

Kapitel 1

Einleitung

Magnetische Resonanz-Methoden sind eine entscheidende Informationsquelle der Proteinforschung. Dabei ist die *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR, Kernspinresonanz) gegenüber der *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR, Elektron-Paramagnetische Resonanz) ungleich verbreiteter. Dies liegt nicht zuletzt an technischen Problemen bei der Konstruktion von EPR-Spektrometern. Vor allem auf dem Gebiet der Hochfeld-EPR¹ wurden erst in den letzten beiden Jahrzehnten die entscheidenden apparativen und methodischen Fortschritte erzielt, die eine Anwendung auf Problemstellungen der Proteinforschung erlauben [1–13]. Trotzdem können viele wichtige EPR-Experimente im Hochfeld aus apparativen Gründen noch nicht durchgeführt werden.

Das Ziel meiner Arbeit war es daher, neue Methoden der Hochfeld-EPR, insbesondere im gepulsten Modus, zu entwickeln und anzuwenden. Im Mittelpunkt stand dabei die Weiterentwicklung eines 360-GHz-EPR-Spektrometers, sowie die Anwendung von EPR- und ENDOR-Methoden bei 95 GHz/3.4 T (W-Band), 180 GHz/6.4 T (G-Band) und 360 GHz/12.8 T auf biologisch relevante paramagnetische Zentren in Proteinkomplexen.

Das Vorliegen von Radikalen ermöglicht erst den Einsatz der EPR-Methode, deren Voraussetzung ja das Vorhandensein ungepaarter Elektronenspins ist. Die entscheidende Bedingung für den Informationsgewinn durch eine Erhöhung des äußeren Magnetfeldes ist, dass die Zeeman-Wechselwirkung eines Elektrons linear von der Stärke des äußeren Feldes abhängt. In paramagnetischen Zentren ist die Zeeman-Wechselwirkung häufig orientierungsabhängig, was durch den Tensor \hat{g} ausgedrückt wird. Die Auflösung des g-Tensors im EPR-Spektrum liefert eine Reihe wichtiger Informationen: Die molekulare Identität paramagnetischer Zustände kann an Hand ihres g-Tensors ermittelt werden. Der g-Tensor ist eine wichtige

¹Als Hochfeld-EPR-Spektrometer, werden in der Regel Spektrometer ab 95 GHz/3.4 T bezeichnet.

molekularphysikalische Größe, aus der Informationen über die intra- und intermolekulare Bindungsstruktur gewonnen werden können. Neben der direkten Untersuchung des g-Tensors bietet die Auflösung seiner Komponenten aber noch weitere wichtige Vorteile. Sie erlaubt es, orientierungsselektive Experimente an Molekülen mit einer bestimmten Orientierung zum äußeren Feld durchzuführen. Vor allem die Richtungsabhängigkeit der Hyperfeinstruktur und molekularer Fluktuationen kann so untersucht werden. Zusätzliche Informationen über feldabhängige und feldunabhängige Wechselwirkungen des Moleküls können durch Multifrequenz-Messungen bei unterschiedlichen Mikrowellenfrequenzen gewonnen werden.

Die Auflösung des g-Tensors von Kofaktorradi- kalen² in Proteinen ist häufig erst bei hohen Feldern möglich; so waren für die Auflösung der in meiner Arbeit untersuchten g-Tensoren Frequenzen von 95 GHz (Chinone) bzw. 360 GHz (Flavine und Chlorophylle) nötig. Ziel der Arbeit war es nicht nur, Messungen an bereits bestehenden Spektrometern durchzuführen, sondern auch die apparativen Voraussetzungen dafür zu schaffen. Deshalb werden die Veränderungen und Neukonstruktionen am 360-GHz-Spektrometer ausführlich diskutiert.

Technische Weiterentwicklungen

Ein EPR-Spektrometer besteht aus einer Mikrowellenbrücke, einem Magneten und, wenn möglich, aus einem Mikrowellenresonator. Das Hauptproblem bei der Konstruktion von Hochfeld-EPR-Spektrometern besteht darin, dass sich die Konstruktionsprinzipien von Mikrowellenbrücken nicht einfach auf immer höhere Frequenzen übertragen lassen. Diese Brücken sind zur Schaffung einer reflektierten Referenzwelle notwendig, um die vom Resonator zurück laufende und die eigentliche EPR-Information tragende Welle nach Amplitude und Phase analysieren zu können. Die Probleme beim Übergang zu immer höheren Frequenzen betreffen fast alle entscheidenden Bauteile einer EPR-Brücke. Viele Bauteile, wie schnelle Schalter oder Hohlleiterzirkulatoren und -phasenschieber, sind nur bis 150 GHz erhältlich. Die Rauschcharakteristik der meisten Mikrowellenquellen und -detektoren nimmt bei hohen Frequenzen stark zu, während sich ihre Leistung auf weniger als ein Milliwatt reduziert. Fundamentalwellenhohlleiter weisen oberhalb 30 GHz wegen des Skineffekts sehr starke Verluste auf. Dieses Problem erschwert auch die Konstruktion von Mikrowellenresonatoren, die zudem wegen der kleinen Wellenlängen noch sehr klein sein müssen. Neben den Problemen bei der Entwicklung geeigneter Mikrowellenbrücken und -resonatoren sind auch EPR-Magneten nur bis 14 T kommerziell erhältlich. Spezialkonstruktionen, die

²Kofaktoren sind besondere organische Moleküle oder Metallzentren in Proteinen, die direkt an den enzymatischen Reaktionen teilnehmen oder diese beeinflussen.

höhere Felder erreichen, überschreiten das Budget von Universitätslabors. Angesichts dieser Probleme müssen viele, für konventionelle EPR-Spektrometer bereits gelöste, technische Probleme neu gelöst werden. Die Basis für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemachten Weiterentwicklungen war das von Martin Fuchs während seiner Dissertation aufgebaute 360-GHz-EPR-Spektrometer [14]. Im Hinblick auf die Messung von radikalischen Zuständen in Proteinkomplexen dienen die Weiterentwicklungen folgenden Zielen:

- Steigerung der Empfindlichkeit und Langzeitstabilität.
- Erweiterung der messbaren Probenklassen.
- Ermöglichung breitbandiger phasenempfindlicher Detektion für zeitaufgelöste Messungen.
- Gepulste EPR bei 360 GHz.

Die Stabilität und Empfindlichkeit eines EPR-Spektrometers wird in erster Linie durch die mechanische Stabilität und Güte des Resonators, sowie das Phasen- und Amplitudenrauschen von Quelle und Detektor bestimmt. Deshalb mussten für eine weitere Optimierung des Spektrometers sowohl der Resonator als auch die Mikrowellenbrücke grundsätzlich überarbeitet werden. In Kapitel 3 sind die apparativen Veränderungen an der Mikrowellenbrücke und an den Resonatoren dargestellt. Gepulste EPR-Experimente bei 360 GHz waren bisher nicht möglich, weil Halbleitermikrowellenquellen nur sehr kleine Leistungen emittieren und keine schnellen Mikrowellenschalter für diese Frequenz erhältlich sind. Um trotzdem gepulste Messungen durchführen zu können, wurde erstmals ein Orotron als Mikrowellenquelle in ein EPR-Spektrometer eingebaut. Die Funktionsweise dieser Röhrenquelle wird in Unterabschnitt 3.3.1 beschrieben. Abschnitt 3.3.3 enthält eine Beschreibung der von mir aufgebauten pulsaren Mikrowellenbrücke. Mit dieser Brücke gelang es erstmals, gepulste EPR-Experimente bei 360 GHz durchzuführen (siehe Abschnitt 3.3.4 und [15]). Ein weiteres entscheidendes Problem bei der Konstruktion von Hochfeld-Spektrometern ist die Realisierung einer phasenempfindlichen Detektion. In Abschnitt 3.4 werden verschiedene Lösungen zur Gewinnung der Phaseninformation, wie sie in der vorliegenden Arbeit angewandt wurden, diskutiert und die Konstruktion einer Mikrowellenbrücke mit variabler Referenzphase beschrieben (siehe Unterabschnitt 3.4.4). Für die Optimierung der Resonatoren und die Reduktion von stehenden Wellen im Strahlengang habe ich die cw-Mikrowellenbrücke um eine *sweep*-Option mit einer durchstimmbaren Mikrowellenquelle erweitert (Abschnitt 3.5). Eine weitere Klasse von EPR-Proben

konnte durch den Einbau einer Lichtanregung in den semikonfokalen Fabry-Pérot-Resonator erschlossen werden (Abschnitt 3.6).

Hochfeld-EPR-Untersuchungen an Proteinkofaktoren

Im zweiten Schwerpunkt meiner Arbeit wurden neue Methoden der Hochfeld-EPR auf paramagnetische Kofaktoren in Proteinkomplexen angewandt. Dabei habe ich die Auflösung des g-Tensors genutzt, um folgende Systeme und Fragestellungen zu behandeln:

- $\text{P}_{865}^{\bullet+}$ (Kapitel 4) ist der primäre Elektronendonator des bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrums von *Rb. sphaeroides* R26. Seine elektronische und energetische Struktur ist entscheidend für die Effizienz des Primärprozesses der bakteriellen Photosynthese. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die g-Tensor-Hauptwerte von $\text{P}^{\bullet+}$ in R26, sowie in den Mutanten HE(M202) und HL(M202), bei denen das Histidin His(M202) ausgetauscht wurde, untersucht. Der Donor hat nur eine sehr kleine g-Tensor-Anisotropie, die erst bei Feldern über 10 T aufgelöst werden kann. Mit Hilfe von 360-GHz-EPR konnten die g-Tensor-Hauptwerte des primären Donors in R26 und der HL(M202)-Mutante mit erhöhter Genauigkeit bestimmt werden. Die g-Tensor-Hauptwerte des Donors in der HE(M202)-Mutante konnten im Rahmen dieser Arbeit sogar erstmals bestimmt werden [16].
- FADH^{\bullet} (Kapitel 5) ist ein stabiles neutrales Flavinradikal, das während des DNS-Reparaturmechanismus der CPD-Photolyase entsteht. Ähnlich wie Chlorophylle zeigen Flavinradikale wie FADH^{\bullet} nur eine sehr geringe g-Tensor-Anisotropie, deshalb konnten die g-Hauptwerte ebenfalls erst bei 360 GHz bestimmt werden. Die Festlegung der g-Tensor-Achsen im Molekülachsensystem konnte durch Vergleich protonierter und teildeuterierter 360-GHz-Spektren mit 'Davies'-ENDOR-Messungen bei 9.5 GHz und 95 GHz erzielt werden [17].
- $\text{Q}_A^{\bullet-}$ und $\text{Q}_B^{\bullet-}$ (Kapitel 6) sind Akzeptorchinone des Elektronentransfers in Reaktionszentren von *Rb. sphaeroides* R26. Der Elektronentransfer in bakteriellen Reaktionszentren wird sowohl durch die Bindungsstruktur der Kofaktoren als auch durch ihre Dynamik beeinflusst. Stochastische Auslenkungen der Moleküle resultieren in g-Tensor-Modulationen, die die Spin-

Spin-Relaxationszeit T_2 beeinflussen. Um diese Modulationen zu untersuchen, habe ich die Orientierungsabhängigkeit von T_2 von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$, in Abhängigkeit von der Position im EPR-Spektrum, aus den Zeitkonstanten der zwei-Puls-Echozerfallsfunktionen ermittelt. Diese Messungen wurden bei verschiedenen Temperaturen (zwischen 120 K und 190 K), sowie bei unterschiedlichen Mikrowellenfrequenzen (95 GHz [18] und 180 GHz) wiederholt. Das Ziel war, mit gepulster Multifrequenz-Hochfeld-EPR Modulationen des g-Tensors von stochastisch fluktuierenden Einflüssen feldunabhängiger magnetischer Wechselwirkungen zu trennen, sowie zwischen Bewegungsmoden mit unterschiedlichen Korrelationszeiten und Orientierungsabhängigkeiten unterscheiden zu können. Durch einen Vergleich der Temperatur- und Frequenzabhängigkeit konnten Aussagen über verschiedene, die Relaxation bestimmende Prozesse gemacht werden.

