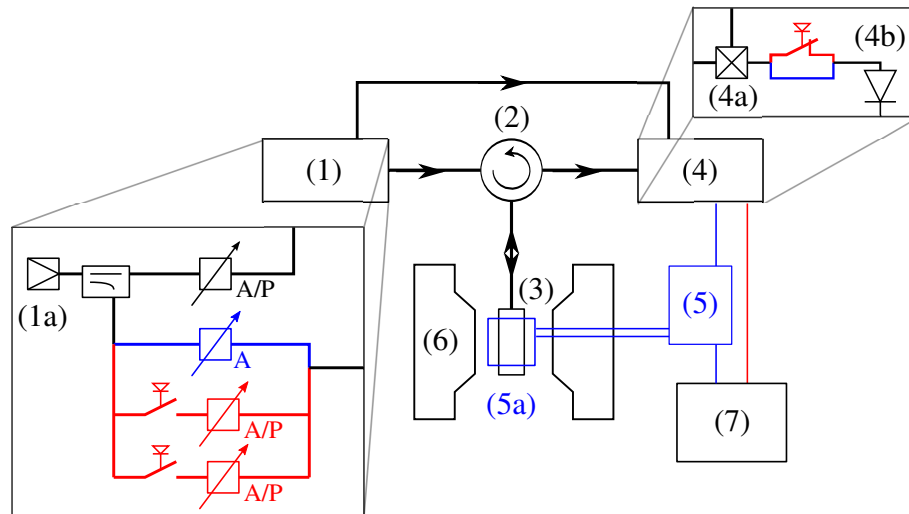
$$n_1 = 0 \quad n_2 = \cos^2 \psi \quad n_3 = \sin^2 \psi \quad n_4 = 0 \quad (3.48)$$

Für  $t = 0$  können die erwarteten ESR-Übergänge und ihre Intensitäten also zusammengefaßt werden zu:

$$\begin{aligned}
 \omega_1 \rightarrow \omega_2 : \quad \omega_{12} &= \omega - \Omega - J + d & I_{12} &= \cos^2 \psi \sin^2 \psi = 1 \\
 \omega_1 \rightarrow \omega_3 : \quad \omega_{13} &= \omega + \Omega - J + d & I_{13} &= \sin^2 \psi \cos^2 \psi = 1 \\
 \omega_2 \rightarrow \omega_4 : \quad \omega_{24} &= \omega + \Omega + J - d & I_{24} &= -\cos^2 \psi \sin^2 \psi = -1 \\
 \omega_3 \rightarrow \omega_4 : \quad \omega_{34} &= \omega - \Omega + J - d & I_{34} &= -\sin^2 \psi \cos^2 \psi = -1
 \end{aligned} \quad (3.49)$$

Leicht ist zu sehen, daß zwei jeweils gegeneinander um  $2(J - d)$  verschobene Signaldubletts mit umgekehrter Phase entstehen. Dabei führen die Übergänge (12) und (13) zur verstärkten Absorption von Mikrowelle, während auf den Übergängen (24) und (34) eine Emission stattfindet (Abbildung 3.3 links).

In realen Systemen werden die Hyperfeinwechselwirkung und eventuell vorhandene g-Anisotropien dazu führen, daß jeder der vier möglichen Übergänge seinerseits ein breiteres und oftmals strukturiertes Spektrum bildet. Die Superposition all dieser Anteile erzeugt dann, abhängig von den konkreten Werten für  $\omega_1$ ,  $\omega_2$ ,  $J$  und  $d$ , im Allgemeinen komplexe Spektren, aus denen die einfließenden Parameter nicht unmittelbar ermittelt werden können (Abbildung 3.3 rechts).



**Abbildung 3.4:** Schematische Darstellung des Aufbaus eines ESR-Spektrometers. schwarz/blau ... cw-Spektrometer; schwarz/rot ... Pulsspektrometer. Dargestellt sind die Mikrowellenbrücke (1) mit Mikrowellenquelle (1a) und mehreren Abschwächern bzw. Phasenschiebern (A/P), der Zirkulator (2), der Resonator (3), die Detektoreinheit (4) mit Mischer (4a) und Mikrowellendiode (4b), der Magnet (6) und der nur in cw-ESR-Experimenten benutzte Lock-In-Verstärker (5) mit Modulationsspulen (5a). Die Verarbeitung der Signale erfolgt mit Hilfe eines PC (7). Zur näheren Erläuterung siehe Abschnitt 3.6.1 und 3.7.

## 3.6 Das cw-ESR-Experiment

ESR-Experimente lassen sich anhand der Mikrowelleneinstrahlung grob in zwei Gruppen unterteilen: Diejenigen mit konstant anliegender Mikrowellenstrahlung und solche, bei denen die Mikrowelle in Pulsen auf die Probe einwirkt. Der experimentell einfachere dieser beiden Ansätze ist das sogenannte *cw-Experiment*<sup>11</sup>, bei dem während der gesamten Messung eine konstante Mikrowellenleistung auf die Probe eingestrahlt wird. Das erste derartige Experiment wurde 1944 von Zavoiski an Kupfersulfat durchgeführt [75].

### 3.6.1 Aufbau des Spektrometers

In Abbildung 3.4 ist der Aufbau eines typischen *cw*-Spektrometers dargestellt. Die Probe befindet sich in einer speziell auf die benutzte Wellenlänge angepassten Kavität, dem *Resonator*. Dieser hat mehrere Aufgaben.

- Seine Geometrie ist resonant zur Mikrowelle gewählt (oder kann entsprechend abgestimmt werden), um das Feld am Probenort zu maximieren.
- Das Maximum des Magnetfeldes soll sich im Zentrum, wo die Probe eingeführt wird,

<sup>11</sup> *cw* für englisch: „continuous wave“.

ausbilden. Zudem soll das elektrische Feld am Probenort verschwinden, damit in der Probe vorhandene elektrische Dipole (insbesondere Wassermoleküle) keine Energie aus dieser Komponente der Mikrowelle absorbieren und damit das eigentlich gewünschte ESR-Signal überdecken.

- Da die gemessenen Signale im Allgemeinen klein gegen die benutzte Mikrowellenleistung sind, wird der Resonator *gekoppelt*. Dabei erfolgt eine Impedanzanpassung an das restliche Mikrowellensystem (beispielsweise mittels einer variablen Blende), so daß der Resonator, sofern keine ESR-Resonanz vorliegt, wie ein schwarzer Körper absorbiert, also keinerlei Mikrowelle zurückreflektiert wird. Wird das Magnetfeld anschließend in den Bereich einer Resonanz gefahren, beginnt die Probe zu absorbieren und die Impedanz des Systems verschiebt sich. Dies führt zu einer der Absorption im Resonator proportionalen Rückreflektion von Mikrowelle an der Schnittfläche zwischen Resonator und zuführendem Mikrowellenleiter.

Dadurch ist es möglich kleine Signale zu vermessen und selbst in flüssiger Lösung, wenn biologische Systeme einen erheblichen Anteil beweglicher Wassermoleküle besitzen, zu arbeiten.

Der Resonator ist über einen Mikrowellenleiter mit der Mikrowellenbrücke verbunden. In dieser wird die Mikrowellenstrahlung erzeugt, auf die gewünschte Leistung gedämpft und anschließend über einen Zirkulator in den Resonator geleitet. Der Zirkulator trennt dabei Wellen nach ihrer Laufrichtung, wodurch das rücklaufende Signal von der hinlaufenden Welle isoliert und zum Detektorsystem weitergeleitet werden kann. Als Detektor fungiert im einfachsten Fall eine Mikrowellendiode. Diese muß durch einen phasengepaßten Referenzstrahl (über den Referenzarm der Mikrowellenbrücke) auf ihren linearen Arbeitspunkt vorgespannt werden, damit das einlaufende Mikrowellensignal linear in elektrischen Strom umgesetzt werden kann.

Das zum Aufheben der  $m_s = \pm \frac{1}{2}$ -Entartung notwendige Magnetfeld wird durch einen (Elektro-) Magneten erzeugt. Dabei ist zu beachten, daß am Ort der Probe ein möglichst homogenes Feld herrscht, da Feldunterschiede zu Signalverbreiterungen führen. Aufgrund der im Vergleich zu NMR relativ großen natürlichen Linienbreiten ist der dafür notwendige Aufwand jedoch überschaubar.<sup>12</sup>

Abgesehen von der zu Steuerung und Betrieb von Magnet und Mikrowellenbrücke benötigten Stromversorgung und Steuerelektronik wird häufig noch ein *Trägerfrequenzverstärker*<sup>13</sup> benutzt, um Rauscheffekte zu verringern. Dabei erzeugt ein zusätzlicher Elektromagnet ein weiteres, harmonisch oszillierendes Magnetfeld (häufig  $\nu = 100$  kHz) am Probenort. Die Amplitude dieses Feldes muß kleiner als die erwartete Signalbreite gewählt werden und

---

<sup>12</sup>Ein sorgsames Ausrichten der Polschuhe ist notwendig, das Benutzen zusätzlicher Shimspulen jedoch meist nicht, da es genügt die durch Feldinhomogenitäten verursachten Linienverbreiterungen auf etwa eine Größenordnung kleiner als die natürliche Linienbreite zu reduzieren.

<sup>13</sup>Englisch: „lock-in amplifier“

liegt entsprechend häufig im Bereich einiger weniger 0,1 mT. Das von der Mikrowellendiode gelieferte Signal wird nun über einen Bandpaß derart gefiltert, daß nur Signale mit gleicher Frequenz und Phase wie das oszillierende Magnetfeld transmittiert werden. Auf diese Weise ist es möglich das tatsächliche ESR-Signal von statistischen Schwankungen im Diodenausgangsstrom zu trennen und das erreichbare Signal-Rausch-Verhältnis erheblich zu verbessern.

Als Nebeneffekt dieser Methode wird in der *cw*-ESR nicht das Absorptionssignal, sondern seine erste Ableitung detektiert.

### 3.6.2 Theorie

Da die Mikrowelle im *cw*-Experiment kontinuierlich eingestrahlt und das Magnetfeld im Allgemeinen sehr viel langsamer als die charakteristischen Relaxationszeiten  $T_1$  und  $T_2$  verändert wird, ist es zulässig das System im stationären Fall zu betrachten. Die Ableitung von  $\vec{M}_{\mathcal{R}}$  verschwindet somit und die Bloch-Gleichungen (Gleichung 3.35 auf Seite 32) vereinfachen sich zu einem normalen linearen Gleichungssystem:

$$\begin{aligned} 0 &= -\Omega M_y - \frac{M_x}{T_2} \\ 0 &= \Omega M_x - \omega_1 M_z - \frac{M_y}{T_2} \\ 0 &= \omega_1 M_y - \frac{M_z - M_0}{T_1} \end{aligned} \quad (3.50)$$

Die Lösung lautet:

$$\begin{aligned} M_x &= M_0 \omega_1 \frac{\Omega T_2^2}{1 + \Omega^2 T_2^2 + \omega_1^2 T_1 T_2} \\ M_y &= -M_0 \omega_1 \frac{T_2}{1 + \Omega^2 T_2^2 + \omega_1^2 T_1 T_2} \\ M_z &= M_0 \frac{1 + \Omega^2 T_2^2}{1 + \Omega^2 T_2^2 + \omega_1^2 T_1 T_2} \end{aligned} \quad (3.51)$$

Das von der Mikrowellendiode detektierte Signal  $I$  ist proportional zum Betrag der Magnetisierung in der  $x/y$ -Ebene. Für den Fall resonanter Einstrahlung ( $\Omega = 0$ ) folgt demnach:

$$I \sim M_y = -M_0 \omega_1 \frac{T_2}{1 + \omega_1^2 T_1 T_2} \quad (3.52)$$

Da  $\omega_1$  proportional zu  $B_1$  und damit zur eingestrahnten Mikrowellenleistung ist, muß ein *Sättigungspunkt* existieren, bei dem das gemessene Signal als Funktion der Leistung maximal ist. Das Maximum von  $I$  ergibt sich für  $\omega_1 = \sqrt{\frac{1}{T_1 T_2}}$ . Eine weitere Erhöhung von  $B_1$  über diesen Punkt hinaus führt zudem zu einer Veränderung der beobachteten Linienform, wie eine genauere Analyse der Gleichungen 3.51 zeigt (siehe dazu zum Beispiel [84]).

Gleichung 3.52 verdeutlicht weiterhin die direkte Proportionalität von gemessener Signalstärke und  $M_0$ , welches wegen Gleichung 3.30 für konstante  $T$  linear abhängig von der Anzahl der am Experiment beteiligten Spins ist.

### 3.7 Pulsfolgen und induziertes Echo

Mit Hilfe kurzer, starker Mikrowellenpulse ist es möglich die magnetischen Momente der untersuchten Elektronen sehr definiert zu beeinflussen. Dadurch kann das System derart präpariert werden, daß auch solche Parameter des Spinhamiltonoperators herausgearbeitet werden können, welche mit *cw*-Methoden nicht isolierbar sind. Die Grundidee hierbei ist, die Magnetisierung, welche im thermischen Gleichgewicht longitudinaler Polarisation entspricht, durch Mikrowelleneinstrahlung um definierte Winkel, insbesondere um  $180^\circ$  ( $\vec{M} \rightarrow -\vec{M}$ ) oder  $90^\circ$  ( $M_z \rightarrow M_x/M_y$ ), zu drehen. Ähnlich wie in der Kernspinresonanz (NMR) können damit spezifische Spinzustände präpariert, modifiziert und detektiert werden, allerdings eingeschränkt durch ein sehr viel engeres oberes Limit an möglichen Längen der Pulsfolgen. Die Ursachen dafür sind

- Die Relaxationszeiten  $T_2$  und insbesondere  $T_1$  definieren die Zeitskala, auf der es möglich ist eine einmal erzeugte transversale Polarisation zu manipulieren.  $T_1$  liegt bei Nitroxid- oder Flavinradikalen in der Größenordnung einiger Mikrosekunden bei 80 K.
- Die minimal erreichbare Pulsdauer ist durch die zur Verfügung stehende Mikrowellenleistung begrenzt.
- Vor dem Start eines Pulses oder dem Beginn der Detektion muß abgewartet werden, bis der vorhergehende Puls möglichst vollständig abgeklungen ist. Dadurch entsteht eine experimentelle *Totzeit* des Spektrometers.

Aufgrund dieser Einschränkungen werden in der Praxis selten mehr als ein halbes Dutzend Pulse pro Folge benutzt. Trotzdem ist die Puls-ESR eine mächtige Methode zur Untersuchung von Radikalen, auch weil sie im Vergleich zu Spektroskopie mit kontinuierlicher Mikrowellenstrahlung eine höhere Sensitivität aufweist, da aufgrund der Anregungsbandbreite der Pulse eine größere Elektronenpopulation gleichzeitig detektiert wird.

Ein Puls-ESR-Spektrometer ist mikrowellentechnisch anspruchsvoller zu konstruieren (und damit teurer) als ein reines *cw*-Gerät, konzeptionell aber ähnlich aufgebaut. Die Unterschiede sind:

- Es existieren mehrere unabhängig voneinander phasen- und leistungsjustierbare Kanäle, welche mittels schneller Mikrowellenschalter kurze (Rechteck-)Pulse erzeugen können.
- Ein zusätzlicher Mikrowellenverstärker wird zwischen Pulsquelle und Resonator ge-

schaltet, damit die Mikrowellenleistung genügt um in einer Zeit, welche kurz gegen die vorhandenen Relaxationszeiten ist, die notwendigen Drehwinkel zu erzeugen.

- Aufgrund der hohen Leistung muß der Zugang zum Detektor geschlossen werden können, während Mikrowellenpulse anliegen.
- Der benutzte Resonator wird normalerweise nicht kritisch (das heißt als perfekter schwarzer Körper) angepaßt, sondern *überkoppelt*, da die Mikrowellenleistung nach Ende des Pulses in vertretbarer Zeit abklingen können muß.

### 3.7.1 Das Hahn-Echo Experiment

Das Hahn-Echo-Experiment [85] ist eine fundamentale und einfache Pulsfolge, mit deren Hilfe sich die Prinzipien der Puls-ESR gut illustrieren lassen.

Der Einfluß eines idealen Rechteckpulses endlicher Länge auf ein sich im thermischen Gleichgewicht befindendes System läßt sich anhand der Gleichungen 3.31 und 3.34 abschätzen. Der Magnetisierungsvektor  $\vec{M}$  wird abhängig von Leistung und Dauer des Pulses um den Winkel  $\theta = \omega_{B_1} \cdot t$  aus der  $z$ -Achse herausgedreht. Da sowohl die Mikrowellenleistung als auch die Pulslänge für den Experimentator leicht zugängliche Größen sind, ist es möglich den Drehwinkel  $\theta$  beliebig zu wählen. Über eine Korrektur der Phase der eingestrahlten Mikrowelle kann zudem eingestellt werden, in welcher Richtung auf der  $x/y$ -Ebene des rotierenden Koordinatensystem  $\mathcal{R}$  das durch den Puls erzeugte Magnetfeld  $B_1$  liegt.

Es sei die Phase ohne Einschränkung der Allgemeinheit derart gewählt, daß  $\vec{M}$  in Richtung der  $y$ -Achse gedreht werde. Nach  $t = \frac{\pi}{2\omega_{B_1}}$  ist die gesamte longitudinale Magnetisierung  $M_z$  dann in transversale Magnetisierung  $M_y$  umgewandelt, sofern die notwendige Zeit  $t$  klein gegen die wirkenden Relaxationszeiten  $T_1$  und  $T_2$  ist.<sup>14</sup> Wenn der Mikrowellenpuls abgeklungen ist, präzediert  $\vec{M}$  weiterhin mit seiner Larmorfrequenz  $\omega_0$  um  $B_0 = z$  im Laborsystem bzw. bleibt konstant in  $\mathcal{R}$ .

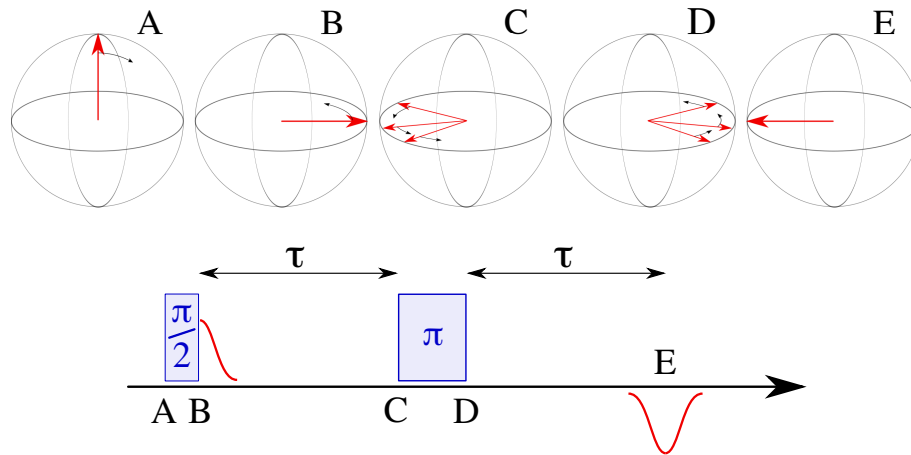
Da es sich bei  $B_1$  um einen *endlichen* Puls handelt, ist die Resonanzbedingung nicht nur für diejenigen magnetischen Momente mit  $\omega_0 \equiv \omega_{\text{MW}}$  erfüllt, sondern wegen des wirksamen Anregungsmusters (Fouriertransformation einer Rechteckfunktion der Breite  $T$ )

$$\mathcal{F}(f(t)) = \mathcal{F}(\omega) = \frac{2 \sin((\omega - \omega_{\text{MW}})T/2)}{\omega - \omega_{\text{MW}}} \quad (3.53)$$

für eine Spinpopulationsverteilung mit  $\omega_0 \sim \omega_{\text{MW}}$ .

Dies führt dazu, daß sich der Magnetisierungsvektor  $\vec{M} = \sum_i \vec{\mu}_i$  aus vielen verschiedenen Teilmomenten zusammensetzt, welche leicht unterschiedliche Larmorfrequenzen besitzen. Nachdem all diese Momente von dem  $\frac{\pi}{2}$ -Puls zusammen auf die  $y$ -Achse von  $\mathcal{R}$  ausgerichtet wurden, drehen sie sich mit ihrer jeweils eigenen Winkelgeschwindigkeit  $\omega_{0,i}$  um  $z$ . Die

<sup>14</sup>Ein solcher Puls wird nach dem durch ihn erzeugten Drehwinkel  $\frac{\pi}{2}$ -Puls genannt.



**Abbildung 3.5:** Schematische Darstellung der Magnetisierungsvektoren und Pulssequenz während der Hahn-Echo-Sequenz. Situation zu Beginn des ersten  $\pi/2$ -Mikrowellenpulses (A), nach Ende des ersten Mikrowellenpulses (B), nach einer Wartezeit  $\tau$  (C), direkt nach dem zweiten Mikrowellenpuls ( $\pi$ -Puls) (D) und nach einer weiteren Wartezeit  $\tau$ , wenn die einzelnen  $\vec{\mu}$  wieder parallel orientiert sind und durch konstruktive Überlagerung das (negative) Echo bilden (E).

magnetischen Momente  $\vec{\mu}_i$  beginnen demnach sich aufzufächern, und der Betrag von  $\vec{M}$  reduziert sich entsprechend, bis er verschwindet und die Einzelmomente statistisch auf der  $x/y$ -Ebene verteilt sind. Das detektierte ESR-Signal (Projektion von  $\vec{M}$  auf die  $x/y$ -Ebene) ist demzufolge direkt nach dem Ende des Pulses maximal und fällt danach auf Null ab. Die Zeitdauer dieses Abfalls ist durch die Breite der Verteilung der  $\omega_{1,i}$  bestimmt und damit der Anregungsbandbreite, also effektiv dem Inversen der Länge des vorhergehenden Mikrowellenpulses, proportional.<sup>15</sup>

Im Prinzip kann direkt über dieses primäre Signal integriert werden um den Meßwert für das aktuelle Magnetfeld  $B_0$  zu ermitteln. Allerdings muß mit dem Beginn der Detektion gewartet werden, bis die Mikrowelle des Pulses selbst vollständig abgeklungen ist. Die notwendige Wartezeit liegt oftmals in der gleichen Größenordnung wie die Länge des FID, was diesen Ansatz häufig praktisch disqualifiziert.

Das Experiment zur Rekonstruktion des direkt nach Ende des  $\pi/2$ -Pulses auftretenden Signals mit Hilfe eines *induzierten Echos* wurde 1950 von Erwin L. Hahn vorgestellt [85]. Dabei wird nach einer Wartezeit  $\tau_1$  ein zweiter Mikrowellenpuls auf die Probe geführt, dessen Produkt aus Leistung und Länge so gewählt ist, daß der effektive Drehwinkel für die Elektronen  $180^\circ$  ist ( $\pi$ -Puls). Dadurch wird das Vorzeichen der Magnetisierung aller

<sup>15</sup>Das direkt nach einem  $\pi/2$ -Puls beobachtbare Signal wird *FID* (freier Induktionszerfall, engl.: „free induction decay“) genannt. Für organische Radikale ist es nur selten möglich (wie in der NMR) direkt daraus durch Fourier-Transformation das Spektrum zu rekonstruieren. Dies liegt daran, daß das zu messende Spektrum normalerweise viel breiter als die erreichbare Anregungsbandbreite eines  $\pi/2$ -Mikrowellenpulses ist.

angeregten Elektronen umgekehrt ( $\vec{\mu}_i \rightarrow -\vec{\mu}_i$ ). Der durch die Larmorpräzession erzeugte Drehwinkel ist gemäß Gleichung 3.31 abhängig von dem Produkt  $\vec{\mu} \cdot t$ , ein Vorzeichenwechsel von  $\vec{\mu}$  ist also äquivalent zu einer Zeitumkehr: Die aufgefächerten magnetischen Momente beginnen wieder zusammenzulaufen, bis sie sich nach einer Zeit  $\tau_2 = \tau_1 = \tau$  wieder vollständig positiv überlagern, bevor sie erneut beginnen auseinander zu fächern (Abbildung 3.5).

Dieses Echo besitzt den Vorteil, daß es erst zur Zeit  $\tau$  nach dem letzten Mikrowellenpuls auftritt.  $\tau$  kann dabei so gewählt werden, daß die Energie des Pulses bereits vollständig abgeklungen ist, bevor sich die transversale Nettomagnetisierung erneut aufbaut. Dadurch ist es möglich das Signal gut zu messen, sofern die Phasenkorrelation der einzelnen magnetischen Momente noch nicht zerstört ist.<sup>16</sup>

### 3.8 Elektron-Kern-Doppelresonanz (ENDOR)

Wie in Abschnitt 3.2 dargelegt wurde, ist es möglich, daß eine Kopplung zwischen den vermessenen Elektronen und in ihrer Umgebung liegenden Atomkernen (mit Spin  $I \neq 0$ ), vorliegt. Dies ist immer dann der Fall, wenn

- am Ort des Atomkerns eine nicht verschwindende Spindichte des Elektrons existiert oder
- die magnetischen Momente geometrisch derart orientiert sind, daß sie dipolar miteinander wechselwirken können.

Die in Gleichung 3.25 angegebene Anzahl der durch Hyperfeinkopplung erzeugten Elektronenenergieniveaus war

$$n_e = \prod_{i=1}^m (2n_i I_i + 1)$$

Aufgrund der multiplikativen Abhängigkeit von der Aufspaltung jedes einzelnen Kerns entsteht häufig eine breite und überlappende Verteilung von Übergängen, weswegen es nur selten möglich ist die Kopplungsparameter  $A_i$  direkt aus dem ESR-Spektrum zu bestimmen. Da auf der anderen Seite ein Kernspin üblicherweise nur mit einem Elektronenspin signifikant gekoppelt ist, ergibt sich für die *Kernspinübergänge* nur ein additives Wachstum:

$$n_n = (2S + 1) \sum_{i=1}^m I_i \quad (3.54)$$

Die klassische Methode zum Vermessen von Kernspins ist die NMR, allerdings besitzt die ESR aufgrund des viel größeren magnetischen Momentes des Elektrons eine deutlich höhere Empfindlichkeit. Mit der Doppelresonanzmethode ENDOR ist es möglich die beiden

<sup>16</sup>Die Phasenkorrelationszeit ist äquivalent zur transversalen Relaxation. Damit das Echo nicht verschwindet, muß also  $2\tau \lesssim T_2$  gelten.



Vorteile zu verbinden und Kernspinübergänge indirekt mittels ESR zu beobachten. Dabei wird neben der Mikrowellenpulssequenz zur Präparation der Elektronenpolarisation ein Radiofrequenzpuls benutzt um selektive Kernspinübergänge anzuregen. Dieses Vorgehen korreliert Kern- und Elektronenspinresonanzen, weshalb eine Modulation des induzierten ESR-Echos auftritt. Dabei muß beachtet werden, daß die Anregungsbandbreite des Mikrowellenpulses kleiner ist als die Energiedifferenz der Kernzustände ist.<sup>17</sup>

### 3.8.1 Davies-ENDOR

Eine Möglichkeit zur Realisierung des ENDOR-Experiments ist die Davies-Pulssequenz (siehe Abbildung 3.6) [86]. Ausgehend von einem  $(S = \frac{1}{2}, I = \frac{1}{2})$ -System im thermischen Gleichgewicht läßt sich die Methode folgendermaßen verstehen (vergleiche Abbildung 3.6):<sup>18</sup>

**MW-Puls 1:** Ein auf den Elektronenübergang von  $|SI\rangle = |-\beta\rangle \leftrightarrow |+\beta\rangle$  resonanter Mikrowellen- $\pi$ -Puls invertiert die Polarisation der Elektronen. (Effektiv werden die Besetzungszahlen der beiden beteiligten Niveaus getauscht.)

**RF-Puls:** Ein *Radiofrequenz- $\pi$* -Puls, welcher resonant auf einem der beiden Übergänge  $|+\beta\rangle \leftrightarrow |+\alpha\rangle$  oder  $|-\beta\rangle \leftrightarrow |-\alpha\rangle$  ist, löscht die Nettopolarisation der Elektronen.

**Induziertes Echo:** Abschließend wird die Polarisation auf der gleichen Resonanzfrequenz wie im MW-Puls 1 durch eine Hahn-Echo-Sequenz (siehe Abschnitt 3.7.1) abgefragt.

War der RF-Puls resonant auf den Kernspinübergang, so wird *kein* Echo detektiert, lag keine Resonanz vor, dann ist ein refokussiertes Echo sichtbar. Wenn nun die Frequenz des RF-Pulses unter Beibehaltung des Magnetfeldes und der Mikrowellenfrequenz variiert wird, läßt sich die Hyperfeinkopplung direkt aus dem Spektrum ablesen (Abbildung 3.6 rechts unten).

Aus der Gleichung für die Hyperfeinaufspaltung (Gleichung 3.23) ergibt sich für  $I = \frac{1}{2}$  eine RF-Resonanz für die beiden Fälle:

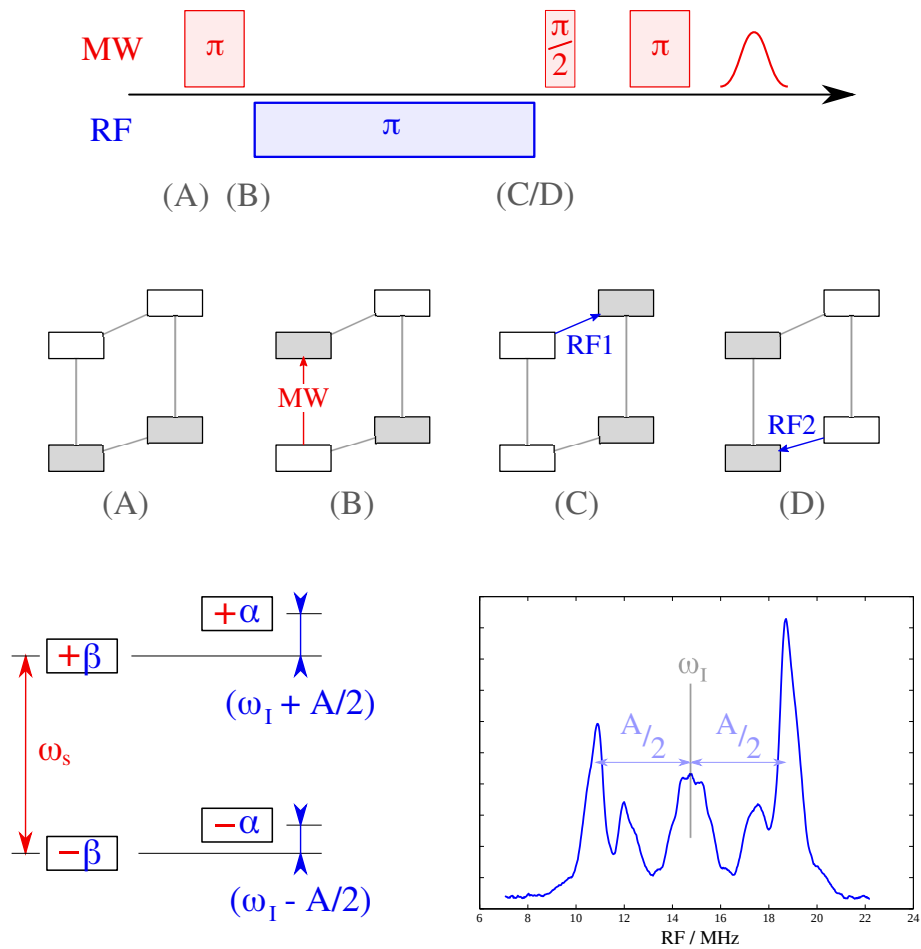
$$\omega_\alpha = \left| \omega_I + \frac{A}{2} \right| \quad \text{und} \quad \omega_\beta = \left| \omega_I - \frac{A}{2} \right| \quad (3.55)$$

Hierbei bezeichnet  $\omega_I$  die Übergangsfrequenz des ungekoppelten Kerns (zwischen  $I = +\frac{1}{2}$  und  $I = -\frac{1}{2}$ ). Für Protonen im X-Band ( $B_0 \approx 350$  mT) liegt sie bei etwa 14,9 MHz. Im Grenzfall der schwachen Kopplung<sup>19</sup> ist  $A$  demzufolge einfach der Abstand der beiden zu einem Übergang gehörenden Signaleinbrüche.

<sup>17</sup>Falls die Bedingung nicht erfüllt ist, werden die Elektronenpopulationen unabhängig von der Orientierung des gekoppelten Kernspins angeregt, so daß ein durch den RF-Puls induzierter Kernübergang keinen Einfluß auf die am Ende abgefragte Polarisation hat.

<sup>18</sup>Zur besseren Unterscheidbarkeit wird die Orientierung des Elektronenspins im Folgenden mit „+“ bzw. „-“ gekennzeichnet, während die Lage des Kernspins relativ zu  $B_0$  mit „ $\alpha$ “ und „ $\beta$ “ bezeichnet wird.

<sup>19</sup>Schwache Kopplung bedeutet  $|\omega_I| > \frac{A}{2}$ .



**Abbildung 3.6:** Veranschaulichung des Davies-ENDOR-Experiments. Pulssequenz (oben), schematische Darstellung der Niveaupopulationen (mittig), Erläuterung der Energieaufspaltungen (unten links) und Beispielspektrum des Protonen-ENDOR eines proteingebundenen Flavins (unten rechts). War der RF-Puls resonant, so tritt entweder die in (C) oder die in (D) dargestellte Situation ein. Im Falle der Nichtresonanz ändert sich die Bevölkung der Energieniveaus (unter Vernachlässigung von Relaxationseffekten) nicht und verbleibt im Zustand (B). Die Orientierung des Elektronenspins ist über „+“ bzw. „-“ angezeigt, diejenige des Kernspins über die Bezeichner  $\alpha$  und  $\beta$ . In dem Beispielspektrum sind mehrere Kopplungen sichtbar, von denen eine exemplarisch markiert ist. Eine ausführlichere Erläuterung des Experiments erfolgt im Text (Abschnitt 3.8.1).

### 3.8.2 Orientierungsselektivität

Wenn die Unterschiede der Hauptwerte von  $\mathbf{g}$  zu einer größeren Aufspaltung des ESR-Signals führen als dessen homogene Linienbreite gefaltet mit der Anregungsbandbreite des Mikrowellenpulses ist, so können orientierungsselektive Anregungen durchgeführt werden. Dabei wird ausgenutzt, daß bei einer festen Frequenz  $\nu$  und einem festen Magnetfeld  $B_0$  genau ein effektiver g-Wert in Resonanz ist (sofern weitere Effekte wie dipolare Wechselwirkung, Hyperfeinaufspaltung usw. ignoriert werden). Gemäß Gleichung 3.8 hängt  $g_{\text{eff}}$  bei gegebener  $\mathbf{g}$ -Matrix allein von der Orientierung des Tensors gegenüber  $\vec{B}_0$  ab. Die Gruppe der ein spezielles  $g_{\text{eff}}$  bildenden Orientierungen läßt sich dabei wie in Abbildung 3.1 auf Seite 24 illustriert veranschaulichen.

Praktisch ermöglicht dies ein Resonanzexperiment durchzuführen, bei dem über die Auswahl der Resonanzbedingung nur ein in seiner Orientierung bezüglich  $\vec{B}_0$  festgelegtes Subensemble aller ESR-aktiven Elektronen benutzt wird.<sup>20</sup> Sowohl die Lage der  $\mathbf{g}$ -Matrix, als auch diejenige der Hyperfeinkopplungstensoren ist in makroskopischen Systemen durch die Molekülstruktur bestimmt und damit unbeweglich gegenüber den molekularen Koordinaten und fix zueinander.<sup>21</sup> Dies führt dazu, daß eine Orientierungsselektion innerhalb  $\mathbf{g}$  gleichzeitig mit einer orientierungsabhängigen Auswahl in  $\mathbf{A}$  gekoppelt ist. Wenn die Lage aller Tensoren zueinander bekannt ist oder abgeschätzt werden kann, ist es deshalb mittels orientierungsselektiver ENDOR-Spektroskopie möglich, die einzelnen Hauptwerte der sichtbaren Hyperfeinkopplungen auch dann zu ermitteln, wenn sie im „normalen“ ENDOR-Spektrum (bei niedrigerem Magnetfeld  $\rightarrow$  unspezifische Anregung der ungepaarten Elektronen) nicht aufgelöst werden können.

---

<sup>20</sup>Diese Argumentation gilt natürlich nur für Lösungen und Pulver, in denen alle möglichen Orientierungen vorhanden sind. In geordneten Proben, beispielsweise Einkristallen, erfolgt eine Spinselektion vernünftigerweise über eine Reorientierung der Probe im Resonator.

<sup>21</sup>Dabei wird vorausgesetzt, daß auf der mittels ESR detektierbaren Zeitskala keine Variation der Radikalparameter ( $\mathbf{g}$ ,  $\mathbf{A}$ ) erfolgt. Dies ist in starren Systemen (z.B. Kristallen oder gefrorene Lösungen) normalerweise gegeben.

# Kapitel 4

## Material und Methoden

### 4.1 Biochemische Grundlagen und Probenpräparation

#### 4.1.1 Expression von AtCry-1 über das Sf21/Baculovirussystem

Vorbereitung des Vektors sowie Synthese und Aufreinigung des Proteins erfolgte wie in [58,87] veröffentlicht im Labor von Dr. M. Ahmad; Université Paris IV, FRE-CNRS 2846, 4 Place Jussieu Casier 156, 75005 Paris, Frankreich.

Zur Expression des *Arabidopsis thaliana* Cryptochroms wurde das BacPAK Baculovirus Expressionssystem benutzt.<sup>1</sup> Dabei wird das Genom des Virus BacPAK6 als Vektor eingesetzt, um eine Synthese des Zielproteins in Insektenzellen der Linie IPLB-Sf21 zu erzwingen [88]. Dieses System basiert auf einer in den 70er Jahren aus *Spodoptera frugiperda* (einem Nachtfalter aus der Familie der Eulenfalter) isolierten Zelllinie. Die Expression in Insektenzellen hat den Vorteil, daß die posttranslationale Verarbeitung eukaryotischer Proteine in den meisten Fällen sehr ähnlich derjenigen in höheren Organismen abläuft. Gleichzeitig ist der Anspruch der Zellkultur an ihre Umgebung überschaubar ( $\vartheta = 22^{\circ}\text{C}$  bis  $30^{\circ}\text{C}$ , kein  $\text{CO}_2$ , TNM-FH + BSA<sup>2</sup> als Medium) und die Verdopplungszeit beträgt nur rund 24 h.

Die Verarbeitung des viralen Vektors beginnt etwa 6 h nach der Infektion und etwa 14 h bis 24 h später bricht die Transkription fast aller Gene der Zelle zusammen, während das Genom des Virus' mit hohen Raten exprimiert wird. Beim Tod der Wirtszelle kann das rekombinante Zielprotein bis zu 30% des gesamten Proteininhaltes der Zelle ausmachen. Dieser Punkt ist je nach verwendetem Virusstamm 2 bis 3 Tage nach der Infektion erreicht.

#### 4.1.2 Präparation der Proben

Sämtliche Handhabung der Proben erfolgte immer unter gedämpftem, grünem Licht.

Ein Teil der vermessenen Proben wurde direkt in Paris beleuchtet und eingefroren. Bei

---

<sup>1</sup>Clontech Laboratories, Kontaktinformationen auf Seite 147

<sup>2</sup>BSA ... *Bovines* Serumalbumin

der Mehrzahl erfolgte die Beleuchtung allerdings an der Freien Universität in Berlin. Dazu wurde das Medium mit den Zellen sowie das aufgereinigte Protein mittels Expressendung auf Eis verschickt. Die Transportzeit variiert je nach Sendung etwas, bewegt sich aber immer im Bereich von  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ . Abgesehen von dieser zusätzlichen Lagerzeit erfolgte die Behandlung der einzelnen Proben in Paris und Berlin identisch. Ausgenommen davon sind die Proben vom Frühjahr 2008, welche aufgrund der technischen Einschränkungen unter leicht abweichenden Bedingungen beleuchtet wurden.

Die vorbereiteten Proben wurden in mittels flüssigem Stickstoff unterkühltem Ethanol schockgefroren. Für W-Band-Proben konnte dabei keine merkliche Verzögerung festgestellt werden, während der Prozeß bei gefüllten X-Band-Röhrchen etwa 1 s benötigt.

Die Lagerung der eingefrorenen ESR-Proben erfolgte in flüssigem Stickstoff. Unter diesen Bedingungen ändert sich der Radikalzustand des Flavin mindestens auf einer Größenordnung von einem Jahr nicht.<sup>3</sup>

## Proteinproben

AtCry-1 ist außerhalb der Zelle äußerst temperaturempfindlich und fällt aus, sobald sich die Probe über etwa  $10\text{ °C}$  erwärmt, weshalb sämtliche Handhabung auf Eis stattfinden muß. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte über:

- Abzentrifugieren der Zellen und Entfernen des Nährmediums
- Aufbrechen der Zellwände (50 mM TRIS pH 7,5; 300 mM NaCl; 1% Triton; 1 h Einwirkzeit)
- Abzentrifugieren der Wandfragmente, Dialyse des Überstandes (50 mM TRIS pH 7,5; 300 mM NaCl; 12 h)
- Versetzen der Probe mit spezifisch bindendem Säulenmaterial (Histidin-Tag bindet an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA; etwa 3 h binden lassen)
- Säule mehrmals waschen (50 mM TRIS pH 7,5; 300 mM NaCl)
- Elution des Proteins durch kompetitive Bindung (50 mM TRIS pH 7,5; 500 mM NaCl, 50 mM Imidazol)

Um die Anforderungen der ESR bezüglich der notwendigen Spindichte zu erfüllen, muß das Protein zusätzlich aufkonzentriert werden. Dies geschieht mittels 30 kDa-Membranfilter. Da AtCry-1 dabei zum Ausfallen neigt, ist es notwendig die Zentrifugation alle 10 min zu unterbrechen um die Probe zu homogenisieren. Trotzdem ist die maximal erreichbare Konzentration mit etwa  $200\text{ }\mu\text{M}$  begrenzt. Allerdings hängt dieser Wert auch stark von der Reinheit der Proteinlösung ab, sobald Verunreinigungen vorliegen, reduziert sich die er-

---

<sup>3</sup>Die Lagerung bei  $-74\text{ °C}$  ist nicht ausreichend, da sich die gemessene ESR-Signalintensität dann im Laufe mehrerer Monate reduziert, was auf eine langsame Dunkeladaption des Flavins schließen läßt.

reichbare Konzentration erheblich. Zum Schutz des Proteins während des Einfrierens wird der Lösung im Anschluß 20% Vol. Glycerin zugesetzt.

Die weitere Verarbeitung der Proben ist je nach Anwendungsbereich verschieden:

- Soll eine Probe für die transiente ESR-Messung erstellt werden, muß ein Elektronenakzeptor hinzugefügt werden, um die Reoxidation des Flavins nach jeder Laseranregung zu gewährleisten. In den hier vorgestellten Messungen wurden dazu 3 bis 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) (Rotes Blutlaugensalz,  $K_3[Fe(CN)_6]$ ) zugegeben.
- Zur Messung des stabilen Flavin-Radikals ist eine vorherige Photoreduktion des Flavins notwendig. Dafür wurden die gefüllten X-Band-Röhrchen für 5 min und die W-Band-Röhrchen für 2 min bei 450 nm mit  $440 \mu E/(m^2s)$  beleuchtet.

## Ganzzellproben

Beim Erstellen der Zellproben zum Ermitteln der Photoreduktionskinetiken des Flavins sind zwei Dinge zu beachten:

- Alle später zu einer Kinetik gehörenden ESR-Proben müssen aus einer Zellcharge stammen<sup>4</sup> und sollten die gleiche Zellanzahl und das gleiche Volumen besitzen.
- Alle Einzelproben sollten sowohl während der Beleuchtung als auch davor und danach so identisch wie möglich behandelt werden.

Schwankungen in einem der beiden Punkte beeinflussen direkt das im Anschluß detektierte ESR-Signal und erhöhen damit den Fehler des Datenpunktes.

**A) Aliquotierung der Proben:** Das in mehreren Gefäßen zu je 50 ml vorliegende Medium mit den darin enthaltenen Zellen wurde zusammengelegt und abzentrifugiert. Das überstehende Medium wurde so abgenommen, daß ein Verhältnis Zellen zu Überstand von etwa 1:10 im Gefäß verblieb. Die Zellen wurden resuspendiert. Nun erfolgte eine Aufteilung der Zellen in Einzelproben zu je 1 ml. Diese wurden erneut abzentrifugiert und der Überstand komplett abgenommen. Somit befand sich in allen Reaktionsgefäßen das gleiche Volumen reiner Sf21-Zellen (rund 100  $\mu$ l). Diese wurden schließlich mit einer definierten Menge (meist 20 bis 50  $\mu$ l) Resuspensionspuffer (200 mM PBS, pH = 7,4; 150 mM NaCl; 60% Glycerin) versetzt, homogenisiert und vollständig in ein ESR-Probenröhrchen überführt.

Alternativ kann auch ein anderer Ansatz verfolgt werden: Anstatt das jeweils identische, voraliquotierte Volumen komplett in die Röhrchen zu transferieren, wird genug Probe in das ESR-Röhrchen eingebracht, so daß der in den Mikrowellenresonator ragende Teil mit Sicherheit vollständig gefüllt ist. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt darin, daß keine Pipettierfehler auftreten und es unerheblich ist, welche Menge der Probe in der zum Befüllen der

---

<sup>4</sup>Die Proteinkonzentration innerhalb der abzentrifugierten Zellen schwankt zwischen den einzelnen Lieferungen teilweise erheblich:  $c \approx (10 \dots 80) \mu M$  (siehe Abschnitt 5.2.1).

Röhrchen benutzen Pasteurpipette haften bleibt. Allerdings ändern alle Schwankungen im Innendurchmesser des Probenröhrchens direkt das vermessene Volumen und insbesondere bei längeren Beleuchtungs- oder Dunkeladaptionzeiten besteht die Gefahr, daß sich die Zellen aufgrund der Schwerkraft im unteren Bereich des Probenröhrchens sammeln. Bei unterschiedlichen Probenvolumina und daher auch unterschiedlichen Zellmengen kann dies die Ergebnisse erheblich verfälschen. Da zudem mehr Zellen benötigt werden als bei der Aliquotierung mittels fester Volumina, wurde diese Methode nur probeweise angewendet und wieder verworfen.

**B) Aufnahme der Zeitserien:** Die vermessenen Zeitserien wurden auf zwei verschiedene Arten aufgenommen:

1. Die Zellproben wurden zuerst in die ESR-Röhrchen überführt, danach beleuchtet und gegebenenfalls im Anschluß im Dunkeln gehalten. Der Vorteil dabei liegt in
  - einem schnellen Einfrieren zum gegebenen Zeitpunkt,
  - experimentell einfacher Handhabbarkeit und
  - dem Verlust nur einer Probe im Falle eines Experimentierfehlers.

Nachteilig wirkt sich aus, daß leichte Schwankungen in den Beleuchtungsparametern (Schwebeteilchen im Kühlwasser, etwas andere Temperatur) und Lagerbedingungen (längere Wartezeit vor der Beleuchtung) das Meßergebnis verfälschen können. Außerdem ist nicht davon auszugehen, daß die innen im Röhrchen liegenden Zellen die gleiche Beleuchtungsintensität erfahren wie die außen platzierten.

2. Die Zellen werden, nachdem sie auf eine Volumenkonzentration von 10% angereichert wurden, alle in einem kleinen Behältnis ( $r \approx 1$  cm) zusammen beleuchtet. Wann immer ein Datenpunkt notwendig ist, wird 1 ml Probenvolumen abgenommen, abzentrifugiert, definiert resuspendiert, in das Meßröhrchen überführt und eingefroren. Während der Beleuchtung und Dunkeladaption der Proben wird die Lösung mittels eines Magnetrührers gemischt ( $\nu \approx 4$  s<sup>-1</sup>), so daß alle Zellen im Mittel die gleiche Lichtleistung erfahren. Der Vorteil und das Hauptproblem hierbei liegt darin, daß zwar alle Zellen bis zum Zeitpunkt der Entnahme den vollständig identischen Bedingungen unterworfen sind, nach Abnahme der Proben aber 1 min bis 1:30 min bis zum Einfrieren benötigt werden. In dieser Zeit erfolgt bereits eine Dunkeladaption, was den präparierten Zustand verändert.

In den ersten Versuchen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Ansätze, weshalb die Mehrzahl der Experimente aufgrund der einfacheren Handhabung mit direkt in den ESR-Röhrchen beleuchteten Zellen durchgeführt wurde. In diesem Zusammenhang ist aber auf die Beobachtungen im Rahmen der Reproduktion der Dunkeladaptionsexperimente hinzuweisen (Abschnitt 5.3.2), bei denen sich

später herausstellte, daß die vermessenen Kinetiken teilweise doch von der Beleuchtungsmethode abhängen.

Die experimentellen Parameter der Beleuchtungsexperimente (außer Frühjahr 2008) waren wie folgt:

- Kaltlichtquelle: Streppel Halolux 100 HL mit Infrarotschutzfilter
- Blaulichtbeleuchtung:  
450 nm Cut-Off-Filter;  $N_t = 440 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ ;  $P = 11,7 \text{ mW}/\text{cm}^2$
- Grünlichtbeleuchtung:  
531 nm Cut-Off-Filter;  $N_t = 800 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ ;  $P = 18,2 \text{ mW}/\text{cm}^2$

Die entsprechenden Werte in den Experimenten vom April/Mai 2008 sind:  $200 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$  Blau (LEDs mit 470 nm Peak) und  $300 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$  Grün (530 nm Filter).

Um eine Überhitzung der Proben auszuschließen, erfolgte die Beleuchtung in einem mittels Eis auf  $8^\circ\text{C}$  bis  $10^\circ\text{C}$  gekühlten Wasserbad. Die Temperatur der Dunkeldaption wurde variiert und ist im Folgenden angegeben, sofern sie nicht  $22^\circ\text{C}$  (Raumtemperatur) entsprach.

## 4.2 Aufbau und Durchführung der Experimente; Aufbereitung der Rohdaten

### 4.2.1 *cw*-ESR

Alle in dieser Arbeit vorgestellten *cw*-Messungen wurden an einem aus industriell gefertigten Komponenten aufgebauten X-Band-Spektrometer durchgeführt. Die in diesem System benutzten Bestandteile sind:<sup>5</sup>

---

<sup>5</sup>Für die Kontaktinformationen der Firmen siehe Seite 147.



Magnet:	AEG-ESR 20 XT
Magnetstromversorgung:	Bruker ER 081S
Magnetfeldsteuerung:	Bruker B-H 15
Mikrowellenbrücke:	Bruker ER 046 XK-T
Brückenkontrolleinheit:	Bruker ER 048 R
Resonator:	Bruker Super-HQ
Lock-In-Verstärker:	Stanford Research SR810 DSP
Frequenzzähler:	Agilent 53181A
Heliumkryostat:	Oxford Instruments ESR 910
Temperatursteuerung:	Oxford Instruments ITC 503S

Die Temperatur bei allen Messungen betrug 80 K; die Feldmodulation erfolgte mit einer Frequenz von 100 kHz und einer Amplitude von 0,27 mT; als Zeitkonstante des Trägerfrequenzverstärker wurde 300 ms gewählt. Um dem Einschwingen des Signals nach Erreichen des nächsten Magnetfeldes genug Zeit zu geben, wurde ein Meßwert alle 900 ms aufgenommen. Die Steuerung des Magnetfeldes und das Auslesen des Lock-in-Verstärkers erfolgte computergestützt mit Hilfe eines selbstgeschriebenen `fsc2`-Skriptes<sup>6</sup>.

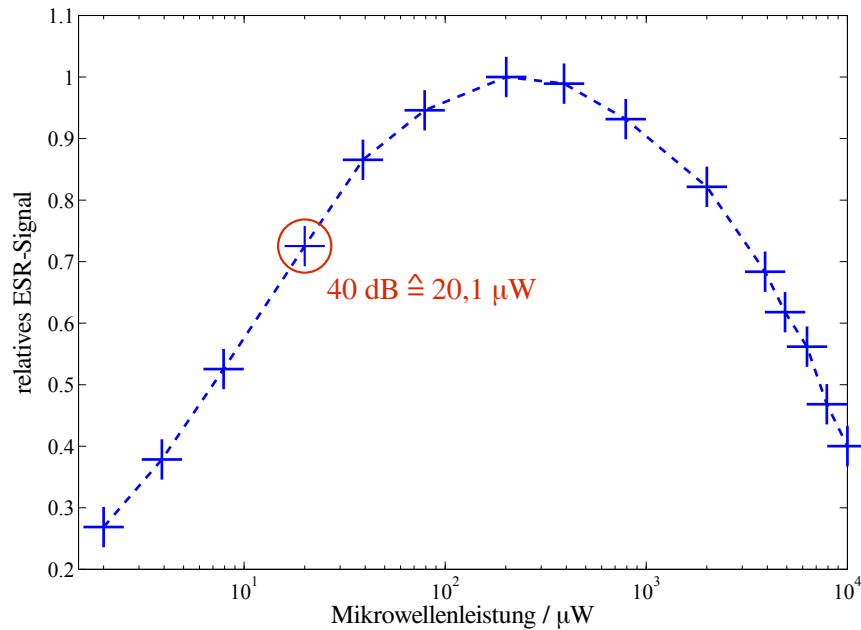
Für die Mikrowellenleistung wurden 20  $\mu$ W eingestellt. Dieser Wert wurde nach einer Untersuchung der Signalstärke als Funktion der Leistung ausgewählt, um ein möglichst gutes Signal, aber noch keine verfälschenden Sättigungseffekte zu beobachten (siehe Abbildung 4.1).

Die Positionierung der Röhren im Resonator erfolgte mit Hilfe einer Schablone. Der Reproduktionsfehler für die Messung einer identischen Probe an aufeinanderfolgenden Tagen beträgt etwa 3%. Allerdings ist dabei zu beachten, daß sich die Probenröhren in ihrer Länge und der Dicke des unteren Verschlusses um bis zu 0,5 mm unterscheiden. Diese Größen sind voneinander unabhängig, verändern aber beide direkt die Lage der Probe im Resonator.

### **Bearbeitung der Datensätze**

Typische *cw*-Spektren von AtCry-1, überexprimiert und gemessen in SF21-Insektenzellen, sind in Abbildung 4.2 gezeigt. Die dargestellten Graphen repräsentieren annähernd den gesamten Bereich der erhaltenen Spektrenqualität. Bei sehr geringer Radikalkonzentration ist nicht nur das Signal/Rausch-Verhältnis entsprechend schlecht, sondern auch der bei 80 K

<sup>6</sup>Quelle und Dokumentation: <http://www.fsc2.org>



**Abbildung 4.1:** Relative Stärke des ESR-Signals von *AtCry-1* in *Sf21*-Zellen als Funktion der anliegenden cw-Mikrowellenleistung. Alle folgenden Messungen wurden bei 40 dB Dämpfung ( $\hat{=}$   $20\ \mu\text{W}$ ) durchgeführt

schwach sichtbare Hintergrund des Resonators nicht mehr sehr klein gegen das Flavinsignal. Außerdem kann im Falle eines nicht ausreichend ausgeheizten Probenröhrchens ein von Störstellen des Quarzglases herrührendes schmales Signal um  $g = 2$  beobachtet werden.

Um die Spektren quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurden folgende Bearbeitungsschritte durchgeführt (siehe auch Abbildung 4.3):

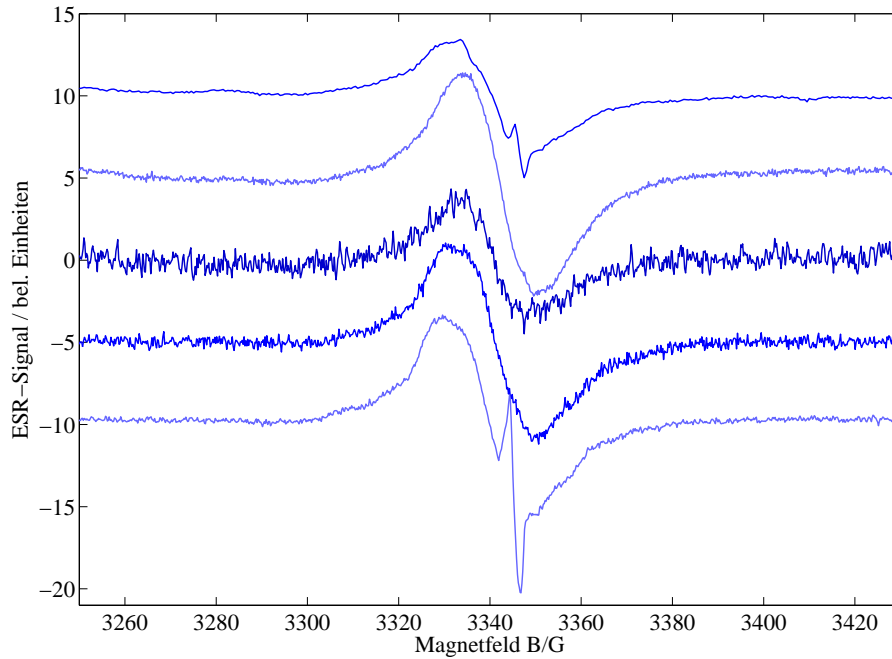
**Frequenzkorrektur:** Zur Vereinfachung der anschließenden Verarbeitung wurden alle Spektren auf eine gemeinsame Mikrowellenfrequenz korrigiert ( $B_{\text{neu}} = \nu_{\text{neu}} \cdot B_{\text{alt}} / \nu_{\text{alt}}$ ). Die Unterschiede in den Frequenzen betragen jeweils nur wenige MHz, so daß der einzige Effekt darin besteht, die Signale auf gleiche Magnetfeldwerte zu schieben.

**Subtraktion des Resonatorhintergrundes:** Wenn in der betrachteten Probenserie eine Dunkelprobe existiert, wurde deren Spektrum abgezogen, ansonsten das separat vermessene Hintergrundsignal des Resonators/Kryostats.

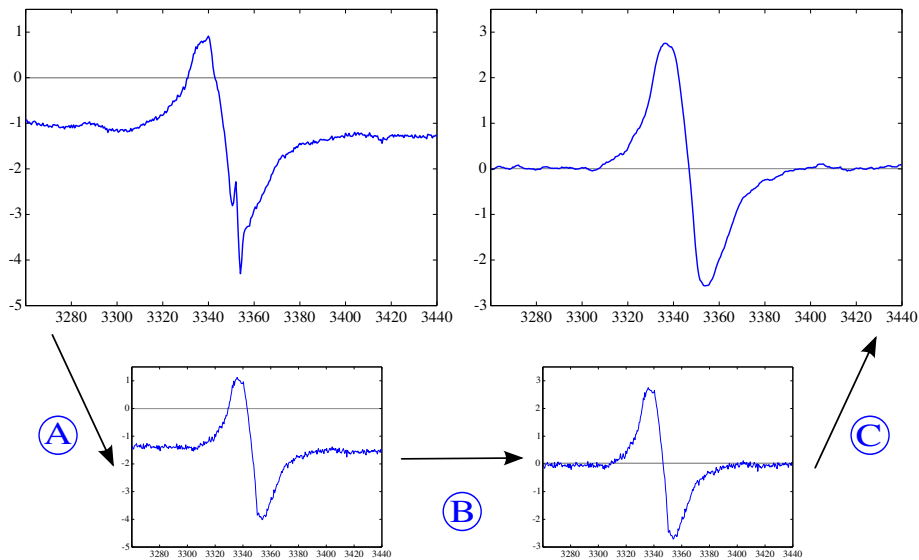
**Abzug eines eventuell vorhandenen Glassignals:** Sofern ein Glassignal im Spektrum sichtbar war, wurde dieses entfernt. Dazu wurde ein Referenzsignal der Quarzstörstelle passend skaliert und abgezogen.

**Korrektur der Grundlinie:** Die Datenpunkte wurden in vertikaler Richtung derart verschoben, daß das Integral über das gesamte Spektrum Null beträgt.

**Phasenkorrektur:** Mit Hilfe einer Hilberttransformation wurde die Phase angepaßt um die



**Abbildung 4.2:** *Typische X-Band cw-Spektren von AtCry-1 in Zellen nach 6 min Blaulichtbeleuchtung. Die Beispiele sollen lediglich ein Bild von den unterschiedlichen Signalstärken und Hintergrundsignalen geben und wurden daher in ihren Amplituden skaliert. Da die Meßparameter identisch gewählt wurden, ist das Signal/sRausch-Verhältnis ein gutes Maß für die tatsächliche Signalstärke der einzelnen Proben. Im untersten Spektrum ist das störende Glassignal besonders gut zu erkennen.*



**Abbildung 4.3:** *Der Rohdatensatz (oben links) wird in mehreren Schritten aufbereitet (zu Erklärung siehe Text): A) Subtraktion von Resonatorhintergrund und Glassignal + Frequenzkorrektur; B) Grundlinien- und Phasenkorrektur; C) Glätten mittels laufendem Mittel*

maximale Signalintensität im Realteil zu erhalten. Zur Erklärung der Hilberttransformation siehe Seite 141 im Anhang.

**Glätten des Spektrums:** Die Anwendung eines laufenden Mittels über jeweils 6 Datenpunkte hatte sich bei einer Schrittweite des Magnetfeldes von 0,05 mT als für die folgende Auswertung vorteilhaft erwiesen.

Für die anschließende Reduktion des Datensatzes auf eine Zahl zur Beschreibung der Signalstärke wurden drei Werte ermittelt:

- der Maximalwert des Integralspektrums<sup>7</sup>
- der Flächeninhalt des Integralspektrums
- der  $y$ -Abstand zwischen dem Maximum und Minimum einer numerischen Anpassung der Ableitung einer Gauss-Funktion an das Spektrum im Bereich  $\pm 2$  mT um das Zentrum des Signals

Da die drei derart erhaltenen Zahlenwerte zwar alle ein Maß für die Signalstärke darstellen, untereinander aber aufgrund der vollkommen unterschiedlichen Einheiten und Größenordnungen nicht vergleichbar sind, wurden sie für die Spektren einer Meßreihe jeweils auf das auftretende Maximum normiert. Dieser Bezugspunkt ist üblicherweise das Spektrum derjenigen Probe, welche direkt nach der maximalen Beleuchtungsdauer eingefroren wurde. Nun ist es möglich aus den drei normierten Einzelwerten eine Signalstärke ( $\bar{x}$ ) und einen Fehler ( $\sigma_x$ ) zu bestimmen.

Sämtliche Bearbeitungs- und Auswertungsschritte erfolgten mittels in `matlab`<sup>8</sup> selbst geschriebener Programme. In diesem Zusammenhang wurde eine umfangreiche Funktionsbibliothek sowie eine graphische Benutzeroberfläche zur komfortablen Bedienung derselben erstellt.

### Abschätzen des Gesamtfehlers

Es ist zu beachten, daß der aus der Streuung der drei Einzelwerte errechnete Fehler nur ein Maß für die Zuverlässigkeit der Auswertung darstellt. In einem rauschfreien Spektrum ohne Störungen beträgt er Null. Für die Bestimmung des realen Meßfehlers müssen daher zusätzliche zufällige Unterschiede in den einzelnen Proben berücksichtigt werden. Relevante Fehlerquellen in diesem Zusammenhang sind:

- Differenzen im gemessenen Probenvolumen: variierende Röhrchendurchmesser ( $\approx 5\%$ ) bzw. Pipettierfehler ( $\approx 5\%$ )<sup>9</sup>

---

<sup>7</sup> Statt des analytischen Integrals wurde die kumulative Summe  $C$  zum Spektrum  $S$  benutzt.  $C$  ist definiert als  $C(n) = k \cdot \sum_{i=1}^n S(i)$ . Hierbei steht  $k$  für die Schrittweite des zugrundeliegenden Spektrums.

<sup>8</sup> MathWorks Inc.; Kontaktinformationen auf Seite 147

<sup>9</sup> Dies bezeichnet nicht den Volumenfehler der Pipette sondern resultiert aus dem Anhaften eines sichtbaren Anteils der Probe an der Innenwand der Pipettenspitze während der Überführung in das ESR-Röhrchen.

- Schwankungen in der Zelldichte (kaum abzuschätzen)
- Unterschiedliche Wartezeiten der einzelnen Aliquote vor der Verarbeitung (bis 3 h Differenz)
- Reproduktionsfehler (Positionierung und Kopplung;  $\approx 3\%$ )

Insgesamt läßt sich daraus ein systematischer Fehler  $\Delta x_{\text{sys}} \approx 8 \dots 10\%$  abschätzen. Dieser Wert gilt allerdings nur für die späteren Messungen, insbesondere die ersten Proben vom Frühjahr 2008 weisen einen etwas größeren systematischen Fehler auf, der in der damals noch mangelhaften Probenpräparation begründet ist (siehe dazu Abschnitt 5.3.2). Für den in den Darstellungen angegebene Gesamtfehler gilt somit:  $\Delta x = \Delta x_{\text{sys}} + \sigma_x$

#### 4.2.2 ENDOR

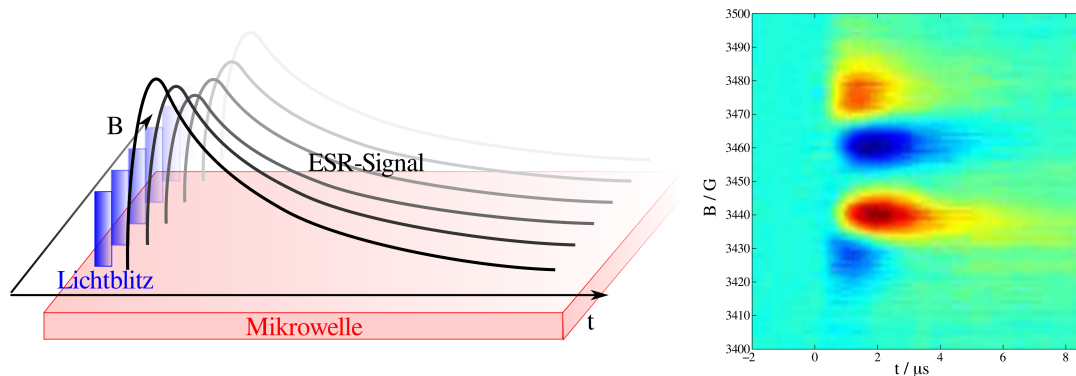
Die im Folgenden vorgestellten ENDOR-Messungen wurde an einem kommerziellen Spektrometer (**Bruker Eleksys E580/E680**) durchgeführt. Dabei wurden als Resonatoren ein **Bruker ER 4118X-MD5-EN** (X-Band) sowie ein **Bruker Teraflex EN600-1021H** (W-Band) verwendet. Zur Verstärkung der Radiofrequenzpulse wurden RF-Verstärker von **Amplifier Research** benutzt (X-Band: AR 250A250A; W-Band: AR 150A400). Die Temperatur des Heliumkryostats wurde in beiden Fällen mit Hilfe eines **Oxford Instruments ITC 503S** auf  $80 \text{ K} \pm 0,02 \text{ K}$  gehalten.

Im X-Band wurde ein 128 ns  $\pi$ -Puls (Mikrowelle) bzw. ein 10000 ns  $\pi$ -Puls (Radiofrequenz) benutzt. Die Position der Pulse war 0 ns (MW- $\pi$ ), 1000 ns (RF- $\pi$ ), 13000 ns (MW- $\pi/2$ ) und 13600 ns (MW- $\pi$ ). Für das W-Band betrug die  $\pi$ -Pulslänge 100 ns (MW) und 16000 ns (RF) mit den Positionen 0 ns (MW- $\pi$ ), 2000 ns (RF- $\pi$ ), 20000 ns (MW- $\pi/2$ ) und 20300 ns (MW- $\pi$ ). In allen Fällen wurde die Radiofrequenz bei jedem Schuß stochastisch bestimmt um Temperierungsartefakte durch ein Aufheizen des Resonators zu unterdrücken. Die Wartezeit zwischen den einzelnen Sequenzen betrug 5000  $\mu\text{s}$ .

#### 4.2.3 Transiente ESR

Das Ziel der hier benutzten transienten ESR ist die Aufnahme des Zeitverhaltens des ESR-Signals nach der Radikalerzeugung durch Lichtanregung. Dafür wird für alle Feldpositionen das zeitlich veränderliche Signal einzeln detektiert (siehe Abbildung 4.4). Da somit eine mehrfache Anregung des Systems notwendig ist,<sup>10</sup> muß eine möglichst vollständige Relaxation des Proteins zwischen zwei aufeinanderfolgenden Lichtblitzen sichergestellt werden. Dazu wurde den vermessenen Proben 3 bis 5 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  zur Reoxidation des Flavins

<sup>10</sup>Mindestens einmal pro Magnetfeldpunkt, in der Praxis allerdings sehr viel häufiger, da aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses eine Akkumulation vieler Zeitspuren pro Feldpunkt unumgänglich wird.



**Abbildung 4.4:** *Transiente ESR: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei transienten Messungen (links) und Beispielspektrum (rechts). Bei kontinuierlich eingestrahlem Mikrowellenfeld wird für jeden Magnetfeldpunkt das auf den Laserblitz folgende ESR-Signal als Funktion der Zeit aufgenommen. Im rechten Bild ist die ESR-Signalsstärke farbcodiert (blau: negatives Signal / Emission; rot: positives Signal / verstärkte Absorption).*

zugegeben und das Experiment nur mit einer Wiederholrate von 1,25 bis 2,5 Hz durchgeführt.

Um die infolge der Beleuchtung entstehende, kurzlebige Spinpolarisation zu detektieren, ist es notwendig das verwendete Spektrometer ohne die bei *cw*-Experimenten üblicherweise verwendete Feldmodulation zu betreiben. Dadurch ist die Sensitivität des Aufbaus stark reduziert, so daß die vergleichsweise geringe Polarisation der Elektronen im thermischen Gleichgewicht kaum vermessen werden kann. Der zeitliche Abfall des gemessenen Signals ist demzufolge auch nicht mit der Lebensdauer des paramagnetischen Zustandes gleichzusetzen, sondern bedingt durch die Rückkehr des hyperpolarisierten Systems in seinen boltzmannverteilten Zustand.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten transienten Messungen erfolgten an einem aus industriell gefertigten Komponenten aufgebauten X-Band-Spektrometer. Die in diesem System benutzten Bestandteile sind:

Magnet:	Varian V7301
Magnetstromversorgung:	Varian V7900
Magnetfeldsteuerung:	Bruker B-H 15
Mikrowellenbrücke:	Bruker ER 046 XK-T
Brückenkontrolleinheit:	Bruker ER 048 R
Resonator:	Bruker ER4118X-MD-5W1
Transientenrekorder:	Tektronix TDS 520A
Lasersystem:	Spectra-Physics Quanta-Ray GCR-11
Optisch-parametrischer Oszillator:	Opta BBO-355
Frequenzzähler:	Hewlett Packard 5340 A
Heliumkryostat:	Eigenbau
Temperatursteuerung:	Lake-Shore 321

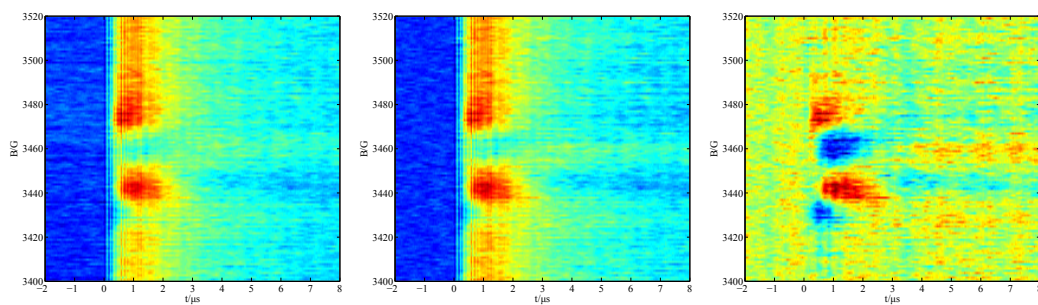
Das zeitlich veränderliche ESR-Signal bei einem festen Magnetfeldpunkt wird in dem durch eine Laserdiode getriggerten Transientenrecorder aufgenommen und über 20 bis 50 Spuren akkumuliert, bevor der Datensatz computergesteuert ausgelesen und das Magnetfeld inkrementiert wird. Um eine zeitliche Drift des Signals zu korrigieren, erfolgt die Messung des Spektrums immer (mindestens) zwei Mal, wobei das Magnetfeld im zweiten Durchgang bei dem Maximalwert startet und schrittweise reduziert wird.

### **Bearbeitung der Datensätze**

Zur Analyse der Datensätze sind einige Korrekturen der gemessenen Spektren notwendig (siehe Abbildung 4.5).

- Der Signalwert vor dem Triggersignal wurde für jede Zeitspur einzeln gemittelt und von der gesamten Transienten abgezogen. Dies setzt den Nullpunkt der ESR-Signalachse.
- Um das Hintergrundsignal des Systems zu eliminieren wurde der Mittelwert der ersten 10 Zeitspuren außerhalb der Resonanz ermittelt und von dem Spektrum abgezogen.

Auch im Falle der transienten Spektren erfolgte die Verarbeitung mittels selbst geschriebener `matlab`-Routinen.



**Abbildung 4.5:** *Aufbereitung der transienten Spektren. Rohspektrum (links); Spektrum nach durchgeführter Nullpunktkorrektur durch Subtraktion des Vortriggersignals (Mitte); Spektrum nach Nullpunktkorrektur und zusätzlicher Hintergrundkorrektur durch Abzug der ersten zehn Zeitspuren (rechts).*

## 4.3 Benutzte Programme für Berechnungen und Simulationen

### 4.3.1 DFT-Berechnungen

Um den Einfluß kleiner struktureller Veränderungen des FAD-Kofaktors auf die magnetischen Eigenschaften des Radikals zu untersuchen, wurden dichtefunktionaltheoretische (DFT) Berechnungen mit Hilfe des Programmes `Gaussian09` [89] durchgeführt. All diese Berechnungen betrachten als Ausgangspunkt die Orientierung des FAD aus der publizierten Cryptochrom-Struktur [33], ignorieren aber sämtliche Atome hinter dem C(4'), sowie die gesamte Proteinstruktur. Dieses Vorgehen ist deshalb zulässig, weil das Ziel der Untersuchung darin liegt, die *Veränderung* der Hyperfeinkopplungen in Abhängigkeit *kleiner* geometrischer Variationen in der Orientierung des Isoalloxazinringes gegenüber der Ribitylseitenkette zu bestimmen. Konstante Abweichungen der Ergebnisse von den experimentell bestimmten Werten können daher ignoriert werden. Diese Vereinfachung bricht natürlich zusammen, wenn die Struktur derart modifiziert wird, daß eine nicht vernachlässigbare Rückkopplung auf die Sekundärstruktur des Proteins erfolgt, wovon bei den hier untersuchten Veränderungen jedoch nicht auszugehen ist (siehe Abschnitt 5.4.5).

Zur Vorbereitung der Rechnung wurde die räumliche Struktur mit Hilfe des Programmes `GaussView` entsprechend modifiziert. Die Berechnung selbst erfolgte mit der DFT-Methode B3LYP. Dabei handelt es sich um ein sogenanntes *Becke-Drei-Parameter-Hybrid-Funktional*, also einer Mischung aus Hartree-Fock-Austausch- und DFT-Austauschkorrelationsmethode [90]. Als Basissatz wurde `EPR-II` von V. Barone verwendet [91], welcher für die Analyse von Hyperfeinkopplungsparametern optimiert ist.

Sämtliche Programmdurchläufe erfolgten auf dem zentralen Rechencluster der FU-Berlin (`Abacus4`).



### 4.3.2 Nachbildung der Absorptions- und ENDOR-Spektren

Zur Simulation der ESR- und ENDOR-Spektren wurde das Programmpaket `EasySpin` 3.1.1 von S. Stoll verwendet [92].<sup>11</sup> Die benutzten Funktionen waren `salt` (ENDOR-Spektren) und `pepper` (Absorptionsspektren).

Ausgangspunkt der Berechnungen bildeten die in Abschnitt 2.2.4 zusammengefaßten Eigenschaften des neutralen Flavin-Radikals. Allerdings ist anzumerken, daß es zur korrekten Beschreibung der experimentellen Spektren notwendig wurde, die auf Seite 17 in Tabelle 2.1 vorgestellten Hyperfeinkopplungen der Protonen H(1'), H(6) und H(8 $\alpha$ ) zu korrigieren (siehe Abschnitt 5.4.4). Desweiteren wurde eine zusätzliche gaussförmige Linienverbreiterung für die ENDOR-Spektren der H(1')-Kerne eingefügt. Wie in Abschnitt 5.4.5 deutlich werden wird, haben bereits kleine Reorientierungen des Flavin-Isoalloxazinringes meßbaren Einfluß auf die Hyperfeinkopplungen der besagten Protonen. Die angesprochene zusätzliche Faltung soll die statistischen Variationen der Geometrie zum Zeitpunkt des Einfrierens der Probe abbilden.

### 4.3.3 Simulation der spinpolarisierten Spektren

Die Simulation der transienten ESR-Spektren erfolgte mittels eines auf der in [93] beschriebenen Methode aufbauenden C-Programmes. Dabei werden die in Abschnitt 3.5 vorgestellten Formeln genutzt um die Spektren für einzelne Orientierungen des Proteins im externen Magnetfeld zu bestimmen. Das Gesamtspektrum ergibt sich anschließend als Summation über alle Einzelspektren. Da die  $g$ -Matrizen der beiden koppelnden Radikale nur schwach anisotrop sind, insbesondere gegen die wirkenden Hyperfeinkopplungen, genügt hierbei ein grobes Raster von  $64 \times 64$  Orientierungen.

Die Lage der beiden  $g$ -Matrizen zueinander kann aus der Kristallstruktur des AtCry-1 berechnet werden, sofern die Orientierung der  $g$ -Hauptachsen bezüglich der Atompositionen bekannt ist. Dasselbe gilt für die Abstände der Spinzentren, aus welchen sich wiederum die Werte der dipolaren Kopplung sowie der Austauschwechselwirkung abschätzen lassen (siehe Abschnitt 3.2.2).

Die für Flavin bzw. Tryptophan benutzten Hyperfeinkopplungen und  $g$ -Werte wurden bereits im Abschnitt 2.2.4 auf Seite 17 zusammengefaßt. Aufgrund der großen Anzahl wirkender Hyperfeinkopplungen, insbesondere für das Tryptophan (9 Protonen mit  $|A_{\text{iso}}| > 10,0$  MHz plus die beiden  $\beta$ -Protonen), führt eine korrekte Berechnung der vollständigen Hyperfeinkopplungsaufspaltung zu einer erheblichen Verlängerung der notwendigen Rechenzeit, da das komplette Spektrum für jede einzelne Kopplung aller Spins bestimmt werden muß.<sup>12</sup> Um dies zu umgehen, wird in einem ersten Schritt das analytisch korrekte

<sup>11</sup>Kontakt, Download und Informationen: [www.easyspin.org](http://www.easyspin.org)

<sup>12</sup>Allein die 9 Protonen des Trp ergeben 512 verschiedene Spinkonfigurationen.

Hyperfeinaufspaltungsmuster berechnet, mit einer gaussförmigen Linienbreite von 1 MHz gefaltet und anschließend abgerastert. Dabei zeigt sich, daß eine Rasterbreite von ebenfalls 1 MHz gut geeignet ist um das Kopplungsmuster in ausreichender Feinheit abzubilden. Danach werden alle Rasterpunkte mit einer normierten Amplitude unter  $10^{-5}$  gelöscht und die verbleibenden Werte an das Simulationsprogramm übergeben. Die Anzahl der pro Orientierung notwendigen Einzelspektren bei Berücksichtigung vieler Protonen reduziert sich damit für jeden Radikalpaarpartner auf etwa 15 bis 20% des bei analytischer Behandlung benötigten Wertes.

# Kapitel 5

## Durchführung und Ergebnisse der Ganzzelleexperimente

### 5.1 Motivation und Fragestellung

Zur Untersuchung physiologisch relevanter Funktionen von AtCry-1 ist die Kenntnis der Zeitdauern für die Radikalerzeugung und den Abbau vorhandener Flavinradikale interessant. Da das Cryptochrom als Blaulichtrezeptor fungiert, ist eine ursächliche Beeinflussung des Zeitverhaltens der gesamten Signalkaskade durch diesen initialen Schritt möglich. Abhängig von der Geschwindigkeit der nachgeschalteten Wechselwirkungen definiert die Aktivierungskinetik des Rezeptors mindestens die minimal mögliche Antwortzeit des Systems.

Zwar läßt sich die Veränderung des Redoxzustandes des Cryptochroms mittels optischer Spektroskopie mit sehr hoher Zeitaufösung an aufgereinigtem Protein beobachten [38,63,65,66], da das Verhalten des FAD-Kofaktors aber äußerst sensitiv auf spezifische Umgebungsparameter, insbesondere das Redoxpotential, ist [94], sind derart gewonnene Ergebnisse nicht notwendigerweise auf native Systeme übertragbar. Mit den hier vorgestellten Experimenten wurde versucht den Schritt von isoliertem Protein hin zu einer möglichst nahe an physiologischen Bedingungen liegenden Situation zu gehen. Dabei wurde der Einfluß verschiedener Beleuchtungsparameter auf die Bildung und Reoxidation des Flavinradikals in lebenden Sf21-Zellen untersucht.

Folgende Punkte sind bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten:

- Da die ESR ausschließlich sensitiv auf paramagnetische Substanzen ist, kann nur der Radikalzustand des Flavins beobachtet werden.
- Die Proteinkonzentration des Cryptochroms muß, bedingt durch die Anforderungen der ESR-Spektroskopie, sehr viel höher sein, als das in der natürlichen Zelle normalerweise der Fall ist.
- Die Zelllinie Sf21 stammt von Insekten ab, das untersuchte Protein dagegen aus einer höheren Pflanze. Die Expression in Insektenzellen ist einem bakteriellen Expressionssystem in Bezug auf eine möglichst native Proteinumgebung jedoch bereits deutlich

überlegen, da sowohl Insekten als auch Pflanzen jeweils zu den höheren Eukaryoten zählen.

- Die Formulierung „an intakten Zellen“ bedeutet nicht, daß die Zellen zum Zeitpunkt der Messung intakt waren. Tatsächlich müssen die Untersuchungen bei niedriger Temperatur (80 K) durchgeführt werden um Relaxationszeiten und Polarisationen zu erhalten, bei denen verwertbare ESR-Signale beobachtet werden können.

Die Zellen befanden sich allerdings bis zum Zeitpunkt des Einfrierens, also insbesondere während der Beleuchtungs-/Dunkeladaptionsphase in einem funktionsfähigen Zustand, und es wird vorausgesetzt, daß sowohl bei dem schnellen Einfrieren als auch während der Lagerung in flüssigem Stickstoff keine für die untersuchten Prozesse relevanten Veränderungen des Systems mehr stattfinden.<sup>1</sup>

- Da die Expression des Cryptochroms über eine Baculovirusinfektion erzwungen wird, ist davon auszugehen, daß die Zellen die ganze Zeit unter Streß standen und in ihrem Metabolismus Unterschiede zu gesunden Organismen vorlagen.

Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen sind folgende Fragestellungen zur Photokinetik des FAD von Interesse und mittels ESR beantwortbar:

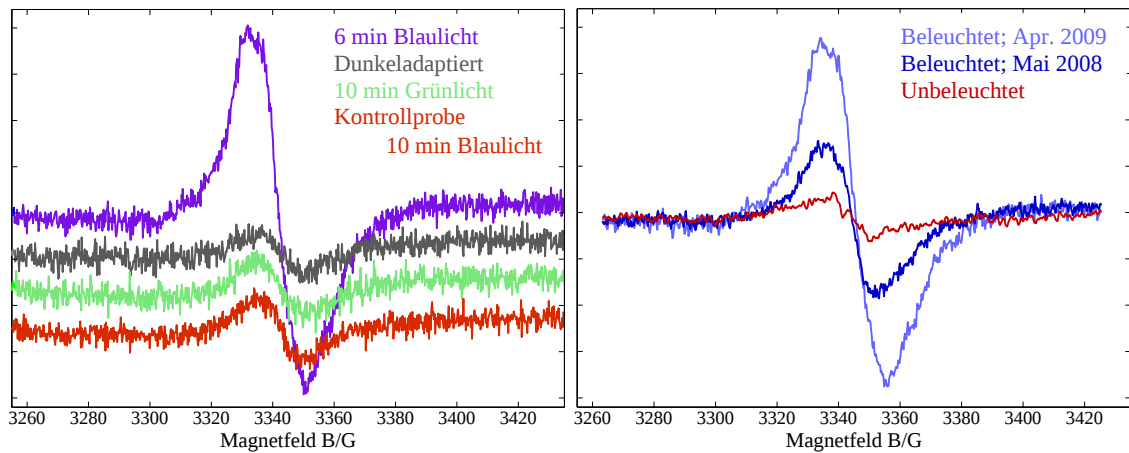
- Mit welcher Geschwindigkeit erfolgt die Bildung des Flavinradikals bei anliegender Blaulichtbeleuchtung?
- Welches Verhalten des Zustandes ist nach der Radikalbildung unter fortgesetzter Beleuchtung zu beobachten?
- Welche Zeit wird für die Relaxation des angeregten FAD in den Grundzustand benötigt, nachdem die Beleuchtung unterbrochen wurde?
- Führt die Beleuchtung des Radikalzustandes mit grünem Licht zu einer Veränderung des Systems? Wenn ja, zu welcher?

Während die ersten drei Fragen naheliegend aus den Kenntnissen über das System (Abschnitt 2.1.3) folgen, hat der vierte Punkt seine Begründung in der Tatsache, daß das neutrale Flavinradikal eine Absorption im grünen Bereich des Spektrums aufweist. Es ist deshalb angebracht zu fragen, ob die damit verbundene Energieaufnahme zu einer Veränderung des Flavinzustandes führt. Denkbar ist hierbei entweder eine induzierte Reoxidation oder eine weitere Photoreduktion, ähnlich der Reduktion des FAD-Radikals in Photolyasen [3,4]. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Veröffentlichungen von Ahmad *et al.* und Casal *et al.* [58,95], die über einen Grünlichteinfluß auf isoliertes AtCry-1 bzw. *A. thaliana*-Keimlinge berichten.

Darüber hinaus ist eine Charakterisierung des Radikalzustandes notwendig, um zwischen neutralem und anionischem Radikal unterscheiden zu können. Optische Messungen an auf-

---

<sup>1</sup>Die Gültigkeit dieser Voraussetzung konnte zumindest für die Stärke des detektierten ESR-Signals bestätigt werden.



**Abbildung 5.1:** Beispiele für X-Band cw-Spektren. Links; von oben nach unten ist dargestellt (ohne Normierung): Cryptochrom exprimierende Zellen nach 6 min Blaulichtbeleuchtung (blau), Zellen der gleichen Charge im dunkeladaptierten Zustand (grau) bzw. nach der Beleuchtung mit grünem Licht (grün) sowie nicht infizierte (und damit kein Zielprotein enthaltende) Zellen nach Behandlung mit Blaulicht (rot). Rechts: Vergleich der auf gleiches Dunkelsignal normierten Spektren der Zellen von Mai 2008 und April 2009.

gereinigtem AtCry-1 zeigten den Übergang zum Neutralradikal und erste Publikationen zu Untersuchungen an Zellproben unterstützen dies tendentiell [58], aber das Signal/Rausch-Verhältnis der veröffentlichten Spektren läßt hier noch keine endgültige Beurteilung zu.

In diesem Zusammenhang werden außerdem in den ENDOR-Spektren auftretende Unterschiede zwischen AtCry-1 in Zellen im Vergleich zu aufgereinigtem Protein untersucht und interpretiert.

## 5.2 Grundlegende Experimente und Charakterisierung des Radikals

Um die spezifische Bildung des Flavinradikals in überexprimiertem AtCry-1 zu belegen, wurden zuerst einige einfache Experimente durchgeführt: Dabei wurden die cw-ESR-Spektren einer infizierten Zelllösung ohne Beleuchtung, nach 6 min Blaulichtbeleuchtung und nach 10 min Grünlichtbeleuchtung sowie einer nicht infizierten Zelllösung nach Blaulichtbeleuchtung miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.1 (links) dargestellt.

Man sieht, daß *nur* nach Beleuchtung mit blauem Licht und *nur* in der infizierten (und damit Cryptochrom im Überschuß enthaltenden) Probe ein deutliches ESR-Signal um  $g \approx 2$  zu beobachten ist. Dieses Signal entspricht demjenigen, welches für ein Flavinradikal erwartet wird [58,96]. Die schwachen Ausschläge in der roten bzw. grünen Kurve gehen auf andere organische Radikale, welche in der Sf21-Zelle nativ vorliegen, zurück. Die dadurch

entstehenden Fehler sind, je nach Gesamtstärke des Signals, mit 2 bis 5 Prozent abzuschätzen. Aus den gezeigten Spektren läßt sich schlußfolgern, daß die angewandte Methode in der Tat geeignet ist um selektiv das durch Blaulichtbeleuchtung in dem überexprimierten Cryptochrom entstehende Flavinradikal zu untersuchen.

Wie Bouly *et al.* bei ENDOR-Messungen feststellen konnten, korrepondiert das beobachtete Flavinsignal mit dem eines Neutralradikals [58]. In der genannten Publikation wurde die Position der H(8 $\alpha$ )-Kopplung des FAD-Semichinons in AtCry-1 bei insgesamt schlechtem Signal/Rausch-Verhältnis als in einem für neutrales FAD-Radikal typischen Bereich liegend identifiziert. (Diese Annahme kann durch eigene, in Abschnitt 5.4.1 ab Seite 78 vorgestellte Messungen bestätigt werden.) In den nun folgenden Untersuchungen wird daher vom Vorliegen der neutralen Radikalform ausgegangen.

### 5.2.1 Radikalkonzentration in den Zellen

Für die Interpretation der folgenden Kinetiken ist die Kenntnis der Radikalkonzentration in der Sf21-Zelle interessant. Wenn davon ausgegangen wird, daß die Reoxidation des photoinduzierten Flavinradikals langsam gegen die Bildung des Radikalzustandes ist (siehe Abschnitt 5.3.3), so entspricht dieser Wert in erster Näherung zudem der Konzentration des intakten Proteins in der Zelle. Zur Bestimmung der Radikalkonzentration wurde der Spinanteil einer Probe mit guter Signalstärke mit Hilfe einer kommerziell verfügbaren Methode quantifiziert (Bruker Biospin; „Xepr: Spin Counting“-Modul). Dabei wird das System aus Mikrowellenquelle, Mikrowellenleiter, Resonator und Detektor mit Hilfe einer Standardprobe bekannter Spinkonzentration kalibriert, bevor das Spektrum des zu untersuchenden Materials dagegen verglichen wird. Das entsprechende Experiment wurde im Helmholtz-Zentrum Berlin<sup>2</sup> durchgeführt.

Die vermessene Probe stammt vom Frühling 2008 und besteht aus 50  $\mu$ l abzentrifugierter Zellen und 20  $\mu$ l Resuspensionspuffer. Sie wurde für 8 min unter den angegebenen Standardbedingungen (Abschnitt 4.1.2) beleuchtet.

Die quantitative Messung ergab eine Anzahl von  $1,4 \cdot 10^{15}$  detektierten Spins, wobei sichergestellt war, daß sich die gesamte Probe vollständig im Resonator befand. Aus dieser Angabe läßt sich die Spinkonzentration im abzentrifugierten Substrat zu

$$c_{\text{Spin,z}} = (46,5 \pm 9,3) \mu\text{M}$$

berechnen. Hierbei ist zu beachten, daß das dabei nicht ausschließlich um isolierte Sf21-Zellen handelt, da sich auch nach durchgeführter Zentrifugation noch ein gewisses Volumen des Nährmediums zwischen den Zellen befindet. Wird für diesen Anteil etwa 30% angesetzt, so erhöht sich die abgeschätzte Spinkonzentration in den Zellen auf rund 70  $\mu$ M.

---

<sup>2</sup>Helmholtz-Zentrum Berlin; Institut für Silizium Photovoltaik; Kekuléstrasse 5; 12489 Berlin

Mit diesem Wert als Referenz können nun die Spinkonzentrationen anderer Proben abgeleitet werden, wenn ein unter identischen Bedingungen aufgenommenes ESR-Spektrum vorhanden ist oder erzeugt werden kann. Für 13 Serien aus der Zeit von Januar 2008 bis September 2009 existieren vergleichbar beleuchtete Proben mit bekannten Zellvolumina, so daß ein entsprechendes Spektrum aufgenommen werden konnte. Die ermittelten Spinkonzentrationen schwanken je nach Wachstumsbedingungen der Zellen mehrheitlich entweder zwischen  $7 \mu\text{M}$  und  $10 \mu\text{M}$  (Bedingungen wie in den Proben vom Frühjahr 2008) oder zwischen  $15 \mu\text{M}$  und  $60 \mu\text{M}$  (optimierte Bedingungen, siehe Abschnitt 5.3.2). Die maximale Spinkonzentration aller insgesamt im Verlaufe dieser Arbeit vermessenen Proben liegt bei  $81 \mu\text{M}$ .

Da die Zellkonzentration im Medium für die spinquantifizierte Probe selbst nicht bekannt ist, muß die Anzahl der Spins pro Insektenzelle geschätzt werden: Ausgehend von einer mittleren Konzentration von  $\bar{c}_M = 1 \cdot 10^7$  Zellen pro ml Nährmedium und einer mittleren Zellausbeute von  $\eta = 6,4\%$  ( $0,32$  ml Zellsubstrat pro  $50$  ml Medium), kann die Konzentration der Zellen im Sediment zu  $\bar{c}_S = 1,56 \cdot 10^9 \text{ ml}^{-1}$  angegeben werden. Unter Beachtung des Volumens der vermessenen Probe von  $V_S = 0,05$  ml ergibt sich somit eine Spinanzahl pro Zelle von:

$$n_{\text{Spin}} = (1,8 \pm 0,8) \cdot 10^7 \frac{1}{\text{Zelle}}$$

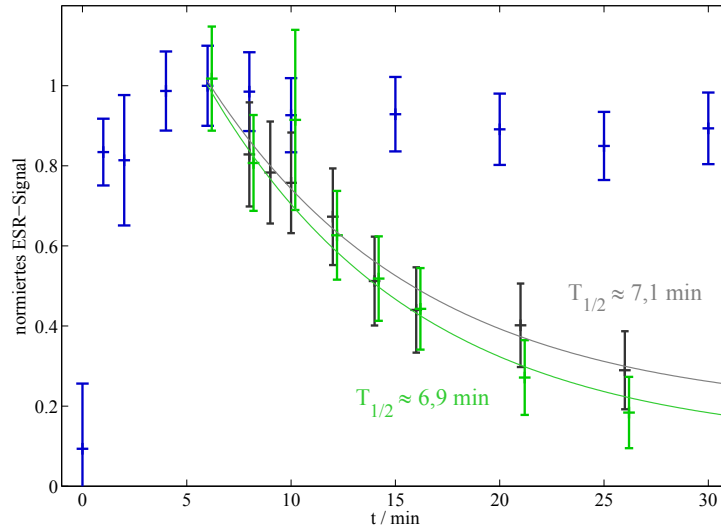
Der angegebene hohe Fehler folgt aus der starken Streuung in der Konzentration der Zellen im Nährmedium. Eine Auswertung der Zellausbeute bei allen Lieferungen, für welche diese Angabe reproduziert werden kann, liefert ein 95%-Vertrauensintervall von 44% des Mittelwertes. Aufgrund der identischen Zentrifugationsbedingungen ist zwar von einer nahezu konstanten Zellkonzentration im Sediment auszugehen, von Dr. M. Ahmad wurde aber nur eine mittlere Zellanzahl im Medium von  $\bar{c}_M = 1 \cdot 10^7 \text{ ml}^{-1}$  kommuniziert und es ist nicht klar, für welche Probe diese Größe angesetzt werden soll.

## 5.3 Kinetiken

### 5.3.1 Erste Messungen

Die Ergebnisse der ersten Beleuchtungsexperimente im Mai 2008 sind in Abbildung 5.2 zusammengefaßt. Sowohl die schnelle Bildung des Radikals durch Beleuchtung mit blauem Licht ( $T_{1/2} < 2$  min) als auch die Reoxidation in Dunkelheit konnte beobachtet werden. Eine exponentielle Anpassung liefert für die Dunkeladaption des lichtaktivierten Zustandes eine Halbwertszeit von rund 7 min. Darüber hinaus wurde der Einfluß von Grünlicht auf das Flavinradikal untersucht. Hierbei ist im Vergleich zur Dunkeladaption der gleichen Zellcharge nur ein geringer Effekt zu erkennen.<sup>3</sup> Weiterhin führt auch die fortdauernde

<sup>3</sup>Insbesondere während der ersten 10 min nach Ende der Blaulichtexposition zeigen die beiden Kinetiken ein quasi identisches Verhalten.



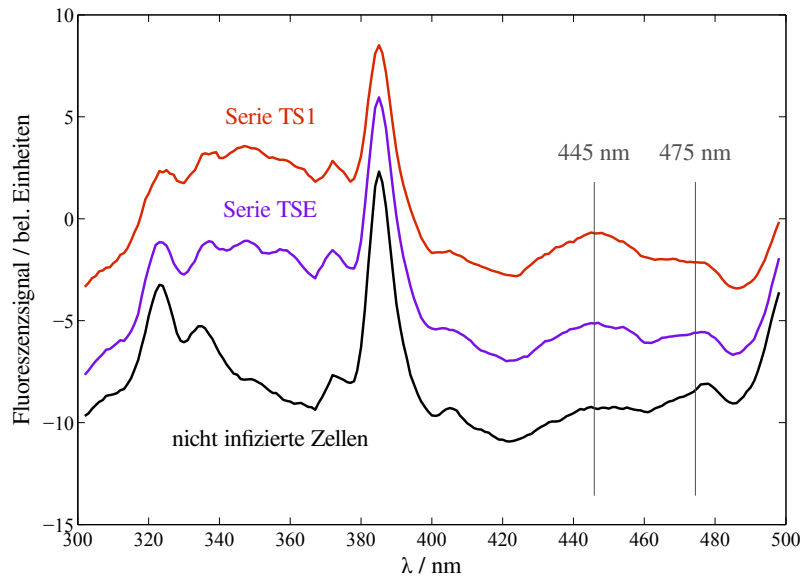
**Abbildung 5.2:** Signalerzeugung, Dunkeladaption und Grünlichteinfluß für die Zellen vom Mai 2008. Dargestellt ist die relative ESR-Signalstärke in Abhängigkeit von der Beleuchtungszeit mit blauem Licht (blau) sowie die Reoxidation des erzeugten Flavinradikals im Dunkeln nach einer vorhergehenden 6 min Blaulichtbehandlung (schwarz) und die Verringerung des Signals als Antwort auf eine kontinuierliche Grünlichtbestrahlung nach vorhergehender 6 min Blaulichtbeleuchtung zur Radikalerzeugung (grün). Die exponentielle Anpassung der Dunkeladaption und Grünlichtbeleuchtung liefert die angegebenen Halbwertszeiten.

Beleuchtung der Probe mit blauem Licht zu keiner signifikanten Veränderung der Radikalkonzentration innerhalb einer Zeitskala von mindestens 6 Aktivierungszeitspannen.

In beiden Fällen bedingen die Fehler der Meßpunkte eine vorsichtige Interpretation, aber die gefundenen Ergebnisse setzen definitiv eine obere Grenze für die Zeitkonstante eines möglichen Einflusses von grünem oder blauem Licht auf den Radikalzustand des FAD.

Bemerkenswert an diesen ersten Meßreihen war eine extreme Inkontinuität der Zellqualität. Neben den in Abb. 4.2 auf Seite 55 dargestellten Signalen existieren auch Probenserien, welche keinerlei oder sehr viel schlechtere Radikalsignale nach der Blaulichtbeleuchtung zeigten. Insgesamt konnte etwa ein Drittel der präparierten Kinetiken wegen zu schlechter ESR-Signale nicht vermessen werden. Dies ist insofern erstaunlich, da die Wachstums- und Infektionsbedingungen für all diese Zellchargen im Rahmen des Kontrollierbaren identisch gewählt wurden und vor jedem Beleuchtungsexperiment ein Fluoreszenzspektrum der Zellprobe (bei Anregung mit 525 nm) aufgenommen wurde. Ein solches Spektrum ist in Abbildung 5.3 gezeigt. Hierbei sollte in Analogie zu den Beobachtungen bei aufgereinigtem AtCry-1 das Verhältnis der Emissionslinien bei 445 nm und 475 nm ein Maß für die Konzentration von in Proteinen gebundenem Flavin sein [58,87]. Es zeigte sich jedoch in diesen und späteren Versuchen, daß keine Korrelation zwischen dem beobachteten Fluoreszenzsi-





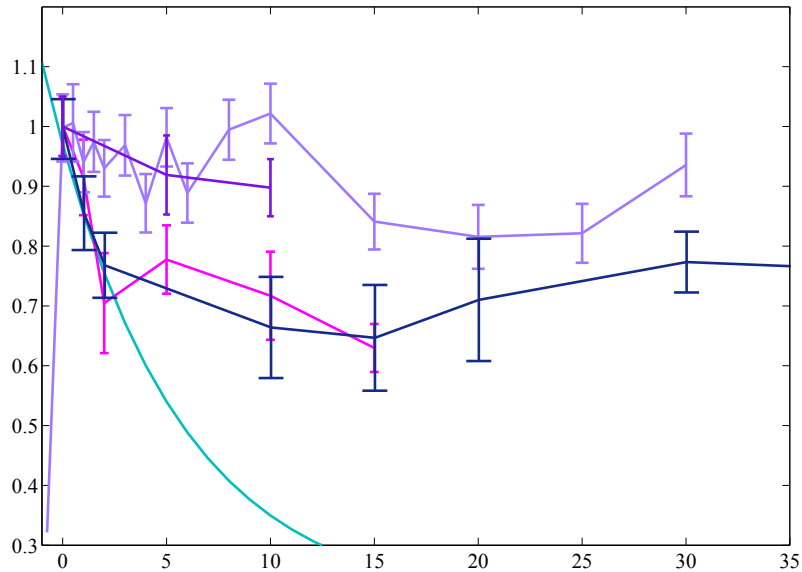
**Abbildung 5.3:** Fluoreszenzspektren verschiedener Sf21-Zellchargen sowohl mit AtCry-1-Expression (rot und blau) als auch ohne jegliche Infektion (schwarz). Der ursprünglichen Annahme folgend sollte das Verhältnis der Fluoreszenzsignale bei 445 nm und 475 nm ein Maß für die Konzentration an proteingebundenem FAD in der Zelle sein. Dies erwies sich als nicht zutreffend.

gnal und der mittels ESR detektierbaren Signalstärke des aktivierten Flavins besteht. Diese Methode ist demnach ungeeignet zum Abschätzen der Proteinkonzentration in Zellen.

### 5.3.2 Reproduktionsproblem der Dunkeladaption und Schlußfolgerungen daraus

Im Laufe des Jahres 2008 konnte die Expression in den vermessenen Zellen soweit verbessert werden, daß die mittlere ESR-Signalstärke des Radikals um etwa 150% gegenüber den besten Proben der ersten Beobachtungsreihen vom Mai 2008 gesteigert wurde und zudem zuverlässig beobachtet werden konnte. Alle ab Dezember 2008 untersuchten Zellproben bildeten unter Blaulichtbeleuchtung das Flavinradikal in meßbaren Konzentrationen. In Abbildung 5.1 (rechts) ist ein sehr gutes Spektrum vom Mai 2008 mit einem typischen Spektrum vom April 2009 verglichen. Verbunden mit dem verbesserten Signal/Rausch-Verhältnis ist ein deutlich geringerer Fehler in den späteren Kinetiken.

Leider erwies es sich aber als zunächst nicht möglich, mit diesen unter verbesserten Bedingungen aufgezogenen Zellen eine zu Abbildung 5.2 vergleichbare Dunkeladaption des einmal erzeugten Radikalzustandes zu beobachten. Wie die Kinetiken in Abbildung 5.4 zeigen, bleibt die Konzentration des Flavinradikals auf einer Zeitskala von mehreren zehn Minuten bei über 70% der Maximalwertes nahezu konstant. Umfangreiche Untersuchun-



**Abbildung 5.4:** Normiertes Radikalsignal als Funktion der Zeit im Dunkeln nach vorhergehender Blaulichtbeleuchtung: Beispiele für Zellserien ohne bzw. mit stark eingeschränkter Reoxidation/Dunkeladaptation. Zum Vergleich wurde die exponentielle Anpassung der Reoxidation aus Abbildung 5.2 grau eingezeichnet.

gen zur Abhängigkeit dieses Effektes von der Lagerzeit der Proben auf Eis (während des Transportes von Paris nach Berlin) und der Temperatur während und nach der Blaulichtbeleuchtung konnte zwar eine leichte aber keinesfalls vollständige Korrelation der Reoxidation mit diesen Faktoren feststellen. Darüber hinaus konnte ein Einfluß des Mechanismus' der Beleuchtung erkannt werden: Wurde die Zellprobe direkt im ESR-Röhrchen beleuchtet, so wurde eine etwas schlechtere Dunkeladaptation beobachtet, als wenn Beleuchtung und Dunkeladaptation in verdünnter Lösung unter ständigem Rühren abliefen. (Vergleiche dazu die Erläuterungen in Abschnitt 4.1.2.) Außerdem führen etwas kürzere Beleuchtungszeiten (3 min gegenüber 6 min) tendenziell zu besserer Reoxidation.

Unter Berücksichtigung dieser Punkte war es schließlich möglich, die Kinetik der Reoxidation zu reproduzieren. Dabei wurden folgende Parameter benutzt.

- Kein Transport auf Eis. Die Zellen wurden direkt nach der Ernte in Paris beleuchtet.
- Verhältnismäßig kurze Beleuchtungszeit von 5 min Blaulicht (gegenüber 6 bis 8 min in vorherigen Experimenten).
- Ständiges Mischen der Probe während der Beleuchtung und Dunkeladaptation.
- $\vartheta = 8^{\circ}\text{C}$  während der Probenpräparation.

Insgesamt lassen sich die Beobachtungen derart interpretieren, daß in den Fällen schwacher Reoxidation nicht ausreichend Oxidationsmittel (Sauerstoff) in der Probe vorhanden

		c / $\mu\text{M}$	T	R/M	$t_{\text{bei}}$ / min	$S_{\text{min}} / S_{\text{max}}$	$T_{1/2}$ / min
P1-D2	Mai 2008	unbekannt	8°C	M	8	22%	6,5
P1-DE	Mai 2008	unbekannt	8°C	R	8	50%	3,7
P1-GLD	Mai 2008	unbekannt	8°C	M	8	10%	5,6
M4-18	Dez 2008	36,9	5°C	R	8	82%	–
M4-2D	Dez 2008	15,3	20°C	R	8	60%	4,7
M5-GL	Dez 2008	38,9	10°C	R	8	89%	–
M6-D	Mär 2009	46,5	10°C	R	8	70%	–
M8-D	Jun 2009	29,35	22°C	M-R*	3	12%	34,8
P2-D1	Aug 2009	10,4	8°C	R	5	72%	–
P2-D2	Aug 2009	9,0	8°C	M	5	0,6%	6,0
P2-D3	Aug 2009	35,7	8°C	R	5	96%	–
P2-D4	Aug 2009	28,2	23°C	R	5	68%	6,4
P2-DX	Aug 2009	7,1	8°C	R	5	67%	2,2
M12-D1	Sep 2009	57,5	23°C	M	2	76%	4,3
M12-D2	Sep 2009	56,0	23°C	M-R <sup>+</sup>	2	32%	14,2

**Tabelle 5.1:** Zusammenfassung verschiedener Dunkeladaptionsexperimente. Korrelation des Abfalls des ESR-Signals im Verhältnis zum Maximum und der Halbwertszeit einer exponentiellen Anpassung (falls möglich) mit der Proteinkonzentration in abzentrifugiertem Zellmaterial, der Temperatur während der Dunkeladaption und den Beleuchtungsparametern. Sofern nicht anders angegeben: Beleuchtung mit  $440 \mu\text{E}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ . R... Beleuchtung im Röhrchen; M... Mischen während der Zellprobe, eine Hälfte direkt beleuchtet, die andere vorher 10 min bei Raumtemperatur gerührt (kein Unterschied des Experiments; \* ... Aufteilen der Zellprobe, eine Hälfte direkt beleuchtet, die andere vorher 10 min bei Raumtemperatur gerührt (kein Unterschied sichtbar); + ... Beleuchtung und Dunkeladaption im Röhrchen, aber davor 10 min an der Luft gerührt

war. Dies tritt insbesondere dann auf, wenn die Proteinkonzentration hoch oder die Beleuchtungszeit lang ist. Eine längere Beleuchtungszeit hat dabei zur Folge, daß bereits während der Blaulichtbehandlung in den Grundzustand reoxidierte Flavine sofort wieder in den Radikalzustand überführt werden und demzufolge bereits in dieser Zeit Oxidationsmittel verbraucht wird, ohne daß sich das beobachtete Signal ändert. Auf diese Weise wird eine längere oder stärkere Blaulichtbeleuchtung die Sauerstoffkonzentration im Medium reduzieren. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, daß ein leichtes Rühren der Probe während der Beleuchtungs- und Dunkeladaptionszeit höchstwahrscheinlich weniger Einfluß auf die Kinetik hat, als die Tatsache, daß die Zellprobe dann, verglichen mit der Beleuchtung in ESR-Röhrchen, etwa 10-fach verdünnt vorliegt.<sup>4</sup>

Der beschriebene Effekt der Abreicherung von Sauerstoff unter bestimmten experimentellen Parametern läßt sich experimentell nutzen, um die im physiologischen Normalfall vorliegende Dunkeladaption des Flavinradikals explizit zu unterdrücken. Derart ist es möglich die Einflüsse von blauem und grünem Licht auf den Radikalzustand des Flavins isoliert zu untersuchen.

### 5.3.3 Ergebnisse

In Abbildung 5.5 und 5.6 sind die Ergebnisse der Kinetikmessungen an AtCry-1 zusammengefaßt. Dabei zeigt Abbildung 5.5 die Bildung des Radikals unter Blaulichtbeleuchtung sowie dessen Reoxidation im Dunkeln. Die Bildung des Flavinradikals unter der verwendeten Beleuchtung von  $440 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$  erfolgt mit einer Halbwertszeit von etwa 15 s und erreicht damit bereits nach wenigen Minuten eine Sättigung, welche sich anschließend kaum noch ändert. Die Reoxidation erfolgt mit einer Halbwertszeit von:<sup>5</sup>

$$T_{1/2} = (360 \pm 20) \text{ s}$$

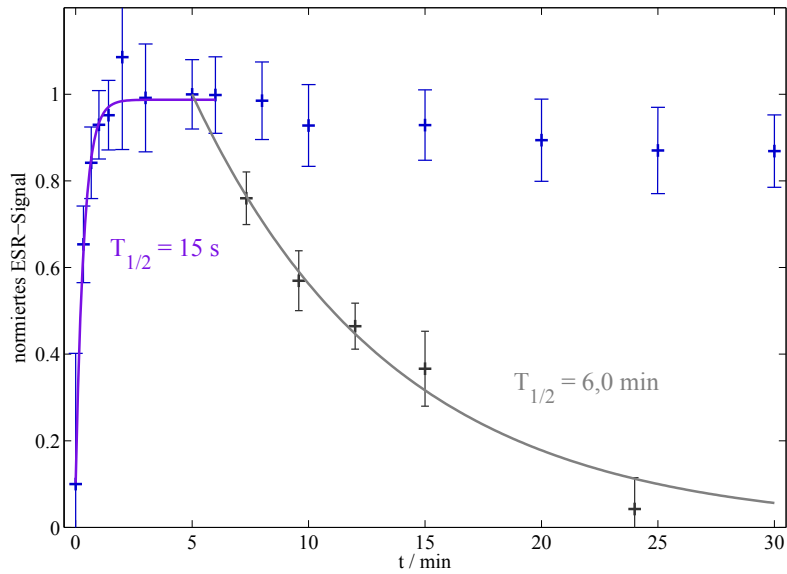
Da dieser Wert um mehr als eine Größenordnung größer als die Zeitkonstante der Radikalerzeugung ist, kann der Einfluß der Reoxidation während des Aufbaus des Signals vernachlässigt werden. Unter Berücksichtigung der Lichtleistung (und einen linearen Zusammenhang der Aktivierung des FAD mit der Beleuchtungsstärke vorausgesetzt) läßt sich daher ein Wirkungsquerschnitt der Photoreduktion berechnen (siehe Abschnitt B.2 auf Seite 142):

$$\sigma \approx 1,7 \cdot 10^{-22} \text{ m}^2 = 170 \text{ pm}^2$$

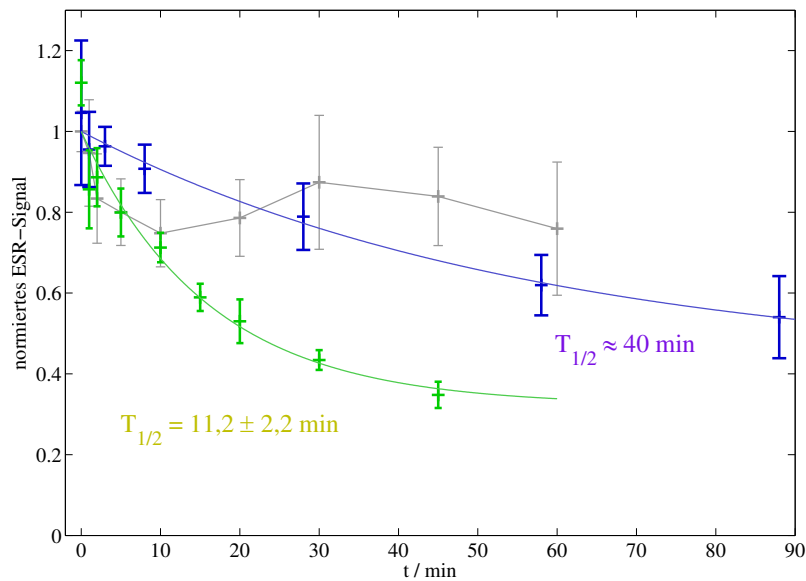
---

<sup>4</sup>Die Durchmischung muß sehr vorsichtig erfolgen, um die empfindlichen Sf21-Zellen nicht zu schädigen und ist vor allem nötig, um eine gleichmäßige Beleuchtung der 8 bis 10 ml umfassenden Probe zu gewährleisten. Eine Verringerung der Zellkonzentration bei Beleuchtung im Probenröhrchen scheidet aufgrund der dann zu geringen ESR-Signalstärke aus.

<sup>5</sup>Mittelwert und Standardabweichung aus allen Kinetiken in welchen das Signal innerhalb von höchstens 20 min auf mindestens 30% des Ursprungswertes abgefallen ist.



**Abbildung 5.5:** Signalerzeugung und Dunkeladaptation. Dargestellt ist die relative ESR-Signalstärke in Abhängigkeit von der Beleuchtungszeit mit blauem Licht (blau) sowie die Reoxidation des erzeugten Flavinradikals im Dunkeln nach einer vorhergehenden 5 min Blaulichtbehandlung (schwarz). Eine exponentielle Anpassung der Radikalerzeugung sowie Dunkeladaptation liefert die angegebenen Halbwertszeiten.



**Abbildung 5.6:** Einfluß von grünem und blauem Licht auf das Flavinradikal bei unterdrückter Reoxidation. Dargestellt ist der Abfall des normierten ESR-Signals bei fortgesetzter Blaulichtbeleuchtung (blau, der Nullpunkt entspricht 2 min) sowie bei Beleuchtung mit grünem Licht nach vorheriger Aktivierung mit blauem Licht für 8 min (grün). Zum Verdeutlichen ist zusätzlich das Dunkelverhalten der identischen Zellen mit aktiviertem  $\text{FADH}^\bullet$ -Radikal eingezeichnet (grau). Eine exponentielle Anpassung der Kinetiken ergibt die angegebenen Halbwertszeiten.

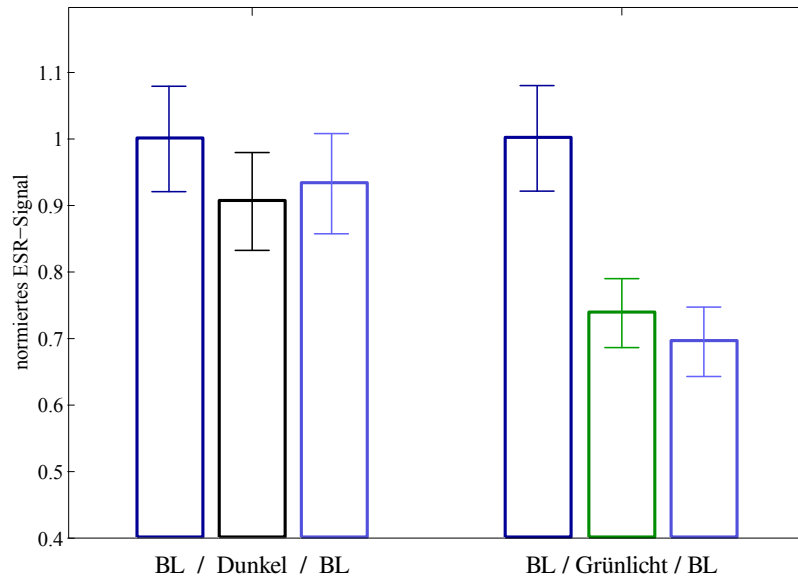
Bei diesem Wert handelt es sich um eine größenordnungsmäßige Abschätzung. Eventuelle Streuverluste an den auftretenden Übergangsflächen (Glas/Wasser, Wasser/Glas, Glas/Medium) sind ebensowenig berücksichtigt wie Absorption des Lichtes im Kühlwasser. Desweiteren setzt die Herleitung der verwendeten Formel eine gleichmäßige Ausleuchtung aller Punkte innerhalb des untersuchten Materials voraus, was mit Sicherheit nicht gegeben ist. Zu beachten ist außerdem eine vermutlich signifikante Abhängigkeit dieses Wertes von der AtCry-1-Konzentration in den Zellen.<sup>6</sup> Leider läßt sich die Proteinkonzentration in den Zellen in den der Auswertung zu Grunde liegenden Proben nicht mehr genau rekonstruieren, eine Abschätzung aus allen bekannten Informationen liefert aber den (im Vergleich mittleren) Wert von  $c \approx 25 \mu\text{M}$  als Radikalkonzentration im abzentrifugierten Zellmaterial. Unter Berücksichtigung des bekannten linearen Absorptionskoeffizienten von voll oxidiertem FAD, kann die Quantenausbeute gemäß der in Abschnitt B.2 ebenfalls hergeleiteten Beziehung schließlich auf  $q \approx 1/25$  abgeschätzt werden.

Um die Frage zu beantworten, inwieweit die gemessene Zeitkonstante der Reoxidation physiologisch relevant ist, muß die Sauerstoffdiffusion während der Dunkelzeit untersucht werden. Die entsprechende Abschätzung dazu findet sich detailliert in Abschnitt B.3 auf Seite 143. Als Ergebnis läßt sich zusammenfassen, daß die Diffusion von Sauerstoff in Wasser und durch eine tierische Zellmembran verglichen mit der beobachteten Kinetik sehr schnell erfolgt. Wenn für die Reoxidation des FADH<sup>•</sup>-Radikals eine lokale Sauerstoffkonzentration von 9 mg/l (entspricht etwa 90% der Sättigungskonzentration von Wasser) ausreicht, so werden pro Sekunde mehr als 10% der am Protein vorhandenen Sauerstoffmoleküle per Diffusion nachgeliefert (wenn die durchschnittliche Konzentration im weit von der Zelle entfernten Medium der Sättigungskonzentration von Wasser entspricht). Dies gilt für stehendes Medium. Sobald die Lösung während der Dunkeladaption gemischt wird, wie es bei der analysierten Zeitserie der Fall war, kommt hierzu noch ein erheblicher Konvektionsanteil.

Es kann demnach festgestellt werden, daß ein *globaler* Sauerstoffmangel zwar zu einer Verzögerung bzw. einer kompletten Unterdrückung der Reoxidation führen kann, die gemessenen Halbwertszeiten aber weit größer als das durch Diffusion des Oxidationsmittels gegebene Minimum sind. *Lokale* Inhomogenitäten der Sauerstoffkonzentration haben also mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit keinen meßbaren Einfluß auf die beobachtete Kinetik. Unter der Voraussetzung, daß eine vollständige Reoxidation vorliegt, die Sauerstoffmenge insgesamt also dem Bedarf genügt, ist die ermittelte Zeitkonstante demnach als das unter physiologischen Bedingungen auftretende Verhalten weitgehend korrekt beschreibend anzusehen.

---

<sup>6</sup>Der Wirkungsquerschnitt ist formal unabhängig von der Konzentration des Zielobjektes, aber eine Veränderung der Proteinanzahl pro Zelle verschiebt das Verhältnis von FAD zu restlichen Zellbestandteilen, wobei letztere effektiv eine Abschirmung des aktiven Zentrums des Proteins verursachen.



**Abbildung 5.7:** Untersuchung zur Wirkung von grünem Licht auf das Radikal. Dargestellt ist die Signalstärke nach 6 min Blaulichtbeleuchtung, anschließender Dunkeladaption für 25 min und darauffolgender erneuter Blaulichtbeleuchtung (links) sowie nach Blaulichtbeleuchtung, anschließender Grünlichtbehandlung für 25 min und erneuter Blaulichtbeleuchtung (rechts). Die Ergebnisse zeigen, daß Flavin im Radikalzustand durch grünes Licht weiter reduziert und nicht reoxidiert wird.

In denjenigen Proben, deren Kinetiken in Abbildung 5.6 dargestellt sind, wurden die experimentellen Parameter zur möglichst guten Unterdrückung der Reoxidation benutzt (hohe Proteinkonzentration, geringe Verdünnung, lange Beleuchtung). Auf diese Weise kann der Einfluß von grünem bzw. blauem Licht auf den Flavinradikalzustand beobachtet werden. Die entsprechenden Halbwertszeiten des Signalabfalls sind:

$$\text{Blaulicht:} \quad T_{1/2} \approx 40 \text{ min}$$

$$\text{Grünlicht:} \quad T_{1/2} = (11,2 \pm 2,2) \text{ min}$$

Hierbei entsteht der angegebene Wert für die Halbwertszeit des Grünlichteinflusses durch eine exponentielle Anpassung des gesamten Datensatzes (wie in Abbildung 5.6 eingezeichnet), der Fehler wird über die Standardabweichung der Halbwertszeiten aller Anpassungen, bei denen jeweils ein Punkt der Meßreihe entfernt wurde, abgeschätzt. Um den Einfluß einer zu Beginn eventuell noch teilweise parallel stattfindenden Dunkeladaption auszuklammern kann die exponentielle Anpassung auch unter Vernachlässigung der ersten 10 Minuten durchgeführt werden. In diesem Fall beträgt die bestimmte Halbwertszeit 11,9 min, liegt also gut in den angegebenen Fehlergrenzen.

Der Vergleich dieser gefundenen Zeitkonstanten macht auch deutlich, wieso der Grünlichteinfluß in den ersten Experimenten 2009 (Abschnitt 5.3.1) nicht zweifelsfrei festgestellt

werden konnte. Bei korrekt ablaufender Reoxidation nach Ende der Blaulichtbeleuchtung ist der Einfluß des grünen Lichts aufgrund seiner etwa doppelt so großen Zeitkonstante zwar beobachtbar, aber innerhalb der Größenordnung der Meßfehler.

Aus den dargestellten Meßwerten ist sofort einsichtig, daß fortgesetzte Blaulichtbeleuchtung zu einer langsamen Überführung des Flavinkofaktors in den voll reduzierten Zustand führen muß, da ein Übergang in den voll oxidierten Flavinzustand eine sofortige Reaktivierung und damit keine sichtbare Veränderung der Radikalkonzentration zur Folge hätte. Für die Wirkung des grünen Lichts auf das vermessene Flavinradikal ist jedoch vorerst unklar, ob ebenfalls eine weitere Photoreduktion oder stattdessen eine Oxidation zurück in den Grundzustand erfolgt. Um dies zu prüfen, wurde die Wirkung einer erneuten Blaulichtexposition nach vorhergehender Photoaktivierung mit anschließender Grünlichtbeleuchtung untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 5.7 zu sehen. Der Vergleich des ESR-Signals der Beleuchtungsexperimente (6 min Blau + 25 min Grün), (6 min Blau + 25 min Grün + 6 min Blau) und (6 min Blau + 25 min Dunkel) läßt den Schluß zu, daß die Population des semireduzierten Flavins unter Grünlichteinfluß zugunsten des *vollreduzierten* Zustandes abgebaut wird. Würde ein Übergang in den volloxidierten Grundzustand erfolgen, müßte die anschließende Beleuchtung mit blauem Licht die detektierte Signalstärke wieder erhöhen.

Zusätzlich ist noch zu bemerken, daß weder die kontinuierliche Beleuchtung mit blauem Licht noch die fortgesetzte Grünlichtbehandlung in der Lage ist das Radikal vollständig zu entfernen. Aus dieser Tatsache kann man spekulieren, daß ein weiterer Prozeß stattfindet, welcher zu einer fortgesetzten Umwandlung des voll reduzierten Zustandes zurück in den Radikalzustand des Flavins führt (teilweise Reoxidation). Aus den gefundenen Anpassungsparametern ist es unter bestimmten Voraussetzungen möglich die einzelnen Raten der vorliegenden Prozesse zu berechnen (Herleitung in Abschnitt B.4 auf Seite 145). Allerdings muß dabei beachtet werden, daß die Berechnung der relativen Reaktionsraten nicht nur von den Zeitkonstanten des exponentiellen Abfalls sondern auch von dem Wert des ESR-Signals für  $t \rightarrow \infty$  abhängt. Es ist davon auszugehen, daß dieser Parameter aus den vorliegenden Meßpunkten nur mit einem erheblichen Fehler bestimmt werden kann. Von biologischer Seite ist weiterhin anzumerken, daß die beiden verglichenen Kinetiken *nicht* mit Zellen derselben Lieferung aufgenommen wurden. Durch Variationen in der Zusammensetzung der Zellen ist ein Unterschied in der Stärke des Untergrundsignals von bis zu 5% des durch AtCry-1 erzeugten ESR-Signals möglich. Die zuverlässige Berechnung der Reaktionsraten ist unter diesen Bedingungen schwierig.



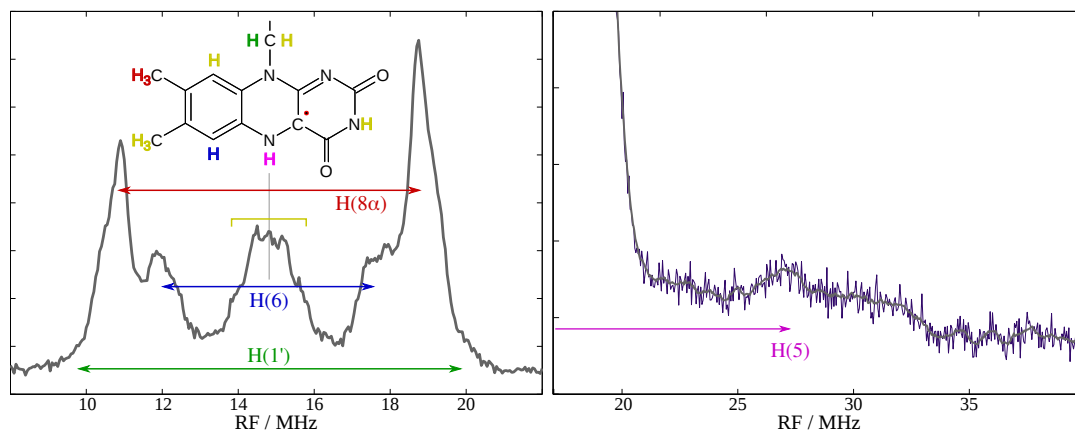
Wenn die gemachten Einwürfe ignoriert werden, so ergeben sich die relativen Reaktionsraten der Hin- und Rückreaktion für die beiden Experimente zu:

Blaulicht:	Radikal $\rightarrow$ voll reduziert	$k \approx 0,010 \text{ min}^{-1}$
	voll reduziert $\rightarrow$ Radikal	$k \approx 0,007 \text{ min}^{-1}$
Grünlicht:	Radikal $\rightarrow$ voll reduziert	$k \approx 0,042 \text{ min}^{-1}$
	voll reduziert $\rightarrow$ Radikal	$k \approx 0,020 \text{ min}^{-1}$

Aus den angegebenen Raten wird zum einen deutlich, daß die Reaktion des Radikals in den voll reduzierten Flavinzustand unter Grünlicht deutlich schneller abläuft als bei fortgesetzter Blaulichtbeleuchtung. Unter Annahme eines Fehlers von mindestens 20% ist außerdem auffällig, daß die Rückreaktion jeweils mit etwa halber Rate der Hinreaktion stattfindet und die entsprechende Reaktionsrate daher in den beiden betrachteten Situationen *nicht* gleich ist. Dies ist insofern problematisch, als daß der Übergang „voll reduziert  $\rightarrow$  Radikal“ als beleuchtungsunabhängig erwartet wird, da das voll reduzierte Flavin weder im grünen noch im blauen Bereich des Spektrums eine nennenswerte Absorption aufweist.

Natürlich ist eine direkte Rückreaktion des FAD in den voll oxidierten Grundzustand denkbar. Unter ständiger Grünlichtbeleuchtung wäre ein solcher Effekt nicht sichtbar, während fortgesetzte Blaulichtexposition zu einer (auf den hier betrachteten Zeitskalen) instantanen Photoaktivierung des Proteins und damit zu einem Übergang des Kofaktors in den radikalischen Zustand führen würde. Als Ergebnis stiege die Radikalkonzentration an, was zu einer scheinbaren *Erhöhung* der berechneten Reaktionsrate „voll reduziert  $\rightarrow$  Radikal“ unter blauem Licht führen müßte, beobachtet wird aber eine *Verringerung* (gegenüber dem Wert unter grünem Licht). Deshalb muß festgestellt werden, daß die Berechnung der Reaktionsraten aus den vorgestellten Meßwerten, entweder aufgrund einer zu starken Vereinfachung in den verwendeten Voraussetzungen oder wegen der oben genannten großen Fehleranfälligkeit der ermittelten Anpassungsparameter, nicht innerhalb einer vertretbaren Genauigkeit möglich ist.

Abschließend ist die im Vergleich zu [58] deutlich verbesserte Qualität der *cw*-Messungen hervorzuheben. Die Signalstärke sowie das damit verbundene Signal/Rausch-Verhältnis konnten soweit gesteigert werden, daß eine detaillierte Untersuchung des FAD-Radikalzustandes mit Hilfe von Puls-ESR-Methoden praktikabel wird. Dabei eröffnet sich zudem die Möglichkeit eines tiefergehenden Vergleiches von AtCry-1 in Zellen mit aufgereinigtem Protein. Die in diesen Experimenten erhaltenen Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.



**Abbildung 5.8:** Davies-ENDOR-Spektrum von blaulichtaktivierten Zellen bei 9,4 GHz. Die typischen Kopplungen eines Flavinradikals können in der Abbildung links beobachtet werden:  $H(1')$ ,  $H(8\alpha)$ ,  $H(6)$ . Sonstige (schwach gekoppelte) Protonen liegen in der „Matriaregion“ in der Mitte des Spektrums um die Eigenfrequenz des freien Protons (gelb). Rechts ist der Radiofrequenzbereich von 20 bis 35 MHz vergrößert, so daß die stark anisotrope Kopplung des  $H(5)$  sichtbar wird. Zur Veranschaulichung wurde neben dem Originalspektrum das laufende Mittel über jeweils 5 Punkte eingezeichnet.

## 5.4 Vergleich von Zellprobe und aufgereinigtem Protein

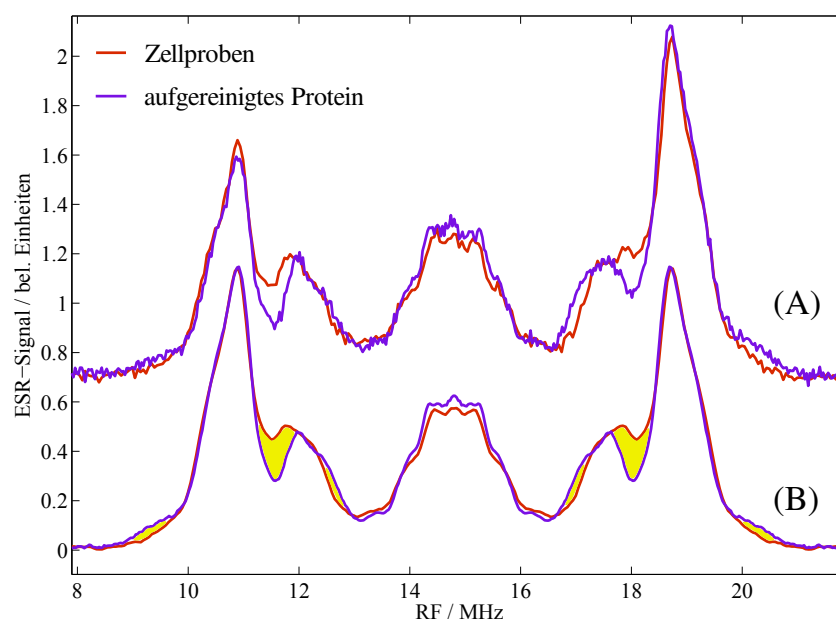
### 5.4.1 X-Band ENDOR-Messungen

Zur näheren Charakterisierung des radikalischen Zustandes des AtCry-1 in Sf21-Zellen wurde ein Davies-ENDOR im X-Band (9 GHz) aufgenommen (Abbildung 5.8). Die Form des erhaltenen Spektrums ist charakteristisch für ein neutrales Flavinradikal [51,54]. Insbesondere können folgende Kopplungen zugeordnet werden:

- $H(6)$  mit rund 5,4 MHz; also in RF-Bereichen um 12 MHz bzw. um 17,8 MHz
- $H(8\alpha)$  mit rund 8,2 MHz; also im Bereich von rund (10...11,5) MHz sowie von (18,2...19,7) MHz mit dem dominanten Signal dreier äquivalenter Protonen
- $H(1')$  mit weniger als 10 MHz; aufgrund der breiten Verteilung dieser Kopplung und der Überlagerung mit  $H(6)$  sowie  $H(8\alpha)$  ist eine Bestimmung der Hyperfeinkopplungen dieser Kerne schwierig
- $H(5)$  mit einer sehr breiten, anisotropen Verteilung der Resonanzen bis hin zu 33 MHz

Bereits die Größe der Hyperfeinkopplung der  $(8\alpha)$ -Protonen ist ein starkes Indiz für die neutrale Ladung des Radikals<sup>7</sup>, wie bereits in [54,58] festgestellt wurde. Aufgrund des guten Signal/Rausch-Verhältnisses des Spektrums kann in der vorliegenden Arbeit darüber hinaus die stark anisotrope, charakteristische Kopplung des Protons an Position 5 aufgelöst

<sup>7</sup>Für das FAD-Anionradikal liegen sie im Bereich von 11,0 bis 12,0 MHz für  $A_{\parallel}$  bzw.  $\approx 10,0$  MHz für  $A_{\perp}$ .



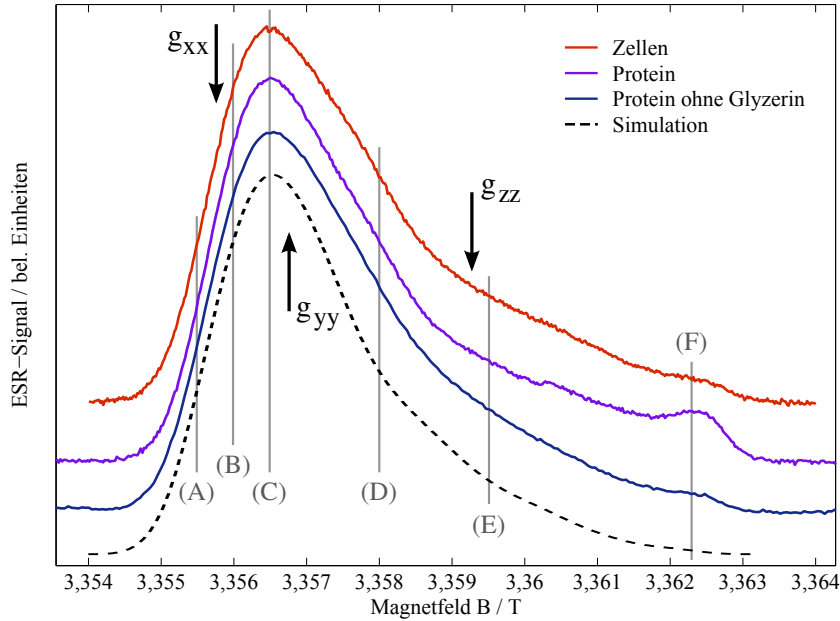
**Abbildung 5.9:** Vergleich der ENDOR-Spektren für *Cry-1* in Zellen und als aufgereinigtes Protein im X-Band (9,4 GHz). Dargestellt sind die skalierten Originalspektren (A) sowie die symmetrisierten und geglätteten Spektren, wobei die auftretenden Unterschiede gelb hervorgehoben wurden (B).

werden. Dies ist der klare Beweis für die Existenz des *Neutralradikals* in überexprimierenden Zellen.<sup>8</sup>

Da ENDOR-Messungen sensitiv auf die direkte Umgebung des beobachteten Spins, in diesem Fall also des freien Elektrons in  $\text{FADH}^\bullet$ , sind, kann ein Vergleich des ENDOR-Spektren von photoaktiviertem AtCry-1 in Zellen mit den äquivalenten experimentellen Ergebnissen an aufgereinigtem Protein wichtige Informationen über eventuell auftretende Unterschiede zwischen diesen Systemen liefern. Abbildung 5.9 zeigt die beiden entsprechenden Spektren und tatsächlich finden sich klare Differenzen im Bereich der vermuteten Hyperfeinkopplungen (gelb markiert). Dabei sind drei Abschnitte auffällig: Im Bereich der äußersten Kante der H(1')-Kopplung (9,0 bzw. 20,5 MHz) und an der innenliegenden Flanke des H(6)-Signals (12,5 bzw. 17 MHz) weist die aufgereinigte Proteinprobe ein stärkeres Signal auf, während die Messung an ganzen Zellen zwischen der H(8 $\alpha$ ) und der H(6)-Kopplung (11,5 bzw. 18 MHz) signifikant höhere Intensität liefert.

Eine genaue Analyse dieser Beobachtung ist aus den vorgestellten X-Band-Messungen schwierig. Da die Unterschiede der einzelnen *g*-Hauptwerte bei Magnetfeldern um 3500 G eine im Vergleich zu den wirkenden Hyperfeinkopplungen (insbesondere N(5) und N(10)) und der homogenen Linienbreite kleine spektrale Separation der einzelnen Komponenten

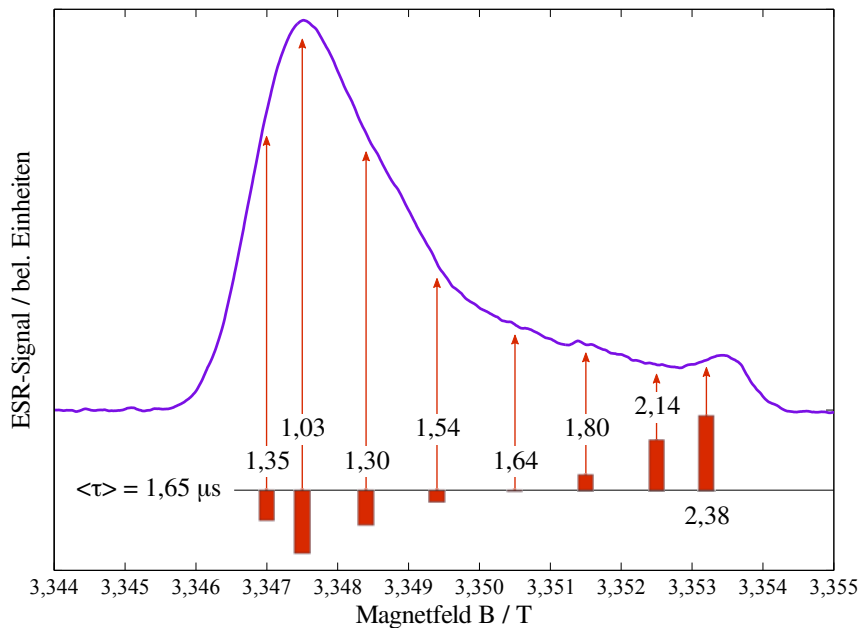
<sup>8</sup>Die Existenz dieses Protons an N(5) definiert gerade das Neutralradikal.



**Abbildung 5.10:** Absorptionsspektren des *Cry-1* im W-Band (94 GHz). Neben den Positionen der  $g$ -Hauptwerte sind die Feldpositionen markiert, an denen orientierungselektive ENDOR-Spektren aufgenommen wurden. Die Unterschiede zwischen den Proteinproben mit und ohne Glycerin haben ihre Ursache in den im Bereich des Spektrums ungleichmäßig veränderten transversalen Relaxationszeiten  $T_2$  (siehe Abbildung 5.11).

ergeben, führt jeder Mikrowellenpuls immer zur Anregung eines aus allen möglichen Orientierungen des Falvin-Systems bestehenden Ensembles. Dies bedeutet für die vermessenen ENDOR-Spektren das gleichzeitige Auftreten aller koppelnder Hyperfeinhauptwerte, bei vier magnetisch inequivalenten Protonenpopulationen also eine Überlagerung von  $4 \cdot 3 = 12$  Einzelkomponenten. Da die beobachteten Kopplungen mit Ausnahme derjenigen des H(5) alle im RF-Bereich von (9,5...20,5) MHz liegen, ist eine Trennung der wirkenden Anteile und damit eine Spezifizierung der Unterschiede zwischen aufgereinigtem Protein und Ganzzellprobe sehr mühsam.

Um die genannten Probleme zu reduzieren, können ENDOR-Messungen im W-Band durchgeführt werden. Aufgrund des um einen Faktor zehn größeren Magnetfeldes erhöht sich die durch die unterschiedlichen Hauptwerte der  $g$ -Matrix bedingte Aufspaltung und liegt nun in die Größenordnung der auftretenden Hyperfeinkopplungen. Daher ist es möglich zur Vereinfachung des Sachverhaltes die in Abschnitt 3.8.2 auf Seite 47 vorgestellte *orientierungselektive ENDOR-Spektroskopie* anzuwenden.



**Abbildung 5.11:** *Transversale Relaxationszeit  $T_2$  in  $\mu\text{s}$  für aufgereinigtes Cry-1 als Funktion der Position im Absorptionsspektrum im W-Band.*

#### 5.4.2 Analyse des W-Band-Absorptionsspektrums

In einem ersten Schritt wird nun das ESR-Absorptionsspektrum der Proben im W-Band untersucht. Abbildung 5.10 zeigt neben den vermessenen Spektren einiger Proben auch die Position der  $g$ -Hauptwerte sowie eine Simulation des Absorptionsspektrums. Bei der Analyse dieser Messung wird deutlich, daß die Beachtung der  $g$ -Hauptwerte allein nicht genügt, um das experimentelle Spektrum, nachzubilden. Dies liegt an den starken auftretenden Hyperfeinkopplungen (siehe Abschnitt 2.2.4). Eine Beachtung der auf Seite 17 angegebenen Hyperfeinkopplungstensoren für H(5), H(6), H(8 $\alpha$ ), H(1'), N(5) und N(10) sowie das Einbeziehen einer zusätzlichen homogenen Linienbreite von 0,05 mT<sup>9</sup> ist notwendig, damit das gemessene W-Band-Spektrum qualitativ simuliert werden kann. Jedoch wird auch dann noch eine deutlich höhere Signalintensität auf der Hochfeldseite der experimentellen Spektren beobachtet.

Um die insbesondere bei aufgereinigtem Protein auftretenden Differenzen zur Simulation zu untersuchen, wurde die transversale Relaxationszeit  $T_2$  für verschiedene Feldpositionen vermessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 5.11 dargestellt. Hierbei wird ein erheblicher systematischer Unterschied sichtbar, welcher zwischen äußerster rechter Flanke und Position des Signalmaximums mehr als 130% beträgt. Kombiniert mit der bei Pulsdetektion notwendigen Wartezeit zwischen erster Anregung und Aufnahme des Signals führt

<sup>9</sup>Durch diese Verbreiterung wird die Wirkung der nicht explizit aufgelösten Hyperfeinwechselwirkungen zusammengefaßt.

dieser Effekt zu einer Modulation der Signalintensität über den Feldbereich des Spektrums. Wie der Vergleich in Abbildung 5.10 zeigt, reduziert sich diese Verzerrung deutlich, sofern der Proteinprobe *kein* Glycerin zugegeben wird. Dies zeigt, daß ein meßbarer Einfluß der direkten Lösemittelumgebung des Proteins auf die Relaxationszeiten und somit auch auf die quantitativen Eigenschaften des Spektrums existiert. Die beobachteten Unterschiede in den ESR-Absorptionsspektren von aufgereinigtem Cryptochrom und überexprimierenden Zellen können demnach über die Wirkung der unterschiedlichen Zusammensetzung des Zellplasmas im Vergleich zu dem benutzten Proteinpuffer verstanden werden.

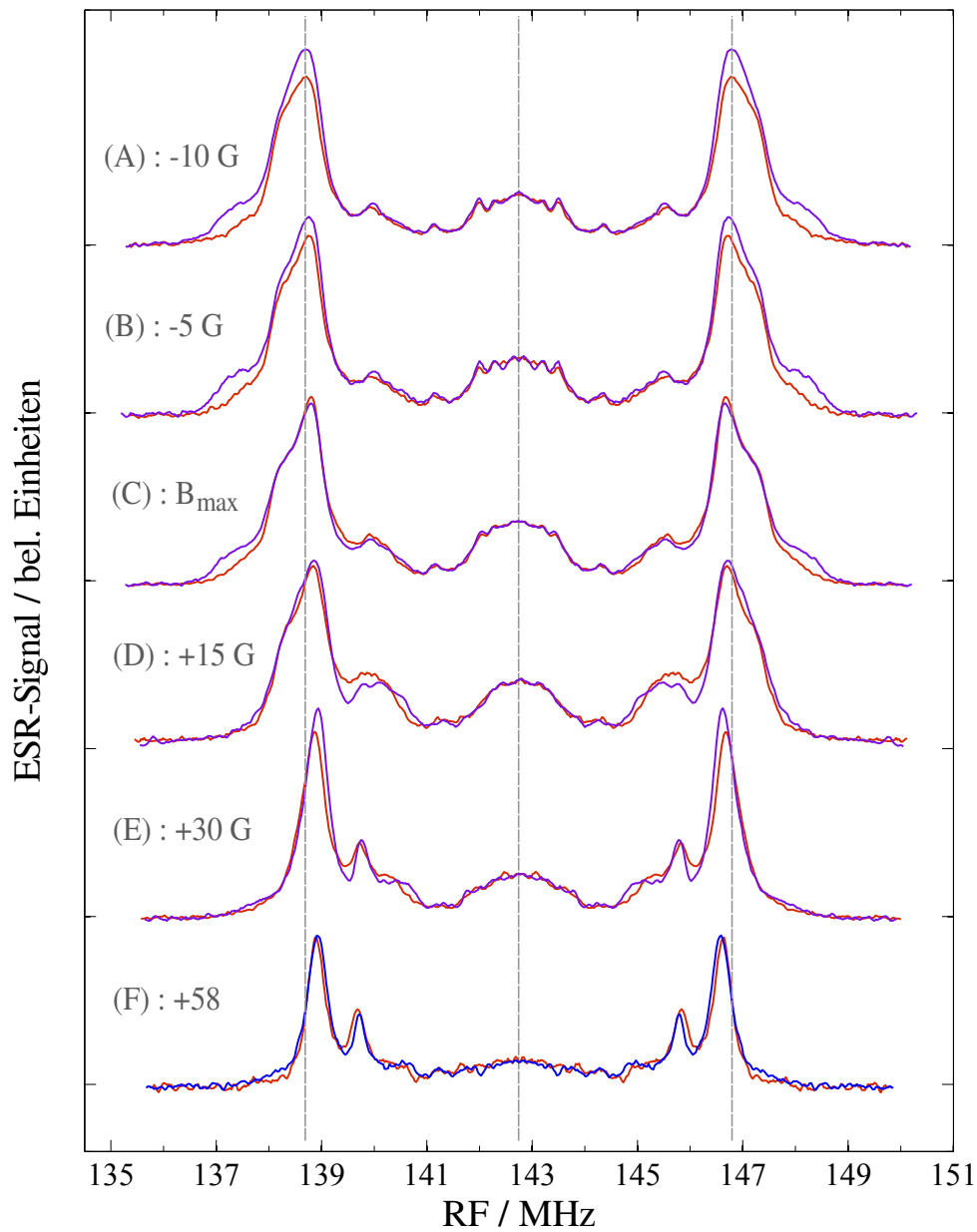
### 5.4.3 W-Band ENDOR-Messungen

Um die bei AtCry-1 zwischen aufgereinigtem Protein und überexprimierenden Zellproben im X-Band gefundenen Unterschiede der ENDOR-Spektren genauer zu analysieren, wurden nun für beide Systeme orientierungsselektive ENDOR-Untersuchungen bei 94 GHz durchgeführt. Dabei erfolgte eine Messung bei insgesamt 6 Magnetfeldpositionen, verteilt über den gesamten Feldbereich des ESR-Absorptionsspektrums (Abbildung 5.10). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 5.12 dargestellt.

Hierbei bestätigt sich die an den X-Band-Spektren festgestellte Beobachtung, es können die gleichen qualitativen Unterschiede festgestellt werden. Allerdings erfolgte aufgrund der orientierungsselektiven Messung eine Aufspaltung der zuvor gleichzeitig detektierten Abweichungen. Während zwischen aufgereinigtem Protein und Zellproben für  $B \parallel g_{yy}$  (Position D) oder  $B \parallel g_{zz}$  (Position F) nur die Verschiebungen im Bereich der H(8 $\alpha$ )- und H(6)-Kopplungen beobachtet werden können, tritt ein deutlicher Unterschied im Bereich der äußeren H(1')-Kopplung isoliert für diejenigen Feldpositionen auf, an denen der effektive g-Faktor der Elektronen  $g_{\text{eff}}$  nicht verschwindende Anteile von  $g_{xx}$  enthält (Positionen A bis C). Im Folgenden wird dieser Unterschied näher betrachtet.

### 5.4.4 Auswertung und Simulation der ENDOR-Spektren im W-Band

Bei der Analyse der ENDOR-Spektren ist zu beachten, daß die starken auftretenden Hyperfeinkopplungen (insbesondere N(5), N(10) und H(5)) nicht nur zu einer Verbreiterung des Absorptionsspektrums führen, sondern selbst im W-Band eine erhebliche Überlagerung derjenigen Magnetfeldbereiche, in denen die einzelnen Hauptwerte der  $g$ -Matrix wirksam werden, verursachen. Deshalb ist es zwar möglich  $g_{zz}$  und in geringerem Maße auch  $g_{xx}$  über eine Magnetfeldposition auf der extremen Hoch- oder Niederfeldflanke zu isolieren, für  $g_{yy}$  gelingt dies aber in keinem Fall. Die Orientierungsselektivität der ENDOR-Experimente bei spezifischen resonanten Magnetfeldern ist deshalb eingeschränkt: Während das Spektrum bei der Magnetfeldposition  $B_{\text{max}} + 58 \text{ G}$  (Abbildung 5.12; F) so gut wie ausschließlich Hyperfeintensorkomponenten in Richtung von  $g_{zz}$  enthält, werden in allen anderen Feldpositionen mindestens Komponenten in Richtung von  $g_{xx}$  und  $g_{yy}$  sichtbar.



**Abbildung 5.12:** Vergleich der orientierungssensitiven ENDOR-Spektren für Cry-1 in Zellen (rot) und als aufgereinigtes Protein (blau) im W-Band. Die vermessene Feldposition ist angegeben als Differenz gegen das Signalmaximum des Absorptionsspektrums und entspricht den in Abbildung 5.10 markierten Stellen. Die dargestellten Spektren wurden symmetrisiert und auf die zentrale Matrixregion skaliert.

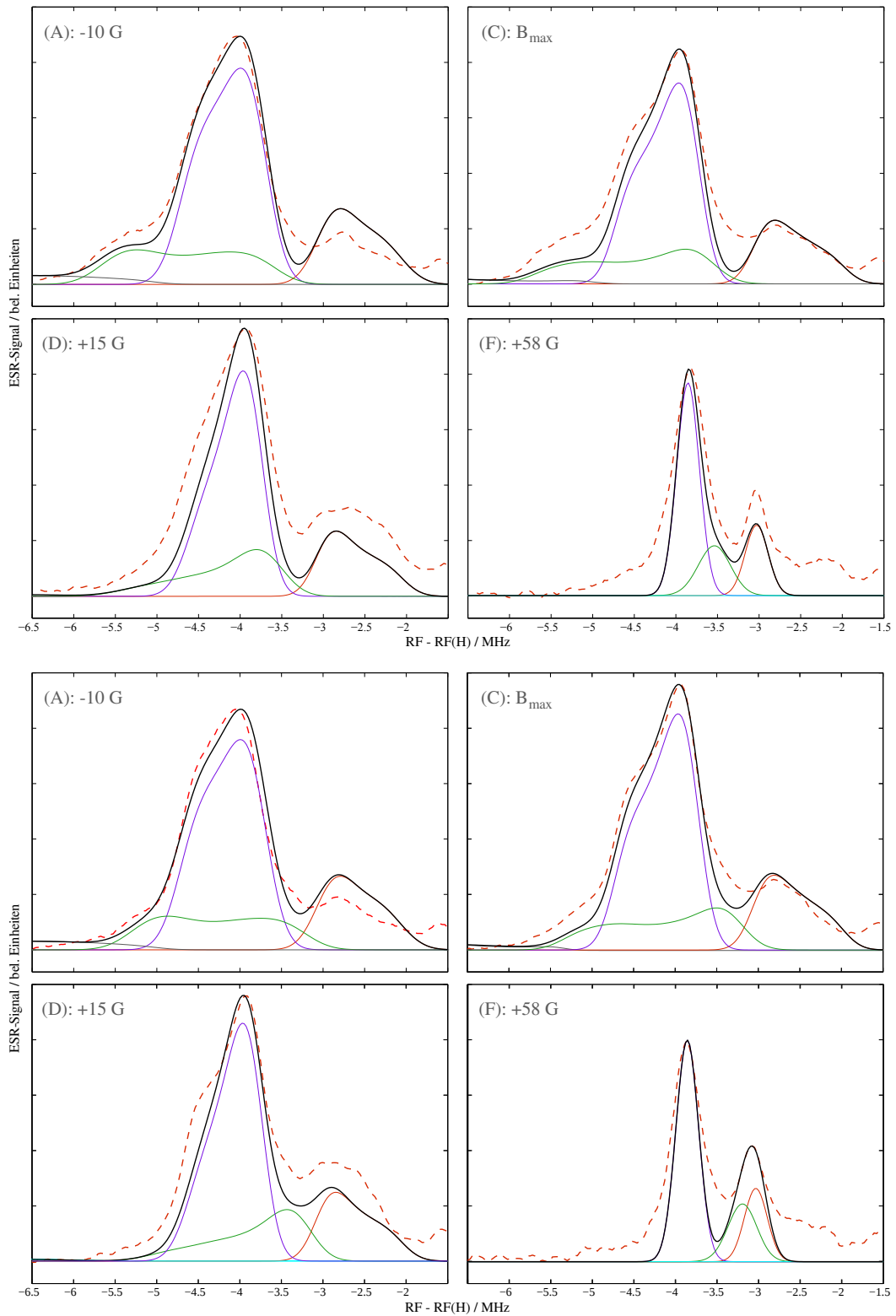
Aus der näheren Analyse der in Abbildung 5.12 vorgestellten ENDOR-Spektren läßt sich in denjenigen Spektren für die Felder mit nicht verschwindendem Anteil von  $g_{xx}$  (A, B und C) eine Verschiebung der äußersten Flanke der H(1')-Kopplung um  $(-0,72 \pm 0,05)$  MHz beim Übergang von aufgereinigtem Protein zu Protein in Zellen feststellen. Außerdem zeigt der RF-Bereich zwischen  $(139,5 \dots 141,0)$  MHz bzw.  $(145,0 \dots 146,5)$  MHz eine kleinere spektrale Verschiebung um  $+0,3$  MHz bei Orientierungen parallel zu  $g_{yy}$  (C, D, E). Diese Region ist typisch für die H(6)-Kopplung, allerdings ist die „Zackenstruktur“ des Spektrums in diesem Bereich ein Indiz für eine Superposition mehrerer Einflüsse. Es fällt zudem auf, daß die letztgenannte Verschiebung mit gleichem Vorzeichen, aber geringerem Betrag ( $+0,2$  MHz), auch im Feldbereich mit Orientierungen parallel zu  $g_{zz}$  (E, F; bei 140 bzw. 146 MHz) und sehr schwach ( $+0,1$  MHz) für das Signal der H( $8\alpha$ ) im Spektrum für  $B = B_{\max} + 30$  G (E) zu beobachten ist.

Abbildung 5.13 zeigt die Simulation für vier verschiedene Feldpositionen, sowohl für aufgereinigtes Protein als auch für AtCry-1 in Sf21-Zellen. Die für eine bestmögliche Anpassung verwendeten Parameter sind in Tabelle 5.2 zusammengefaßt. Die erläuterten Unterschiede zwischen aufgereinigten Proteinproben und Zellen wurden hierbei über eine Verschiebung der isotropen Hyperfeinkopplung des H(1') von  $-0,74$  MHz simuliert. Dadurch können die wesentlichen beobachteten Unterschiede, insbesondere auch die genannten leichten Variationen im RF-Bereich der H(6)- und H( $8\alpha$ )-Kopplungen, quantitativ nachgebildet werden.

Leider muß festgestellt werden, daß es sich als nicht möglich erwiesen hat, alle Merkmale der experimentellen Spektren korrekt zu simulieren. Hierbei sind insbesondere die leichte Verschiebung des Maximums der H( $8\alpha$ )-Kopplung bei Positionen auf der Niederfeldflanke (A) sowie insgesamt fehlende Signalintensität im Bereich der äußeren H( $8\alpha$ )-Schulter bei den Feldpositionen C und besonders D hervorzuheben. Desweiteren sind auch bei Orientierungen parallel zu  $g_{zz}$  (F) nicht durch die Simulation reproduzierte Signalanteile zu erkennen. Diese Befunde sind in Wesentlichen unabhängig davon, ob das AtCry-1 in der Probe als aufgereinigtes Protein oder in Zellen vorlag. Durch Hinzufügen der Kopplung an ein weiteres Proton, beispielsweise einer prominenten Wasserstoffbrückenbindung, welche als breites, anisotropes Signal unter den betrachteten Hyperfeinsignalen liegt, könnten die genannten Diskrepanzen erheblich reduziert werden.

Die Fehler für die in Tabelle 5.2 angegebenen Hyperfeinkopplungen der H( $8\alpha$ ) und H(6) sind mit etwa  $\pm 0,05$  MHz für  $A_{xx}$  bzw.  $A_{yy}$  sowie mit  $\pm 0,02$  MHz für  $A_{zz}$  anzugeben. Für H(1') ist die Genauigkeit der Angabe aufgrund der Überlagerung durch die anderen Signale geringer.  $\Delta A_{zz}$  und  $\Delta A_{xx}$  können auf etwa  $0,1$  MHz sowie  $0,05$  MHz abgeschätzt werden, der angegebene Wert von  $A_{yy}$  dagegen ist kaum belastbar. Eine Veränderung dieses Kopplungsparameters hat nur geringen Einfluß auf das Ergebnis der Simulation, so daß für  $\Delta A_{yy}$  mindestens  $0,2$  MHz anzusetzen sind. Für die angegebene Veränderung der isotropen Hyperfeinkopplung des H(1') beim Übergang von aufgereinigtem Protein zu Zellen wird

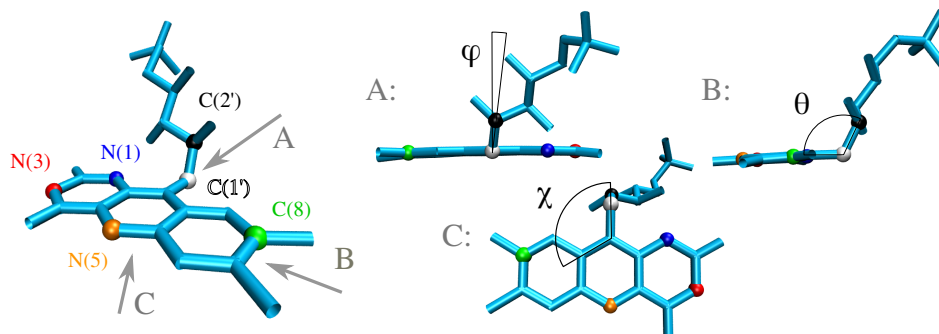




**Abbildung 5.13:** Simulation der W-Band-ENDOR-Spektren für aufgereinigtes AtCry-1 (oben) und überexprimierende Sf21-Zellen (unten) bei verschiedenen Magnetfeldern. Dargestellt ist das experimentelle Spektrum (rot, gestrichelt), die Simulation (schwarz) sowie die einzelnen Anteile an letzterer: H(8α) (blau), H(6) (rot), H(1') (grün), H(5) (grau). Die Buchstaben entsprechen den in Abbildung 5.11 markierten Feldpositionen.

$g$ -Hauptwerte	
$\vec{g} = (2,0043; 2,0037; 2,0022)$	Orientierung: $(-20; 0; 0)^\circ$
Hyperfeinkopplungen	
$A_{\text{H}(8\alpha)} = (7,62; 9,35; 7,66)$ MHz	Orientierung: $(120; 0; 0)^\circ$
$A_{\text{H}(1')} = (6,95; 7,5; 11,45)$ MHz	Orientierung: $(7,6; 96; -3)^\circ$ zus. Linienbr.: 0,3 MHz
$A_{\text{H}(6)} = (5,9; 4,0; 6,06)$ MHz	
$A_{\text{H}(5)} = (10; 25; 37)$ MHz	
$A_{\text{N}(5)} = (5; 5; 50)$ MHz	
$A_{\text{N}(10)} = (1; 1; 27)$ MHz	
ENDOR-Linienbreiten	
$B = B_{\text{max}} - 10 \text{ G}: 0,50 \text{ MHz}$	$B = B_{\text{max}}: 0,42 \text{ MHz}$
$B = B_{\text{max}} + 15 \text{ G}: 0,42 \text{ MHz}$	$B = B_{\text{max}} + 58 \text{ G}: 0,32 \text{ MHz}$

**Tabelle 5.2:** *Verwendete Simulationsparameter für die Anpassung der orientierungselektiven ENDOR-Spektren der aufgereinigten Proteinprobe. Bei nicht angegebenen Orientierungen liegen die Hauptwerte der Hyperfeintensoren parallel zum molekularen Koordinatensystem. Für die Simulation der Messungen an ganzen Zellen wurde die isotrope Hyperfeinkopplung des H(1') um 0,74 MHz verringert.*



**Abbildung 5.14:** Dreidimensionale Struktur des Flavins (links) sowie die drei Projektionen entlang der gekennzeichneten Achsen (A, B, C). Zur Verdeutlichung wurden die untersuchten Winkel,  $\theta$  und  $\chi$  sowie einige Atompositionen farbig eingezeichnet.

der Fehler hauptsächlich durch die Spektren an Position F auf  $\approx 0,02$  MHz eingeschränkt. Wenn allein die auch im X-Band sichtbare Verschiebung der äußeren Schulter betrachtet wird, so ergibt sich ein etwas höherer Fehler von 0,04 MHz.

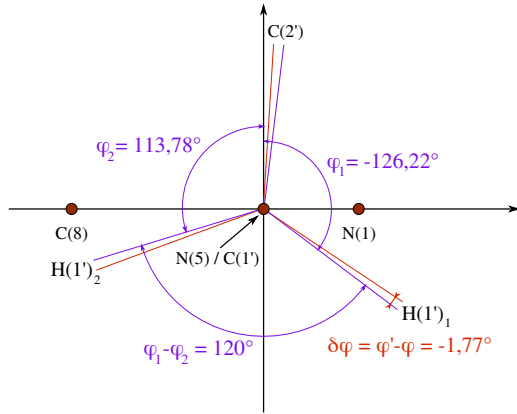
#### 5.4.5 Strukturelle Interpretation der Meßergebnisse

Da außer der Kopplung des ungepaarten Elektrons an die H(1')-Protonen keine auffälligen Unterschiede in den Hyperfeinwechselwirkungen beobachtet werden konnten, kann eine Veränderung der Spindichteverteilung des Elektrons in der Zellprobe ausgeschlossen werden. Ebenfalls als unwahrscheinlich vernachlässigt wird im Folgenden eine Torsion oder Verzerrung des Isoalloxazinringes sowie eine größere strukturelle Veränderung innerhalb der Bindungstasche, da auch in diesen Fällen ein deutlicher Einfluß auf die Protonenkopplungen H(6) und/oder H(8 $\alpha$ ) zu erwarten wäre. Zur Erklärung der spektralen Unterschiede bleiben somit nur noch spezifische Veränderungen in der Geometrie der H(1')-Protonen in Bezug auf die Punkte hoher Elektronendichte.

Die geometrische Situation ist in Abbildung 5.14 veranschaulicht. Im Folgenden werden drei mögliche Reorientierungen im Vergleich zur Kristallstruktur des Proteins vorgestellt, welche die effektive Hyperfeinkopplung des vermessenen Protons verändern:

- Ein Drehung um die Achse C(1')-N(10) (Variation des Diederwinkels  $\varphi = 6,2^\circ$ ).
- Eine Verkippung am Punkt C(1'), also eine Veränderung des Winkels N(10)-C(1')-C(2') (Variation des Kippwinkels  $\theta = 117,87^\circ$ ).
- Eine Verkippung der N(5)-C(1') Verbindungsachse am Angelpunkt N(5) innerhalb der Ebene des Isoalloxazinringes (Variation des Winkels  $\chi = 120,42^\circ$ ).

Diese drei Winkel sind voneinander linear unabhängig und damit geeignet alle möglichen Dimensionen der Verkippung zwischen Isoalloxazinring und Ribitylkette des Flavins abzu-



	Protein	Zellen
$A_{\text{iso},1}$	8,85 MHz	8,11 MHz
$A_{\text{iso},2}$	4,12 MHz	4,72 MHz
$\varphi_1$	-126,22°	-124,44°
$\varphi_2$	113,78°	115,55°
$\delta\varphi$		1,77°

**Abbildung 5.15:** Notwendige Rotation und daraus folgende Einflüsse auf die Hyperfeinkopplung der beiden  $C(1')$ -Protonen, um die beobachtete Verschiebung der äußeren  $H(1')$ -Kopplung zwischen aufgereinigtem Protein (blau) und *Cry-1* in Zellen (rot) mittels einer Veränderung des Diederwinkels  $\varphi$  zu beschreiben.

decken. Eventuell denkbare Stauchungen der Bindung wurden in diesen Untersuchungen vernachlässigt.

### Veränderungen des Diederwinkels $\varphi$

Wie bereits in den 1960er Jahren bei Untersuchungen an strahlengeschädigten Kristallen von Heller und McConnell festgestellt wurde [97], läßt sich der isotrope Anteil der Hyperfeinwechselwirkung für  $\beta$ -Protonen am  $C(1')$  als Funktion des Diederwinkels  $\varphi$  annähern über:

$$A_{\text{iso},i} = C_0 + C_2 \cos^2 \varphi_i \quad (5.1)$$

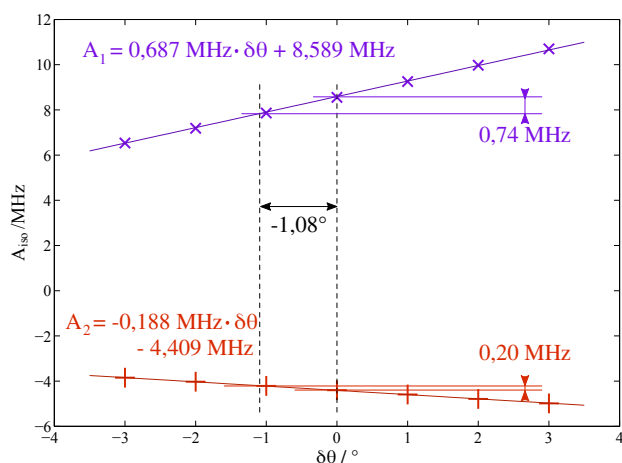
Dabei ist  $\varphi$  der Winkel zwischen der  $C(1')$ - $H^i$ -Bindung und dem  $2p_z$ -Orbital des  $N(10)$ , wenn beide Geraden auf eine Ebene senkrecht zu der  $N(10)$ - $C(1')$ -Bindung projiziert werden (Abbildung 5.15) [97, 98]. Weiterhin konnten theoretische Berechnungen zeigen, daß  $C_0 \ll C_2$  gilt, weshalb  $C_0$  vernachlässigt werden kann, solange der Winkel  $\varphi_i$  nicht zu nahe bei  $90^\circ$  liegt [96]. Die Kopplungen der beiden  $\beta$ -Protonen an  $C(1')$  lassen sich demzufolge miteinander verknüpfen zu:

$$\frac{A_{\text{iso},1}}{A_{\text{iso},2}} = \frac{\cos^2 \varphi_1}{\cos^2 \varphi_2} \quad (5.2)$$

Aus der bekannten Kristallstruktur von *Cry-1* können die entsprechenden Diederwinkel sowie das Verhältnis der isotropen Hyperfeinwechselwirkungen abgeschätzt werden zu:

$$\varphi_1 \approx 126,2^\circ; \quad \varphi_2 \approx -113,8^\circ; \quad \frac{A_{\text{iso},1}}{A_{\text{iso},2}} \approx 2,15$$

Ausgehend von dem in Abschnitt 5.4.4 festgestellten Unterschied von  $A_{\text{iso},1}$  lassen sich nun mit Hilfe der Formeln 5.1 und 5.2 die notwendige Variation des Diederwinkels  $\delta\varphi$  sowie



$\delta\theta$	$A_{\text{iso},1} / \text{MHz}$	$A_{\text{iso},2} / \text{MHz}$
$-3^\circ$	6,23	-3,85
$-2^\circ$	7,19	-4,03
$-1^\circ$	7,86	-4,21
$\pm 0^\circ$	8,55	-4,40
$+1^\circ$	9,25	-4,56
$+2^\circ$	9,97	-4,79
$+3^\circ$	10,70	-4,98

**Abbildung 5.16:** Abhängigkeit der isotropen Hyperfeinkopplung für die beiden Protonen an  $C(1')$  von der Variation des Kippwinkels  $\theta$ . Dargestellt sind zusätzlich die linearen Regressionen der berechneten Punkte und die zum Erhalt der experimentell beobachteten Verschiebung von  $A_{\text{iso},1}$  notwendige Verkippung.

der vor bzw. nach dieser Drehung erwartete isotrope Kopplungswert des *zweiten* Protons an  $C(1')$  berechnen:

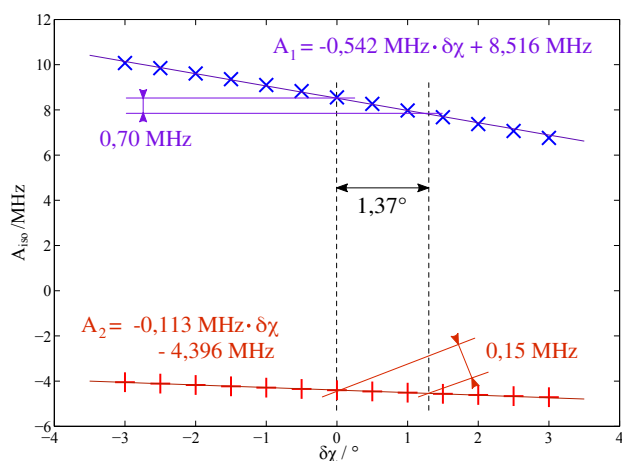
$$\delta\varphi = -1,77^\circ \quad \Delta |A_{\text{iso},2}| = +0,49 \text{ MHz}$$

Die konkreten Werte der Kopplungen und Winkel sowie eine Illustration der geometrischen Situation sind in Abbildung 5.15 zusammengestellt.

### Variation des Kippwinkels $\theta$

Auch eine Variation des Winkels  $\theta$  (siehe Abbildung 5.14) führt zu einer Veränderung der isotropen Hyperfeinkopplung. Diese Einflüsse können jedoch nicht einfach abgeschätzt werden, so daß eine Reihe von dichtefunktionaltheoretischen Berechnungen mit Hilfe des Computerprogrammes **Gaussian** [89] durchgeführt wurden. Dabei wurde die Geometrie des FAD aus der publizierten Kristallstruktur des Cryptochrom-1 als Ausgangspunkt angesetzt, bevor der angegebene Winkel in Schritten von  $1^\circ$  um den „natürlichen“ Wert von  $117,87^\circ$  variiert wurde.

Für die Mehrzahl dieser Strukturen konnte ein vollständiger Satz an ESR-Parametern berechnet werden. Allerdings führte eine Vergrößerung von  $\theta$  um  $\delta\theta > 3^\circ$  zu einem ergebnislosen Abbruch des Programmes, da die notwendigen Konvergenzkriterien zur Berechnung der orbitalen Besetzung nicht erreicht wurden. Wie im Folgenden zu sehen sein wird, ist dies aber unkritisch. Außerdem ist zu beachten, daß die gesamte Proteinumgebung des Kofaktors in der Rechnung vollständig vernachlässigt wurde. Eine systematische Abweichung der ermittelten isotropen Hyperfeinkopplungen von den experimentell bestimmten Werten



$\delta\chi$	$A_{\text{iso},1} / \text{MHz}$	$A_{\text{iso},2} / \text{MHz}$
$-3^\circ$	10,07	-4,05
$-2^\circ$	9,61	-4,17
$-1^\circ$	9,10	-4,29
$\pm 0^\circ$	8,55	-4,40
$+1^\circ$	7,97	-4,51
$+2^\circ$	7,37	-4,61
$+3^\circ$	6,76	-4,71

**Abbildung 5.17:** Abhängigkeit der isotropen Hyperfeinkopplung für die beiden Protonen an C(1') von der Variation des Kippwinkels  $\chi$ . Dargestellt sind zusätzlich die linearen Regressionen der berechneten Punkte und die zum Erhalt der experimentell beobachteten Verschiebung von  $A_{\text{iso},1}$  notwendige Verkippung.

ist somit nicht verwunderlich. Da das Ziel der Untersuchung aber darin liegt, eine Veränderung in den Kopplungsparametern als Funktion von  $\theta$  zu berechnen, ist eine geringe konstante Diskrepanz unerheblich.

In Abbildung 5.16 ist  $A_{\text{iso}}$  als Funktion von  $\delta\theta$  für beide Protonen an C(1') dargestellt. Um die experimentell festgestellte Verschiebung der größeren H(1')-Hyperfeinkopplung von  $\Delta A_{\text{iso},1} = -0,74 \text{ MHz}$  zu simulieren, ist eine Verkippung des Isoalloxazinringes  $\delta\theta$  notwendig, welche im Gegenzug zu einer Verringerung der Kopplung des zweiten H(1') führt:

$$\delta\theta = -1,1^\circ \quad \Delta |A_{\text{iso},2}| = -0,20 \text{ MHz}$$

### Veränderung des Kippwinkels $\chi$

Äquivalent zu dem soeben behandelten Vorgehen bei der Variation von  $\theta$  kann auch die Veränderung des Winkels  $\chi$  gegenüber seinem Kristallstrukturwert von  $\chi = 120,42^\circ$  analysiert werden. Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Abbildung 5.17 zusammengestellt. Die für  $\Delta A_{\text{iso},1} = -0,74 \text{ MHz}$  notwendige Verkippung und die daraus resultierende Veränderung von  $A_{\text{iso},2}$  ergibt sich demnach zu:

$$\delta\chi = +1,37^\circ \quad \Delta |A_{\text{iso},2}| = +0,15 \text{ MHz}$$

### Zusammenfassung

Alle drei betrachteten Reorientierungen sind in der Lage die beobachtete Verschiebung der isotropen Hyperfeinkopplung des „größeren“ H(1') mittels verhältnismäßig kleiner Win-

kelvariationen zu reproduzieren. Allerdings ist festzustellen, daß in jedem Fall auch eine Verschiebung der Kopplung des zweiten H(1') zu erwarten wäre.

Im Falle der Veränderung des Diederwinkels  $\varphi$  beträgt dieser Unterschied mehr als ein halbes Megahertz. Wenn die Anisotropie des zugehörigen Tensors vergleichbar derjenigen für das sichtbare erste H(1') ist, so wird die Verschiebung um rund +0,5 MHz für spektrale Anteile im Bereich von 2 MHz bis 7 MHz erwartet. Eine solche Signalverschiebung ist in den Spektren in Abbildung 5.12 (Seite 83) nicht zu beobachten. Deshalb kann die Veränderung der Verdrehung des Isoalloxazinringes gegenüber der Ribitylkette als alleinige Ursache für die vermessenen Unterschiede innerhalb der ENDOR-Spektren ausgeschlossen werden.

In den Untersuchungen zur Veränderung der Winkel  $\theta$  und  $\chi$  wird eine zusätzliche Verschiebung um  $-0,2$  bzw.  $+0,15$  MHz prognostiziert. Tatsächlich können in den Experimenten kleine Unterschiede im RF-Bereich um 140,5 und 145 MHz festgestellt werden. Allerdings sind diese nur in den Spektren bei  $B_{\max}+15$  G und  $B_{\max}+30$  G nicht allein über die Verschiebung der „äußeren“ H(1')-Kopplung vollständig simulierbar. Wenn in diesem Zusammenhang die generell schwierige Reproduktion der experimentellen Ergebnisse rekapituliert wird, so ist es angebracht festzustellen, daß die postulierte Hyperfeinkopplungsverschiebung des „inneren“ H(1') in den vermessenen Spektren nicht belastbar identifiziert werden kann.

Aufgrund der Unabhängigkeit der drei betrachteten Winkel untereinander (bei kleinen Veränderungen) ist es möglich eine Linearkombination zu finden, bei welcher die Verschiebung der größeren H(1')-Kopplung reproduziert wird und die kleinere Kopplung unverändert bleibt. Da die Einflüsse der behandelten Winkelvariationen aber nicht notwendigerweise orthogonal sind, ist eine anschließende Verifikation des gefundenen Ergebnisses mittels DFT-Berechnungen notwendig. Zur Vereinfachung des Sachverhaltes wird der Diederwinkel  $\varphi = -126,22^\circ$  im Folgenden konstant gehalten.<sup>10</sup> Aus den in Abbildung 5.16 und 5.17 angegebenen Regressionsgeraden lassen sich dann für die Bedingungen

$$\Delta |A_{\text{iso},1}| = -0,74 \text{ MHz} \quad \text{und} \quad \Delta |A_{\text{iso},2}| = 0 \text{ MHz} \quad (5.3)$$

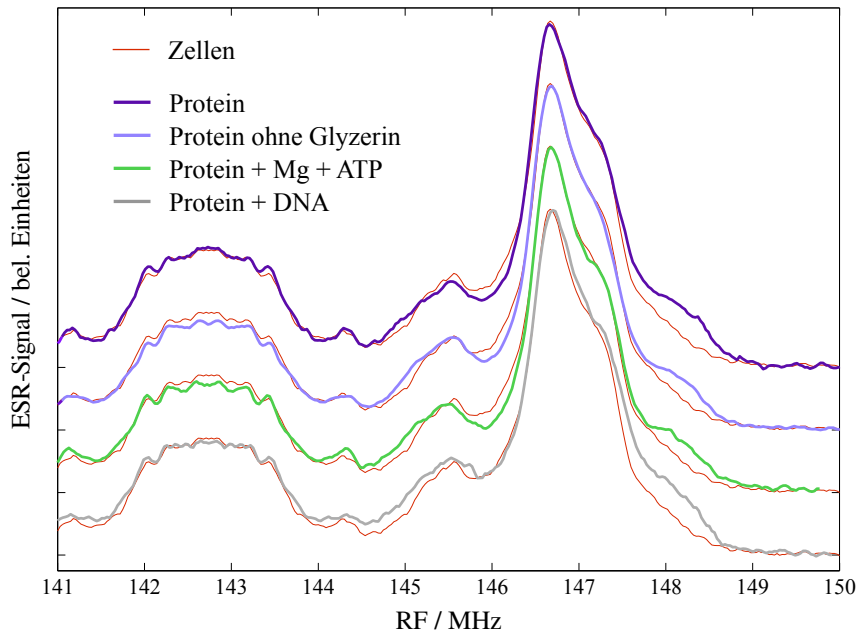
die notwendigen Variationen zu  $\delta\theta = -0,465^\circ$  und  $\delta\chi = 0,776^\circ$  abschätzen.

Berechnungen der Hyperfeinkopplungen mittels **Gaussian** in der Umgebung dieser Werte liefern als beste Übereinstimmung:

$$\begin{array}{rcl} \Delta |A_{\text{iso},1}| & = & -0,740 \text{ MHz} \\ \Delta |A_{\text{iso},2}| & = & 0,004 \text{ MHz} \end{array} \quad \text{unter} \quad \begin{array}{rcl} \delta\theta & = & -0,44^\circ \\ \delta\chi & = & 0,74^\circ \end{array} \quad (5.4)$$

Der Einfluß dieser Reorientierung auf die Hyperfeinkopplungen der anderen beobach-

<sup>10</sup>Dieses Vorgehen wird mit dem erheblichen Einfluß der Variation von  $\varphi$  auf  $A_{\text{iso},2}$  begründet, ist aber insofern etwas problematisch, als daß der Diederwinkel üblicherweise der am wenigsten feste Parameter in derartigen Molekülen ist.



**Abbildung 5.18:** W-Band-ENDOR-Spektren für verschiedene Proben des aufgereinigten Proteins. Alle Spektren wurden bei der Feldposition des Signalmaximums aufgenommen. Zum Vergleich ist das ENDOR-Spektrum einer Ganzzellprobe mit eingezeichnet.

teten Protonen beträgt  $+0,008$  MHz ( $H(8\alpha)$ ),  $-0,03$  MHz ( $H(6)$ ) und  $+0,12$  MHz ( $H(5)$ ). Diese Veränderungen liegen deutlich unterhalb der experimentellen Auflösung. Die soeben diskutierte geometrische Variation ist somit *eine mögliche* Erklärung der vorgestellten Beobachtungen. Darüber hinaus gehende Entscheidungen sind mit den im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich.

#### 5.4.6 Test verschiedenener Hypothesen zur Ursache der Reorientierung

Wenn die beobachteten Unterschiede in den ENDOR-Spektren zwischen aufgereinigtem Protein und ganzen Zellen ihre Ursache in geringfügigen Veränderungen der Konformation des Flavins haben, so ist es von biologischem Interesse die Ursache dieser Veränderung zu ermitteln. Eine Möglichkeit liegt dabei in kleinen globalen Verschiebungen, welche, ausgelöst durch die unterschiedliche Zusammensetzung des umgebenden Mediums, zu geringen Reorientierungen des Flavins führen. Vom physiologischen Standpunkt aus deutlich interessanter ist allerdings eine Verkipfung des Isoalloxazinringes aufgrund der Wechselwirkung mit einem an das Cryptochrom bindenden Substrat. Tatsächlich besitzt Cry-1 eine Bindungstasche, welche in Photolyasen zur Fixierung der zu reparierenden DNA benutzt wird. Diese Tasche endet an dem Kanal, welcher zur Bindungsstelle des FAD führt, so daß der DNA-Schaden in Photolyasen sehr nah am Isoalloxazinring des Flavins zu liegen kommt. Außerdem konnten Weber *et al.* an *E. coli* DNA-Photolyase bereits zeigen,



daß diese Bindung von strahlengeschädigter DNA zu meßbaren Verschiebungen der im ENDOR-Spektrum beobachteten Signale führen kann [99].

Daher ist auch für den hier vorliegenden Fall die Bindung einer niedermolekularen Substanz derart vorstellbar, daß eine entsprechende Verdrehung des Flavins erfolgt. Die Bindung eines größeren Objektes, wie beispielsweise eines anderen Proteins, erscheint insofern unwahrscheinlich, als daß ein Vordringen dieses Objektes bis zu dem Kofaktor aufgrund der Dimensionen des Zugangskanals fragwürdig ist.<sup>11</sup>

Von AtCry-1 ist eine Bindung von ATP (unter Anwesenheit von Mg) bekannt [33,67,68] und auch eine schwache Bindung von DNA-Fragmenten konnte beobachtet werden [70]. Deshalb wurde das ENDOR-Spektrum an der Feldposition des Signalmaximums für Proteinproben mit 1 mM  $\gamma$ -ATP und 2 mM  $Mg^{2+}$  bzw. mit 133  $\mu$ M DNA-Fragmenten<sup>12</sup> mit demjenigen des reinen Proteins verglichen. Außerdem wurde der Einfluß von Glycerin auf das ENDOR-Spektrum untersucht. Da eine erhebliche Verzerrung der orientierungsabhängigen Relaxationszeiten des Radikals durch Glycerin beobachtet wurde (siehe Abschnitt 5.4.2), wäre eine Modifikation der vermessenen ENDOR-Spektren bei Anwesenheit von Glycerin denkbar. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 5.18 gezeigt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß weder die Abwesenheit von Glycerin noch die Bindung von ATP oder DNA für die Verschiebung der H(1')-Kopplung in Zellen verantwortlich ist.

---

<sup>11</sup>Eine Protein-Protein-Bindung, welche die globale Struktur des Cryptochroms genau so verschiebt, daß der FAD-Kofaktor die vorgeschlagene Verkippung durchführt, ist natürlich ebenfalls denkbar, entsprechende Untersuchungen würden aber den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

<sup>12</sup>Einsträngige, unbeschädigte DNA-Fragmente mit jeweils 12 zufälligen Nukleotiden. In den biochemischen Bindungsexperimenten konnte kein Unterschied zwischen normaler und strahlungsgeschädigter DNA beobachtet werden [70].

# Kapitel 6

## Untersuchungen zum Elektronentransfer mittels transienter ESR-Spektroskopie

### 6.1 Überblick

Mit Hilfe der transienten ESR ist es grundsätzlich möglich auftretende paramagnetische Spezies mit einer Zeitauflösung von etwa 10 ns zu detektieren. Mit dem hier genutzten Aufbau lag die zeitliche Auflösung in der Größenordnung von  $\sim 500$  ns. Während das vorherige Kapitel der Untersuchung des (physiologisch auf der Minutenzeitskala) stabilen Flavinderadikals gewidmet ist, liegt der Fokus des folgenden Abschnittes auf der Analyse des Dublettpaarzustandes, welcher mit der Bildung des FADH $\bullet$ -Radikals verknüpft ist. Den durchgeführten Experimenten lagen dabei folgende Fragestellungen zu Grunde:

- Existiert in AtCry-1 ein hinreichend spinpolarisiertes Dublettpaar/Radikalpaar, um es mittels transienter ESR zu detektieren? Wenn ja, welche Lebensdauer besitzt die Spinpolarisation und auf welcher Zeitskala wird das Paar gebildet?
- Wie läßt sich ein beobachtetes Radikalpaarspektrum interpretieren? Insbesondere: Welche Partner können zugeordnet werden?
- Ist es möglich ein Modell des sequenziellen Elektronentransfers aufzustellen? Welche Implikationen für die Funktionsweise des Proteins als Lichtrezeptor lassen sich daraus ableiten?

In einem ersten Schritt wurde dazu isoliertes Protein des AtCry-1-Wildtyps bei verschiedenen Temperaturen vermessen (Abschnitt 6.2). Um die Rolle einzelner Aminosäuren während des Elektronentransfers zu isolieren, erfolgte danach eine Untersuchung zweier Mutantanten des Proteins, bei denen jeweils ein Tryptophan in der potentiellen Elektronentransferkette ersetzt wurde (Abschnitt 6.3). Nach der Darstellung der Meßergebnisse bildet der Vorschlag einer Interpretation der Beobachtungen den Abschluß des Kapitels.

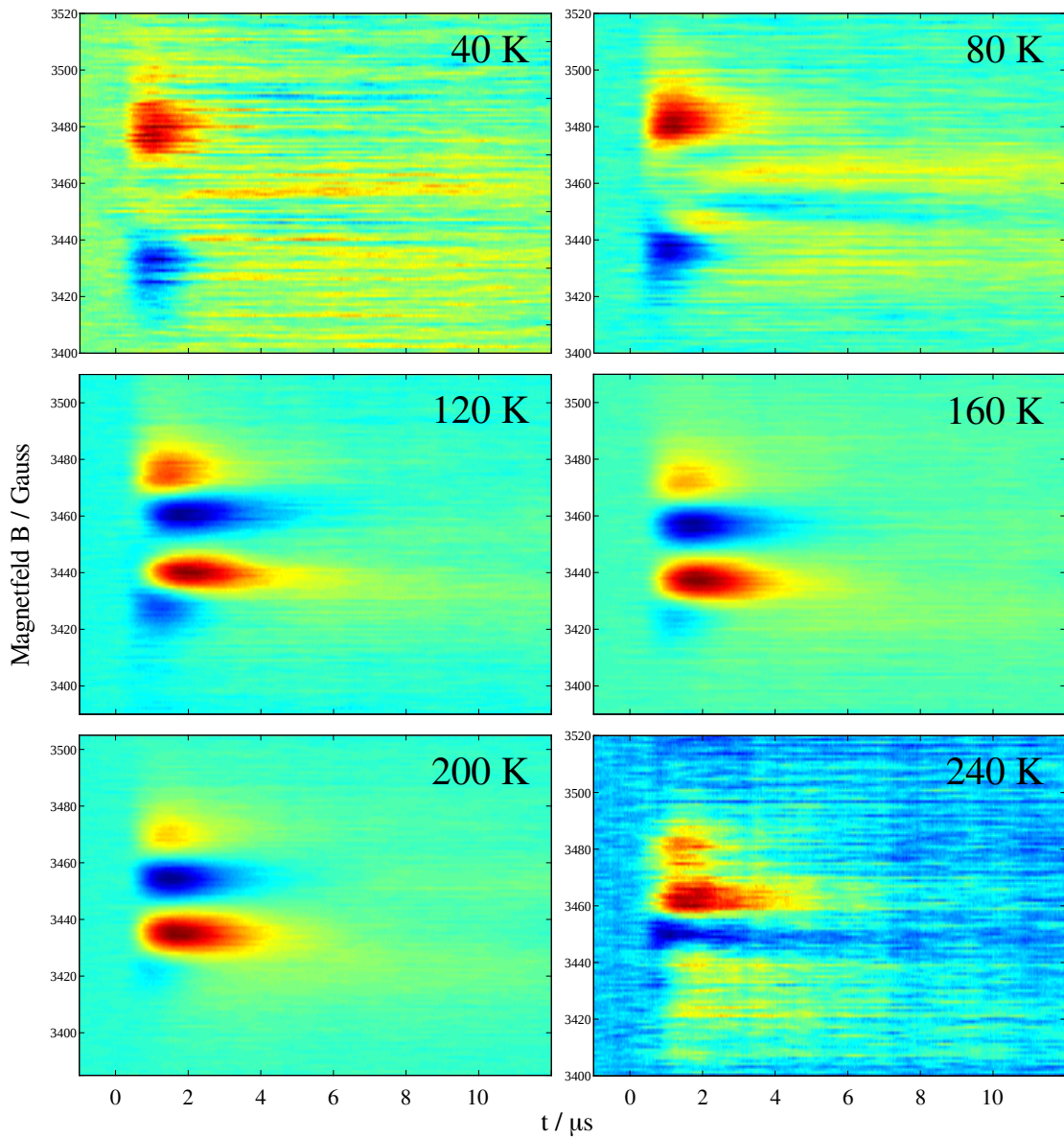
## 6.2 Transiente ESR-Messungen an Wildtyp-AtCry-1

Das mit Oxidationsmittel und Gefrierschutz versehene (siehe Abschnitt 4.1.2) AtCry-1-Protein wurde bei acht verschiedenen Temperaturen zwischen 40 K und 274 K untersucht. Die Spektren der Messungen zwischen 40 K und 200 K sind in Abbildung 6.1 gezeigt. Da es nicht möglich war ein ESR-Signal des Dublett-paares in flüssiger Lösung zu detektieren, können keine Ergebnisse für die Untersuchung bei 260 K und 274 K vorgestellt werden. Diese ist erstaunlich, weil bereits transiente Raumtemperatur-ESR-Messungen an strukturell sehr ähnlichen Photolyasen [62] und DASH-Cryptochromen [36,64] publiziert wurden. In diesem Zusammenhang ist zu betonen, daß die Probe aufgrund der Zugabe von 20% Glycerin bereits bei etwa 240 K zu schmelzen beginnt.

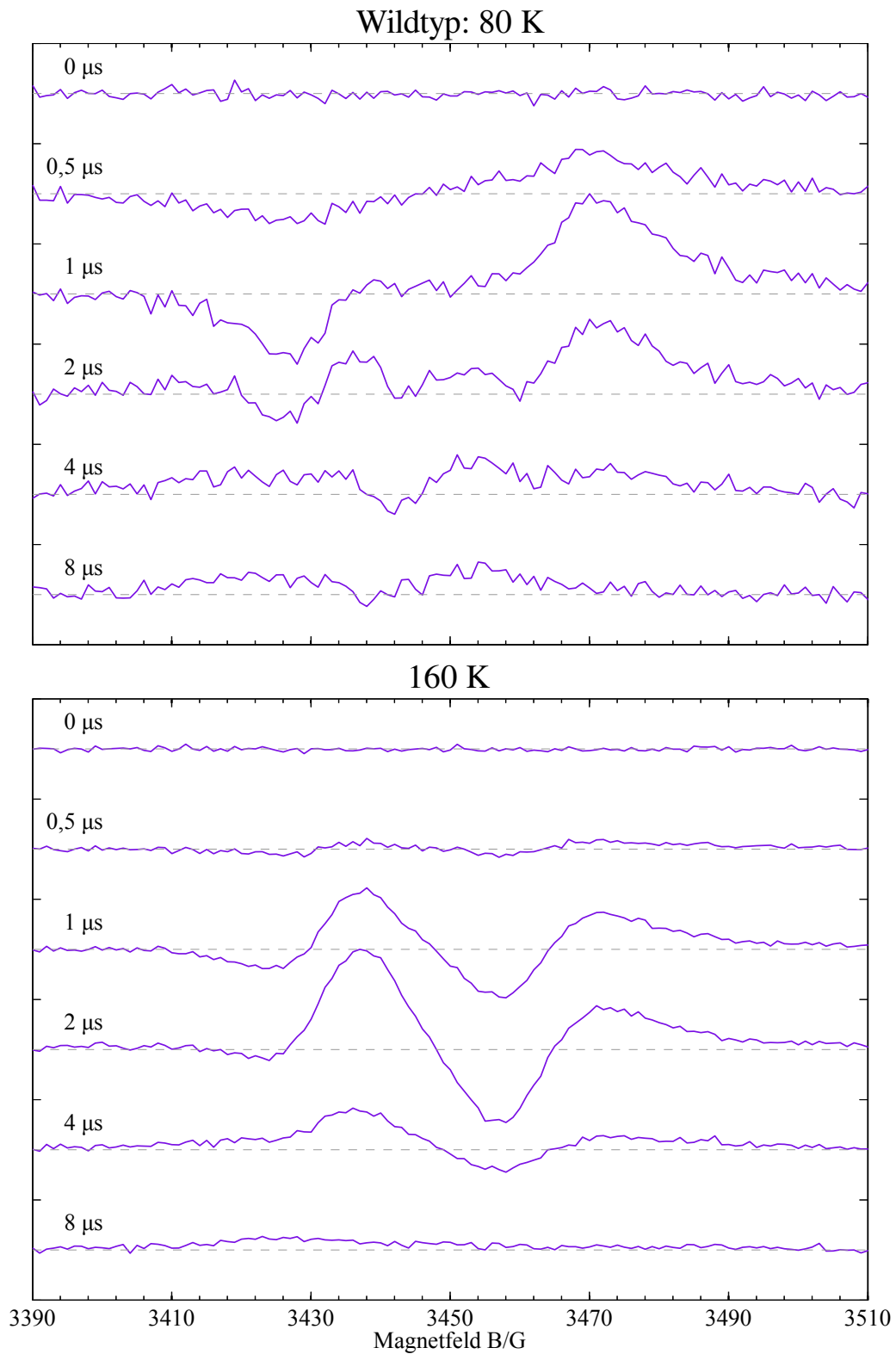
Zur besseren Veranschaulichung der im Folgenden zusammengefaßten Eigenschaften der Spektren sind exemplarisch für die Messungen bei 80 K und 160 K in Abbildung 6.2 entsprechende zweidimensionale Schnitte in Richtung der Magnetfeldachse zu verschiedenen Zeiten nach dem Laserpuls aufgetragen. Dabei zeigt sich, daß die Basislinie des Spektrums bei 80 K mit leicht positivem Anstieg geneigt vorliegt. Zur Diskussion dieser Beobachtung siehe die Ausführungen zum Flavintriplett in Abschnitt 6.3 auf Seite 106.

Die dargestellten Spektren zeigen zwei auffällige spektrale Charakteristiken mit jeweils entgegengesetztem Polarisationsmuster. Einerseits existiert ein Anteil mit einem Abstand zwischen Emissions- und Absorptionsmaximum von etwa 44 G, bei welchem die induzierte Emission auf der Niederfeldseite auftritt. Andererseits ist ein Signal mit einer Aufspaltung der Maxima von 20 G, in dem die Absorption bei niedrigeren Feldern beobachtet wird, zu erkennen. Beide Spektren sind annähernd um ein gemeinsames Zentrum bei  $g \approx 2,003$  positioniert. Es fällt auf, daß derjenige Anteil mit der größeren Aufspaltung bereits bei niedrigeren Temperaturen sichtbar ist, während die zweite Komponente in den Messungen bei 40 K bzw. 80 K kaum beobachtet werden kann. Mit fortlaufender Erwärmung der Probe verschiebt sich das Verhältnis der Signalintensitäten jedoch zugunsten des Anteiles mit kleinerer Aufspaltung, wobei die Messung bei 240 K aufgrund des dort einsetzenden Phasenüberganges eine Sonderstellung einnimmt.

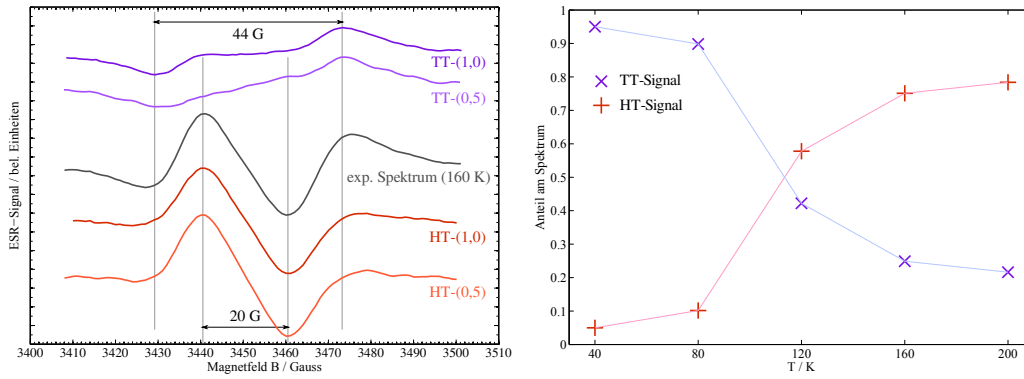
Neben diesen beiden dominanten Signalen, kann ein zusätzlicher kleiner Effekt im Spektrum bei 80 K beobachtet werden: In diesem Datensatz findet sich ein weiteres Signal, das im Feldbereich zwischen 3450 G und 3470 G auftritt. Dies ist in etwa die selbe Region, in welcher bei höheren Temperaturen das bereits angesprochene, auffällige A/E-Muster vorliegt. Allerdings zeigt das Teilsignal bei 80 K gegenüber diesem einige Unterschiede: Erstens wird sein Auftreten erst bei Zeiten oberhalb von etwa 3,5  $\mu$ s beobachtet, zweitens ist die Polarisation derjenigen des inneren Spektrums bei höheren Temperaturen entgegengesetzt und drittens ist die vorliegende Aufspaltung um rund ein Drittel kleiner als 20 G. Ein ähnlicher Beobachtung ist ebenfalls in dem Spektrum bei 240 K festzustellen. Auch dort hat sich die Phase der zentralen Komponente im Vergleich zu den Messungen bei 120 K bis 200 K



**Abbildung 6.1:** *Transiente ESR-Spektren des Wildtyp-AtCry-1 für verschiedene Temperaturen. Für  $T > 240$  K konnte kein Signal beobachtet werden, grundlegende Veränderungen im Bereich des Phasenüberganges von fest nach flüssig zeigen sich bereits im Spektrum für 240 K (unten rechts). Die Messung bei 260 K und 274 K zeigen keinerlei Signal und sind daher hier nicht wiedergegeben.*



**Abbildung 6.2:** *Transiente ESR-Spektren des Wildtyp-AtCry-1 für verschiedene Wartezeiten nach dem Laserblitz für 80 K (oben) und 160 K (unten). Die dargestellten Graphen entsprechen Schnitten des zweidimensionalen Teppichs in Richtung der Magnetfeldachse.*



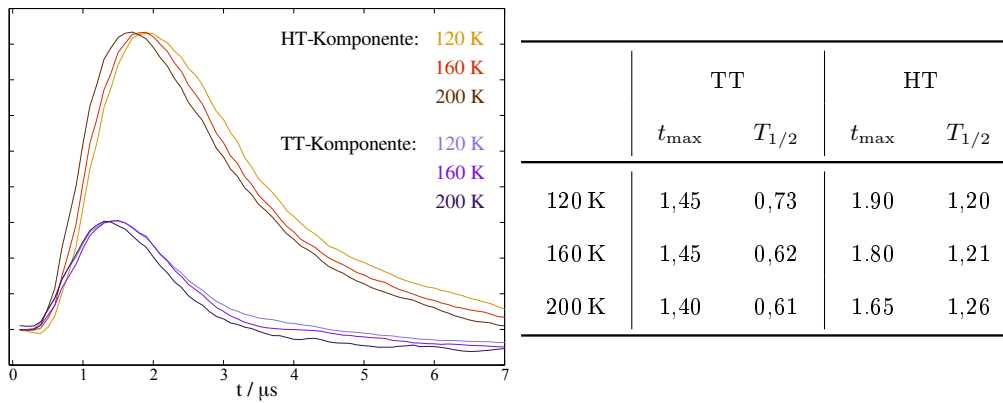
**Abbildung 6.3:** Spektrale Komponenten des transienten ESR-Spektrums des AtCry-1-Wildtyps. Links: ESR-Spektrum 1  $\mu$ s nach dem Laserblitz (schwarz) sowie seine Aufspaltung in ein Tieftemperatursignal (TT; blau) und ein Hochtemperatursignal (HT; rot). Es wurden zwei unterschiedliche Aufspaltungen durchgeföhrt; die Zahl hinter dem Bezeichner gibt die Wartezeit nach der Beleuchtung (in  $\mu$ s) zur Isolation des TT-Spektrums an. Rechts: Anteile des TT- bzw. HT-Spektrums am Gesamtsignal 1,5  $\mu$ s nach dem Laserblitz für verschiedene Temperaturen.

scheinbar umgedreht und die Aufspaltung ist etwas reduziert. Aufgrund der zu geringen Signalintensität erfolgt in der vorliegenden Arbeit keine nähere Analyse dieser spektralen Komponente, im Rahmen der Interpretation der Ergebnisse wird jedoch auf die Existenz dieses bei 80 K schwach und verzögerten, bei 240 K dominierenden Signals zurückgegriffen werden.

### 6.2.1 Isolation der spektralen Anteile

Wie soeben festgestellt wurde, lassen sich in den in Abbildung 6.1 bzw. 6.2 dargestellten Meßergebnissen zwei dominante spektrale Komponenten feststellen. In Abbildung 6.3 ist die Isolation dieser beiden Anteile zu sehen. Dabei wurde das ESR-Signal der Messung bei 80 K als *Tieftemperatursignal* (TT) übernommen, während sich das korrespondierende *Hochtemperatursignal* (HT) als Differenz aus dem 160 K-Spektrum (1,5  $\mu$ s nach der Lichtanregung) und dem skalierten TT-Signal ergibt.<sup>1</sup> Trotzdem ist die Isolation der beiden Anteile nicht eindeutig: Die genauere Betrachtung der Meßergebnisse für 80 K, kurz nach dem Lichtblitz, führt zu der Erkenntnis, daß ein Unterschied in der Form des Spektrums zwischen  $t = 0,5 \mu$ s und  $t = 1,0 \mu$ s besteht. Eine Bewertung dieses Sachverhaltes erfolgt im Abschnitt zur Analyse der Einzelkomponenten (6.2.2), vorerst ist es aber notwendig eine Fallunterscheidung durchzuführen. Deshalb sind in der Abbildung jeweils zwei mögliche Spektren für jede der beiden Komponenten dargestellt: Die angehängte Zahl bezeichnet

<sup>1</sup>Eine Verwendung des 40 K-Spektrums zur Bestimmung des TT-Signals führt zu den gleichen Resultaten, allerdings mit deutlich schlechterem Signal/Rausch-Verhältnis.



**Abbildung 6.4:** Zeitverhalten der beiden Komponenten (*TT* und *HT*) für verschiedene Temperaturen. Links: Darstellung der Anteile der Einzelkomponenten am gemessenen Signal als Funktion der Zeit nach dem Laserblitz. Die Graphen wurden zur besseren Vergleichbarkeit für jede Komponente auf jeweils gleiche Höhen skaliert. Rechts: Zusammenfassung der Zeiten des Signalmaximums sowie der Halbwertszeit des Signalabfalls. Alle Angaben in  $\mu\text{s}$ .

die Wartezeit nach der Lichtanregung, für welche das *TT-Spektrum* isoliert wurde.<sup>2</sup>

Im Folgenden wird davon ausgegangen, daß diese beiden Komponenten zu zwei verschiedenen Dublettpaaren gehören, von denen ein Partner jeweils das Flavinradikal ist. Außer durch das unterschiedliche Temperaturverhalten wird dieser Ansatz auch durch die Kinetiken der Signale gerechtfertigt. Während das Signalmaximum des *TT-Spektrums* bereits etwa  $1,45 \mu\text{s}$  nach der Lichtanregung auftritt, wird das Maximum des *HT-Signals* erst  $0,25$  bis  $0,45 \mu\text{s}$  später beobachtet (Abbildung 6.4) und die Konstanten der Signalabfälle variieren etwa um einen Faktor 2.

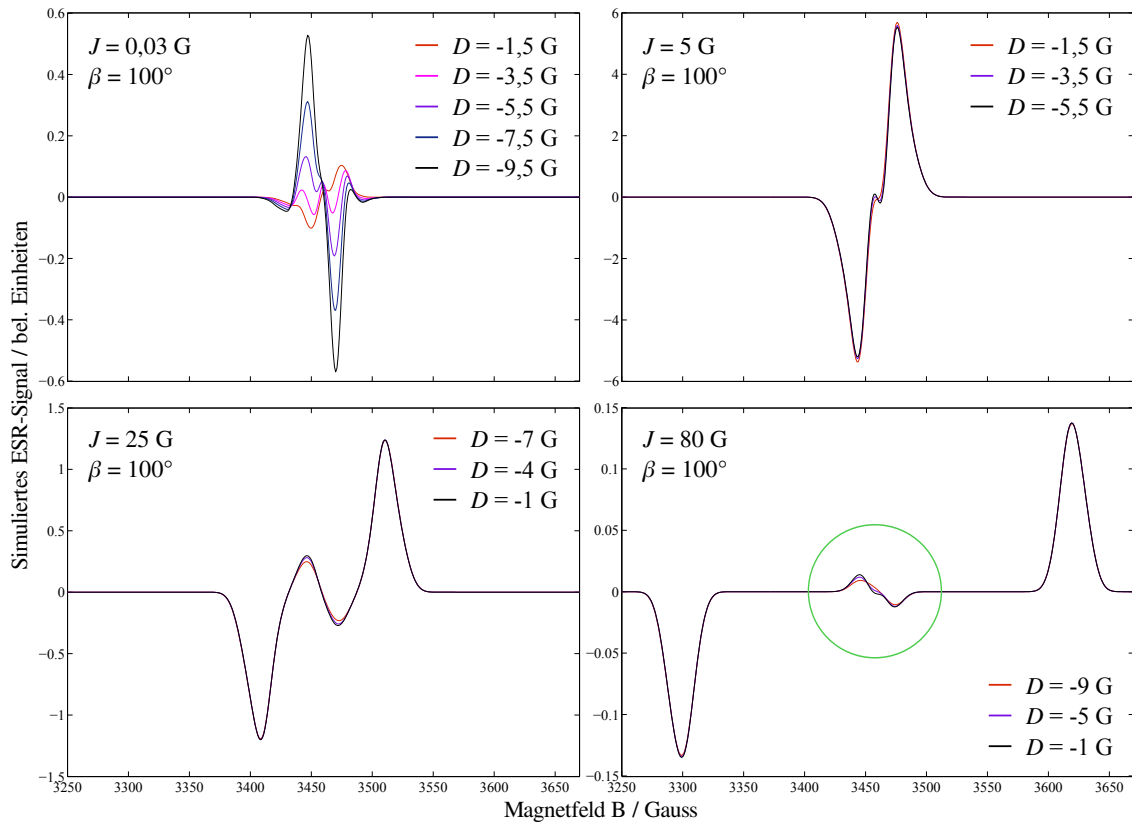
## 6.2.2 Analyse und Simulation der spektralen Komponenten

### Voruntersuchungen

Der Radikalpaarpartner des Flavins wird aufgrund der beobachteten Form des Spektrums sowie der publizierten Ergebnisse für *AtCry-1* und andere Proteine der Familie einem Tryptophan zugeordnet [3, 36, 37, 62–64].<sup>3</sup> Desweiteren gehen alle folgenden Betrachtungen von einer Erzeugung des Dublettpaars aus dem Singulettzustand des Flavins aus [46, 47]. Nachdem die Hauptwerte der *g*-Matrix und die wesentlichen Hyperfeinkopplungen für das Flavin- und Tryptophanradikal bekannt sind (siehe Abschnitt 2.2.4), und die Orientierung der beiden Radikalpaarpartner zueinander keinen im Rahmen der Meßauflösung beobachtbaren Einfluß auf die spinpolarisierten Spektren hat, bleiben als zu untersuchende

<sup>2</sup>Das *HT-Spektrum* berechnet sich daraus wie zu Beginn des Absatzes beschrieben.

<sup>3</sup>Zur Diskussion der von Brettel *et al.* veröffentlichten Beobachtung eines *Tyrosin*-Radikals in *AtCry-1* siehe Abschnitt 7.3 auf Seite 124.



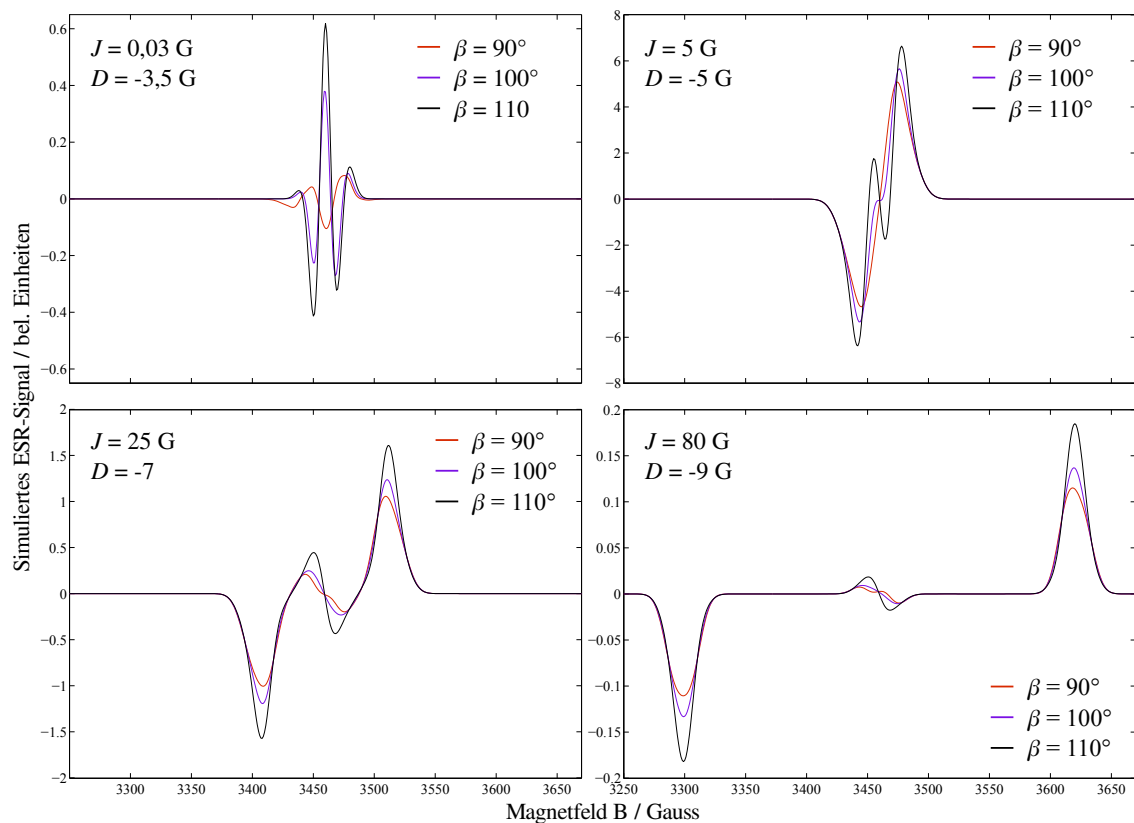
**Abbildung 6.5:** Simulationen zur Abhängigkeit des spinpolarisierten Dublettpearspektrums von  $J$  und  $D$ . Der Winkel  $\beta$  beträgt in allen Simulationen  $100^\circ$  (Position des energetischen Minimums laut [71]). Bei großen Werten der Austauschwechselwirkung ist die Höhe der dipolaren Kopplung nahezu irrelevant für das zu erwartende Spektrum, während bei sehr kleinen  $J$ -Kopplungen eine entsprechende Wahl von  $D$  sogar zu einer Verschiebung des Polarisationsmusters ( $E/A \rightarrow A/E$ ) führt (links oben). Im Falle sehr großer Austauschkopplungen kann im Zentrum des Spektrums ein scheinbar isoliertes Teilsignal beobachtet werden (rechts unten, markiert). Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen der Ordinaten.

Größen hauptsächlich die Werte der dipolaren Wechselwirkung  $D$  und der Austauschwechselwirkung  $J$  übrig. Darüber hinaus ist der Einfluß des Winkels  $\beta$ , des Diederwinkels der  $\beta$ -Protonen des Trp, zu analysieren. Letzteres ist notwendig, da die Hyperfeinkopplung der entsprechenden Protonen *erheblich* von diesem Parameter abhängt (vergleiche dazu Abbildung 2.10 auf Seite 18 bzw. [71]).

Die Abbildungen 6.5 und 6.6 zeigen einige simulierte Spektren zur Illustration der auftretenden Abhängigkeiten. Es wird deutlich, daß der Einfluß von  $D$  für größere  $J$  schnell vernachlässigbar wird.<sup>4</sup> In diesem Zusammenhang sind auch die bekannten Abstandsabhängigkeiten für die dipolare Wechselwirkung ( $\sim 1/r^3$ ) und die Austauschkopplung ( $\sim e^{-\beta r}$ ) zu beachten: Für reduzierte Abstände  $r$  der beiden Radikalpaarpartner wächst  $J$  sehr viel

<sup>4</sup>Dies wird bereits bei der Betrachtung der Gleichung 3.49 auf Seite 37 klar.





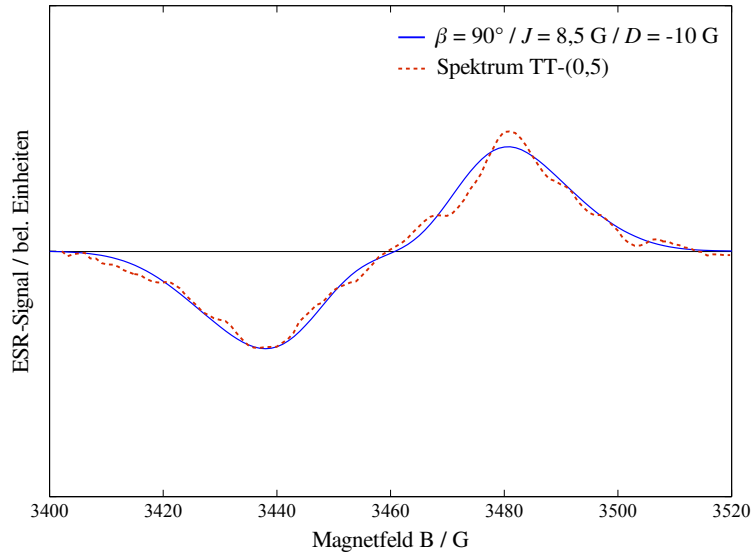
**Abbildung 6.6:** Simulationen zur Abhängigkeit des spinpolarisierten Dublettpaarspektrums von  $J$  und  $\beta$ . Wie bereits aus der Darstellung der Hyperfeinkopplungen als Funktion des Diederwinkels (Abbildung 2.10 auf Seite 18) deutlich wird, sind die simulierten Spektren symmetrisch um  $\beta \approx 90^\circ$ , weshalb darauf verzichtet wurde Ergebnisse für kleinere Winkel darzustellen.

schneller als  $D$ , so daß der Wert der dipolaren Kopplung für  $r \lesssim 16 \text{ \AA}$  keinen relevanten Einfluß auf das beobachtete Spektrum mehr hat (Abbildung 6.5).<sup>5</sup> Demgegenüber weisen die Simulationen unabhängig von anderen Parametern immer eine deutliche Sensitivität gegenüber dem Winkel  $\beta$  auf, da die Kopplungen der beiden  $H(\beta)$ -Protonen im Allgemeinen über der experimentellen Linienbreite liegen. Diese Abhängigkeit manifestiert sich im Wesentlichen in der Höhe (und damit auch der Halbwertsbreite) der äußeren Signalanteile und dem „Durchschwingen“ des Signals im Zentrum des Spektrums.

### Tieftemperatursignal

Die deutliche Aufspaltung zwischen emissiven und absorptiven Signalbeiträgen in der TT-Komponente erzwingt die Annahme einer erheblichen  $J$ -Kopplung ( $>7 \text{ G}$ ), der Einfluß der

<sup>5</sup>Für  $r = 16 \text{ \AA}$  folgt aus der Punktdipolnäherung  $D = -6,8 \text{ G}$  während  $J$  auf  $> 10 \text{ G}$  abgeschätzt werden kann [28].

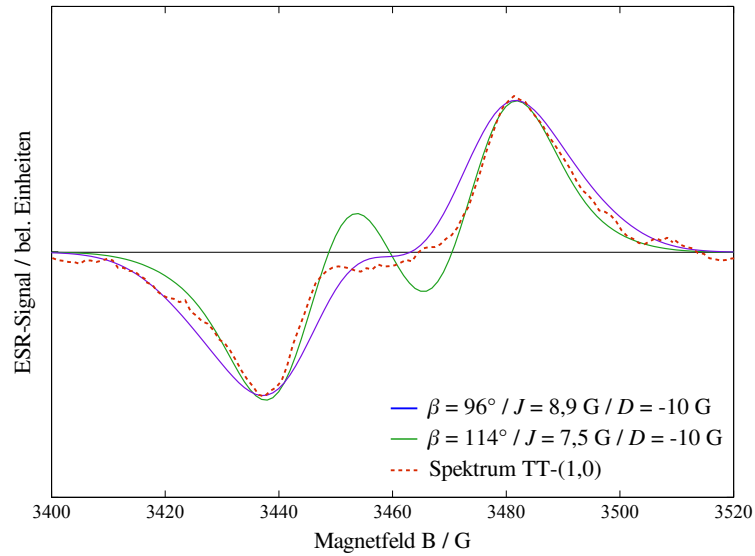


**Abbildung 6.7:** Simulation des Spektrums  $TT-(0,5)$  mit den angegebenen Werten für  $J$ ,  $D$  und  $\beta$ . Alle restlichen Parameter ( $g$ ,  $A$ ) entsprechen der Zusammenstellung in Abschnitt 2.2.4. Die räumliche Orientierung der Radikalpaarpartner zueinander wurde aus der Kristallstruktur entnommen (FAD bzw. W377), hat aber keinen meßbaren Einfluß auf das Ergebnis. Für Abstände und daraus folgende dipolare Kopplungen gemäß der Punktdipolnäherung siehe Tabelle 6.1 auf Seite 115.

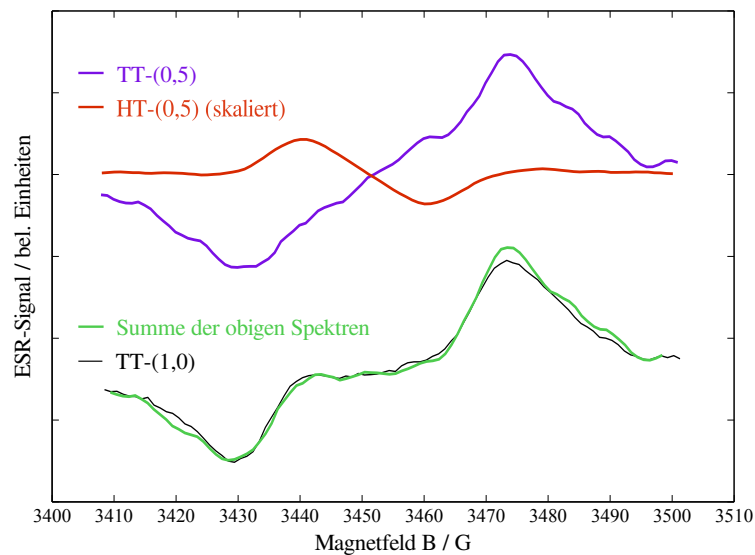
dipolaren Wechselwirkung ist somit klein.<sup>6</sup> In Abbildung 6.7 und 6.8 ist der Versuch einer Simulation der beiden möglichen Tieftemperaturspektren gezeigt. Während  $TT-(0,5)$  gut nachgebildet werden kann, ist es nicht möglich die Signalform in  $TT-(1,0)$  korrekt zu reproduzieren. Abhängig von der konkreten Wahl des Parameters  $\beta$  ergibt sich bei gegebenem Abstand der beiden Maxima entweder ein charakteristisches (aber nicht beobachtetes) Polarisationsmuster (E/A/E/A) oder die Halbwertsbreite und Form der einzelnen Signale bei 3430 G bzw. 3475 G unterscheidet sich deutlich von derjenigen des experimentellen Spektrums.

Aus diesen Betrachtungen muß gefolgert werden, daß  $TT-(0,5)$  und *nicht*  $TT-(1,0)$  das physikalisch korrekte Einzelspektrum darstellt. Da es auf der anderen Seite einfach möglich ist  $TT-(1,0)$  als Linearkombination von  $TT-(0,5)$  und  $HT-(0,5)$  darzustellen (siehe Abbildung 6.9) und aus Abbildung 6.2 (rechts) deutlich wird, daß selbst für die Spektren bei 40 K und 80 K ein nicht verschwindender Anteil des Hochtemperatursignals existiert, ist es naheliegend anzunehmen, daß bereits eine Mikrosekunde nach dem Laserblitz eine Überlagerung der beiden Komponenten vorliegt. Im Folgenden wird daher nur noch von einem

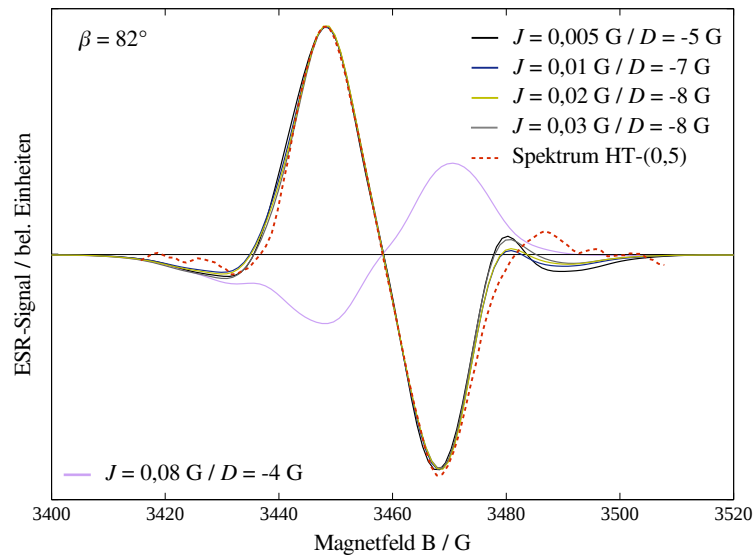
<sup>6</sup>Zwar ist es ebenfalls möglich einen solchen Effekt über große dipolare Kopplungen nachzubilden, aber aufgrund der Abstandsabhängigkeit für  $D$  bzw.  $J$  und der Größenordnung der vermessenen Aufspaltung ( $\sim 40$  G) muß der Abstand  $r$  in jedem Fall derart gewählt werden, daß die Austauschwechselwirkung dominiert.



**Abbildung 6.8:** Versuch der Simulation des Spektrums  $TT-(1,0)$  mit den angegebenen Werten für  $J$ ,  $D$  und  $\beta$ . Alle restlichen Parameter ( $g$ ,  $A$ ) entsprechen der Zusammenstellung in Abschnitt 2.2.4. Die räumliche Orientierung der Radikalpaarpartner zueinander wurde aus der Kristallstruktur entnommen (FAD bzw. W377), hat aber keinen meßbaren Einfluß auf das Ergebnis. Von den beiden vorgestellten Simulationen wird keine als korrekt betrachtet, da entweder die Halbwertsbreite der Signale oder der zentrale Bereich nicht einmal annähernd korrekt reproduziert wird.



**Abbildung 6.9:** Darstellung von  $TT-(1,0)$  als Linearkombination von  $TT-(0,5)$  und  $HT-(0,5)$ .



**Abbildung 6.10:** Simulation des Hochtemperaturspektrums. Im Rahmen der Meßungenauigkeit lassen sich  $J$  und  $D$  nur grob abschätzen, wie die unterschiedlichen Simulationen mit den verzeichneten Werten verdeutlichen. Die Kurve für  $(J = 0,08 \text{ G}; D = -4 \text{ G})$  verdeutlicht die Phasenumkehr der Signale bei kleinen Variationen der Parameter (vergleiche dazu auch Abbildung 6.5 auf Seite 100). Alle nicht angegebenen Parameter ( $g, A$ ) entsprechen der Zusammenstellung in Abschnitt 2.2.4. Die räumliche Orientierung der Radikalpaarpartner zueinander wurde aus der Kristallstruktur entnommen (FAD bzw. W379), hat aber keinen sichtbaren Einfluß auf das Ergebnis. Für Abstände und daraus folgende dipolare Kopplungen gemäß der Punktdipolnäherung siehe Tabelle 6.1 auf Seite 115.

TT- oder HT-Signal die Rede sein, gemeint ist in jedem Fall TT-(0,5) bzw. HT-(0,5).

### Hochtemperatursignal

Um die im Vergleich zu Photolyasen ungewöhnliche Polarisation des HT-Signals (Absorptionsmaximum im Niederfeldbereich, Emission bei höheren Feldern) zu simulieren ist eine Reihe von Ansätzen denkbar:

- Wenn der Vorläuferzustand des Dublettpears nicht als Singulett sondern als Triplett vorliegt, so dreht sich die Polarisation der beobachteten Übergänge in erster Näherung um. Dies gilt nur unter der Annahme einer Gleichverteilung der Population der Triplettenergieniveaus exakt (Abschnitt 3.5), welche unter den vorherrschenden Bedingungen  $(T, B_0)$  nicht gerechtfertigt ist.<sup>7</sup> Doch selbst unter Vernachlässigung dieses

<sup>7</sup>Da das angeregte Flavin als Vorläufer des untersuchten Dublettpears im Singulettzustand erzeugt wurde und die Spin-Gitter-Relaxation des Systems bei den betrachteten Temperaturen in der Größenordnung einiger hundert Mikrosekunden liegt, das beobachtete Signal aber bereits unter  $2 \mu\text{s}$  nach der optischen Anregung auftritt, müßte ein möglicher Triplettzustand des Dublettpears zum Zeitpunkt der Messung noch stark spinpolarisiert, also weit entfernt von einer Gleichverteilung, vorliegen.

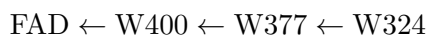
Einwandes spricht auch die gleichzeitige Beobachtung des HT-Signals zusammen mit dem TT-Spektrum gegen die Hypothese eines spinkorrelierten Radikalpaars im Triplet: Es ist unwahrscheinlich, daß die beiden zeitlich stark überlappenden Signale TT und HT aus verschiedenen Vorläuferzuständen entstammen.

- Für sehr große Austauschkopplungen ist ein Verschwinden der Hauptkomponenten des Signals aus dem vermessenen Feldbereich denkbar. In diesem Fall zeigt die Simulation, daß die im Zentrum des Spektrums verbleibenden Anteile eine zu den Hauptmaxima entgegengesetzte Polarisation aufweisen (Abbildung 6.5; rechts unten). Demgegenüber sind zwei Argumente zu bedenken: Erstens ist auch bei der Messung über einen weiten Feldbereich von 2600 G bis 4400 G kein weiteres Signal zu sehen (Abbildung 6.14) und zweitens liegt die Intensität der erwarteten „inneren“ Komponenten bei noch größeren Aufspaltungen um mindestens zwei bis drei Größenordnung unter derjenigen der Hauptmaxima bei kleinen Austauschkopplungen. Möglicherweise ist  $J$  tatsächlich so groß, daß die dominanten Anteile des Spektrums erst bei Feldern unter 2600 G bzw. über 4400 G auftreten, angesichts des insgesamt verhältnismäßig schwachen Signals dürften die zentralen spektralen Anteile dann aber nicht meßbar sein, wenn das vorhandene Rauschniveau berücksichtigt wird.
- Sofern  $J$  deutlich kleiner als  $D$  ist, tauschen die emissiven und absorptiven Anteile ebenfalls ihre Position. Dies wird leicht aus den in der Einleitung angegebenen Beziehungen klar (siehe Gleichung 3.49 auf Seite 37); Abbildung 6.5 (links oben) auf Seite 100 veranschaulicht diesen Effekt. Wegen der unterschiedlichen Abstandsabhängigkeit der beiden Kopplungen ist es theoretisch möglich solche Positionen von FAD und Trp zu konstruieren, bei denen diese Bedingung erfüllt ist.

Als einzig plausible Möglichkeit soll nun der im dritten Punkt skizzierte Gedankengang umgesetzt werden. In Abbildung 6.10 ist die Simulation des HT-Spektrums zusammen mit den dafür verwendeten Parametern dargestellt. Hierbei zeigt sich die Unmöglichkeit der definitiven Bestimmung von  $J$  oder  $D$  bei dem vorliegenden Signal/Rausch-Verhältnis. Deshalb kann nur festgestellt werden, daß  $J$  unterhalb von 0,05 G und  $|D|$  oberhalb von 5 G liegen muß.

### 6.2.3 Vorläufige Interpretation

Wie bereits mehrfach festgestellt wurde, existieren Veröffentlichungen, welche die Trennung von Elektron und Loch über die konservierte Tryptophankette



nachweisen [37–39, 72]. Daher ist es naheliegend das gemessene Signal mit  $\text{FADH}^\bullet\text{-W324}^\bullet$  zu identifizieren. Dieser Ansatz funktioniert allerdings ausschließlich bei einer Zuordnung des W324 zum HT-Spektrum, da es nicht möglich ist die große Aufspaltung des TT-Signals

zu reproduzieren: Der aus der Kristallstruktur ermittelte Abstand der Radikalzentren liegt bei rund  $(19 \pm 3)$  Å, wodurch  $J$  mit höchstens 2 G angenähert werden kann, was selbst unter günstiger Wahl des Diederwinkels der  $\beta$ -Protonen des Trp bei weitem nicht ausreicht um die beobachtete Aufspaltung von 40 G zu simulieren.

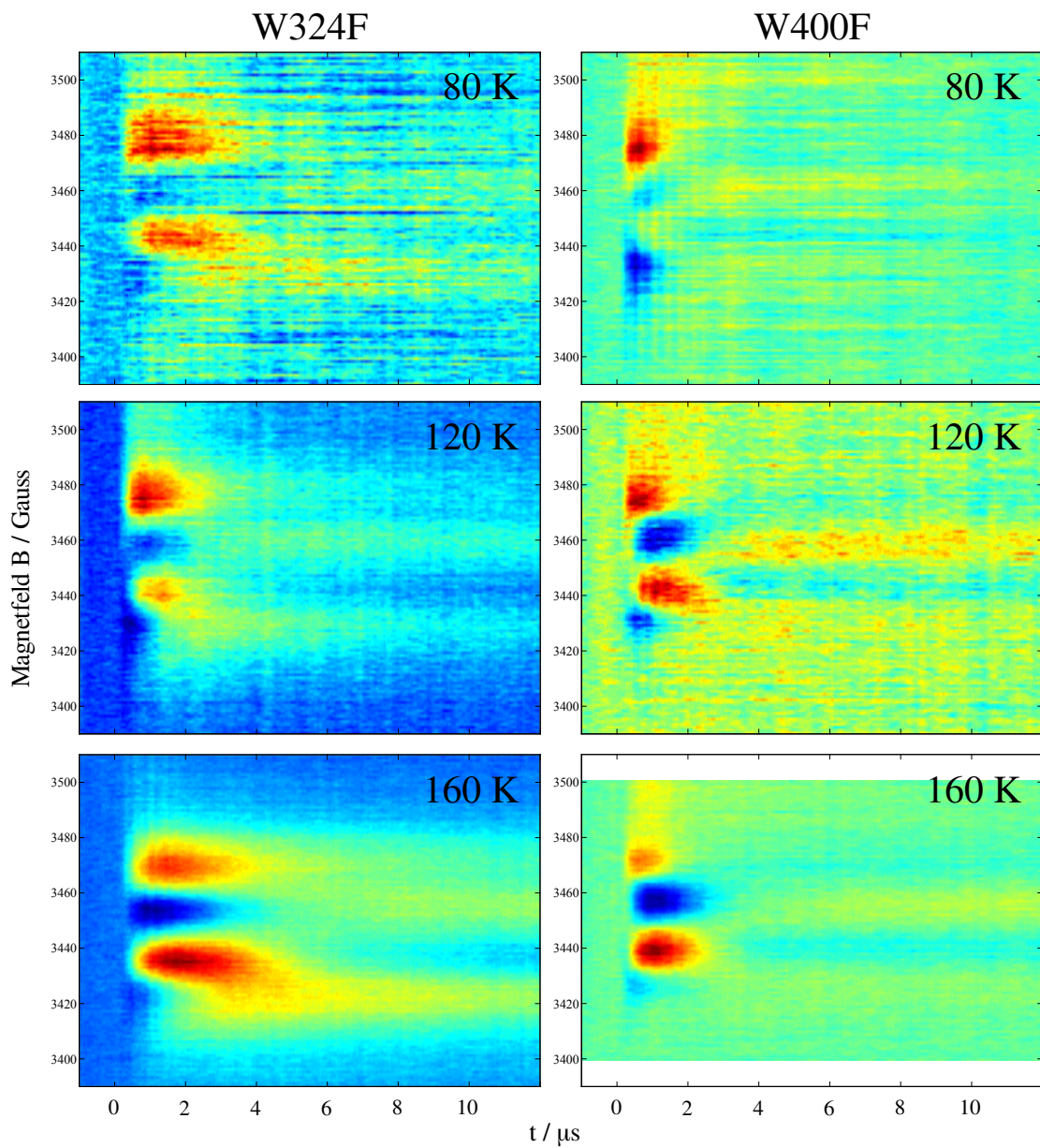
Wenn  $\text{FADH}^\bullet\text{-W324}^\bullet$  mit dem HT-Signal assoziiert wird, so bleibt als möglicher Kandidat für das TT-Signal nur noch das Radikalpaar  $\text{FADH}^\bullet\text{-W377}^\bullet$ , sofern die vorgeschlagene Transferkette nicht verlassen wird. Da die Rate des Elektronentransfers temperaturabhängig sein kann [82, 100], ist eine Verringerung der Wahrscheinlichkeit des Elektronentransportes zwischen W377 und W324 bei niedrigen Temperaturen denkbar. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Elektronentransport im Protein bei tiefen Temperaturen ( $< 200$  K) möglicherweise völlig unabhängig von der vorgestellten Tryptophankette stattfindet. Beispielsweise wäre eine Ladungstrennung über den Adeninrest und verschiedene aromatische Aminosäuren auf der dem Flavin abgewandten Seite der FAD-Bindungstasche möglich. Desweiteren befindet sich in unmittelbarer Nähe der mutmaßlichen Transferkette ein weiteres Tryptophan (W379; siehe Abbildung 6.17 auf Seite 114), dessen Abstand zum Zentrum des Flavinradikals rund 17 Å beträgt. Aufgrund der Geometrie der Situation ist eine Elektronen- bzw. Lochbewegung über diesen Punkt nicht auszuschließen.

Zur Klärung des Problems der Zuordnung der Radikalpaarpartner erfolgte deshalb eine Untersuchung zweier Mutanten des AtCry-1, in denen jeweils entweder das innerste (W400) oder äußerste (W324) Tryptophan der Kette durch ein redoxinertes Phenylalanin ersetzt wurde.

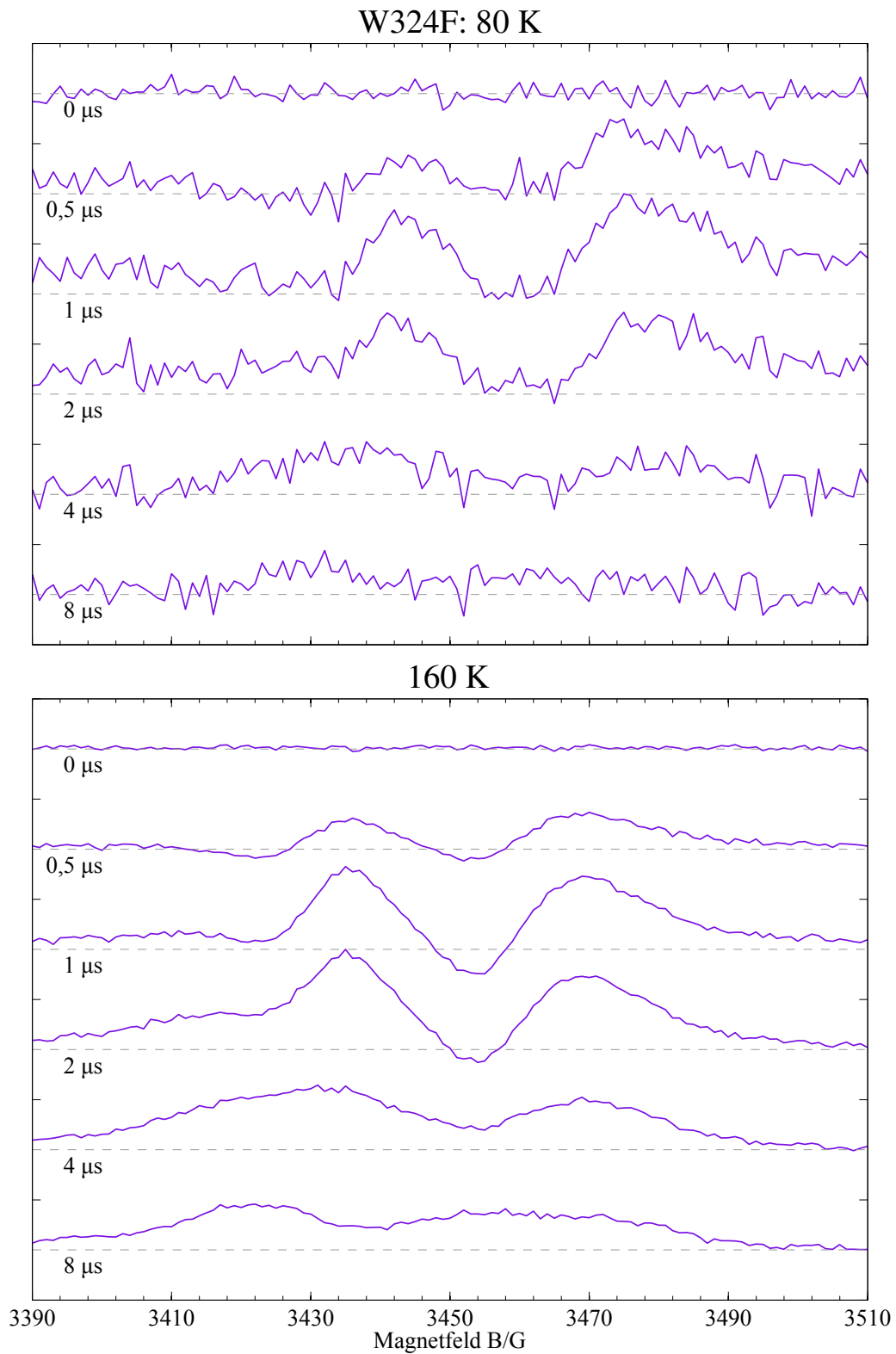
### **6.3 Messungen an den Mutanten W324F und W400F, Vergleich mit dem Wildtyp**

Das transiente ESR-Signal der beiden vorliegenden Mutanten W324F und W400F wurde bei unterschiedlichen Temperaturen (80 K, 120 K, 160 K) aufgenommen. Die entsprechenden zweidimensionalen Darstellungen sind in Abbildung 6.11 zu sehen. Abbildung 6.12 und 6.13 zeigen außerdem eine Reihe von magnetfeldabhängigen Spektren zu unterschiedlichen Zeiten nach der Lichtanregung für die Messungen bei 80 K und 160 K. Darüber hinaus wurden die Experimente mit einem sehr breiten beobachteten Magnetfeldbereich wiederholt, um Klarheit über die Existenz eventuell weit außen liegender spektraler Komponenten (hohe Aufspaltung durch große  $J$ -Kopplungen) sowie über das Auftreten eines ESR-aktiven Flavin-Tripletts zu erhalten. In Abbildung 6.14 (S. 110) sind die entsprechenden Ergebnisse bei zwei Temperaturen, sowohl für die beiden untersuchten Mutanten, als auch für das Wildtypprotein, dargestellt.

Während die gezeigten Graphen der W324F-Mutante eine umfangreichere Diskussion benötigen, ist leicht ersichtlich, daß die Messungen an der W400F-Mutante bis auf insgesamt

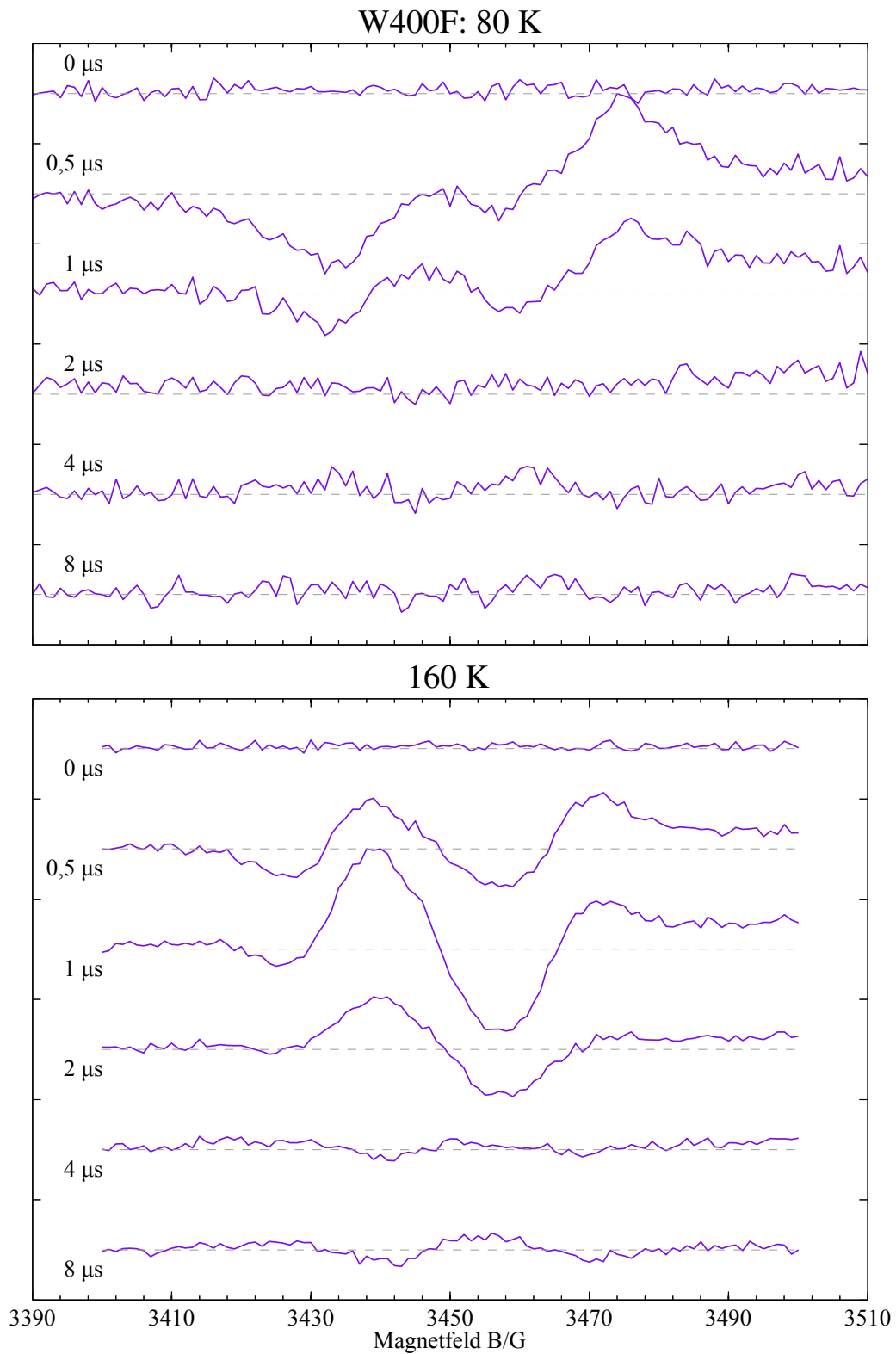


**Abbildung 6.11:** *Transiente Spektren der untersuchten AtCry-1-Mutanten für verschiedene Temperaturen.*

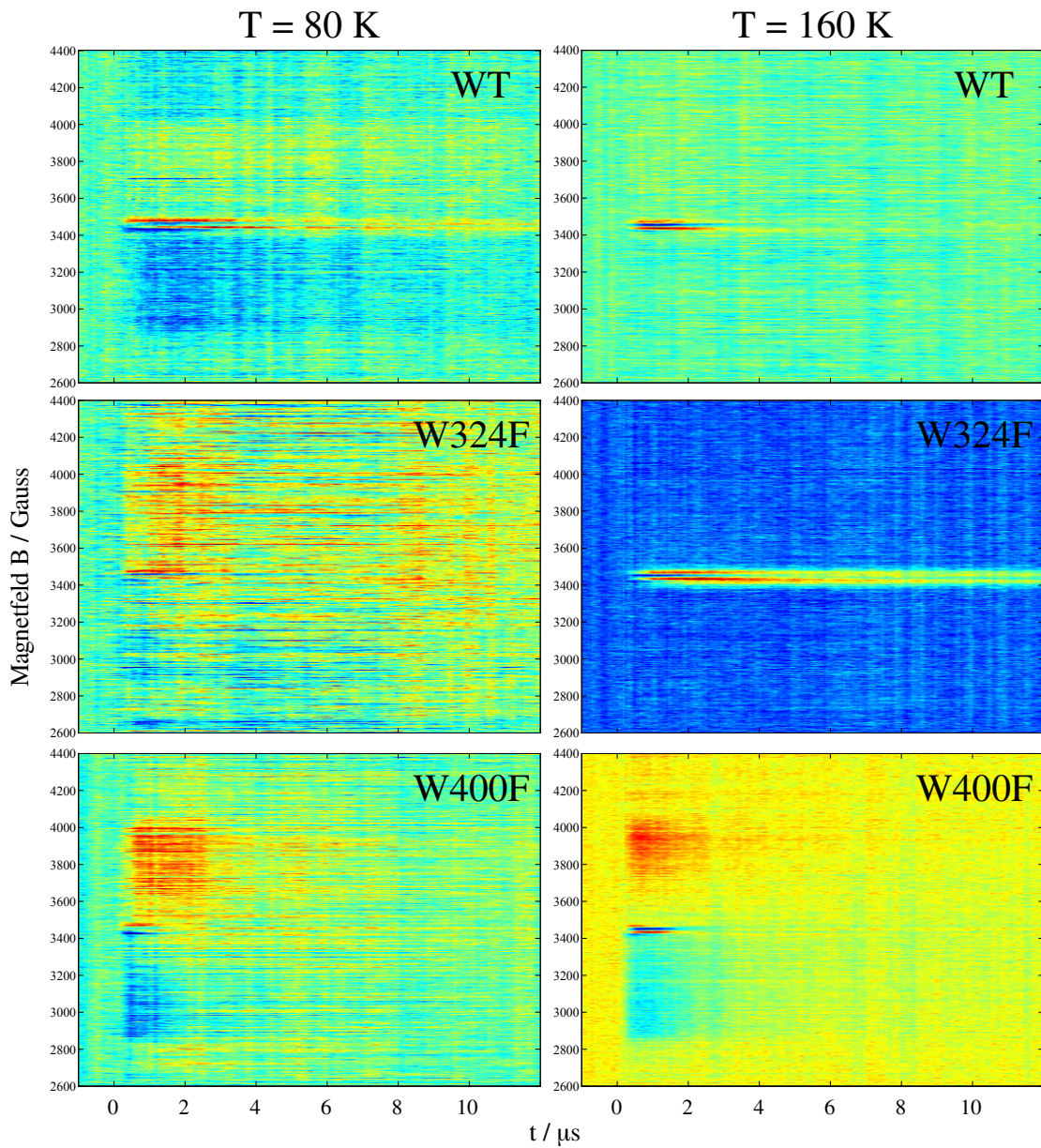


**Abbildung 6.12:** *Transientes ESR-Spektrum der W324F-Mutante für verschiedene Wartezeiten nach dem Laserblitz für 80 K (oben) und 160 K (unten). Die dargestellten Graphen entsprechen Schnitten des zweidimensionalen Teppichs in Richtung der Magnetfeldachse.*





**Abbildung 6.13:** *Transientes ESR-Spektrum der W400F-Mutante für verschiedene Wartezeiten nach dem Laserblitz für 80 K (oben) und 160 K (unten). Die dargestellten Graphen entsprechen Schnitten des zweidimensionalen Teppichs in Richtung der Magnetfeldachse. Für eine Erklärung des auffälligen Versatzes der Basislinie siehe die Ausführungen in Abschnitt 6.3.*



**Abbildung 6.14:** *Transiente Spektren der untersuchten AtCry-1-Mutanten sowie des Wildtyps (WT) über einen weiteren Feldbereich und bei zwei verschiedenen Temperaturen. Das breite, bei etwa 2900 G negativ startende und dann bis rund 4000 G gleichmäßig ansteigende Signal kann mit einem Flavin-Triplett assoziiert werden (vergleiche Abbildung 2.7 auf Seite 12).*

schwächere Signalintensitäten eine auffällige Ähnlichkeit zu den Spektren des Wildtypproteins aufweisen. Lediglich in den Darstellungen mit weitem Magnetfeldbereich (Abb. 6.14) können Unterschiede im Auftreten eines Flavin-Tripletts festgestellt werden: Sowohl bei den Proben mit nativem AtCry-1, als auch bei denjenigen mit AtCry-1-W324F, ist ein entsprechendes Signal nur bei tiefen Temperaturen (80 K), und zudem nur sehr schwach, sichtbar. Dies entspricht dem erwarteten Verhalten, wenn die Geschwindigkeit der Trennung des Dublett-paars mit sinkender Temperatur nachläßt, so daß ein Singulett-Triplett-Übergang des lichtangeregten FAD erfolgen kann. Demgegenüber zeigen die Spektren der W400F-Mutante des Proteins bei beiden betrachteten Temperaturen einen relativ zum restlichen Signal deutlich stärkeren FAD-Triplett-Anteil.

Bei der Betrachtung der Spektren des W400F sowie derjenigen des Wildtypproteins bei niedrigen Temperaturen ist zu bedenken, daß die Existenz des Flavin-Triplett-Signals zu einer diagonalen Basislinie im Feldbereich der untersuchten Signalanteile (3400 G. . . 3500 G) führt. Dieser Effekt kann teilweise deutlich als Versatz in der Lage des Rauschniveaus zwischen linker und rechter Seite des Spektrums beobachtet werden.

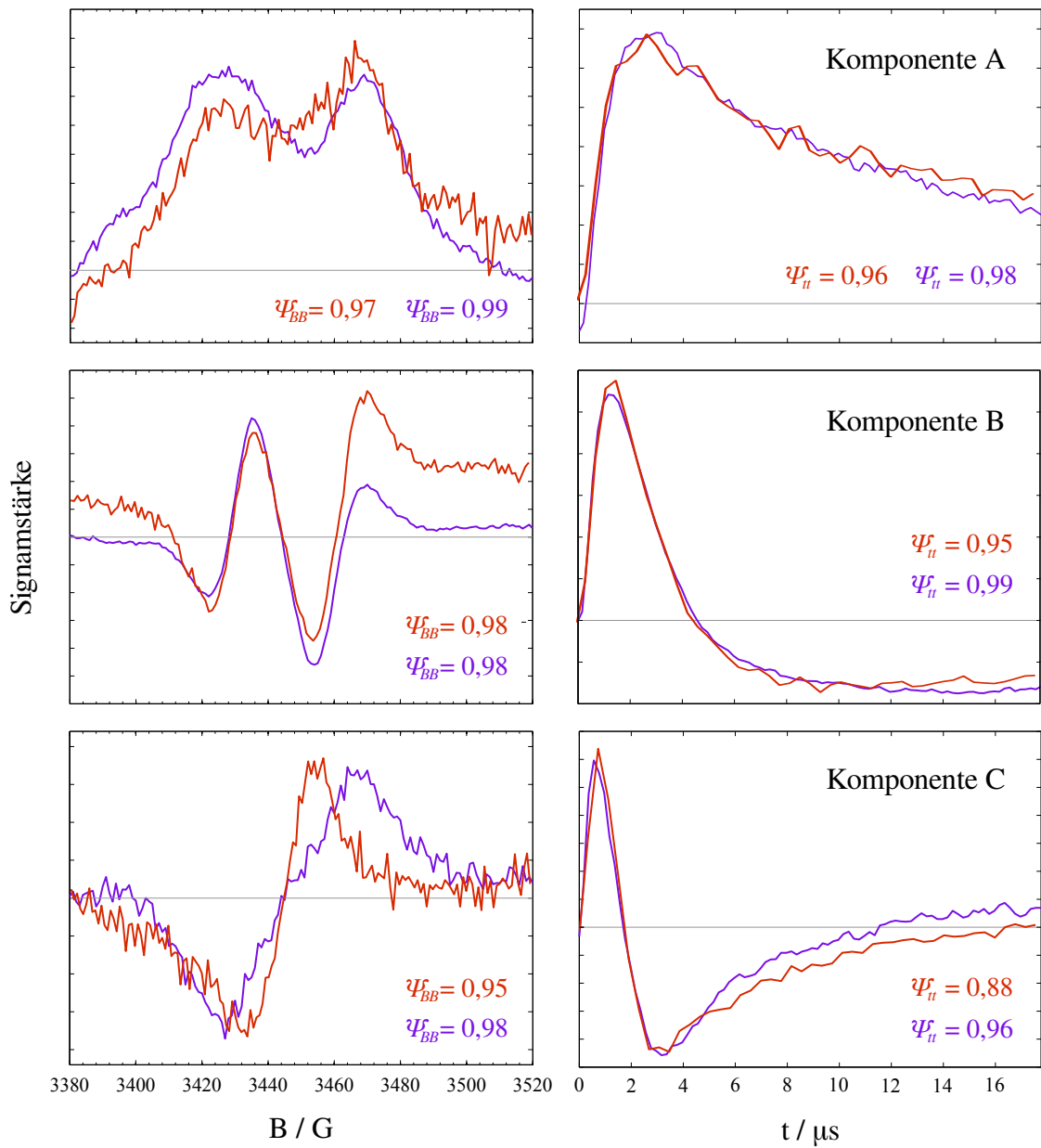
Aufgrund der Ergebnisse der Messungen über einen weiten Magnetfeldbereich ist zudem festzustellen, daß in keinem der aufgenommenen Spektren ein zusätzliches Signal mit großer Aufspaltung zwischen Feldposition des Maximums der Emission und Absorption beobachtet werden kann. Ein derartiger Anteil kann demnach höchstens unterhalb von 2600 G und/oder oberhalb von 4400 G existieren

### 6.3.1 Untersuchungen zu den Spektren der W324F-Mutante

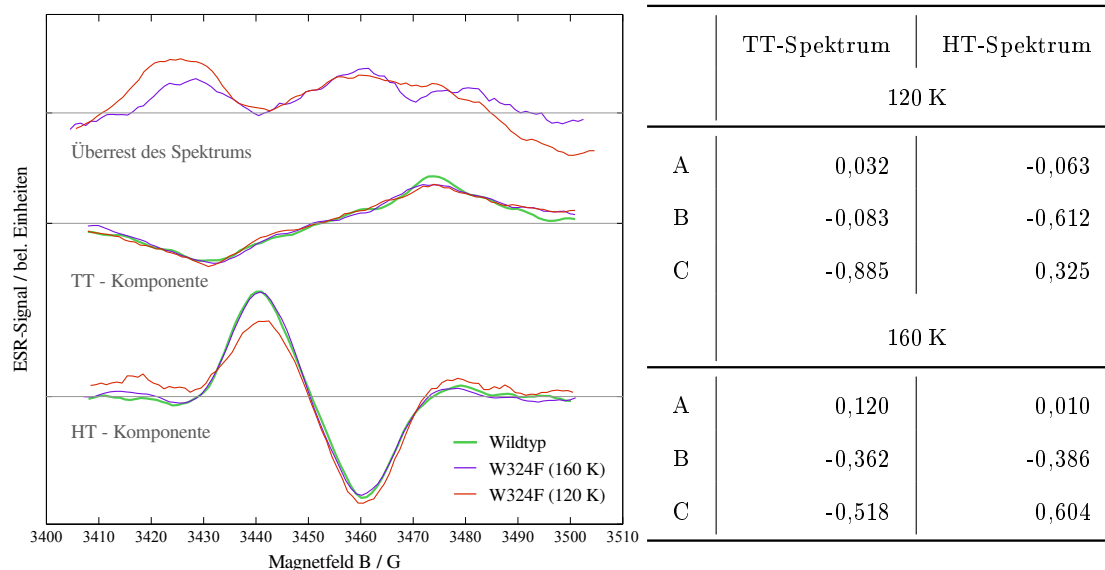
Die Spektren der W324F-Mutante zeigen einige Ähnlichkeiten zu denjenigen des Wildtyps, insbesondere was die Position der auftretenden Minima und Maxima betrifft, die relativen Signalstärken der einzelnen Komponenten zueinander weisen jedoch ein deutlich abweichendes Verhalten auf. In einem ersten Schritt zur Klärung dieses Sachverhaltes wurde eine Singulärwertzerlegung der drei zweidimensionalen Spektren des mutierten Proteins durchgeführt.<sup>8</sup> Während dieser Prozedur für die Meßwerte bei 80 K kein befriedigendes Ergebnis liefert, ergibt die Analyse der beiden anderen Spektren ein sehr ähnliches Resultat: Es zeigen sich drei linear unabhängige Vektoren (A, B, C) mit Singulärwerten oberhalb des Rauschniveaus. Abbildung 6.15 veranschaulicht das Ergebnis für die Meßwerte bei 160 K und 120 K.

Zur korrekten Interpretation dieser Beobachtungen ist hervorzuheben, daß die Ergebnisse einer Singulärwertzerlegung im Allgemeinen *nicht* mit den physikalisch tatsächlich unabhängigen Komponenten übereinstimmen, sondern lediglich *eine mögliche* Basis darstellen. Daher ist es hilfreich zu ermitteln, ob sich die in Abschnitt 6.2 isolierten Teilspektren des Wildtyp-AtCry-1 als Linearkombination der soeben vorgestellten Komponenten A, B und

<sup>8</sup>Für Erläuterungen und Beispiele zur Singulärwertzerlegung siehe z.B. [101, 102].



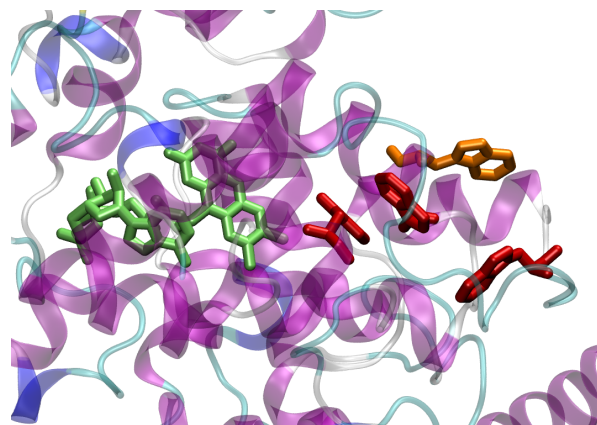
**Abbildung 6.15:** Singulärwertzerlegung der Spektren des AtCry-W324F für 120 K (rot) und 160 K (blau). Dargestellt sind die einzelnen Vektoren der U-Matrix (links; korrespondiert mit den „Spektren“) und V-Matrix (rechts; korrespondiert mit dem jeweiligen Zeitverhalten) für die drei über dem Rauschniveau liegenden Singulärwerte (120 K:  $S = (0,241; 0,066; 0,029 | 0,008; 0,006; 0,006)$ ; 160 K:  $S = (0,318; 0,101; 0,026 | 0,005; 0,005; 0,004)$ ). In den Graphen sind die Auto-korrelationskoeffizienten der einzelnen Vektoren farbig eingetragen.



**Abbildung 6.16:** Links: Nachbildung der zuvor am Wildtypprotein definierten TT- und HT-Spektren (grün) als Linearkombination der per Singulärwertzerlegung ermittelten Komponenten des W324F für 120 K (rot) und 160 K (blau) (vergleiche Abbildung 6.15). Im oberen Bereich ist der nach Abzug der beiden bekannten Teilspektren übrig bleibende Anteil des experimentellen Spektrums der Proteinmutante eingefügt. Rechts: Faktoren der Linearkombinationen zur Reproduktion der Spektren TT und HT aus den vorgestellten SVD-Komponenten..

C darstellen lassen. In Abbildung 6.16 sind die entsprechenden (mittels Matrixdivision berechneten) Faktoren sowie das Ergebnis der Verknüpfung im Vergleich zu den isolierten TT- und HT-Spektren, zusammengefaßt. Dabei werden zwei Punkte deutlich: Einerseits lassen sich die früher definierten Spektren TT und HT im Rahmen der Meßgenauigkeit gut nachbilden, wobei die etwas schlechtere Passung im Falle der Messung bei 120 K ihre Ursache im deutlich reduzierten Signal/Rausch-Verhältnis dieser Meßreihe hat. Andererseits verbleibt nach Abzug der derart konstruierten Signale vom experimentellen Spektrum ( $\text{Exp} - (\text{TT} + \text{HT})$ ) noch immer ein erheblicher Anteil übrig (Abbildung 6.16 links oben). Dieser „Rest“ ist nicht integrierbar, weist keine Ähnlichkeit mit einem der bisher untersuchten spektralen Verläufe auf und wird im Wesentlichen durch die SVD-Komponente A bestimmt.

Daher muß festgestellt werden, daß die vermessenen Spektren der W324F-Mutante tatsächlich aus (mindestens) drei Komponenten bestehen: Den beiden bereits im Wildtyp isolierten Teilspektren sowie einem weiteren Anteil, dessen Integral über den vermessenen Feldbereich nicht verschwindet.



	$r_{\text{Spin}} / \text{\AA}$	$r_{\text{Geom}} / \text{\AA}$
FAD–W324	19,4	19,1
FAD–W377	12,6	13,3
FAD–W379	15,5	18,6
FAD–W400	7,0	8,4
W400–W377	5,7	7,3
W377–W324	7,5	8,0
W377–W379	8,3	10,4
W379–W324	9,1	9,9

**Abbildung 6.17:** Links: Veranschaulichung der Position des Tryptophans W379 (orange) in Bezug auf die Tryptophane der konservierten Kette (W400, W377, W324; rot) und den FAD-Kofaktor (grün) in *AtCry-1*. Erstellt mit Hilfe von VMD [57]. Rechts: Aus der Kristallstruktur berechnete Abstände der Tryptophane vom Flavin und untereinander.  $r_{\text{Spin}}$  ... Abstand der Punkte maximaler Spindichte;  $r_{\text{Geom}}$  ... Abstand der geometrischen Mittelpunkte des Isoalloxazinringes bzw. des Indolringes.

## 6.4 Interpretation der Ergebnisse

Aus den vorgestellten Ergebnissen läßt sich schlußfolgern, daß die Trennung der Elektronenloch-Paare des angeregten Flavins auch unter den hier betrachteten Bedingungen tiefer Temperaturen im Regelfall über das W400 erfolgt, ansonsten wäre das deutlich erhöhte Auftreten des Flavin-Triplett-Signals in der W400F-Mutante rätselhaft. Selbst wenn weitere Transferpfade zur Umgehung dieser Aminosäure offensichtlich zur Verfügung stehen, sind diese mit einer signifikant verringerten Elektronenübergangsrate verknüpft. Die Tatsache der weitestgehenden Äquivalenz der Spektren von W400F und Wildtyp ist zudem ein Indiz für einen höchstens sehr geringen Anteil an vermessenen Dublett-paaren mit Triplettvorläufer. Da die Bildung des Flavin-Tripletts durch eine Mutation an W400 begünstigt wird, sollte das Radikalpaarspektrum für aus dem Triplettzustand erzeugte Paare dann einen deutlich erhöhten Anteil am Gesamtspektrum besitzen und somit zu einer Veränderung der beobachteten Magnetfeldabhängigkeit des ESR-Signals führen, was jedoch nicht beobachtet werden kann.<sup>9</sup>

Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen an der W324F-Mutante ergibt sich zwei-

<sup>9</sup>Nur bei guter Gleichverteilung der Populationen auf den Triplett-niveaus bestände der Effekt allein in einer nicht feststellbaren globalen Signaldämpfung. Von einer derartigen Verteilung ist bei den hier benutzten Meßparametern ( $B$ ,  $T$ ) jedoch nicht auszugehen. Vergleiche dazu auch die Ausführungen in Fußnote 7 auf Seite 104.

FAD <sup>•</sup> -W377 <sup>•</sup>			FAD <sup>•</sup> -W379 <sup>•</sup>			$J_0 / \text{G}$	$\beta / \text{\AA}^{-1}$
$r_1 / \text{\AA}$	$J_1 / \text{G}$	$D_1 / \text{G}$	$r_2 / \text{\AA}$	$J_2 / \text{G}$	$D_2 / \text{G}$		
13,8	8,5	-10,6	17,5	0,04	-5,2	$4,1 \cdot 10^9$	1,45
12,6	8,5	-13,9	16,5	0,02	-6,2	$2,6 \cdot 10^9$	1,55
13,0	8,5	-12,7	18,0	0,01	-4,8	$3,5 \cdot 10^8$	1,35

**Tabelle 6.1:** Darstellung der Kopplungen zwischen den Radikalpaarpartnern für einige exemplarische Situationen. Die Abstände  $r_i$  und die Austauschwechselwirkungen  $J_i$  wurden in Übereinstimmung mit den Unsicherheiten der experimentellen Ergebnisse aus den Simulationen der Spektren TT und HT abgeleitet. Die Werte der dipolaren Wechselwirkung errechnen sich mit Hilfe der Punktdipolnäherung direkt aus den Abständen;  $J_0$  und  $\beta$  wurden aus den gegebenen Punkten ( $r_1, J_1$ ) und ( $r_2, J_2$ ) ermittelt. Insbesondere bei  $J_0$  handelt es sich nur um einen Schätzwert, da die Austauschkopplung in der Realität nicht ausschließlich von  $r$  abhängt.

erlei: Erstens, daß auf Basis der durchgeführten spektralen Simulationen keines der beiden im Wildtyp isolierten Teilspektren mit dem Radikalpaar FAD<sup>•</sup>-W324<sup>•</sup> identifiziert werden kann und zweitens, daß die durchgeführte Mutation dennoch einen meßbaren Unterschied in den beobachteten Spektren verursacht. Zusammen mit den im vorhergehenden Absatz gemachten Ausführungen zur W400F-Mutante schränkt der zweite Punkt die räumliche Position des Radikalpaarpartners ein: Es ist *nicht* davon auszugehen, daß der Elektronentransfer weit von der konservierten Kette entfernte Residuen in Anspruch nimmt.

#### 6.4.1 Zuordnung der Radikalpaarpartner

Eine Analyse der publizierten Kristallstruktur liefert neben den Kettengliedern selbst nur ein weiteres Tryptophan in näherer Umgebung des W377 oder W324. Dabei handelt es sich um W379. Abbildung 6.17 zeigt den entsprechenden Ausschnitt der Kristallstruktur sowie die Abstände der verschiedenen Tryptophane zum FAD. Aus der Größenordnung der zur Simulation notwendigen Austauschwechselwirkungen ist klar, daß der Radikalpaarpartner des Flavin bei der TT-Komponente deutlich näher am Flavin liegen muß als bei der HT-Komponente. Nachdem sowohl W324, als auch W400 als Partner ausgeschlossen werden können, bleibt nur noch folgende Zuordnung möglich:

$$\text{TT-Spektrum: FAD}^{\bullet}\text{-W377}^{\bullet} \qquad \text{HT-Spektrum: FAD}^{\bullet}\text{-W379}^{\bullet}$$

Um diese Hypothese zu testen ist es hilfreich die angenommenen Größen für  $D$  und  $J$  auf Konsistenz mit den Abständen in den genannten Dublettpearen zu überprüfen. Es gilt (Gleichung 3.22 und 3.17):

$$J(r) = J_0 \cdot e^{-\beta r} \quad \text{bzw.} \quad D = -\frac{3g_e\beta\mu_0}{8\pi} \frac{1}{r^3} \quad (6.1)$$

Dabei ergibt sich jedoch das Problem der Unsicherheiten der einbezogenen Größen:

- Während  $J$  für das TT-Spektrum verhältnismäßig genau ( $\pm 2\%$ ) bestimmt werden kann, beträgt der Fehler für das HT-Spektrum größenordnungsmäßig 100%. Für  $D$  ist die Situation noch unklarer.
- Wie die Spindichteverteilung (Abbildung 2.6 auf Seite 10) zeigt, ist es nicht trivial den Abstand der Radikale voneinander zu bestimmen. Die Beschränkung auf die Punkte höchster Spindichte (Position N(5) im Flavon bzw. Position C(3) im Trp) ist dabei eine ebenso starke Vereinfachung wie die Betrachtung des geometrischen Mittelpunktes. Diese Einschränkung ist für  $J$  allerdings weniger relevant als für  $D$ , da im Falle der Austauschwechselwirkung die Kantenabstände der Orbitale bestimmend sind.
- Die Auflösung der diesen Überlegungen zugrunde liegenden Kristallstruktur wird von Brautigam *et al.* mit 2,45 Å angegeben. Selbst wenn zugestanden werden muß, daß die Erkennbarkeit organischer Ringstrukturen (wie Trp-Seitenketten) in der Elektronendichteverteilung verhältnismäßig gut möglich ist, muß dennoch von einem gewissen Fehler der angegebenen Positionen ausgegangen werden.
- Die Konstante des exponentiellen Abfalls der Stärke der Austauschwechselwirkung  $\beta = (14 \pm 2) \text{ \AA}^{-1}$  besitzt selbst bereits eine Unsicherheit von fast 15% [82]. Desweiteren kann der Parameter  $J_0$  in einem weiten Intervall variieren, wobei mit den vorliegenden strukturellen Informationen noch nicht einmal die Größenordnung theoretisch vorgegeben werden kann.

Aus diesen Punkten folgt ein breiter Bereich an möglichen Werten für  $r$  und insbesondere  $J_0$ , welche den experimentellen Ergebnissen entsprechen und konsistent mit den Literaturangaben sind. Im Falle der dipolaren Wechselwirkung besteht außer der Unsicherheit des Abstandes ein Problem in der Anwendung der Punktdipolnäherung, da die Spindichte bei jedem der beiden Partner in einem Gebiet von mindestens 3 Å delokalisiert ist, während der Abstand der Radikale voneinander im Bereich zwischen 13 Å und 19 Å liegt.<sup>10</sup> In Tabelle 6.1 sind die Parameter für einige ausgewählte Situationen dargestellt. Aus diesen Werten läßt sich schlußfolgern, daß die durchgeführte Zuordnung der Spektren mit der erwarteten Abstandsabhängigkeit von  $J$  und  $D$  harmonisiert, auch wenn aus den vorgestellten Messungen keine weiteren Aussagen über z.B.  $J_0$  abgeleitet werden können.

Bei der Betrachtung der Meßergebnisse ist besonders interessant, daß kein spinpolariertes Radikalpaarspektrum in flüssiger Lösung erhalten werden konnte. AtCry-1 weist somit innerhalb der unter vergleichbaren Bedingungen untersuchten Photolyasen/DASH-Proteine eine Besonderheiten auf, da äquivalente Messungen bei 270 K bzw. 274 K an Cry-DASH-Proteinen aus *X. laevis* und *Synechocystis* sp. oder Photolyasen aus *E. coli* pro-

---

<sup>10</sup>Wie Efimova und Hore zeigen, beträgt dieser Fehler etwa 20% für  $r = 8,5 \text{ \AA}$  und sinkt mit steigendem Abstand auf etwa 5% für  $r = 19 \text{ \AA}$  [28].



blemlos möglich sind [3,36,62,64]. Das bei diesen Proteinen unter nahezu Raumtemperatur beobachtete Radikalpaarspektrum ähnelt qualitativ dem an AtCry-1 isolierten HT-Signal, zeigt allerdings eine umgekehrte Polarisierung und konnte in den genannten Publikationen zuverlässig mit einem Radikalpaar aus Flavin und letztem Tryptophan der Transferkette assoziiert werden.

Am Ende von Abschnitt 6.2 wurde das Auftauchen eines damit vergleichbaren spektralen Anteils in den Messungen am Wildtypprotein bei 80 K und 240 K hervorgehoben. Bei einer dahingehenden Analyse der Meßergebnisse in Abbildung 6.11 auf Seite 107 (temperaturabhängige transiente Spektren der Mutanten) muß zudem festgestellt werden, daß die besagte Komponente zwar in den 80 K-Spektren des Wildtyps und der W400F-Mutante, *nicht* jedoch in demjenigen der W324F-Mutante auftritt. Insgesamt kann das in E/A-Polarisation vorliegende Signal mit einer Aufspaltung von rund 14 G daher mit einiger Wahrscheinlichkeit dem Radikalpaar  $\text{FAD}^\bullet\text{-W324}^\bullet$  zugeordnet werden. Wie in Abbildung 6.10 auf Seite 104 deutlich wird, ist die Simulation eines solchen Spektrums über eine schwache Erhöhung von  $J$  bzw. eine Verringerung von  $D$  leicht möglich. Der Abstand des W324 von Flavin ist gemäß der Kristallstruktur zwar etwas größer als derjenige des W379 (siehe Abbildung 6.17), aber aufgrund der unterschiedlichen Orientierungen der Tryptophane ist eine Erhöhung der Austauschkopplung durch den stärkeren Wellenfunktionsüberlapp der Elektronen denkbar, insbesondere, da keine großen Unterschiede notwendig sind. Fundiertere Aussagen über die genaue Natur dieser mutmaßlichen W324-Signale können aus den vorliegenden Meßwerten, aufgrund der geringen Intensität dieser Komponente und des damit verbundenen schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses, nicht abgeleitet werden.

#### 6.4.2 Transferpfad und Temperaturabhängigkeit

Aus den bisher genannten Beobachtungen wird folgendes Modell für die lichtinduzierte Ladungstrennung im AtCry-1 abgeleitet:

Nach Anregung des FAD mit Licht im blauen Spektralbereich erfolgt ein auf der Zeitskala der transienten ESR schneller Elektronentransfer vom inneren Tryptophan der konservierten Kette (W400) zu dem angeregten Flavin und ein sich direkt anschließender Elektronenübergang vom W377 auf das W400. Die Rate dieses Prozesses und damit auch das Verhältnis des sich einstellenden Populationsgleichgewichtes des Elektronenloches zwischen den beiden Partnern ist temperaturabhängig, so daß unter Umständen ein Flavintriplett (Transfer erfolgte nicht ausreichend innerhalb der Singulett-Triplett-Übergangszeit) beobachtet werden kann. Außerdem führt der Austausch des ersten Trp mit einem Phenylalanin zu einer erheblichen Verringerung des Elektronentransfers vom W377 zum FAD, was sich ebenfalls in einer vermehrten Bildung des Flavintripletts äußert. Bei tiefen Temperaturen ist der weitere Transport des Radikalzustandes hin zum äußeren Tryptophan (W324) stark verzögert, möglicherweise durch eine für diesen Elektronentransfer ungünstige Kon-

formation der beteiligten Tryptophane im eingefrorenen Protein. Dies gilt ebenso für den Übergang von W379 auf W377, weshalb in den Spektren für 80 K und 40 K nur eine sehr schwache zentrale Signalkomponente gefunden werden kann. Die beobachteten Spektren werden somit vom Signal des Radikalpaars  $\text{FAD}^\bullet\text{-W377}^\bullet$  dominiert.

Mit steigender Temperatur verändern sich die Transferraten zwischen den beiden Tryptophanen W377 und W379 im Bereich von 100 K bis 120 K recht sprunghaft, wodurch sich die Radikalpopulation von fast ausschließlich W377 auf bevorzugt (aber nicht allein) W379 verschiebt. Das dabei auftretende Radikalpaar  $\text{FAD}^\bullet\text{-W379}^\bullet$  ist als HT-Komponente in den Spektren zwischen 120 K und 200 K deutlich erkennbar. Da der von diesem Signal eingenommene Magnetfeldbereich mit demjenigen des mutmaßlichen Paares  $\text{FAD}^\bullet\text{-W324}^\bullet$ , dessen Polarisation ein umgekehrtes Vorzeichen aufweist, identisch ist, entsteht dabei eine Signalüberlagerung, in deren Ergebnis die gegenüber dem W379-Spektrum deutlich schwächere W324-Komponente vollständig kompensiert wird. Aus den wirksamen Anteilen der Spektren HT und TT für verschiedene Temperaturen (Abbildung 6.3 auf Seite 98; rechts) kann eine Veränderung des Verhältnisses der Elektronentransferraten zwischen 80 K und 160 K zu

$$\frac{(k_{\text{W377} \rightarrow \text{W379}}/k_{\text{W379} \rightarrow \text{W377}})_{80 \text{ K}}}{(k_{\text{W377} \rightarrow \text{W379}}/k_{\text{W379} \rightarrow \text{W377}})_{160 \text{ K}}} \approx 27$$

abgeleitet werden. Eine mögliche Begründung für diese postulierte Verschiebung der Transferraten ist eine Erhöhung der Seitenkettenflexibilität des W379 über einen Schwellwert, wodurch die Wahrscheinlichkeit für die Einnahme einer den Elektronenübergang von W379 auf W377 fördernden Orientierung signifikant ansteigt. Auch eine temperaturabhängige Verschiebung der Solvatationsenergie eines der Reaktionspartner oder das Öffnen zusätzlicher dynamische Moden der Seitenkette ist denkbar.

Im Falle noch höherer Temperaturen erfolgt um 240 K herum der Phasenübergang von fest nach flüssig. Die genaue Schmelztemperatur ist dabei von der exakten Protein- und Glycerinkonzentration abhängig, welche in der vermessenen Probe jedoch nur grob bekannt sind. In diesem Bereich kann sich die Flexibilität des oberflächenexponierten W324 sowie die Beweglichkeit der umgebenden Lösemittelmoleküle derart erhöhen, daß nun auch der Übergang des Elektrons von W324 auf W377 gefördert wird. Da in Folge dessen die gesamte Transferkette des Radikalzustandes vom Flavin bis hin zum finalen Tryptophan auf einer Zeitskala erfolgt, welche schnell gegen die Lebensdauer der Spinpolarisation ist, stellt das Signal des Radikalpaares  $\text{FAD}^\bullet\text{-W324}^\bullet$  den dominanten Anteil des Spektrums bei 240 K dar. Allerdings weisen die Signalkomponenten bei 3430 G bzw. 3480 G auf eine nach wie vor nicht verschwindende Bevölkerung des W377 hin. Über die Intensität des mit  $\text{FAD}^\bullet\text{-W379}^\bullet$  verknüpften spektralen Anteils kann aufgrund der vorliegenden Überlagerung mit dem W324-Signal keine Aussage getroffen werden.

Bereits das soeben diskutierte Spektrum bei 240 K besitzt ein deutlich schlechteres Signal/Rausch-Verhältnis als die Spektren bei 120 K, 160 K oder 200 K. Dies erstaunt be-

sonders, weil mit Ausnahme dieser Messung eine stetige Verbesserung des Signals mit steigender Temperatur auftritt.<sup>11</sup> Der Sonderfall bei 240 K und die Unmöglichkeit der Detektion eines spinkorrelierten Radikalpaares bei noch höheren Temperaturen impliziert daher einen zusätzlichen Effekt, welcher zu einer schnellen Zerstörung der Spinpolarisation nach Erreichen des W324 führt. Über die Natur dieses Mechanismus' kann jedoch nur spekuliert werden, eine denkbare Option ist aber z.B. die Wechselwirkung mit dem (strukturell nicht charakterisierten) C-Terminus des Proteins.

Wird das letzte Tryptophan (W324), welches den Kontakt mit der Proteinoberfläche herstellt, beseitigt, so ist die zielgerichtete Elektronenwanderung unterbrochen. Dies erschwert die Aufnahme des an das Flavin weitergeleiteten Elektrons aus der Lösung, und einige der Elektronenlöcher bilden verzögert Zustände mit nicht verschwindender Nettopolarisation aus, deren Beschreibung nicht mehr im Rahmen des Radikalpaarmechanismus' möglich ist. Dabei kann es sich beispielsweise um die Akkumulation ungekoppelter, nicht-spinpolarisierte Radikale, einen auftretenden Singulett-Triplett-Übergang oder eine Verschiebung der Polarisation in Folge des schrittweisen Elektronentransfers handeln. Als Folge eines derartigen Prozesses tritt eine weitere, unsymmetrische Komponente in den beobachteten transienten ESR-Spektren auf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es jedoch nicht möglich die genaue Ursache oder Natur dieser Signale zu bestimmen, insbesondere da die Verteilung der Spinpolarisation in Folge eines sequenziellen Elektronentransfers, abhängig von der genauen Größe aller einfließenden Parameter, sehr divergenten Entwicklungen folgen kann [103–105].

---

<sup>11</sup>Dies entspricht den Erwartungen, wenn die Rate des Elektronenübergangs vom W377 über W400 hin zum FAD temperaturabhängig ist.

# Kapitel 7

## Zusammenfassung und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Cryptochrom-1-Protein aus *Arabidopsis thaliana* (AtCry-1) mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie untersucht. Bei AtCry-1 handelt es sich um einen Blaulichtrezeptor, dessen photochemische Aktivierung über eine lichtinduzierte Reduktion des gebundenen Kofaktors Flavin-Adenin-Dinukleodid (FAD) erfolgt. Dabei wird das im dunkeladaptierten Zustand vollständig oxidiert vorliegende Flavin in seine Radikalform überführt. Dieses Radikal konnte mittels ESR beobachtet und charakterisiert werden. Ein Großteil der vorgestellten Messungen erfolgte dabei an überexprimierenden Zellen, damit die Eigenschaften des Proteins, insbesondere der Redoxzustand des Flavin-Kofaktors, nicht durch notwendige Aufreinigungsschritte sowie die (künstliche) Lösemittelumgebung beeinflusst werden. Darüber hinaus war es möglich aus dem Vergleich der Hyperfeinkopplungsmuster des Flavinradikals in Zellen und aufgereinigtem Protein Unterschiede zwischen diesen beiden Systemen zu isolieren. Zur Untersuchung des auf die Lichtanregung des Flavins folgenden Elektronentransfers zum FAD wurden außerdem verschiedene Messungen mittels transientser ESR durchgeführt, die erhaltenen Spektren simuliert und entsprechenden FAD-Trp-Dublettpaaren zugeordnet.

### 7.1 Messungen an ganzen Zellen

Wie in Abschnitt 5.4.1 gezeigt wurde, liegt der FAD-Kofaktor in AtCry-1, überexprimiert und untersucht in Sf21-Zellen, nach erfolgter Lichtaktivierung in seiner neutralen Radikalform vor. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen an aufgereinigtem Protein bei Redoxpotentialen zwischen -143 mV und -181 mV [7] und untermauert die bereits von Bouly *et al.* [58] präsentierten Resultate. Zur Reduktion des oxidierten Grundzustandes ist eine Beleuchtung mit blauem Licht erforderlich. Anhand der aufgenommenen Kinetiken zum Aufbau des Radikals kann der Wirkungsquerschnitt der Photoaktivierung mit etwa 170 pm<sup>2</sup> abgeschätzt werden. Daraus ergibt sich unter der angelegten Beleuchtungsstärke von 440 µE/(m<sup>2</sup>s) eine Aktivierungshalbwertszeit von 15 s, was gemessen an der Zeitskala, auf der Schwankungen der für eine Pflanze relevanten physikalischen Parameter (z.B.

Dauer des Sonnenaufgangs<sup>1</sup>) stattfinden, als instantan zu betrachten ist.

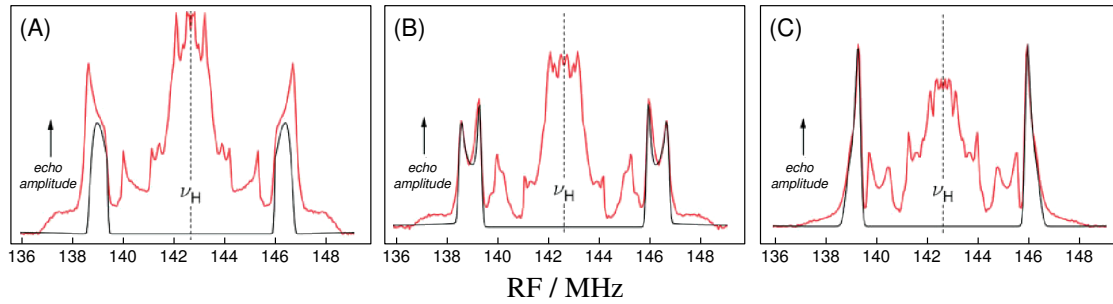
Nach Ende der Beleuchtungsdauer erfolgt die Reoxidation des Flavin-Kofaktors mit einer Halbwertszeit von etwa 6 min. Bedingung dafür ist jedoch eine ausreichende Versorgung mit Oxidationsmittel, wovon in unbeeinflussten Pflanzen ausgegangen werden kann, was in Experimenten mit stark erhöhter Proteinkonzentration aber nicht gegeben sein muß. Diese Zeit ist für einen biologischen Lichtrezeptor verhältnismäßig lang, insbesondere, wenn sie mit der Deaktivierung von z.B. Rhodopsin im menschlichen Auge verglichen wird ( $\tau < 0,1$  s [106]). Allerdings sind in diesem Zusammenhang mehrere Anmerkungen zu beachten:

- Erstens ist darüber nachzudenken, ob eine schnellere Deaktivierung im Hinblick auf die natürliche Beleuchtungssituation einen evolutionären Vorteil bringen würde.
- Zweitens wurde in den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten die „passive“ Deaktivierung vermessen. Dies bedeutet, daß der (hypothetische) Einfluß eines deaktivierenden Reaktionspartners nicht untersucht wird, schon weil ein solcher in der Zelle nicht ebenfalls überexprimiert wurde. Dabei ist es unerheblich, an welcher Stelle der Signalkaskade ein solcher Wechselwirkungspartner beteiligt wäre.
- Drittens erfolgten alle hier vorgestellten Messungen am Radikalzustand des FAD. Dessen Dunkeladaption muß nicht notwendigerweise mit der Zeit verknüpft sein, in welcher das Protein tatsächlich „aktiv“ ist. Aufgrund der Beobachtungen von Yang *et al.* liegt nahe, daß die Aufgabe der PHR-Domäne in Pflanzencryptochromen darin liegt, die C-terminale Erweiterung im Dunkelfall inaktiv zu halten und nach Blaulichtbeleuchtung freizugeben [18]. Deshalb ist es denkbar, daß die einmal hergestellte Aktivität des Proteins im weiteren zeitlichen Verlauf unabhängig vom Oxidationszustand des FAD ist.

Gegen die im letzten Punkt aufgestellte Hypothese spricht allerdings die Publikation von Sellaro *et al.*, in der ein Grünlichteinfluß auf das Pflanzenwachstum von *Arabidopsis* beobachtet werden konnte [95]. Dabei wurde das Hypokotylwachstum als Funktion des Verhältnisses von Blau- und Grünlicht untersucht. Es stellte sich heraus, daß die blaulichtinduzierte Hemmung des Wachstums mit steigendem Grünlichtanteil nachläßt. Dies ist konsistent mit den in Abschnitt 5.3.3 dargestellten Ergebnissen, nach denen Grünlichtbeleuchtung zu einer Deaktivierung des Flavinradikals durch Überführung in seine voll reduzierte Form mit einer Halbwertszeit von  $\approx 11$  min führt. Damit dieser Effekt aber einen Einfluß auf das Pflanzenwachstum haben kann, muß die Aktivität des Cryptochroms direkt vom Oxidationszustand des FAD-Kofaktors abhängen, sofern die folgende Signalkaskade unabhängig von der Beleuchtungssituation ist.

---

<sup>1</sup>Die auf die Oberfläche eingestrahlte Lichtleistung eines durchschnittlichen Sommermittages in Zentraleuropa beträgt rund 70 mW/cm<sup>2</sup>. Unter Berücksichtigung der Verteilung dieses Wertes auf das gesamte Sonnenspektrum liegt der Photonenfluß für blaues Licht in der gleichen Größenordnung wie die hier benutzten Beleuchtungsparameter.



**Abbildung 7.1:** Simulation (schwarz) der ENDOR-Spektren (rot) im W-Band für *X. laevis* (6-4)-Photolyase. Bearbeitet übernommen aus [45]. Die Orientierungen sind  $B_0 \parallel g_x$  (A),  $B_0 \parallel g_y$  (B),  $B_0 \parallel g_z$  (C). Deutlich ist die schlechte Passung der Simulation für die Kopplung der  $H(8\alpha)$  in Fall (A) zu erkennen.

Während ein Grünlichteinfluß auf das Flavinradikal somit auch in der Physiologie der Pflanzen gezeigt wurde, ist zumindest fragwürdig, ob es sich dabei um einen biologisch sinnvollen Regelmechanismus oder nur einen photochemischen Nebeneffekt handelt. Die in Kapitel 5 ebenfalls festgestellte weitere Reduktion des Flavinradikals durch fortgesetzte Blaulichtbeleuchtung dagegen hat aufgrund der im Vergleich zur Dunkeladaptation sehr viel längeren Halbwertszeit ( $\approx 40$  min) sicherlich kaum physiologische Relevanz.

## 7.2 Unterschiede zwischen Zellen und aufgereinigtem Protein

Im Vergleich der ENDOR-Spektren von aufgereinigtem Protein und Ganzzellproben wurden einige Unterschiede in dem vermessenen Hyperfeinkopplungsmuster beobachtet. Zur näheren Untersuchung dieses Effektes wurden orientierungsselektive ENDOR-Messungen im W-Band durchgeführt. Dabei wurde deutlich, daß die spektralen Verschiebungen gut durch die Veränderung der isotropen Hyperfeinkopplung des Protons am ersten Kohlenstoff der Ribitylkette von  $\Delta |A| \approx -0,74$  MHz nachgebildet werden können.

Bei der Simulation der gemessenen Spektren war es nicht möglich die Intensitäten, insbesondere im Bereich der  $H(8\alpha)$ -Kopplung, vollständig korrekt zu reproduzieren. Die verwendeten Parameter können dabei entweder derart gewählt werden, daß die Signalförmigkeit für die Spektren mit  $B \parallel g_{xx}$  oder für die Spektren mit  $B \parallel g_{yy}$  dem experimentellen Befund weitestgehend entspricht. In den in Abschnitt 5.4 vorgestellten Ergebnissen wurde dabei die erste Möglichkeit gewählt. In diesem Zusammenhang ist eine Betrachtung von [45] interessant. In dieser Publikation benutzen Kay *et al.* orientierungssensitive ENDOR-Spektren zur Bestimmung der  $g$ -Matrix-Orientierung in *X. laevis* (6-4)-Photolyase. Auch in den dort veröffentlichten Daten ist die Übereinstimmung der simulierten Signalintensitäten mit den experimentellen Ergebnissen für das Spektrum einer Orientierung (in diesem Fall  $B_0 \parallel g_{xx}$ ) mangelhaft (Abbildung 7.1). Die Autoren begründen dies mit der Kopplung des  $H(1')$ ,

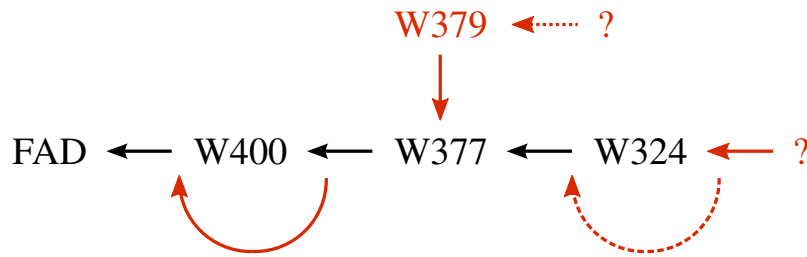
welche in den vorgestellten Berechnungen nicht berücksichtigt wurde. Diese Argumentation ist allerdings kritisch zu sehen, da die genannte Wechselwirkung in dem gezeigten Spektrum klar als ausgeprägte rundliche Schulter bei etwa  $\pm 10$  MHz beobachtet werden kann. Unter Berücksichtigung der anderen beiden dargestellten Spektren erscheint es zudem fragwürdig, ob die besagte Kopplung genug Intensität besitzt um das fehlende Signal zu verursachen.

Insgesamt kann demnach festgehalten werden, daß die Probleme in der korrekten Simulation der orientierungsselektiven ENDOR-Spektren nicht allein in der vorliegenden Arbeit auftraten. Wie am Ende von Abschnitt 5.4.4 bereits angemerkt wurde, ließe sich die Passung der Nachbildung der Spektren deutlich verbessern, wenn eine weitere Protonenkopplung angenommen würde. In diesem Fall könnten die Simulationsparameter derart gewählt werden, daß sowohl für  $B_0 \parallel g_{xx}$ , als auch für  $B_0 \parallel g_{yy}$  „fehlende“ Intensität entsteht, welche dann über die zusätzliche Hyperfeinwechselwirkung „ausgefüllt“ wird. Die Wasserstoffatome des FAD können dafür ausgeschlossen werden, übrig bliebe jedoch die Möglichkeit einer (oder mehrerer) dominanter Wasserstoffbrückenbindungen, beispielsweise zu nahen Seitenketten des Proteins, zum Adeninrest des FAD, welcher aufgrund der U-förmigen Verdrehung des Kofaktors sehr nah am Flavin zu liegen kommt, oder zu in der Bindungstasche lokalisierten Wassermolekülen.

Als mögliche strukturelle Ursache der beobachteten Verschiebung in der H(1')-Kopplung erfolgte eine Untersuchung unterschiedlicher geometrischer Reorientierungen des Isoalloxazinringes gegenüber der Ribitylkette (Abschnitt 5.4.5). Dabei wurde festgestellt, daß alle betrachteten Variationen zu einer Veränderung der genannten Kopplung führen, im Allgemeinen aber ebenfalls die Kopplung des zweiten Protons an C(1') verschieben. Da eine solche jedoch nicht beobachtet wird, kann die Forderung  $\Delta A_{\text{H}(1')_2} = 0$  als Bedingung zur Konstruktion einer Linearkombination der isolierten Verkippungen benutzt werden. Das am Ende von Abschnitt 5.4.5 vorgestellte Ergebnis der Kombination aus  $\delta\theta = -0,44^\circ$  und  $\delta\chi = -0,74^\circ$  ist somit eine Möglichkeit um die beobachteten Unterschiede in den Hyperfeinkopplungsmustern mittels kleiner Änderungen in der Struktur des FAD zu erklären.

Natürlich existiert eine Reihe anderer potentieller Reorientierungen (z.B. Streckungen bzw. Stauchungen der C-C-Bindungen), welche in dieser Arbeit nicht untersucht wurden. So konnte beispielsweise 2005 bei Messungen an DNA-Photolyase gezeigt werden, daß ENDOR-Untersuchungen sensitiv auf Bindungslängenunterschiede von lediglich 2,5% sind [53]. Außerdem weisen Untersuchungen von Kao *et al.* mit dem Auftreten einer leichten „schmetterlingsflügelartigen“ Biegung des Isoalloxazinringes (zumindest bei dem anionischen Semichinon sowie voll reduziertem FAD) eine weitere denkbare strukturelle Modifikation nach [66].

Leider war es im Anschluß an die geometrischen Betrachtungen nicht möglich die Ursache der Veränderungen zu identifizieren. Wie Weber *et al.* mit X-Band-cw-ENDOR-Messungen an *E. coli* DNA-Photolyase beobachten konnten, tritt dort eine Variation der Hyperfein-



**Abbildung 7.2:** Vorgeschlagenes Elektronentransferschema in *AtCry-1*. Das lichtangeregte Flavin oxidiert im Normalfall das Tryptophan W400. Allerdings ist es möglich diesen Schritt zu überspringen, was jedoch mit einer meßbaren Verringerung der Elektronentransferrate einhergeht. Im Anschluß erfolgt der Elektronenübergang von W377 auf W400. Zwischen W379 und W377 besteht ein temperaturabhängiges Gleichgewicht, weshalb das Radikal auf beiden Aminosäureresten gefunden werden kann. Normalerweise erfolgt die Reduktion im Anschluß über eine Elektronenaufnahme von W324. Für das W324• folgt nun entweder eine (verglichen mit der experimentellen Zeitauflösung) sehr schnelle Reduktion (aus der Lösung oder über eine weitere Aminosäure) oder die Spinpolarisation wird durch auftretende Wechselwirkungen zerstört. In jedem Fall ist ein signifikantes Signal des FAD•–W324• in gefrorener Lösung nicht detektierbar. Wenn der Elektronentransfer über W324 geblockt ist, erfolgt die Aufnahme eingeschränkt über alternative Pfade. Als zwei Optionen dafür sind beispielhaft ein direktes Überspringen des besagten Trp und ein Transfer über W379 eingezeichnet.

kopplungen des Flavin bei der Bindung von UV-geschädigter DNA auf [99]. Neben kleinen Veränderungen im Bereich der H(8 $\alpha$ )- und minimalen Unterschieden bei der H(6)-Kopplung kann eine Verschiebung der äußeren H(1')-Flanke von rund 0,15 MHz festgestellt werden. Dieser Wert ist deutlich kleiner als der in Abschnitt 5.4.2 gemessene Unterschied von 0,74 MHz und tatsächlich wird in der genannten Publikation als Ursache der Differenzen keine strukturelle Modifikation sondern eine Änderung der Polarisation in der Umgebung des Kofaktors diskutiert. Diese Veröffentlichung zeigt damit aber, daß eine Bindung im Bereich der FAD-Bindungstasche mittels ENDOR-Spektroskopie beobachtet werden kann. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten unter Zugabe von DNA oder ATP änderte sich das vermessene Spektrum im Vergleich zum reinen *AtCry-1* jedoch nicht signifikant. Die Differenz der Spektren von Protein und Zellen kann also nicht mit der Bindung einer dieser beiden Substanzen in der Ganzzellprobe erklärt werden.

### 7.3 Untersuchungen zur Bildung des transienten Dublettpears

In Bezug auf die in Kapitel 6 eingangs gestellten Fragen können folgende Antworten formuliert werden: Die beiden dominanten, in gefrorener Lösung von *AtCry-1* detektierten, lichtinduzierten Signale wurden mit den spinkorrelierten Radikalpaaren FAD•–W377• und FAD•–W379• identifiziert, wobei ein temperaturabhängiges Gleichgewicht zwischen den



beiden Populationen besteht. Hierbei erfolgte die Entscheidung für W379 hauptsächlich aus geometrischen Gesichtspunkten, da dieses Tryptophan als einzige aromatische Seitenkette in der Nähe des W377 verbleibt, nachdem W324 aus den Untersuchungen an mutiertem Protein ausgeschlossen werden konnte. Allerdings existiert auch diese Zuordnung unterstützende Literatur: So wird in [64] für *Synechocystis* sp. Cryptochrom-DASH der Elektronentransfer im Normalfall von einem außerhalb der Kette liegenden Tryptophan beobachtet. Die Position der Seitenkette der dafür vorgeschlagenen Aminosäure (W375 in SCry-DASH) relativ zum mittleren Glied der konservierten Kette ist etwa vergleichbar derjenigen des W379 in AtCry-1.

Die Halbwertszeit der beobachteten Spinpolarisation variiert je nach betrachteter Komponente zwischen 0,6  $\mu\text{s}$  und 1,2  $\mu\text{s}$ . Allerdings muß bei der Interpretation dieser Resultate beachtet werden, daß es aufgrund der verhältnismäßig hohen Mikrowellenleistung von 1 mW zu deutlichen Störungen der natürlichen Relaxationszeiten kommt, so daß die angegebenen Werte nur eine untere Schranke darstellen [107]. Da die Länge üblicher Pulssequenzen in der ESR in der gleichen Größenordnung liegen, sollte es möglich sein die Radikalpaare mittels Puls-ESR zu untersuchen.

Entgegen den Erwartungen konnte bei tiefen Temperaturen kein deutliches und eindeutig mit dem Paar  $\text{FAD}^\bullet\text{-W324}^\bullet$  verbundenes Signal beobachtet werden, was insofern erstaunlich ist, als daß auch an AtCry-1 bereits die Notwendigkeit der Existenz des Trp-324 für die physiologische Funktion des Proteins nachgewiesen wurde [39]. Aus den zur Verfügung stehenden Informationen wurde ein minimales Reaktionsmodell des Elektronentransfers abgeleitet (Abbildung 7.2).

Die vorgestellte Interpretation der Meßergebnisse geht von einer Temperaturabhängigkeit des Elektronentransfers aus. Zwar sagt die Marcus-Theorie unter bestimmten Bedingungen temperaturunabhängige Transferraten voraus, dies gilt allerdings nur unter starken Einschränkungen [82, 108]: Erstens muß das chemische Potential für einen idealen Elektronenübergang optimiert sein ( $\Delta G^\circ = -\lambda$ ) und zweitens darf der Einfluß der (im Allgemeinen stark temperaturabhängigen) Reorganisationsenergie nicht dominieren. Tatsächlich wird in einigen photoaktiven Reaktionszentren nur eine schwache Abhängigkeit beobachtet (z.B. [100, 109]), wobei allerdings zu beachten ist, daß es sich bei den dabei untersuchten Systemen um photosynthetisch aktive Proteine handelt, deren Funktion signifikant von einer hohen Geschwindigkeit der Ladungstrennung abhängt. Es ist daher plausibel von im Laufe der Evolution optimierten Bedingungen auszugehen. In AtCry-1 handelt es sich bei dem Transfer mutmaßlich eher um einen „Nebeneffekt“ der Photoaktivierung des Flavins. Für die Funktion des Proteins ist eine besonders schnelle Elektronenbewegung nach der einmal erfolgten Reduktion des angeregten Kofaktors nicht von wesentlichem Vorteil, so daß die Transferraten nicht notwendigerweise nahe am theoretischen Optimum liegen müssen ( $\Delta G^\circ \neq -\lambda$ ). Außerdem ist der Einfluß der Reorganisationsenergie bei kleinen Radikalen (wie einem Tryptophan) erheblich, so daß die Einschränkung der Beweglichkeit

der umgebenden Lösemittelmoleküle oder termisch unterdrückte Vibrationsfreiheitsgrade zu einer zusätzlichen Energiebarriere führen [110]. Unter diesen Bedingungen ist eine Temperaturabhängigkeit der Transferraten nicht ungewöhnlich (z.B. [111–114]) und eine große Anzahl an Elektronentransferprozessen in Proteinen lassen sich durch Unterschreiten einer charakteristischen „Sprungtemperatur“ ausfrieren (z.B. [115–117]).

In Kapitel 6.4.2 wird eine Veränderung in der relativen Geometrie der Transferpartner zueinander oder das Öffnen einer neuen dynamischen Mode der Seitenketten vorgeschlagen. Diese Hypothesen basiert dabei auf dem Zeitverhalten der spinpolarisierten Spektren. Wie Abbildung 6.4 auf Seite 99 zeigt, erfolgt die Bildung der beiden hauptsächlich beobachteten Signalkomponenten TT und HT zwischen 0,45  $\mu\text{s}$  (bei 120 K) und 0,25  $\mu\text{s}$  (bei 200 K) gegeneinander verzögert. Die Zeitkonstante des Elektronentransfers muß also mindestens für die Bildung des später beobachteten Radikalpaars in der Größenordnung von 100 ns liegen, wenn davon ausgegangen wird, daß der Zeitpunkt der Detektion des zuerst auftretenden Signals hauptsächlich durch die experimentelle Auflösung definiert ist. Für proteingebundenes Flavin ist bekannt, daß die Reduktion des angeregten Flavins bei Präsenz aromatischer Seitenketten in der näheren Umgebung innerhalb einiger hundert Femtosekunden bis hin zu wenigen zehn Pikosekunden erfolgt [65, 66]. Brettel *et al.* konnten in den gegenüber Cryptochromen strukturell sehr ähnlichen Photolyasen bei Raumtemperatur eine Zeitkonstante von 30 ps für die Oxidation des innersten Trp und  $< 4$  ps für die darauf folgende Oxidation des mittleren Trp der Kette ermitteln [63]. Wenn der Elektronentransfer in vergleichbaren Proteinen im Normalfall auf der Zeitskala von Pikosekunden abgeschlossen ist, muß ein deutlich langsamerer Einfluß zu der beobachteten Verzögerung in AtCry-1 bei tiefen Temperaturen führen. Kombiniert mit der Beobachtung einer Verringerung des zeitlichen Unterschiedes zwischen Maximum des TT- und HT-Signales bei steigender Temperatur erscheint der Vorschlag der Notwendigkeit der Bevölkung einer spezifischen Gruppe an Zuständen innerhalb des von den Seitenketten insgesamt populierbaren Ensembles realistisch. Die beobachtete lange Zeitskala für den Übergang des Elektrons von W379 auf W400 wäre dann durch die benötigte Zeit zur Diffusion des Systems in einen den Elektronentransfer begünstigenden Konstellation bestimmt.

Desweiteren müssen die vorgestellten Ergebnisse im Bezug auf die von Brettel *et al.* veröffentlichten Resultate zum Elektronentransport in AtCry-1 [37] diskutiert werden. Dabei wurde die Bildung des Flavinradikals mittels transientser Absorptionsspektroskopie untersucht und neben dem Flavin- und einem Typtophanradikal wird auch die Existenz eines Tyrosinradikals postuliert. Dessen Auftreten korreliert mit dem Verschwinden des Trp-Signals, weshalb eine Zuordnung des Tyr als Elektronendonator des W324 abgeleitet wurde, ohne daß es möglich war ein spezielles Tyrosin dafür zu identifizieren. Erst dieses Tyr soll als finales Kettenglied fungieren und schließlich ein Elektron aus der Lösung aufnehmen. Leider ist die zeitliche Auflösung dieser Experimente um Größenordnungen niedriger als die Lebensdauer des spinkorrelierten Dublett-paars, was eine Verknüpfung mit den in der

vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen erschwert. Brettel *et al.* gehen von einer (innerhalb ihrer experimentellen Zeitauflösung) sofortigen Oxidation des W324 aus, wohingegen der anschließende Elektronentransfer vom Tyrosin auf der Zeitskala einer Millisekunde stattfinden soll.

Eine wichtige Beobachtung bei den Untersuchungen der spinkorrelierten Dublettpaare ist zudem die Unmöglichkeit der Detektion eines solchen Signals an AtCry-1 in flüssiger Lösung. In Kombination mit den Ergebnissen der entsprechenden Messungen bei niedrigen Temperaturen und an spezifischen Mutanten des Proteins lassen sich zwei wesentliche Punkte folgern:

- Erstens besteht trotz der hohen sequenziellen und strukturellen Ähnlichkeit zu anderen Proteinen der Gruppe der Photolyasen/Cryptochrome ein deutlicher Unterschied in Ziel und/oder Kinetik des Elektronentransportes bei Raumtemperatur [3, 36, 62, 64]. Zur Diskussion der physiologischen Prozesse ist es somit nicht möglich die an einem Vertreter der Photolyase/Cryptochrom-Proteinfamilie gefundenen Ergebnisse auf ein anderes Protein derselben Gruppe zu übertragen. Bereits kleine Variationen in der Sequenz und Struktur können zu signifikanten Veränderungen in dem photoinduzierten Elektronentransfer führen, weshalb aus anderen Proteinen abgeleitet Aussagen immer verifiziert werden sollten.
- Zweitens erstaunt der extreme Unterschied zwischen flüssiger und gefrorener Lösung, auch wenn eine Temperaturabhängigkeit des Elektronentransfers im Protein generell nicht überrascht. Diese Messungen zeigen daher eindrucksvoll, daß die Ergebnisse von Untersuchungen, Berechnungen und Simulationen am makroskopisch starren Protein bei ihrer Übertragung auf physiologische Bedingungen zumindest kritisch geprüft werden müssen.

Zur Einschränkung der verbleibenden Unklarheiten in der Interpretation der vorhandenen Spektren wird die Vermessung weiterer Mutanten, insbesondere von W377F und W379F vorgeschlagen. Diese Untersuchungen könnten die in Kapitel 6 vorgestellten Zuordnungen endgültig bestätigen (oder ausschließen). Darüber hinaus wäre auch die Analyse verschiedener Doppelmутanten, wie z.B. W400F/W377F interessant. Alle möglichen Aussagen beziehen sich jedoch immer auf AtCry-1 im gefrorenen Zustand, zur Aufklärung des Elektronentransportes in flüssiger Lösung kann die in dieser Arbeit benutzte transiente ESR unter den gegebenen Umständen vorerst leider nur indirekte Beiträge liefern. Hier sind weitere Untersuchungen mit schnellen optischen Methoden oder gepulster ESR notwendig.

## 7.4 Abschließende Bemerkungen

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden verschiedene paramagnetische Zustände des Cryptochrom-1 aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. Die vorgestellten Messungen und deren Interpretationen tragen dabei einen weiteren Teil zum Verständnis der Photobiophysik dieses Proteins bei. Eine abschließende Klärung der Fragen zum Mechanismus der Aktivierung und Deaktivierung des Proteins ist allein mittels ESR-Methoden erwartungsgemäß zwar nicht möglich, aber die hier dargelegten Ergebnisse liefern wichtige Hinweise, welche bei künftigen Vorschlägen zum Reaktionsmechanismus beachtet werden müssen.

# Literaturverzeichnis

- [1] FUJIHASHI, Masahiro; NUMOTO, Nobutaka; KOBAYASHI, Yukiko; MIZUSHIMA, Akira; TSUJIMURA, Masanari; NAKAMURA, Akira; KAWARABAYASI, Yutaka; MIKI, Kunio: Crystal structure of archaeal photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with two FAD molecules: implication of a novel light-harvesting cofactor. In: *J Mol Biol* 365 (2007), Jan, Nr. 4, 903–910
- [2] LIN, Chentao; TODO, Takeshi: The cryptochromes. In: *Genome Biol* 6 (2005), Nr. 5, 220
- [3] WEBER, Stefan: Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. In: *BBA Bioenerg* 1707 (2005), Nr. 1, 1 - 23. – ISSN 0005–2728. – Functional Redox Radicals in Proteins
- [4] SANCAR, Aziz: Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. In: *Chem Rev* 103 (2003), Jun, Nr. 6, 2203–2237
- [5] SENGER, H. (Hrsg.): *Proceedings in Life Sciences – The Blue Light Syndrome*. Springer-Verlag, 1980
- [6] AHMAD, M.; CASHMORE, A. R.: HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. In: *Nature* 366 (1993), Nov, Nr. 6451, 162–166
- [7] LIN, C.; ROBERTSON, D. E.; AHMAD, M.; RAIBEKAS, A. A.; JORNS, M. S.; DUTTON, P. L.; CASHMORE, A. R.: Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1. In: *Science* 269 (1995), Aug, Nr. 5226, S. 968–970
- [8] MALHOTRA, K.; KIM, S. T.; BATSCHAUER, A.; DAWUT, L.; SANCAR, A.: Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. In: *Biochemistry* 34 (1995), May, Nr. 20, S. 6892–6899
- [9] CASHMORE, A. R.; JARILLO, J. A.; WU, Y. J.; LIU, D.: Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. In: *Science* 284 (1999), Apr, Nr. 5415, S. 760–765
- [10] HUALA, E.; OELLER, P. W.; LISCUM, E.; HAN, I. S.; LARSEN, E.; BRIGGS, W. R.: *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. In: *Science* 278 (1997), Dec, Nr. 5346, S. 2120–2123

- [11] BRIGGS, W. R.; HUALA, E.: Blue-light photoreceptors in higher plants. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 15 (1999), 33–62
- [12] BRIGGS, Winslow R.; CHRISTIE, John M.: Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. In: *TiPS* 7 (2002), May, Nr. 5, S. 204–210
- [13] TODO, T.; RYO, H.; YAMAMOTO, K.; TOH, H.; INUI, T.; AYAKI, H.; NOMURA, T.; IKENAGA, M.: Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. In: *Science* 272 (1996), Apr, Nr. 5258, S. 109–112
- [14] HSU, D. S.; ZHAO, X.; ZHAO, S.; KAZANTSEV, A.; WANG, R. P.; TODO, T.; WEI, Y. F.; SANCAR, A.: Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. In: *Biochemistry* 35 (1996), Nov, Nr. 44, 13871–13877
- [15] SELBY, Christopher P.; SANCAR, Aziz: A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006), Nov, Nr. 47, 17696–17700
- [16] POKORNY, Richard; KLAR, Tobias; HENNECKE, Ulrich; CARELL, Thomas; BATSCHAUER, Alfred; ESSEN, Lars-Oliver: Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008), Dec, Nr. 52, 21023–21027
- [17] BRUDLER, Ronald; HITOMI, Kenichi; DAIYASU, Hiromi; TOH, Hiroyuki; KUCHO, Ken ichi; ISHIURA, Masahiro; KANEHISA, Minoru; ROBERTS, Victoria A.; TODO, Takeshi; TAINER, John A.; GETZOFF, Elizabeth D.: Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. In: *Mol Cell* 11 (2003), Jan, Nr. 1, S. 59–67
- [18] YANG, H. Q.; WU, Y. J.; TANG, R. H.; LIU, D.; LIU, Y.; CASHMORE, A. R.: The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. In: *Cell* 103 (2000), Nov, Nr. 5, S. 815–827
- [19] ZHAO, S.; SANCAR, A.: Human blue-light photoreceptor hCRY2 specifically interacts with protein serine/threonine phosphatase 5 and modulates its activity. In: *Photochem Photobiol* 66 (1997), Nov, Nr. 5, S. 727–731
- [20] GRIFFIN, E. A.; STAKNIS, D.; WEITZ, C. J.: Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. In: *Science* 286 (1999), Oct, Nr. 5440, S. 768–771
- [21] SHEARMAN, L. P.; SRIRAM, S.; WEAVER, D. R.; MAYWOOD, E. S.; CHAVES, I.; ZHENG, B.; KUME, K.; LEE, C. C.; HORST, G. T. d.; HASTINGS, M. H.; REPPERT, S. M.: Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. In: *Science* 288 (2000), May, Nr. 5468, S. 1013–1019
- [22] HORST, G. T. d.; MUIJTJENS, M.; KOBAYASHI, K.; TAKANO, R.; KANNO, S.; TAKAO,

- M.; WIT, J. de; VERKERK, A.; EKER, A. P.; LEENEN, D. van; BUIJS, R.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J. H.; YASUI, A.: Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. In: *Nature* 398 (1999), Apr, Nr. 6728, 627–630
- [23] AHMAD, M.; JARILLO, J. A.; SMIRNOVA, O.; CASHMORE, A. R.: Cryptochrome blue-light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism. In: *Nature* 392 (1998), Apr, Nr. 6677, 720–723
- [24] CANAMERO, Roberto C.; BAKRIM, Nadia; BOULY, Jean-Pierre; GARAY, Alvaro; DUDKIN, Elizabeth E.; HABRICOT, Yvette; AHMAD, Margaret: Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*. In: *Planta* 224 (2006), Oct, Nr. 5, 995–1003
- [25] SCHULTEN, Klaus; SWENBERG, Charles E.; WELLER, Albert: A Biomagnetic Sensory Mechanism Based on Magnetic Field Modulated Coherent Electron Spin Motion. In: *Z Phys Chem* 111 (1978), S. 1–5
- [26] SCHULTEN, Klaus: Magnetic field effects in chemistry and biology. In: TREUSCH, J. (Hrsg.): *Festkörperprobleme*, Vieweg, Braunschweig, 1982
- [27] SCHULTEN, K.; WINDEMUTH, A.: Model for a physiological magnetic compass. In: *Biophysical Effects of Steady Magnetic Fields*, Springer, Berlin, 1986
- [28] EFIMOVA, Olga; HORE, P. J.: Role of exchange and dipolar interactions in the radical pair model of the avian magnetic compass. In: *Biophys J* 94 (2008), Mar, Nr. 5, 1565–1574
- [29] YOSHII, Taishi; AHMAD, Margaret; HELFRICH-FÖRSTER, Charlotte: Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity of *Drosophila*'s circadian clock. In: *PLoS Biol* 7 (2009), Apr, Nr. 4, e1000086
- [30] AHMAD, Margaret; GALLAND, Paul; RITZ, Thorsten; WILTSCHKO, Roswitha; WILTSCHKO, Wolfgang: Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. In: *Planta* 225 (2007), Feb, Nr. 3, 615–624
- [31] SOLOV'YOV, Iliia A.; CHANDLER, Danielle E.; SCHULTEN, Klaus: Magnetic field effects in *Arabidopsis thaliana* cryptochrome-1. In: *Biophys J* 92 (2007), Apr, Nr. 8, 2711–2726
- [32] HARRIS, Sue-Re; HENBEST, Kevin B.; MAEDA, Kiminori; PANNELL, John R.; TIMMEL, Christiane R.; HORE, P. J.; OKAMOTO, Haruko: Effect of magnetic fields on cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. In: *J R Soc Interface* 6 (2009), Dec, Nr. 41, 1193–1205
- [33] BRAUTIGAM, Chad A.; SMITH, Barbara S.; MA, Zhiquan; PALNITKAR, Maya; TOMCHICK, Diana R.; MACHIUS, Mischa; DEISENHOFER, Johann: Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana*. In: *Proc Natl*

*Acad Sci USA* 101 (2004), Aug, Nr. 33, 12142–12147

- [34] HITOMI, Kenichi; DiTACCHIO, Luciano; ARVAI, Andrew S.; YAMAMOTO, Junpei; KIM, Sang-Tae; TODO, Takeshi; TAINER, John A.; IWAI, Shigenori; PANDA, Satchidananda; GETZOFF, Elizabeth D.: Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (2009), Apr, Nr. 17, 6962–6967
- [35] KLAR, Tobias; KAISER, Gebhard; HENNECKE, Ulrich; CARELL, Thomas; BATSCHAUER, Alfred; ESSEN, Lars-Oliver: Natural and non-natural antenna chromophores in the DNA photolyase from *Thermus thermophilus*. In: *ChemBioChem* 7 (2006), Nov, Nr. 11, 1798–1806
- [36] BISKUP, Till; SCHLEICHER, Erik; OKAFUJI, Asako; LINK, Gerhard; HITOMI, Kenichi; GETZOFF, Elizabeth D.; WEBER, Stefan: Direct observation of a photoinduced radical pair in a cryptochrome blue-light photoreceptor. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 48 (2009), Nr. 2, 404–407
- [37] GIOVANI, Baldissera; BYRDIN, Martin; AHMAD, Margaret; BRETTEL, Klaus: Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. In: *Nat Struct Biol* 10 (2003), Nr. 6, S. 489–490
- [38] BYRDIN, Martin; EKER, André P. M.; VOS, Marten H.; BRETTEL, Klaus: Dissection of the triple tryptophan electron transfer chain in *Escherichia coli* DNA photolyase: Trp382 is the primary donor in photoactivation. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003), Jul, Nr. 15, 8676–8681
- [39] ZEUGNER, Anke; BYRDIN, Martin; BOULY, Jean-Pierre; BAKRIM, Nadia; GIOVANI, Baldissera; BRETTEL, Klaus; AHMAD, Margaret: Light-induced electron transfer in *Arabidopsis* cryptochrome-1 correlates with in vivo function. In: *J Biol Chem* 280 (2005), May, Nr. 20, 19437–19440
- [40] *Kapitel 1.* In: MACHEROUX, Peter: *Flavoprotein Protocols.* Springer Science+Business Media, 1999, S. 1–7
- [41] MASSEY, V.; HEMMERICH, P.: Active-site probes of flavoproteins. In: *Biochem Soc Trans* 8 (1980), Jun, Nr. 3, S. 246–257
- [42] HEMMERICH, P.; MASSEY, V.; FENNER, H.: Flavin and 5-deazaflavin: A chemical evaluation of 'modified' flavoproteins with respect to the mechanics of redox biocatalysis. In: *FEBS Lett.* 84 (1977), S. 5–21
- [43] *Kapitel 1.* In: EDWARDS, Ana M.: *General Properties of Flavins.* RSC Publishing, 2006, S. 1–11
- [44] GARCIA, Jose I.; MEDINA, Milagros; SANCHO, Javier; ALONSO, Pablo J.; GOMEZ-MORENO, Carlos; MAYORAL, Jose A.; MARTÍNEZ, Jesus I.: Theoretical Analysis of



- the Electron Spin Density Distribution of the Flavin Semiquinone Isoalloxazine Ring within Model Protein Environments. In: *J Phys Chem* 106 (2002), S. 4729–4735
- [45] KAY, Christopher W. M.; SCHLEICHER, Erik; HITOMI, Kenichi; TODO, Takeshi; BITTL, Robert; WEBER, Stefan: Determination of the g-matrix orientation in flavin radicals by high-field/high-frequency electron-nuclear double resonance. In: *Magn Reson Chem* 43 Spec no. (2005), Nov, S96–102
- [46] HENBEST, Kevin B.; MAEDA, Kiminori; HORE, P. J.; JOSHI, Monika; BACHER, Adelbert; BITTL, Robert; WEBER, Stefan; TIMMEL, Christiane R.; SCHLEICHER, Erik: Magnetic-field effect on the photoactivation reaction of *Escherichia coli* DNA photolyase. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008), Sep, Nr. 38, 14395–14399
- [47] WEBER, Stefan; BISKUP, Till; OKAFUJI, Asako; MARINO, Anthony R.; BERTHOLD, Thomas; LINK, Gerhard; HITOMI, Kenichi; GETZOFF, Elizabeth D.; SCHLEICHER, Erik; NORRIS, James R.: Origin of light-induced spin-correlated radical pairs in cryptochrome. In: *J Phys Chem B* 114 (2010), Nov, Nr. 45, 14745–14754
- [48] GINDT, Y. M.; VOLLENBROEK, E.; WESTPHAL, K.; SACKETT, H.; SANCAR, A.; BABCOCK, G. T.: Origin of the transient electron paramagnetic resonance signals in DNA photolyase. In: *Biochemistry* 38 (1999), Mar, Nr. 13, 3857–3866
- [49] SCHNEGG, A.; KAY, C. W. M.; SCHLEICHER, E.; HITOMI, K.; TODO, T.; MÖBIUS, K.; WEBER, S.: The g-tensor of the flavin cofactor in (6-4) photolyase: a 360 GHz/12.8 T electron paramagnetic resonance study. In: *Molecular Physics* 104 (2006), S. 1627–1633
- [50] FUCHS, Martin R.; SCHLEICHER, Erik; SCHNEGG, Alexander; KAY, Christopher W. M.; TORRING, Jens T.; BITTL, Robert; BACHER, Adelbert; RICHTER, Gerald; MOBIUS, Klaus; STEFAN WEBER, Stefan: g-Tensor of the Neutral Flavin Radical Cofactor of DNA Photolyase Revealed by 360 GHz Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. In: *J Phys Chem* 106 (2002), S. 8885–8890
- [51] OKAFUJI, Asako; SCHNEGG, Alexander; SCHLEICHER, Erik; MÖBIUS, Klaus; WEBER, Stefan: G-tensors of the flavin adenine dinucleotide radicals in glucose oxidase: a comparative multifrequency electron paramagnetic resonance and electron-nuclear double resonance study. In: *J Phys Chem B* 112 (2008), Mar, Nr. 11, 3568–3574
- [52] WEBER, S.; MÖBIUS, K.; RICHTER, G.; KAY, C. W.: The electronic structure of the flavin cofactor in DNA photolyase. In: *J Am Chem Soc* 123 (2001), Apr, Nr. 16, S. 3790–3798
- [53] WEBER, Stefan; KAY, Christopher W. M.; BACHER, Adelbert; RICHTER, Gerald; BITTL, Robert: Probing the N(5)-H bond of the isoalloxazine moiety of flavin radicals by X- and W-band pulsed electron-nuclear double resonance. In: *ChemPhysChem* 6 (2005), Feb, Nr. 2, 292–299

- [54] SCHLEICHER, Erik; WENZEL, Ringo; AHMAD, Margaret; BATSCHAUER, Alfred; ESSEN, Lars-Oliver; HITOMI, Kenichi; GETZOFF, Elisabeth D.; BITTL, Robert; WEBER, Stefan; OKAFUJI, Asako: The Electronic State of Flavoproteins: Investigations with Proton Electron-Nuclear Double Resonance. In: *Appl Magn Reson* 37 (2010), S. 339–352
- [55] KOWALCZYK, Radoslaw M.; SCHLEICHER, Erik; BITTL, Robert; WEBER, Stefan: The photoinduced triplet of flavins and its protonation states. In: *J Am Chem Soc* 126 (2004), Sep, Nr. 36, 11393–11399
- [56] PARTCH, Carrie L.; CLARKSON, Michael W.; OZGÜR, Sezgin; LEE, Andrew L.; SANCAR, Aziz: Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. In: *Biochemistry* 44 (2005), Mar, Nr. 10, 3795–3805
- [57] HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K.: VMD: visual molecular dynamics. In: *J Mol Graph* 14 (1996), Feb, Nr. 1, S. 33–8, 27–8
- [58] BOULY, Jean-Pierre; SCHLEICHER, Erik; DIONISIO-SESE, Maribel; VANDENBUSCHE, Filip; STRAETEN, Dominique Van D.; BAKRIM, Nadia; MEIER, Stefan; BATSCHAUER, Alfred; GALLAND, Paul; BITTL, Robert; AHMAD, Margaret: Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. In: *J Biol Chem* 282 (2007), Mar, Nr. 13, 9383–9391
- [59] AHMAD, M.; JARILLO, J. A.; SMIRNOVA, O.; CASHMORE, A. R.: The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro. In: *Mol Cell* 1 (1998), Jun, Nr. 7, S. 939–948
- [60] MÁŠ, P.; DEVLIN, P. F.; PANDA, S.; KAY, S. A.: Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. In: *Nature* 408 (2000), Nov, Nr. 6809, 207–211
- [61] SHALITIN, Dror; YANG, Hongyun; MOCKLER, Todd C.; MAYMON, Maskit; GUO, Hongwei; WHITELAM, Garry C.; LIN, Chentao: Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. In: *Nature* 417 (2002), Jun, Nr. 6890, 763–767
- [62] WEBER, Stefan; KAY, Christopher W. M.; MOGLING, Heike; MÖBIUS, Klaus; HITOMI, Kenichi; TODO, Takeshi: Photoactivation of the flavin cofactor in *Xenopus laevis* (6-4) photolyase: Observation of a transient tyrosyl radical by time-resolved electron paramagnetic resonance. In: *PNAS* 99 (2002), 1319–1322
- [63] LUKACS, Andras; EKER, André P. M.; BYRDIN, Martin; BRETTEL, Klaus; VOS, Marten H.: Electron hopping through the 15 Å triple tryptophan molecular wire in DNA photolyase occurs within 30 ps. In: *J Am Chem Soc* 130 (2008), Nov, Nr. 44, 14394–14395
- [64] BISKUP, Till: *Elektronenspinresonanz an funktionell relevanten paramagnetischen Intermediaten blaulichtaktiver Flavoproteine*, Freie Universität Berlin; Institut für

- [65] ZHONG, D.; ZEWAHL, A. H.: Femtosecond dynamics of flavoproteins: charge separation and recombination in riboflavine (vitamin B<sub>2</sub>)-binding protein and in glucose oxidase enzyme. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001), Oct, Nr. 21, 11867–11872
- [66] KAO, Ya-Ting; SAXENA, Chaitanya; HE, Ting-Fang; GUO, Lijun; WANG, Lijuan; SANCAR, Aziz; ZHONG, Dongping: Ultrafast dynamics of flavins in five redox states. In: *J Am Chem Soc* 130 (2008), Oct, Nr. 39, 13132–13139
- [67] BOULY, Jean-Pierre; GIOVANI, Baldissera; DJAMEI, Armin; MUELLER, Markus; ZEUGNER, Anke; DUDKIN, Elizabeth A.; BATSCHAUER, Alfred; AHMAD, Margaret: Novel ATP-binding and autophosphorylation activity associated with *Arabidopsis* and human cryptochrome-1. In: *Eur J Biochem* 270 (2003), Jul, Nr. 14, S. 2921–2928
- [68] BURNEY, Sarah; HOANG, Nathalie; CARUSO, Michael; DUDKIN, Elizabeth A.; AHMAD, Margaret; BOULY, Jean-Pierre: Conformational change induced by ATP binding correlates with enhanced biological function of *Arabidopsis* cryptochrome. In: *FEBS Lett* 583 (2009), May, Nr. 9, 1427–1433
- [69] IMMELN, Dominik; SCHLESINGER, Ramona; HEBERLE, Joachim; KOTTKE, Tilman: Blue light induces radical formation and autophosphorylation in the light-sensitive domain of *Chlamydomonas* cryptochrome. In: *J Biol Chem* 282 (2007), Jul, Nr. 30, 21720–21728
- [70] AHMAD, Margaret: *Persönliche Mitteilung*. unveröffentlicht,
- [71] HIMO, Fahmi; ERIKSSON, Leif A.: Theoretical Study of Model Tryptophan Radicals and Radical Cations: Comparison with Experimental Data of DNA Photolyase, Cytochrome c Peroxidase, and Ribonucleotide Reductase. In: *J Phys Chem B* 101 (1997), S. 9811–9819
- [72] AUBERT, C.; VOS, M. H.; MATHIS, P.; EKER, A. P.; BRETTEL, K.: Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. In: *Nature* 405 (2000), Jun, Nr. 6786, 586–590
- [73] POGNI, Rebecca; BARATTO, M. C.; TEUTLOFF, Christian; GIANSANTI, Stefania; RUIZ-DUEÑAS, Francisco J.; CHOINOWSKI, Thomas; PIONTEK, Klaus; MARTÍNEZ, Angel T.; LENDZIAN, Friedhelm; BASOSI, Riccardo: A tryptophan neutral radical in the oxidized state of versatile peroxidase from *Pleurotus eryngii*: a combined multifrequency EPR and density functional theory study. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Apr, Nr. 14, 9517–9526
- [74] BLEIFUSS, Gunther; KOLBERG, Matthias; POTSCHE, Stephan; HOFBAUER, Wulf; BITTL, Robert; LUBITZ, Wolfgang; GRASLUND, Astrid; LASSMANN, Gunter; LENDZIAN, Friedhelm: Tryptophan and Tyrosine Radicals in Ribonucleotide Reductase:

- A Comparative High-Field EPR Study at 94 GHz. In: *Biochemistry* 40 (2001), S. 15362–15368
- [75] ZAVOISKY, Yevgeny K.: In: *J Phys USSR* 9 (1945), 221 S.
- [76] HOFF, A. J. (Hrsg.): *Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry*. Elsevier, 1989
- [77] WEIL, John A.; BOLTON, James R.: *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*. John Wiley & Sons, 2007
- [78] UHLENBECK, G. E.; GOUDSMIT, S. A.: Ersetzung der Hypothese vom unmechanischen Zwang durch eine Forderung bezüglich des inneren Verhaltens jedes einzelnen Elektrons. In: *Naturwissenschaften* 47 (1925), S. 953
- [79] K. NAKUMURA ET AL. (PARTICLE DATA GROUP): Review of Particle Physics 2010. In: *JPG* 37 (2010), S. 075021
- [80] GERLACH, Walther; STERN, Otto: Der experimentelle Nachweis der Richtungsquantelung im Magnetfeld. In: *Zeitschrift für Physik* 9 (1922), S. 349–352
- [81] KANTER, F. J. J. D.; KAPTEIN, R.; SANTEN, R. A. V.: Magnetic field dependent biradical CIDNP as a tool for the study of conformations of polymethylene chains. In: *Chem Phys Lett* 45 (1977), S. 575
- [82] MOSER, C. C.; KESKE, J. M.; WARNCKE, K.; FARID, R. S.; DUTTON, P. L.: Nature of biological electron transfer. In: *Nature* 355 (1992), Feb, Nr. 6363, 796–802
- [83] HORE, P. J.; HUNTER, D. A.; MCKIE, C. D.; HOFF, A. J.: Electron Paramagnetic Resonance of Spin-Correlated Radical Pairs in Photosynthetic Reactions. In: *Chem Phys Lett* 137 (1987), S. 495
- [84] JESCHKE, Gunnar: *Kurze Einführung in die elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie*. <http://www.epr.ethz.ch/education/BasicConceptsofEPR/epr2007.pdf> : online, Feb. 2008
- [85] HAHN, E.L.: Spin echoes. In: *Phys Rev* 80 (1950), S. 580–594
- [86] DAVIES, E. R.: A new pulse ENDOR technique. In: *Phys Lett* 47A (1974), Nr. 1, S. 1
- [87] HOANG, Nathalie; SCHLEICHER, Erik; KACPRZAK, Sylwia; BOULY, Jean-Pierre; PICOT, Marie; WU, William; BERNDT, Albrecht; WOLF, Eva; BITTL, Robert; AHMAD, Margaret: *Human and Drosophila* cryptochromes are light activated by flavin photoreduction in living cells. In: *PLoS Biol* 6 (2008), Jul, Nr. 7, e160
- [88] CLONTECH LABORATORIES: *BacPAK Baculovirus Expression System User Manual*. PT1260, May 1999
- [89] FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.;

CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A. JR.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, A.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J.: *Gaussian 09 Revision A.02*. – Gaussian Inc. Wallingford CT 2009

- [90] BECKE, A. D.: Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. In: *J Chem Phys* 98 (1993), S. 5648–5652
- [91] BARONE, V.; CHONG, D. P. (Hrsg.): *Recent Advances in Density Functional Methods, Part I*. World Scientific Publ. Co., Singapore, 1996
- [92] STOLL, Stefan; SCHWEIGER, Arthur: EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. In: *J Magn Reson* 178 (2006), Jan, Nr. 1, 42–55
- [93] ZECH, Stephan G.: *Pulsed and Transient Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy on Light-Induced Radical Pairs in Photosynthetic Reaction Centers*, Technische Universität Berlin, Diss., 1998
- [94] DAMIANI, Michael J.; YALLOWAY, Gary N.; LU, Jessica; MCLEOD, Neahlanna R.; O'NEILL, Melanie A.: Kinetic stability of the flavin semiquinone in photolyase and cryptochrome-DASH. In: *Biochem* 48 (2009), Dec, Nr. 48, 11399–11411
- [95] SELLARO, Romina; CREPY, María; TRUPKIN, Santiago A.; KARAYEKOV, Elizabeth; BUCHOVSKY, Ana S.; ROSSI, Constanza; CASAL, Jorge J.: Cryptochrome as a sensor of the blue/green ratio of natural radiation in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiol* 154 (2010), Sep, Nr. 1, 401–409
- [96] KAY, C. W.; FEICHT, R.; SCHULZ, K.; SADEWATER, P.; SANCAR, A.; BACHER, A.; MÖBIUS, K.; RICHTER, G.; WEBER, S.: EPR, ENDOR, and TRIPLE resonance spectroscopy on the neutral flavin radical in *Escherichia coli* DNA photolyase. In: *Biochemistry* 38 (1999), Dec, Nr. 51, S. 16740–16748
- [97] HELLER, Chonon; MCCONNELL, Harden M.: Radiation Damage in Organic Crystals. II. Electron Spin Resonance of (C<sub>0</sub>2H)CH<sub>2</sub>CH(C<sub>0</sub>2H) in β-Succinic Acid. In: *J Chem*

*Phys* 32 (1960), S. 1535–1539

- [98] HORSFIELD, A; MORTON, J. R.; WHIFFEN, D.H.: The electron spin resonance spectrum of  $\text{CH}_3\text{CHCOOH}$  at 77K in l- $\alpha$ -alanine. In: *Mol Phys* 4 (1961), S. 425–431
- [99] WEBER, S.; RICHTER, G.; SCHLEICHER, E.; BACHER, A.; MÖBIUS, K.; KAY, C. W.: Substrate binding to DNA photolyase studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy. In: *Biophys J* 81 (2001), Aug, Nr. 2, 1195–1204
- [100] LAUTERWASSER, C.; FINKELE, U.; SCHEER, H.; ZINTH, W.: Temperature dependence of the primary electron transfer in photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. In: *Chem Phys Lett* 183 (1991), S. 471–477
- [101] SHRAGER, Richard I.; HENDLER, Richard W.: Titration of Individual Components in a Mixture with Resolution of Difference Spectra, pKs, and Redox Transitions. In: *Anal Chem* 54 (1982), S. 1147–1152
- [102] HENDLER, Richard W.; SHRAGER, Richard I.: Deconvolutions based on singular value decomposition and the pseudoinverse: a guide for beginners. In: *JBBM* 1033 (1993), S. 1–33
- [103] NORRIS, J. R.; MORRIS, A. L.; THURNAUER, M. C.; TANG, J.: A general model of electron spin polarization arising from the interactions within radical pairs. In: *J Chem Phys* 92 (1990), S. 4239–4250
- [104] SNYDER, Seth W.; MORRIS, Andrea L.; BONDESON, Stephen R.; NORRIS, James R.; THURNAUER, Marion C.: Electron Spin Polarization in Sequential Electron Transfer. An Example from Iron-Containing Photosynthetic Bacterial Reaction Center Proteins. In: *J Am Chem Soc* 115 (1993), S. 3774–3775
- [105] EST, Art van d.: Transient EPR: using spin polarization in sequential radical pairs to study electron transfer in photosynthesis. In: *Photosynth Res* (2009), Mar
- [106] CARUSO, Giovanni; BISEGNA, Paolo; LENOCI, Leonardo; ANDREUCCI, Daniele; GUREVICH, Vsevolod V.; HAMM, Heidi E.; DiBENEDETTO, Emmanuele: Kinetics of rhodopsin deactivation and its role in regulating recovery and reproducibility of rod photoresponse. In: *PLoS Comput Biol* 6 (2010), Nr. 12, e1001031
- [107] *Kapitel 11*. In: STEHLIK, D.; BOCK, C.H.; THURNAUER, M.C.: *Advanced EPR; Applications in Biology and Chemistry*. Elsevier, 1989, S. 371–402
- [108] KURREK, Harry; HUBER, Martina: Model Reactions for Photosynthesis - Photoinduced Charge and Energy Transfer between Covalently Linked Porphyrin and Quinone Units. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 34 (1995), S. 849–866
- [109] HUBER, Heinz; MEYER, Michaela; SCHEER, Hugo; ZINTH, Wolfgang; WACHTVEITL, Josef: Temperature dependence of the primary electron transfer reaction in pigment-modified bacterial reaction centers. In: *Photosynth Res* 55 (1998), S. 153–162

- [110] KAKITANI, T.; MATAGA, N.: Effects of freezing out protein vibrational modes on electron transfer kinetics in bacterial reaction centers. In: *Photosynth Res* 22 (1989), S. 187–193
- [111] HALES, Brian J.: Temperature dependence of the rate of electron transport as a monitor of protein motion. In: *Biophys J* 16 (1976), S. 471–480
- [112] SCHENCK, Craig C.; HOLTEN, William W. P.; WINDSOR, Maurice W.; SARAI, Akinori: Temperature dependence of electron transfer between bacteriopheophytin and ubiquinone in protonated and deuterated reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. In: *Biophys J* 36 (1981), S. 479–489
- [113] ENGSTROM, Gregory; XIAO, Kunhong; YU, Chang-An; YU, Linda; DURHAM, Bill; MILLETT, Francis: Photoinduced Electron Transfer between the Rieske Iron-Sulfur Protein and Cytochrome c1 in the *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrome bc1 Complex. In: *JBC* 277 (2002), S. 31072–31078
- [114] WANG, Haiyu; LIN, Su; KATILIUS, Evaldas; LASER, Christa; ALLEN, James P.; WILLIAMS, JoAnn C.; WOODBURY, Neal W.: Unusual Temperature Dependence of Photosynthetic Electron Transfer due to Protein Dynamics. In: *J Phys Chem B* 113 (2009), S. 818–824
- [115] ANDREASSON, L.-E.; VIINNGARD, T.: Electron Transport in Photosystems I and II. In: *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39 (1988), S. 379–411
- [116] ANDEL, F.; LAGARIAS, J. C.; MATHIES, R. A.: Resonance raman analysis of chromophore structure in the lumi-R photoproduct of phytochrome. In: *Biochemistry* 35 (1996), Dec, Nr. 50, 15997–16008
- [117] ORTEGA, J. M.; DOHSE, B.; OESTERHELT, D.; MATHIS, P.: Low-temperature electron transfer from cytochrome to the special pair in *Rhodospseudomonas viridis*: role of the L162 residue. In: *Biophys J* 74 (1998), Mar, Nr. 3, 1135–1148
- [118] JOHANSSON, Mathias: *The Hilbert transform*, Växjö University, Diplomarbeit, 1999
- [119] GROTE, Jürgen: Die Sauerstoffdiffusionskonstanten im Lungengewebe und Wasser und ihre Temperaturabhängigkeit. In: *Pflügers Archiv* 295 (1967), S. 245–254
- [120] SUBCZYNSKI, Witold K.; HOPWOOD, Larry E.; HYDE, James S.: Is the Mammalian Cell Plasma Membrane a Barrier to Oxygen Transport? In: *J Gen Physiol* 100 (1992), S. 69–87

# Anhang A

## Abkürzungsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge:

8-HDF	...	8-Hydroxyl-5-Deazariboflavin
AtCry-1	...	<i>Arabidopsis thaliana</i> Cryptochrom-1
ATP	...	Adenosintriphosphat
<i>cw</i>	...	kontinuierliche Mikrowelle (engl.: „continuous wave“)
DFT	...	Dichtefunktionaltheorie
DNA	...	Desoxyribonukleinsäure
ENDOR	...	Elektronen-Kern-Doppelresonanz (engl.: „electron nuclear double resonance“)
ESR	...	Elektronenspinresonanz
FAD	...	Flavin-Adenin-Dinukleotid
MTHF	...	Methylentetrahydrofolat
Trp	...	Tryptophan
Tyr	...	Tyrosin
W-Band	...	Mikrowelle bei ~ 94 GHz
W324F	...	Austausch des Tryptophans an Position 324 (terminales Trp der konservierten Kette) durch ein Phenylalanin in AtCry-1
W400F	...	Austausch des Tryptophans an Position 400 (proximales Trp der konservierten Kette) durch ein Phenylalanin in AtCry-1
X-Band	...	Mikrowelle bei ~ 9,4 GHz



# Anhang B

## Herleitungen

### B.1 Erläuterung zur Phasenkorrektur mit Hilfe der Hilberttransformation

Die Hilberttransformation  $\mathcal{H}$  einer Funktion  $f(t)$  ist definiert als:

$$(\mathcal{H}f)(t) = \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{f(x)}{t-x} dx \quad (\text{B.1})$$

Dabei ist das Integral aufgrund der auftretenden Polstelle bei  $t-x$  als Cauchy'scher Hauptwert aufzufassen. Diese Darstellung entspricht der Faltung von  $f$  mit  $\frac{1}{\pi t}$ :

$$(\mathcal{H}f)(t) = \frac{1}{\pi t} * f(x) \quad (\text{B.2})$$

Durch Einsetzen kann leicht gezeigt werden, daß zwischen Hilbert- und Fouriertransformation der folgende Zusammenhang besteht:

$$\mathcal{F}\mathcal{H}\mathcal{F}^{-1} = -i \operatorname{sig}(x) \quad (\text{B.3})$$

Eine Signalfunktion  $J$  ist *kausal*, wenn ihre Fouriertransformierte keine negativen Frequenzanteile enthält. Veranschaulicht bedeutet dies, daß ein Ursprungsereignis keine in der Zeit rückwärts laufenden Folgen hat. Das ist für physikalische Meßwerte immer der Fall. Ein solches Signal ist im Komplexen differenzierbar und damit *analytisch*. Dies wiederum bedeutet, daß sich der Imaginärteil des Zeitverlaufes durch die Hilberttransformierte des Realteils darstellen läßt:

$$J = \operatorname{Re}(J) + i\mathcal{H}\operatorname{Re}(J) \quad (\text{B.4})$$

Zur vollständigen Beschreibung von  $J$  genügt somit die Aufnahme des reellen Anteils. Dies gilt streng natürlich nur bei einer Betrachtung von 0 bis  $+\infty$ . Für eine gut verständliche Übersicht über die mathematischen Hintergründe der Hilberttransformation sei die Lektüre von [118] empfohlen.

In ESR-Experimenten wird das Signal normalerweise in der Frequenz-/Energiedomäne aufgenommen. Da die Fouriertransformierte einer analytischen Funktion jedoch ebenfalls

analytisch ist, gelten die soeben gemachten Kommentare äquivalent. Mit Hilfe der Hilberttransformation ist es demnach möglich zu einem gegebenen reellen Spektrum das zugehörige imaginäre Spektrum exakt zu berechnen, wenn das Signal rauschfrei und von  $B = 0 \rightarrow +\infty$  vorliegt.<sup>1</sup> Da dies in der Realität nicht zutrifft, ist es im Allgemeinen sinnvoll mittels Quadraturdetektion zwei um  $90^\circ$  phasenverschobene Signale aufzunehmen. Wenn dies aus technischen Gründen jedoch nicht durchführbar ist, so ermöglicht die Anwendung von  $\mathcal{H}$  eine zumindest näherungsweise Rekonstruktion des vollständigen Signals.

Bei der Phasenkorrektur der aufgenommenen *cw*-Spektren wurde nun folgendermaßen vorgegangen: Aus Gleichung B.3 ergibt sich

$$\mathcal{H} = \mathcal{F}^{-1} \mathcal{F} \mathcal{H} \mathcal{F} \mathcal{F}^{-1} = \mathcal{F}^{-1} (-i \operatorname{sig}(x)) \mathcal{F}^{-1} \quad (\text{B.5})$$

Die Anwendung der Hilberttransformation im Frequenzraum ist also trivial. Zum Übergang aus dem und in den Ortsraum wurden die von `matlab` zur Verfügung gestellten FFT-Funktionen benutzt. Mit Hilfe des nun vorliegenden Imaginärteils des Signals kann eine Phasenverschiebung leicht durchgeführt werden. Der entsprechende Korrekturwinkel wurde dabei so gewählt, daß das zweifache Integral des reellen Spektrums maximal ist.

## B.2 Abschätzen des Wirkungsquerschnittes

Es seien  $n$  die Anzahl der einlaufenden Photonen,  $N_{\text{FAD}}$  die Menge der Flavine im voll oxidierten Zustand und  $N_{\text{WW}}$  die Anzahl der Wechselwirkungen von FAD mit Lichtquanten. Für den Wirkungsquerschnitt  $\sigma$ , normiert auf eine Fläche  $A$ , gilt dann:

$$\frac{\sigma}{A} = \frac{N_{\text{WW}}}{n N_{\text{FAD}}} \quad (\text{B.6})$$

Wenn vorausgesetzt wird, daß jede stattfindende Wechselwirkung zu einer Photoreduktion des Flavins führt und Reoxidationsprozesse auf der betrachteten Zeitskala irrelevant sind, so gilt für die zeitliche Änderung von  $N_{\text{FAD}}$ :

$$\frac{dN_{\text{FAD}}}{dt} = -N_{\text{WW}} = -\sigma N_{\text{FAD}} \frac{n}{A} \quad (\text{B.7})$$

Die Lösung der Differentialgleichung mittels eines Exponentialansatzes führt zu:

$$N_{\text{FAD}} = N_{\text{FAD},0} \cdot \exp\left(-\sigma \frac{n}{A} t\right) \quad (\text{B.8})$$

Für die Halbwertszeit der Reaktion ergibt sich entsprechend:

$$T_{1/2} = \frac{A \ln(2)}{\sigma n} \quad (\text{B.9})$$

---

<sup>1</sup>„Rauschfrei“ in diesem Zusammenhang bedeutet die Abwesenheit sämtlicher von der Mikrowelle und/oder dem Feld unabhängiger Signalanteile. Nur dann ist die Annahme der Nichtexistenz negativer Fourierkomponenten korrekt.

Nachdem der Abbau von voll oxidiertem FAD direkt mit der Erzeugung des Radikalzustandes verknüpft ist, entspricht diese Halbwertszeit derjenigen für den Aufbau des ESR-Signals als Funktion der Belichtungszeit. Nachdem die Anzahl der Photonen pro Fläche und Zeiteinheit bekannt ist, berechnet sich der Wirkungsquerschnitt demnach zu:

$$\sigma = \frac{\ln(2)}{T_{1/2}} \cdot \left(\frac{n}{A}\right)^{-1} \quad (\text{B.10})$$

Da der dekadische Absorptionskoeffizient von voll oxidiertem Flavin bekannt ist ( $\epsilon_{440\text{nm}} = 1,12 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \approx 1,86 \cdot 10^{-21} \text{ m}^2$ ), kann der Photonenfluß nach dem Durchgang durch ein Probenvolumen der Dicke  $d$  mit einer Teilchenkonzentration  $\rho$  entweder über den Wirkungsquerschnitt

$$\left(\frac{I}{I_0}\right) = e^{-\sigma\rho d} \quad (\text{B.11})$$

oder mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten

$$\left(\frac{I}{I_0}\right) = 10^{-\epsilon\rho d} \quad (\text{B.12})$$

berechnet werden. Diese beiden Ausdrücke bezeichnen die selbe Größe und lassen sich daher gleichsetzen. Wenn für den Wirkungsquerschnitt der aus Zellbeleuchtungsexperimenten ermittelte Wert von  $\sigma = 1,7 \cdot 10^{-22} \text{ m}^2$  benutzt werden soll, so muß dabei ein Parameter  $q$ , welcher die Quantenausbeute bei der Beleuchtung in Zellen beschreibt, eingeführt werden:

$$\ln(10^{-\epsilon\rho d}) = -\sigma\rho d \cdot q \quad (\text{B.13})$$

In der vorliegenden Arbeit wird die hergeleitete Beziehung benutzt, um  $q$  zu bestimmen. Es gilt demnach:

$$1/q = \frac{-\sigma\rho d}{\ln(10^{-\epsilon\rho d})} = \frac{-\sigma\rho d}{-\ln 10 \cdot \epsilon\rho d} = \frac{\sigma}{\epsilon \cdot \ln 10} \quad (\text{B.14})$$

### B.3 Abschätzen der Sauerstoffdiffusion während der Reoxidation

In den Zellproben, welche zur Berechnung der Halbwertszeit der Reoxidation des Flavinradikals im Dunkeln benutzt wurden, erfolgte eine ständige Durchmischung der Probe mit Hilfe eines Magnetrührgerätes. Dazu wurden die abzentrifugierten Zellen auf das zehnfache Volumen verdünnt. Bei einem durchschnittlichen Zelldurchmesser von  $d_z = 20 \mu\text{m}$  bietet sich eine Aufteilung des Volumens in  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  an. Dann befindet sich im Mittel in jedem zweiten Volumenelement eine Insektenzelle. Nun kann für eine grobe Abschätzung vereinfacht davon ausgegangen werden, daß die Elemente dazwischen eine konstante Sauerstoffkonzentration  $c_w$  aufweisen, während die entsprechende Konzentration in den Volumina mit einer Zelle  $c_z$  variiert.

Die Diffusionsstromdichte berechnet sich gemäß des ersten Fick'schen Gesetzes zu:

$$J = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \quad (\text{B.15})$$

Um den tatsächlichen Massenstrom zu erhalten, muß der derart erhaltene Wert noch mit dem Flächeninhalt der Querschnittsfläche, durch welche der Transport erfolgt, multipliziert werden.

Wenn das Zentrum des keine Zelle enthaltenden Volumenelementes als Sauerstoffquelle und das Volumenelement mit Insektenzelle entsprechend als Senke betrachtet wird, so ergibt sich  $dx = 100 \mu\text{m}$  für den Abstand auf dem der Konzentrationsunterschied  $dc = c_w - c_z$  wirksam wird. Die durchflossene Fläche läßt sich demnach mit  $A = 6 \cdot (dx)^2$  abschätzen. Wenn man den so erhaltenen Volumenstrom auf die Sauerstoffmenge in dem Volumenelement mit Sf21-Zelle normiert, so erhält man:

$$J_{\text{norm}} = \frac{AD(c_w - c_z)}{dx^3 c_z dx} = 6D \frac{c_w - c_z}{c_z dx^2} \quad (\text{B.16})$$

Folgende Werte wurden für die Konstanten angesetzt [119]:  $c_w = 10 \text{ mg/l}$ ;  $D = 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ;  $dx = 100 \mu\text{m}$ . Das erhaltene Ergebnis läßt sich als Funktion von  $c_z/c_w$  darstellen:

$c_z/c_w$	$J_{\text{norm}} / \text{s}^{-1}$	$c_z/c_w$	$J_{\text{norm}} / \text{s}^{-1}$
0,1	10,2	0,7	0,51
0,3	2,8	0,8	0,3
0,5	1,2	0,9	0,13
0,6	0,8	0,95	0,06

Hierbei bedeutet ein Wert von  $0,3 \text{ s}^{-1}$ , daß bei konstantem Verhältnis  $c_z/c_w$  innerhalb von einer Sekunde 30% des im Volumenelement der Zelle vorhandenen Sauerstoffs per Diffusion nachströmt.

Laut Subczynski *et al.* beträgt der Sauerstoff-Permeabilitätskoeffizient einer tierischen Zellmembran mit  $42 \text{ cm/s}$  etwa die Hälfte des entsprechenden Wertes für eine Wasserschicht gleicher Dicke [120]. Das Einbinden einer einzelnen Zellmembran in die obige Betrachtung hat somit keinen signifikanten Einfluß auf das Ergebnis.

Selbst wenn man in Rechnung stellt, daß die hier berechneten Werte nur eine grobe Abschätzung darstellen, ist offensichtlich, daß die Sauerstoffdiffusion nicht der ratenlimitierende Faktor in den gemessenen Kinetiken sein kann. Insbesondere ist die Angabe des Abstandes von der Zelle als Verbraucher zum nächsten Reservoir mit im Mittel  $100 \mu\text{m}$  sicherlich deutlich zu hoch angesetzt. In der Realität handelt es sich vielmehr um eine

kontinuierliche Verteilung in der gesamten Umgebung. Die angegebenen Zahlen sind somit eher als obere Schranke des Einflusses der Diffusion zu sehen. Deshalb kann der Transport des gelösten Sauerstoffs auf der beobachteten Zeitskala der Reoxidation als instantan angenommen werden. Dies würde nur dann nicht gelten, wenn die Oxidation des Flavinradikals eine lokale Sauerstoffkonzentration von weit über 90% der Startkonzentration im umgebenden Puffer benötigen sollte.

In diesem Zusammenhang ist auch zu beachten, daß die Vermischung der Probe mittels eines Magnetrührers mit etwa 3 bis 4 Umdrehungen pro Sekunde erfolgte. Zu der hier abgeschätzten Diffusion ist also außerhalb der Sf21-Zellen noch ein erheblicher Konvektionsanteil hinzuzufügen.

## B.4 Berechnung der Reaktionsraten

Zur Berechnung der Reaktionsraten aus der exponentiellen Anpassung der Kinetik des ESR-Signals wird von zwei Zuständen 1 und 2, zwischen denen Übergänge stattfinden können, ausgegangen. Es seien  $c_{1/2}$  die normierten Besetzungszahlen und  $k_{12}$  sowie  $k_{21}$  die entsprechenden relativen Übergangsraten. Wenn davon ausgegangen wird, daß die absoluten Reaktionsraten proportional zur Population des Mutterzustandes sind, so ergibt sich die folgende Differentialgleichung:

$$\frac{dc_1}{dt} = -c_1 \cdot k_{12} + c_2 \cdot k_{21} \quad (\text{B.17})$$

Da die Gesamtzahl der Systeme, welche in den beiden Zuständen vorliegen können, konstant ist, gilt  $c_2 = 1 - c_1$  und damit:

$$\frac{dc_1}{dt} = -c_1 (k_{12} + k_{21}) \quad (\text{B.18})$$

Zur Lösung dieser Differentialgleichung wird ein exponentieller Ansatz gewählt:

$$c_1 = A \cdot e^{-\lambda t} + A' \quad (\text{B.19})$$

Dabei werden die Integrationskonstanten über die folgenden Randbedingungen festgelegt:

- Für lange Zeiten ist ein stationärer Zustand zu erwarten:  $\frac{dc_1}{dt} = 0$  für  $t \rightarrow \infty$
- Alle Systeme sollen im Zustand 1 starten:  $c_1 = 1$  für  $t = 0$

Aus der homogenen Lösung der Differentialgleichung und den angegebenen Randbedingungen ergibt sich für die gesuchten Konstanten:

$$\begin{aligned} \lambda &= k_{12} + k_{21} \\ A &= 1 - \frac{k_{21}}{k_{12} + k_{21}} \\ A' &= \frac{k_{21}}{k_{12} + k_{21}} \end{aligned} \quad (\text{B.20})$$

Bei Kenntnis der Parameter  $\lambda$  und  $A'$  aus einer exponentielle Anpassung der Meßwerte lassen sich somit  $k_{12}$  und  $k_{21}$  berechnen, sofern die Datenpunkte im Vorfeld derart normiert wurden, daß sich für  $t = 0$  der Wert 1 ergibt.

Im Abschnitt 5.3.3 ist der Zustand 1 derjenige des  $\text{FADH}^\bullet$  und 2 der voll reduzierte Zustand  $\text{FADH}^-$ . Während die relativen Übergangsraten  $k_{12}$  für die Beleuchtung mit blauem oder grünem Licht voneinander verschieden sein können, sollten die Rückreaktionsraten  $k_{21}$  unabhängig von der Beleuchtung sein, da das voll reduzierte Flavin weder für grünes, noch für blaues Licht eine signifikante Absorption aufweist.

# Anhang C

## Kontaktinformationen der Firmen

### **AEG:**

Die „Allgemeine Elektrizitäts-Gesellschaft“ wurde 1996 aufgelöst.

### **Agilent:**

Agilent Technologies; 5301 Stevens Creek Blvd; Santa Clara CA 95051; USA

### **Amplifier Research:**

Amplifier Research; 160 School House Rd.; Souderton PA 18964-9990; USA

### **Bruker:**

Bruker BioSpin GmbH; Silberstreifen 4; 76287 Rheinstetten; Deutschland

### **Clonotech:**

Clontech Laboratories; 1290 Terra Bella Avenue; Mountain View, CA 94043; USA

### **Hewlett-Packard:**

Die Meßgerätesparte von HP wurde 1999 in die Firma ↗Agilent ausgegliedert.

### **Lake-Shore:**

Lake Shore Cryotronics; 575 McCorkle Blvd; Westerville, OH 43082-8699; USA

### **MathWorks:**

MathWorks Inc.; 3 Apple Hill Drive; Natick, MA 01760-2098; USA

### **Opta:**

OPTA GmbH Laborzubehör; Lindbergstraße 3; 64625 Bensheim; Deutschland

### **Oxford Instruments:**

Oxford Instruments; Tubney Woods; Abingdon; Oxfordshire OX13 5QX; GB

### **Spectra Physics:**

Spectra Physics / Newport Corporation; 3635 Peterson Way; Santa Clara, CA 95054;  
USA

### **Stanford Research:**

Stanford Research Systems; 1290-D Reamwood Avenue; Sunnyvale, CA 94089; USA

**Tektronix:**

Tektronix Communications; 3033 W President George Bush Highway; Plano, TX  
75075; USA

**Varian:**

Varian Corporate Headquarters; 3120 Hansen Way; Palo Alto, CA 94304-1030; USA



# Veröffentlichungen

Im Rahmen der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation wurden folgende wissenschaftliche Veröffentlichungen angefertigt:

## Artikel in Fachzeitschriften

- SCHLEICHER, Erik; WENZEL, Ringo; AHMAD, Margaret; BATSCHAUER, Alfred; ESSEN, Lars-Oliver; HITOMI, Kenichi; GETZOFF, Elisabeth D.; BITTL, Robert; WEBER, Stefan; OKAFUJI, Asako:  
The Electronic State of Flavoproteins: Investigations with Proton Electron-Nuclear Double Resonance. In: *Appl Magn Reson* 37 (2010), S. 339–352
- BOTEV, Anne; MUNTER, Lisa-Marie; WENZEL, Ringo; RICHTER, Luise; ALTHOFF, Veit; ISMER, Jochen; GERLING, Ulla; WEISE, Christoph; KOKSCH, Beate; HILDEBRAND, Peter W.; BITTL, Robert; MULTHAUP, Gerd:  
The Amyloid Precursor Protein C-Terminal Fragment C100 Occurs in Monomeric and Dimeric Stable Conformations and Binds  $\gamma$ -Secretase Modulators. In: *Biochemistry* 50 (2011), Feb, Nr. 5, 828–835
- BURNEY, Sarah; WENZEL, Ringo; KOTTKE, Tilman; ROUSSEL, Thomas; HOANG, Nathalie; BOULY, Jean-Pierre; BITTL, Robert; HEBERLE, Joachim; AHMAD, Margaret:  
Single amino acid substitution reveals latent photolyase activity in *Arabidopsis* cryptochrome-1 (2011) – eingereicht

## Konferenzbeiträge

- WENZEL, Ringo; AHMAD, Margaret; BITTL, Robert:  
First results on EPR measurements on *Arabidopsis thaliana* cryptochrome-1 in whole cells. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik* (2008); Berlin (Deutschland)
- WENZEL, Ringo; AHMAD, Margaret; BITTL, Robert:  
EPR measurements on *Arabidopsis thaliana* cryptochrome-1 in whole cells. *42th Annual meeting of the EPR group of the Royal Society of Chemistry* (2009); Norwich (Großbritannien)

- WENZEL, Ringo; AHMAD, Margaret; BITTL, Robert:  
The blue-light-induced flavin radical in AtCry1 studied by EPR. *Abschlußkonferenz der DFG FOR 526* (2010); Fraueninsel/Chiemsee (Deutschland)
- WENZEL, Ringo; AHMAD, Margaret; BITTL, Robert:  
New results on EPR measurements on *Arabidopsis thaliana* cryptochrome-1 in whole cells. *43th Annual meeting of the EPR group of the Royal Society of Chemistry* (2010); Cardiff (Großbritannien)

# Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des  
Datenschutzes nicht enthalten.



# Danksagung

Als erstes und wichtigstes möchte ich Talea dafür danken, daß sie immer für mich da war, meine Stimmungsschwankungen der letzten Jahre ertragen und die ständig wiederkehrend auftretenden Tiefphasen ausgeglichen hat.

Von fachlicher Seite gilt mein Dank in erster Linie Prof. Robert Bittl, in dessen Arbeitsgruppe und unter dessen Betreuung diese Doktorarbeit angefertigt wurde. Es war ein sehr positives Erlebnis festzustellen, daß er trotz seiner vielfältigen Aufgaben immer Zeit fand, um aufgetretene Frage zu erörtern oder bei experimentellen Problemen beizustehen.

Prof. Andreas Möglich möchte ich für die sehr kurzfristige Zusage zur Zweitbegutachtung meiner Doktorarbeit danken.

Ich danke Margaret Ahmad für die freundliche Aufnahme während meiner Aufenthalte in Paris und die zuverlässige Bereitstellung der Proben.

Darüber hinaus danke ich insbesondere Christian Teutloff für verschiedenste Hilfestellungen, seien es Probleme mit der Rechentechnik oder den Experimenten, und Till Biskup für viele konstruktive Vorschläge und Diskussionen. Ich danke außerdem der ganzen ehemaligen und aktuellen Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Auch bei den nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern des Fachbereiches, besonders den Angestellten des Tieftemperaturlabors, möchte ich mich für die Unterstützung und Hilfe bedanken.

Während der Arbeit an der Dissertation wurde ich zu großen Teilen von der Leibniz-Graduiertenschule „Molekulare Biophysik“ finanziert. Ich danke den Verantwortlichen, insbesondere Prof. Bernd Reif, für diese Unterstützung.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern. Auch wenn ich den heimatlichen Hafen schon seit einigen Jahren verlassen habe, so weiß ich doch, daß ich mich bei Problemen immer an sie wenden kann.