

# Kapitel 4

## Bestimmung der g-Tensor-Hauptwerte des primären Donors in Mutanten von *Rb. sphaeroides*

Mit dem im vorhergehenden Kapitel beschriebenen 360-GHz-EPR-Spektrometer gelang es, die g-Tensor-Hauptwerte des Kations des primären Donors  $P_{865}^{\bullet+}$  im bakteriellen Reaktionszentrum (Rz) von *Rb. sphaeroides* R26 sowie in den Mutanten HE(M202) und HL(M202) zu bestimmen. Die g-Tensor-Hauptwerte von  $P^{\bullet+}$  in HE(M202) wurden im Rahmen dieser Arbeit das erste Mal bestimmt, während die Werte für HL(M202) und R26 mit erhöhter Genauigkeit festgelegt werden konnten. Experimentelle Details sowie die Probenpräparation werden in Abschnitt 4.2 dargestellt. Die cw-EPR-Spektren sowie die aus ihnen ermittelten g-Tensor-Hauptwerte der drei Systeme sind in Abschnitt 4.3 dokumentiert. In Abschnitt 4.4 erfolgt eine Diskussion der gemessenen Werte an Hand eines Vergleichs mit Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Rechnungen. Im wesentlichen gibt das folgende Kapitel die von Fuchs *et al.* in [16] veröffentlichten Ergebnisse wieder.

### 4.1 $P_{865}^{\bullet+}$ in R26 und seinen Mutanten HL(M202) und HE(M202)

Die Kinetik der Primärprozesse der Photosynthese in Bakterien und Pflanzen hängt sowohl von der räumlichen Struktur der Reaktionszentren als auch von der elektronischen Struktur der einzelnen Kofaktoren ab. Die räumliche Anordnung der Kofaktoren im photosynthetischen Reaktionszentrum von *Rb. sphaeroides*

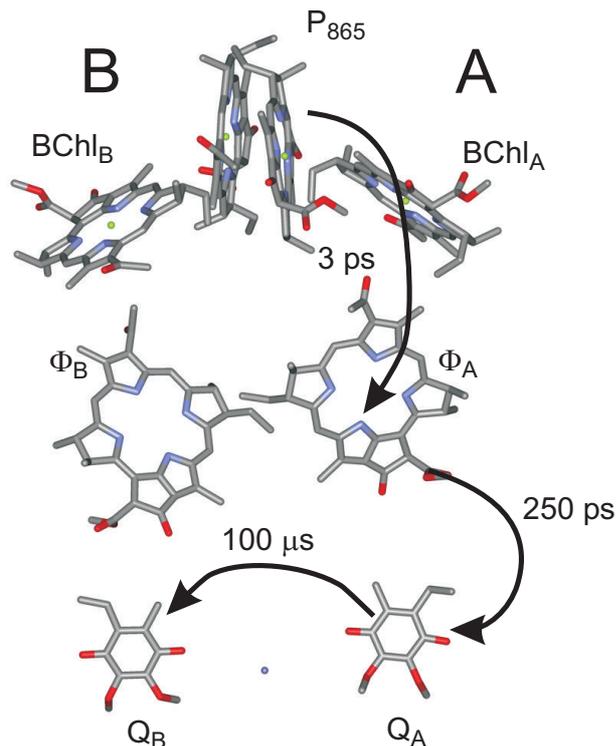


Abbildung 4.1: Die räumliche Anordnung der Kofaktoren des bakteriellen Reaktionszentrums in *Rb. sphaeroides* R26 [89] (Brookhaven Datenbank Eintrag: 1pss). Die Kofaktoren sind: das Bakteriochlorophyll  $a$ -Dimer  $P_{865}$ , die Bakteriochlorophylle  $BChl_A$   $a$  und  $BChl_B$   $a$ , die Bakteriopheophytine  $\Phi_A$   $a$  und  $\Phi_B$   $a$  und die Ubichinone  $Q_A$  und  $Q_B$ . Die Pfeile zeigen den Weg des unidirektionalen Ladungstransfers mit den jeweiligen Transferzeiten [90].

R26 wurde mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse mit hoher Auflösung ermittelt [77–81]. Die elektronische Struktur wurde eingehend mit EPR und ENDOR (für Übersichtsartikel siehe [82–88]) untersucht.

Eines der Hauptziele der EPR- und ENDOR-Untersuchungen an bakteriellen Reaktionszentren war die Untersuchung der elektronischen Struktur des primären Donors, um Aufschluss über den Einfluss des ersten Ladungstransferschritts auf die Dynamik und Richtung des Gesamttransfers zu erhalten. Beim Elektronentransfer im bakteriellen Reaktionszentrum laufen nach Lichtanregung folgende Schritte ab [91]: Der primäre Donor,  $P_{865}$ , ein Bakteriochlorophyll  $a$ -Dimer ( $BChl a_2$  siehe Abb. 4.5), wird in einen Singulettzustand,  $P_{865}^*$ , angeregt. Das angeregte  $BChl a_2$  gibt innerhalb von 3 ps über ein weiteres Bakteriochlorophyll  $a$  ein Elektron an ein Bakteriopheophytin  $a$  ( $\Phi a$ ) ab. Das Elektron wandert innerhalb von 250 ps weiter zu  $Q_A$  und von dort nach etwa 100  $\mu s$  zu  $Q_B$  [90]. Abbildung

4.1 zeigt die Anordnung der Kofaktoren sowie die einzelnen Elektronentransferschritte. Während die Nettobilanz der Primärreaktionen und die Struktur des Reaktionszentrums weitgehend aufgeklärt sind, sind viele funktionelle Details des Elektronentransfers noch unbekannt. Obwohl das Reaktionszentrum aus zwei nahezu symmetrischen Armen, Arm A und Arm B, gleicher Kofaktoren besteht (siehe Abb 4.1), läuft der Elektronentransfer fast ausschließlich über den Arm A, während Arm B bis auf  $Q_B$  inaktiv ist (Unidirektionalität). Der Grund für diese Unidirektionalität ist nicht bekannt. Da sich die Kofaktoren nur durch ihre Proteinumgebung unterscheiden, scheint es offensichtlich, dass die funktionellen Unterschiede von den Einflüssen der die Kofaktoren umgebenden Aminosäuren abhängen.

Es wird angenommen, dass dem primären Donor eine Schlüsselfunktion bei der Erklärung der Dynamik und der Unidirektionalität des primären Ladungstransfers zukommt. In Abbildung 4.2 links ist der primäre Donor  $P_{865}^{\bullet+}$  in R26 mit dem Histidin His(M202), welches das Magnesium auf der M-Seite des Donors ligiert, dargestellt. Obwohl der Donor ebenso wie das Reaktionszentrum nahezu eine  $C_2$ -Symmetrie aufweist, zeigten TRIPLE- und ENDOR-Messungen an Einkristallen eine asymmetrische Spindichteverteilung zu Gunsten des auf der L-Seite liegenden BChl von 2:1 [92]. Da die Bakteriochlorophylle auf der L- und M-Seite identisch sind, kann die unterschiedliche Spindichteverteilung nur aus den Wechselwirkungen des Dimers mit seiner Umgebung herrühren [86].

Um die Ursachen und Auswirkungen der asymmetrischen Spindichteverteilung zu erforschen, wurden eine Reihe ortsspezifischer Mutationen in der Umgebung von  $P_{865}$  in *Rb. sphaeroides* R26 hergestellt. Die bisher durch ortsspezifische Mutagenese ausgetauschten Aminosäuren lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Aminosäuren, die Wasserstoffbrücken zum Dimer bilden und solche, die wie das His(M202) die Magnesiumatome in den Bakteriochlorophyllen ligieren [88]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Mutanten HL(M202) und HE(M202) untersucht. Die beiden Mutanten wurden erzeugt, indem in den Reaktionszentren das Histidin an Position M202 (siehe Abb. 4.2) entweder gegen ein Leucin (HL) [89] oder gegen Glutaminsäure (HE) [93, 94] ausgetauscht wurde. Im optischen Absorptionsspektrum der von uns untersuchten Mutanten ist die Absorptionsbande von  $P^{\bullet+}$  in R26 mit  $\lambda = 865$  nm stark abgeschwächt [93, 95]. Deshalb werde ich im Folgenden den primären Donor ganz allgemein mit  $P^{\bullet+}$  bezeichnen, während  $P_{865}^{\bullet+}$  nur für den Donor in R26 steht.

In den Heterodimermutanten HL(M202) und HE(M202) zeigte sich, dass bei der Faltung des Proteins kein Mg in die M-Hälfte des Dimers eingebaut wird. Dies zeigten Röntgenstrukturanalysen an  $P^{\bullet+}$  in HE(M202) [96] und HL(M202) [89].

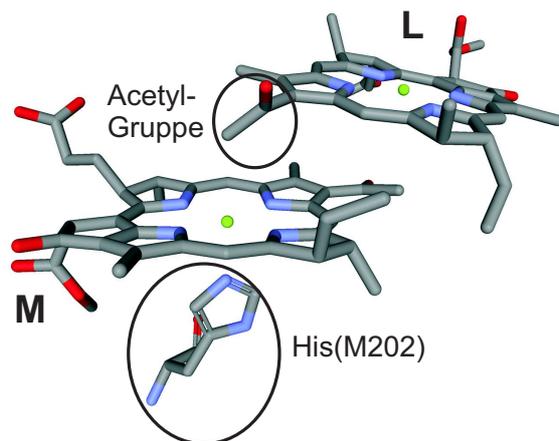


Abbildung 4.2: Röntgenstruktur des primären Donors  $P_{865}$  in *Rb. sphaeroides* R26 [89]. In der Abbildung ist neben dem Bakteriochlorophyll-Dimer von  $P_{865}$  auch noch das Histidin an Position M202 gezeigt. Das Histidin wird in der HL(M202)-Mutante gegen ein Leucin und in HE(M202) gegen Glutaminsäure ausgetauscht. Außerdem ist die in den DFT-Rechnungen (siehe Abschnitt 4.4) veränderte Acetylgruppe hervorgehoben.

Anstelle des BChl-Dimers entsteht ein BChl(L):BPhe(M). Für beide Mutanten konnte mit ENDOR- [97, 98] und FTIR-Spektroskopie [94] gezeigt werden, dass der Spin nur auf einem BChl lokalisiert ist. Zusammen mit den Informationen der Röntgenstrukturanalyse kann daraus geschlossen werden, dass sowohl in der HL(M202)- als auch in der HE(M202)-Mutante die gesamte Spindichte auf dem BChl(L) konzentriert ist. Untersuchungen zur Unidirektionalität des Elektronentransfers zeigten, dass der Elektronentransfer von HL(M202) ebenso von  $Q_A^{\bullet-}$  nach  $Q_B^{\bullet-}$  verläuft [99] wie in R26 und in der HL(L173)-Mutante, bei der der Donor aus einem BChl(M):BPhe(L)-Dimer besteht und der Spin auf der M-Seite lokalisiert ist [98]. Auf Grund dieser Erkenntnisse scheint es fraglich, ob die Symmetrie der Ladungsverteilung auf  $P^{\bullet+}$  entscheidenden Einfluß auf die Unidirektionalität des Elektronentransfers hat.

Eine weitere wichtige Größe für den Elektronentransfer ist das Oxidationspotential des primären Donors. Untersuchungen an Rzn mit Mutationen an der Stelle M202 zeigten, dass die meisten der eingebauten Residuen das Oxidationspotential ( $E_D^{\text{ox}}$ ) von  $P^{\bullet+}$  ( $\approx 500$  mV) nur unbedeutend verändern. Wenn das Histidin jedoch gegen Leucin oder Glutaminsäure ausgetauscht wird, gleicht sich  $E_D^{\text{ox}}$  mit 640(10) mV (HL(M202)) [95] bzw. 673(10) mV (HE(M202)) [93] dem des monomeren BChl *a* ( $E_D^{\text{ox}} = 660(10)$  mV [100]) an. Bakterioopheophytin *a* hat ein höheres Redoxpotential als BChl *a* [100], weshalb nur die BChl *a*-Hälfte des Dimers oxidiert

wird. Besteht der Donor nur aus einem Bakteriochlorophyll, beobachtet man eine geringere Quantenausbeute und Ladungstransferrate als im Wildtyp [88]. Zusammengefasst lässt sich aus diesen Messungen das Bild eines durch viele Effekte optimierten Systems gewinnen. Dazu zählen die elektronische Struktur der Kofaktoren, die Energien der intermediären Zustände sowie die Kopplung der Kofaktorwellenfunktionen. Um zwischen den verschiedenen Beiträgen zu unterscheiden, habe ich in meinen Untersuchungen die g-Tensor-Hauptwerte von  $P^{\bullet+}$  in den Mutanten HL(M202) und HE(M202) sowie in nativem R26 bestimmt. Durch die Bestimmung des g-Tensors und den Vergleich mit den aus quantenmechanischen Berechnungen gewonnenen Werten (siehe Unterabschnitt 4.4) ist es möglich, die elektronische Struktur zu untersuchen. Während mit ENDOR/TRIPLE die Spindichten an einzelnen Atomen des Moleküls bestimmt werden können, spiegelt der g-Tensor die gesamte elektronische Wellenfunktion und insbesondere den energetischen Abstand zwischen den angeregten Zuständen und dem Grundzustand des Moleküls wider (siehe Gleichung 2.5 und 2.6 in Abschnitt 2.1.1). Systematische Untersuchungen der sehr geringen  $\hat{g}$ -Anisotropie ( $\Delta g \sim 10^{-3}$ ) von  $P^{\bullet+}$  waren erst durch die Entwicklung der Hochfeld-EPR möglich [22, 49, 71, 75, 86, 101–105]. Die Auflösung dieser Anisotropie war bei 9.5 GHz/0.34 T (X-Band) nicht möglich, auch bei 95 GHz/3.4 T (W-Band) [22, 75, 106] und 135 GHz/4.8 T (D-Band) [102] lassen sich die Hauptwerte nicht vollständig voneinander trennen. Die g-Tensor Hauptwerte von Bakteriochlorophyll  $a^-$  wurden erstmals von Burghaus *et al.* bei 95 GHz ermittelt [107] und kürzlich in einer 325 GHz Studie bestätigt [108]. Klette *et al.* gelang es in einer 95-GHz-Studie an Kristallen von *Rb. sphaeroides*, sowohl die Hauptwerte des Tensors als auch zwei mögliche Orientierungen im Molekülachsensystem zu bestimmen [75]. Endgültig konnte die Orientierung des g-Tensors von  $P_{865}^{\bullet+}$  durch zeitaufgelöste W-Band-EPR an Pulverspektren des primären Radikalpaares  $P_{865}^{\bullet+}Q_A^{\bullet-}$  ermittelt werden [109]. Törring ermittelte ebenfalls bei einer Mikrowellenfrequenz von 95 GHz den g-Tensor der HL(M202) Mutante [22]. Es wurde eine geringere Anisotropie des g-Tensors als in R26, ähnlich der des monomeren BChl  $a$ , beobachtet. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass aus Spektren, in denen der g-Tensor teilweise aufgelöst ist, die Hauptwerte durch numerische Fit-Routinen ermittelt werden können. Allerdings führt dies zu größeren Fehlern [22] als die Auswertung von vollständig aufgelösten Spektren. In jüngster Zeit wurden Hochfeld-EPR-Messungen am primären Donor von *Rb. sphaeroides* [104] sowie des pflanzlichen Photosystems PS I [71] bei Mikrowellenfrequenzen oberhalb von 300 GHz durchgeführt. Die Messungen zeigten, dass in gefrorenen Lösungen erst bei diesen Frequenzen eine spektrale Trennung der g-Tensor-Hauptwerte möglich ist. Im pflanzlichen  $P_{700}^{\bullet+}$  und im primären Do-

nor von *Rps. viridis* [103] wurde eine Abhängigkeit der g-Tensor-Hauptwerte von der Temperatur beobachtet [71],  $P_{865}^{\bullet+}$  in *Rb. sphaeroides* [104] zeigt hingegen keine Temperaturabhängigkeit. Für alle bisher gemessenen Bakteriochlorophylle und Chlorophylle gilt, dass die g-Tensoren *in vivo*, also im Reaktionszentrum, eine wesentlich geringere Linienbreite aufweisen als *in vitro*, im Lösungsmittel [104, 108]. Die g-Heterogenität (*g-strain*) *in vitro* ist so groß, dass selbst bei 670 GHz noch keine spektrale Trennung der g-Tensor-Hauptwerte möglich war, ohne die Proben zu deutieren [105]. Im Proteingerüst ist eine Trennung, wie in Abschnitt 4 gezeigt wird, bei 360 GHz/12.8 T möglich. Bei diesem Feld sind auch in gefrorener Lösung die g-Tensor-Hauptwerte spektral voneinander getrennt und erlauben eine sehr genaue Beobachtung von Änderungen des g-Tensors in Abhängigkeit von strukturellen Änderungen in der Nähe des Moleküls. Die Messung des g-Tensors bei sehr hohen Mikrowellenfrequenzen hat den Vorteil, dass die Reaktionszentren nicht wie bei der Kristallisation aufwändigen und unter Umständen die elektronische Struktur des Moleküls verfälschenden chemischen Verfahren unterworfen werden müssen. Die hier präsentierten Messungen wurden sowohl an chemisch oxidierten als auch an mit Licht oxidierten Proben durchgeführt, um Einflüsse durch die Probenpräparation auszuschließen.

## 4.2 Probenpräparation

Die Herstellung der Mutanten HE(M202) und HL(M202) erfolgte entsprechend den Beschreibungen in [93]. Als Pufferlösung wurde für HE(M202) und HL(M202) 10 mM Tris-HCl bei einem pH-Wert 8.0 mit 0.03 % Triton-X-100 verwendet. Als Puffer für R26 diente 10 mM Tris-HCl bei einem pH-Wert 8.0 mit 0.03 % Polyoxyethylen-10-Laurylether. Dieser Puffer wurde auch für die Lösung der Probe für die optischen Absorptionsmessungen verwendet. Frühere Messungen zeigten, daß bestimmte Detergenzien beim Einfrieren zu einer Konformationsverteilung des Donors führen [110]. Um dies zu vermeiden, wurden die oben angeführten Lösungen verwendet, bei denen nur eine Konformation beobachtet wurde. Die Probenkonzentration lag zwischen 0.2 und 0.3 mM. Die Proben wurden entweder durch Lichtbestrahlung oder mit 25 mM  $K_3[Fe(CN_6)]$  (Kalium-Ferrizyanid) oxidiert, um  $P^{\bullet+}$  zu erzeugen. Abbildung 4.3 zeigt die abgeleiteten cw-EPR-Spektren von  $P_{865}^{\bullet+}$  in R26. Das obere Spektrum stammt aus einer Messung, bei der die Probe mit Licht ( $\lambda = 784$  nm) angeregt wurde, für das untere Spektrum wurde die Probe chemisch oxidiert. Weder die Linienposition noch die Linienbreite weichen signifikant voneinander ab. Im Rahmen des Fehlers konnte keine Verschiebung der g-Tensor-Hauptwerte in Abhängigkeit von der Art der Probenpräparation beob-

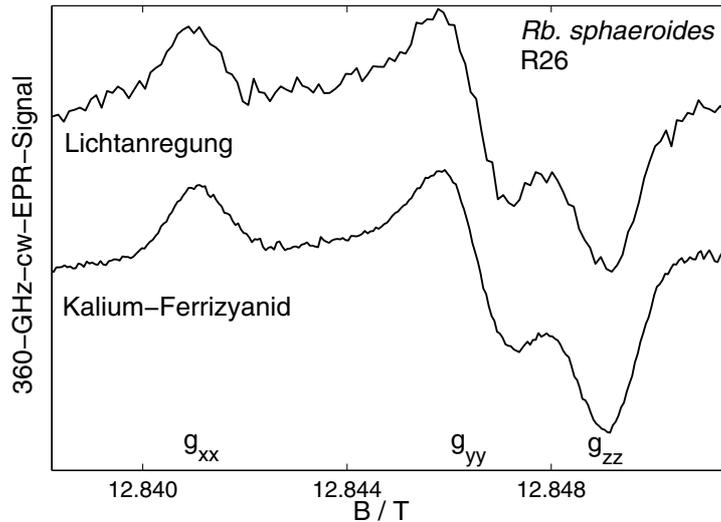


Abbildung 4.3: Abgeleitetes cw-EPR-Spektren von  $P^{\bullet+}$  in RZ von *Rb. sphaeroides* R26. Mikrowellenfrequenz = 360.03 GHz,  $T = 160$  K). Oben: Oxidation durch Lichtanregung ( $\lambda = 784$  nm); Unten: chemische Oxidation mit 25 mM  $K_3[Fe(CN_6)]$ .

achtet werden. Das gleiche Ergebnis wurde für  $P^{\bullet+}$  in HE(M202) erzielt.  $P^{\bullet+}$  in HL(M202) konnte erst durch eine Kombination von chemischer und optischer Oxidation erzeugt werden, weshalb eine Trennung der Einflüsse beider Methoden nicht möglich ist. Die Erzeugung der chemisch oxidierten Radikale in R26 wurde durch die Beobachtung der optischen Absorptionsbande bei  $\lambda = 865$  nm überwacht. Nach dem Hinzufügen von Kalium-Ferrizyanid nahm die Amplitude der Bande ab, verschob sich aber nicht. Dies ist ein wichtiger Hinweis dafür, dass die in [110,111] beobachtete Konformationsänderung nicht stattfindet. Müh *et al.* zeigten, dass sich auf Grund der Konformationsänderung die Bande bei  $\lambda = 865$  nm zu  $\lambda = 850$  nm verschiebt. Die Oxidation von HE(M202) und HL(M202) wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt. Das auf den vergoldeten Spiegel des EPR-Resonators aufgebraachte Probenvolumen betrug  $\leq 1\mu l$ . Die mit Licht oxidierten Proben wurden unter Raumtemperatur in den Resonator eingebracht und dann unter Lichtbestrahlung auf 160 K abgekühlt. Da der Kryostat vorgekühlt war, erfolgte das Einfrieren der Probe innerhalb einiger Minuten.

### 4.3 Ergebnisse

Abbildung 4.4 zeigt die cw-EPR Spektren von  $P^{\bullet+}$  in *Rb. sphaeroides* R26 sowie in den Mutanten HE(M202) und HL(M202). Die EPR-Spektren wurden entsprechend dem in [14] beschriebenen Modell simuliert und mit einer *least-squares-fit*-Routine an die experimentellen Datensätze angepasst. Die gewonnenen Simulationsparameter sind in Tabelle 4.1 dargestellt. In Abbildung 4.4 sind die Simulationen den experimentellen Spektren als durchbrochene Linien unterlegt. Die Fit-Werte für  $g_{xx}$  und  $g_{zz}$  von R26 sind durch senkrechte gestrichelte Linien gekennzeichnet, um die Richtung der Verschiebung der g-Tensor-Hauptwerte der Mutanten zu verdeutlichen.

Die Spektren von HL(M202), HE(M202) und R26 unterscheiden sich sowohl in

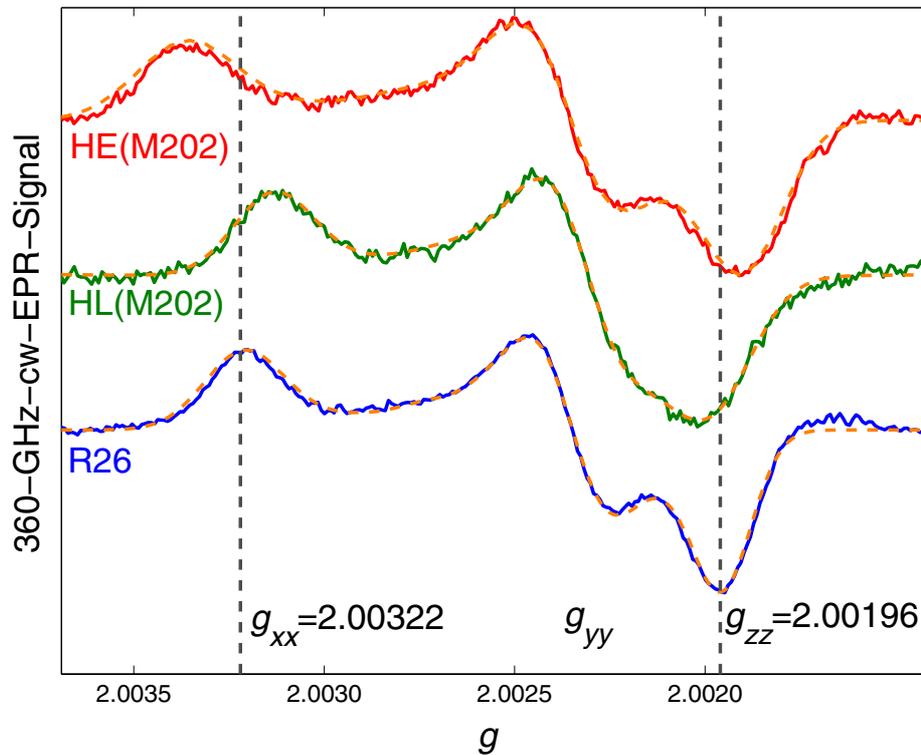


Abbildung 4.4: Durchgezogene Linien: Abgeleitetes cw-EPR-Spektrum von  $P^{\bullet+}$  in Reaktionszentren der HE(M202) (Oben)- und HL(M202) (Mitte)-Mutante sowie in R26 (Unten). Unterbrochene Linien: Simulationen mit den in Tabelle 4.1 wiedergegeben Parametern.  $\nu_{MW} = 360.03$  GHz,  $T = 160$  K. Die Spektren unterscheiden sich in ihren g-Tensor-Hauptwerten, wobei die Verschiebungen von  $g_{xx}$  und  $g_{zz}$  besonders ausgeprägt ist.  $g_{xx}$  und  $g_{zz}$  von  $P^{\bullet+}_{865}$  in R26 sind durch senkrechte gestrichelte Linien markiert.

Probe	$g_{XX-2}$	$g_{YY-2}$	$g_{ZZ-2}$	$g_{iso-2}$	$\Gamma_{XX}$	$\Gamma_{YY}$	$\Gamma_{ZZ}$
	$10^{-5}$				mT		
HE 360 GHz <sup>a</sup>	333(3)	236(2)	191(2)	253	2.1	1.5	1.8
HE 360 GHz <sup>b</sup>	337(3)	236(2)	190(2)	254	2.0	1.7	1.5
HL 360 GHz <sup>a+b</sup>	314(2)	230(2)	200(2)	248	1.4	1.7	1.5
R26 360 GHz <sup>a</sup>	324(2)	236(2)	195(2)	252	1.6	1.3	1.2
R26 360 GHz <sup>b</sup>	322(2)	235(2)	196(2)	251	1.6	1.4	1.1

<sup>a</sup> Kationerzeugung durch Lichtanregung

<sup>b</sup> Kationerzeugung durch chemische Oxidation

Tabelle 4.1: Aus den Fits der 360-GHz-Spektren gewonnene g-Werte des Donors  $P^{\bullet+}$  in *Rb. sphaeroides*, sowie der HL(M202)- und HE(M202)-Mutanten.

ihren g-Tensor-Hauptwerten als auch in ihren Linienbreiten. Die Art der Oxidation beeinflusst diese Parameter nicht (siehe Abbildung 4.3). Der Haupteffekt des Austausches des Histidins M202 gegen Leucin oder Glutaminsäure auf das 360-GHz-EPR-Spektrum ist eine veränderte inhomogene Linienbreite sowie eine Verschiebung der  $g_{XX}$ - und  $g_{ZZ}$ -Werte. Besonders ausgeprägt ist die Verschiebung von  $g_{XX}$ ; wie aus der Tabelle 4.1 zu entnehmen ist, gilt:  $g_{XX}(\text{HL(M202)}) < g_{XX}(\text{R26}) < g_{XX}(\text{HE(M202)})$ . Für  $g_{ZZ}$  beobachtet man eine kleinere Verschiebung mit:  $g_{ZZ}(\text{HL(M202)}) > g_{ZZ}(\text{R26}) > g_{ZZ}(\text{HE(M202)})$ . Die EPR-Spektren von HE(M202) zeigen nicht nur eine Verbreiterung des Gesamtspektrums, sondern auch eine deutliche Vergrößerung der inhomogenen Linienbreite gegenüber HL(M202) und R26, was sich in den Simulationen in einem vergrößerten  $\Gamma$  widerspiegelt.

In Tabelle 4.2 sind die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen g-Tensor-Hauptwerte von  $P^{\bullet+}$  den Ergebnissen anderer EPR-Messungen bei 95 GHz [75, 112, 113], 130 GHz [102], 330 GHz [104, 108] gegenübergestellt. Unsere Messungen ergaben für  $P_{865}^{\bullet+}$  in R26 eine gute Übereinstimmung mit den in [104] gemessenen Werten, daher stützen unsere Ergebnisse die von Bratt *et al.* [104] vorgenommene Diskussion der Abweichungen zu den in [102, 113] angegebenen Werte. Für HL(M202) ermittelten wir aus den bei 360 GHz gemessenen Spektren eine signifikante Abweichung der absoluten g-Tensor-Hauptwerte zu den bei 95 GHz gewonnenen Werten [106, 112]. Die von Huber *et al.* angegebenen Werte für  $g_{XX}$ ,  $g_{YY}$  und  $g_{ZZ}$  sind signifikant höher als die von uns ermittelten. Trotzdem stimmen unsere Untersuchungen mit denen von Huber *et al.* [106, 112] insofern überein, als wir für HL(M202) die gleichen relativen Verschiebungen der Hauptwerte von  $P^{\bullet+}$  in

Probe	$\nu_{\text{MW}}$ GHz	$g_{\text{XX}-2}$	$g_{\text{YY}-2}$	$g_{\text{ZZ}-2}$ $10^{-5}$	$g_{\text{iso}-2}$	$\Delta g$	$T$ K	Quelle
Wt(WS231)	95	333(1)	250(1)	201(2)	261	132	200–240	[112] <sup>a</sup>
Wt(2.4.1)	95	337(5)	248(5)	208(5)	264	129	225	[75] <sup>a,d</sup>
Wt(2.4.1)	95	333(2)	246(2)	204(3)	261	129	225	[112] <sup>a,d</sup>
R26	95	329(2)	239(2)	203(2)	257	126	285	[75] <sup>a,c</sup>
R26	95	326(1)	240(1)	191(1)	252	135	200–240	[112] <sup>a</sup>
R26	94	334(?)	246(?)	221(?)	267	113	?	[113] <sup>b,d</sup>
R26	135	402(7)	224(7)	159(7)	262	243	210	[102] <sup>a</sup>
R26	330	323(2)	241(2)	197(2)	254	126	5–160	[104] <sup>a,b</sup>
R26	360	324(2)	236(2)	195(2)	251	129	160	hier <sup>a</sup>
R26	360	322(2)	235(2)	196(2)	251	126	160	hier <sup>b</sup>
HL(M202)	95	325(5)	247(5)	219(5)	263	106	288–291	[106] <sup>a,c</sup>
HL(M202)	95	319(2)	246(4)	215(4)	260	104	200–240	[112] <sup>a</sup>
HL(M202)	360	314(2)	230(2)	200(2)	248	114	160	hier <sup>a+b</sup>
HE(M202)	360	333(3)	236(2)	191(2)	253	142	160	hier <sup>a</sup>
HE(M202)	360	337(3)	236(2)	190(2)	254	147	160	hier <sup>b</sup>
BChl <i>a</i>	325	338(?)	256(?)	217(?)	270	121	5	[108] <sup>b,d</sup>

<sup>a</sup> Kationerzeugung durch Lichtanregung

<sup>b</sup> Kationerzeugung durch chemische Oxidation

<sup>c</sup> Einkristallmessungen

<sup>d</sup> Deuterierte Probe

Wt: Wildtyp

Tabelle 4.2: g-Tensor-Hauptwerte von  $\text{P}^{\bullet+}$  im Wildtyp und in der R26-Mutante von *Rb. sphaeroides*, sowie in den Mutanten HL(M202) und HE(M202).

HL(M202) gegenüber  $P_{865}^{\bullet+}$  in R26 beobachten. Ein Grund für die Abweichungen zwischen den Messungen bei 360 GHz und 95 GHz könnte sein, dass die 95-GHz-Messungen mit Klystren aufgenommen wurden, deren Mikrowellen-Frequenz nur mit einem relativ großen Fehler ( $\sim 100$  MHz) bestimmt werden konnte. Die Ungenauigkeit führt zu einem Fehler bei der Feldeichung mit Hilfe des  $Mn^{2+}$ -Spektrums und somit zu einer verfälschten Feldachse für das  $P^{\bullet+}$ -Spektrum. In dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten 360-GHz-Spektrometer ist die Mikrowellenfrequenz auf genau 360.03 GHz festgelegt. Der Hauptfehler der g-Tensor-Messung rührt daher vom Fehler des g-Werts des Manganstandards. Deshalb ist in der Tabelle 4.2 neben  $g_{XX}$ ,  $g_{YY}$ ,  $g_{ZZ}$  und  $g_{iso}$  auch noch der relative Wert  $\Delta g$  angegeben.  $\Delta g$  ist die Differenz zwischen dem größten und dem kleinsten Hauptwert von  $\hat{\mathbf{g}}$ .

$$\Delta g = (g_{XX} - g_{ZZ}) \quad (4.1)$$

Die Kalibrierung der absoluten g-Tensor-Achse ist mit einem Fehler von  $5 \cdot 10^{-5}$  behaftet. Der Fehler von  $\Delta g$  hingegen ist nur  $2 \cdot 10^{-5}$ .

Die Referenzmessungen stützen, so weit verfügbar, die von uns ermittelten Werte. Die Verschiebung von  $\Delta g$  für HL(M202) gegenüber R26 ist  $-13 \times 10^{-5}$  während für HE(M202) eine Verbreiterung gegenüber R26 von  $+17 \times 10^{-5}$  ermittelt wurde. Diese Veränderungen der g-Anisotropie liegen signifikant außerhalb der Fehlerintervalle. Der zweite beobachtete Effekt ist eine veränderte inhomogenen Linienbreite. Verbreiterte Linien sind vor allem in der HE(M202)-Mutante zu beobachten. Dies gilt sowohl für die lichtangeregten als auch für die chemisch oxidierten Reaktionszentren. Die Simulationen der Spektren von HE(M202) ergaben eine um  $\sim 0.5$  mT größere Linienbreite auf  $g_{XX}(\Gamma_{XX})$  und ein um  $\sim 0.3$  mT größeres  $\Gamma_{ZZ}$  als die Spektren von  $P_{865}^{\bullet+}$  in R26. Die Spektren von HL(M202) und R26 konnten mit weniger voneinander abweichenden Linienbreiten simuliert werden, wobei  $\Gamma_{XX}$  für HL(M202) und R26 in etwa gleich ist und für  $\Gamma_{YY}$  und  $\Gamma_{ZZ}$  ein Unterschied von 0.3 mT beobachtet wurde.

W-Bandmessungen ergaben für HL(M202) und R26 die gleiche inhomogene Linienbreite von 0.35 mT [112], dies ist in Übereinstimmung mit den im X-Band ermittelten Werten. Die gegenüber X- und W-Bandmessungen vergrößerte inhomogene Linienbreite zeigt, dass bei höheren Magnetfeldern *g-strain* der die inhomogene Linienbreite bestimmende Effekt ist. Dieser Effekt führt unter anderem auch dazu, dass der g-Tensor von BChl *a* auch bei Feldern von 24 T nicht aufgelösbar ist [108] und erst durch eine Deuterierung der Reaktionszentren die Hauptwerte ermittelt werden konnten. Im Proteingerüst liegt eine wesentlich definiertere Umgebung als im Lösungsmittel vor, weshalb bei 12.8 T eine Auflösung der g-Tensor-Hauptwerte der protonierten Reaktionszentren möglich ist (siehe Abbildung 4.4). Die Mutation des Histidins M202 verursacht offenbar

eine Störung dieser Ordnung, was sich in den vergrößerten Linienbreiten  $\Gamma_{XX}$ ,  $\Gamma_{YY}$  und  $\Gamma_{ZZ}$  widerspiegelt.

Alle aufgenommenen EPR-Spektren enthielten ein  $\sim 35$  mT breites, sechs Linien enthaltendes Hintergrundsignal, das an Hand des g-Wertes und der Hyperfeinauspaltung als  $\text{Mn}^{2+}$ -Signal identifiziert werden konnte. Die Kontamination der Reaktionszentren mit Mangan kann entweder durch einen Austausch des  $\text{Fe}^{2+}$  mit Mangan aus der Nährlösung der Bakterien [114] zustandekommen oder durch einen Einbau von  $\text{Mn}^{2+}$  in die Zn(II)-Bindungsstelle [115]. Andere Messungen an  $\text{P}_{865}^{\bullet+}$  bei 11 T und 24 T [104] bestätigten die erhöhte Empfindlichkeit der Hochfeld-EPR für dieses Hintergrundsignal. Die größte relative Intensität im Vergleich zum  $\text{P}^{\bullet+}$ -Signal war in den Spektren der HL(M202)-Mutante zu beobachten. Da das Signal aber im Dunklen und unter Lichtbestrahlung die gleiche Intensität hatte, konnte es subtrahiert werden, ohne das Spektrum von  $\text{P}^{\bullet+}$  zu verfälschen.

## 4.4 Diskussion

Die Diskussion der ermittelten g-Tensor-Hauptwerte erfolgt durch einen Vergleich mit Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse, FTIR- und ENDOR-Untersuchungen, sowie Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Rechnungen. Röntgenstrukturanalysen an  $P^{\bullet+}$  in HE(M202) und HL(M202) zeigten, dass  $P^{\bullet+}$  in beiden Mutanten ein Heterodimer ist, bestehend aus einem Bakteriochlorophyll *a* und einem Bakteriopheophytin *a*, BChl(L):BPhe(M) [89, 96, 116]. Im Gegensatz dazu ist der Donor von R26 ein Bakteriochlorophyll *a*-Dimer (BChl)<sub>2</sub>. ENDOR-Untersuchungen zeigten, dass in  $P^{\bullet+}$  von HL(M202) und HE(M202) praktisch die gesamte Spindichte auf dem BChl(L) der L-Untereinheit des Proteins konzentriert ist [97, 98]. Auf Grund dieser Analogie in HL(M202) und HE(M202) wäre es naheliegend, auch eine analoge Verschiebung des g-Tensors als Folge der Umwandlung von (BChl)<sub>2</sub> in BChl:BPhe zu erwarten. Stattdessen beobachtet man für HL(M202) eine kleinere g-Tensor-Anisotropie als in R26, während die Anisotropie für HE(M202) größer ist als in R26 (siehe Tabelle 4.1).

Die beobachtete Verschiebung der g-Tensor-Hauptwerte legt nahe, dass es neben der Konzentration des Spins auf einer statt auf zwei Dimerhälften noch andere wichtige, die Spindichte beeinflussende Veränderungen durch die Mutationen gibt. Gestützt wird diese Annahme, durch die Beobachtung unterschiedlicher Spindichteverteilungen auf dem BChl(L) in den beiden Mutanten. ENDOR/TRIPLE-Studien [93] ergaben unterschiedliche Verhältnisse  $R_L = a(12_L^1)/a(2_L^1)$  der isotropen Hyperfeinkopplungen der Methylprotonen an Position 12<sup>1</sup> und 2<sup>1</sup> (siehe Abbildung 4.5)

$$R_L(\text{HL(M202)}) = 1.29$$

$$R_L(\text{R26}) = 1.44$$

$$R_L(\text{HE(M202)}) = 1.66$$

Das heißt, dass die Spindichte auch in den Mutanten, in denen der Spin nur auf einer Dimerhälfte konzentriert ist, nicht gleich verteilt ist. Ein Grund für die unterschiedliche Spindichteverteilung müssen daher strukturelle Veränderungen durch die jeweiligen Mutationen sein. Ein Vergleich semiempirischer *molecular-orbital*-(MO)-Studien [117] mit ENDOR/TRIPLE-Messungen an  $P^{\bullet+}$  in photosynthetischen Reaktionszentren [97, 118, 119] ergaben, dass sich eine Änderung von  $R_L$ , durch eine Drehung der Acetylgruppe an Position 3, relativ zur Ebene des aromatischen Rings A um den Winkel  $\Theta_{ac}(L)$ , erklären läßt. Als Torsionswinkel  $\Theta_{ac}(L)$  der Acetylgruppe wurde der Diederwinkel  $\Theta(2, 3, 3^1, 3^2)$ , welcher die Drehung der Acetylgruppe relativ zur Ebene des Chlorophylls beschreibt,

definiert (siehe Abbildung 4.2). Eine Änderung von  $\Theta_{ac}$  als Folge der Mutation wird durch einen Vergleich mit der Röntgenstruktur (siehe Abbildung 4.1) nahegelegt. Die Struktur des Dimers in Abbildung 4.1 zeigt, dass die Acetylgruppe in die Region hineinragt, in der im Zentrum von BChl(M) (bzw. BPhe(M) im Falle der Mutanten) die Strukturänderung durch die Mutation stattfindet. Da sich die isotropen Hyperfeinkopplungen als Funktionen lokaler Spindichten durch eine Drehung der Acetylgruppe verändern lassen, ist es naheliegend anzunehmen, dass auch der g-Tensor, der ebenfalls eine Funktion der Spindichte ist, von dieser strukturellen Veränderung beeinflusst wird.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden in [16] DFT-Rechnungen an R26, HL(M202) und HE(M202) durchgeführt. Dank der schnellen Entwicklung der Dichtefunktionaltheorie in den letzten Jahren sind eine Reihe hochentwickelter Programmpakete erhältlich, wie das von uns verwendete Amsterdam-Density-Functional-Paket (ADF) [120]<sup>1</sup>. Zur Berechnung der Hyperfein- und g-Tensoren benutzten wir eine der im ADF-Paket enthaltenen EPR-Optionen. Die von uns gewählte Option arbeitet entsprechend dem *unrestricted-Hatree-Fock*-Ansatz von Schreckenbach und Ziegler [123,124]. Um die Rechenzeit zu verkürzen, wurde die Struktur

---

<sup>1</sup>Sowohl die semiempirischen als auch die DFT-Rechnungen wurden von Martin Plato in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Das ADF-Paket wurde von uns nur angewandt und soll hier nicht weiter beschrieben werden. Eine Einführung in die verschiedenen Ansätze zur Berechnung von Molekülorbitalen wird z.B. in [121] Kapitel 8 und 9 gegeben, eine spezielle Einführung in die DFT bietet [122].

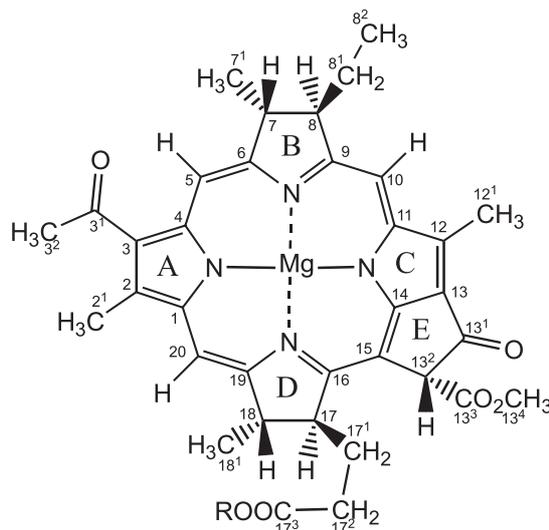


Abbildung 4.5: Molekulare Struktur von Bakteriochlorophyll *a* (BChl *a*) mit der IUPAC Nummerierung

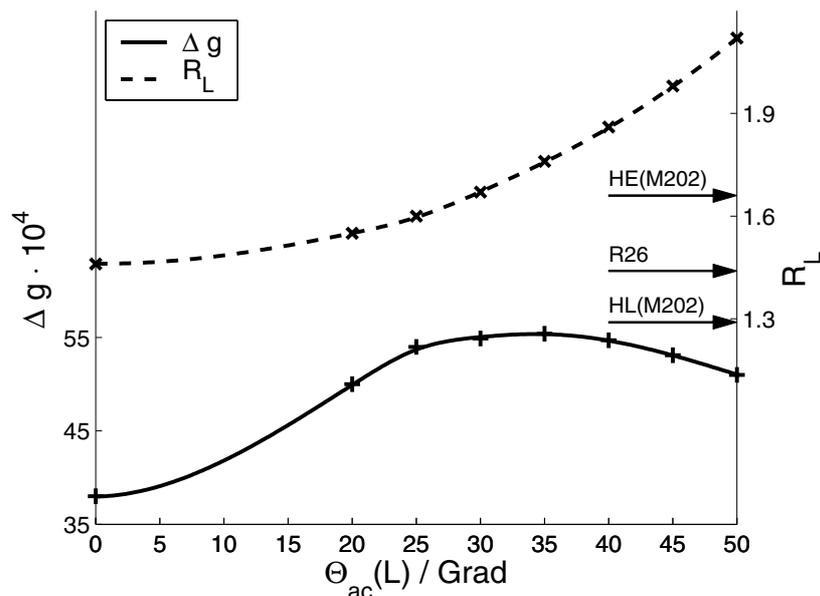


Abbildung 4.6: Ergebnisse der DFT-Rechnungen für  $\Delta g = g_{XX} - g_{ZZ}$  (durchgezogene Linie) und  $R_L$  (unterbrochene Linie), als Funktion des Torsionswinkels  $\Theta_{ac}(L)$ . Die waagrechten Pfeile markieren die experimentellen Werte von  $R_L$  für HL(M202), R26 und HE(M202). Sowohl für die berechneten Werte für  $R_L$  als auch für die von  $\Delta g$  ist ein Anstieg im Bereich  $0^\circ \leq \Theta_{ac}(L) \leq 35^\circ$  zu beobachten, dies ist in Übereinstimmung mit  $R_L(\text{HL(M202)}) < R_L(\text{R26}) < R_L(\text{HE(M202)})$  und  $\Delta g(\text{HL(M202)}) < \Delta g(\text{R26}) < \Delta g(\text{HE(M202)})$ .

von BChl(L) vereinfacht. Die Anzahl von 82 Atomen wurde reduziert, indem die gesättigten Seitengruppen an den Kohlenstoffpositionen 2, 7, 8, 12, 13<sup>2</sup>, 17 und 18 (siehe Abbildung 4.5) gegen Wasserstoffatome mit einer Bindungslänge  $r(\text{C-H}) = 1.09 \text{ \AA}$  ersetzt wurde. Außerdem wurden für alle anderen Bindungen Standardbindungslängen und -winkel verwendet. Die Acetylgruppe an Position 3 in Abbildung 4.5 blieb unverändert.

Die Ergebnisse unserer Berechnungen für  $R_L$  und  $\Delta g$  sind als Funktionen von  $\Theta_{ac}(L)$  in Abbildung 4.6 dargestellt. Die gezeigten Kurven wurden durch eine numerische Spline-Interpolation durch die acht errechneten Punkte (in Abb. 4.6 als Kreuze dargestellt) zwischen  $\Theta_{ac}(L) = 0^\circ$  und  $50^\circ$  erzeugt. Die berechneten Werte für  $R_L$  zeigen einen monotonen Anstieg für größer werdendes  $\Theta_{ac}(L)$ . Obwohl die experimentellen Werte für  $R_L$  in etwa im Bereich der errechneten Werte liegen, sind die Abweichungen von den experimentellen Werten deutlich größer als der Messfehler. Für  $\Delta g$  ergaben die DFT-Rechnungen Werte zwischen  $35$  und  $55 \times 10^{-4}$ , gemessen wurden Werte zwischen  $10$  und  $15 \times 10^{-4}$ . Die starke Abweichung vom gemessenen  $\Delta g$  kann verschiedene Gründe haben: i) eine

unzulässige Vereinfachung der Geometrie von  $P^{\bullet+}$ , ii) die Vernachlässigung elektrischer Felder der umgebenden Aminosäuren oder iii) eine ungünstige Wahl des Doppel- $\zeta$  Basis-Satzes in den DFT-Rechnungen. Es bleibt festzuhalten, dass die DFT-Rechnungen die gemessene Korrelation der Veränderung von  $R_L$  und  $\Delta g$  als Resultat der Mutationen reproduzieren. Dies bestärkt die Annahme einer Drehung der Acetylgruppe als Ursache der Verschiebung der beiden Parameter.

Neben  $\Delta g$  weichen auch die aus den DFT-Rechnungen ermittelten absoluten Werte von  $g_{XX}$ ,  $g_{YY}$  und  $g_{ZZ}$  von den experimentellen Werten ab. Die Spektren von HL(M202), HE(M202) und R26 zeigen Verschiebungen auf den  $g_{XX}$ - und  $g_{ZZ}$ -Hauptwerten, während die DFT-Rechnungen nur eine Verschiebung von  $g_{ZZ}$  ergaben. Die Verschiebung von  $g_{ZZ}$  ist wahrscheinlich eine Folge der Änderung der Planarität des  $\pi$ -Systems durch die Drehung der Acetylgruppe. Diese Änderung führt jedoch zu keiner Verschiebung von  $g_{XX}$ . Deshalb müssen offensichtlich noch andere, bisher in den Rechnungen unberücksichtigte Einflüsse simuliert werden. Untersuchungen an kleineren planaren Molekülen ergaben, dass die in der Molekülebene liegende  $g_{XX}$ -Komponente sehr empfindlich auf Wasserstoffbrücken mit der Umgebung reagiert (siehe z.B. Abbildung 6.2). Die Wasserstoffbrücken werden aber in unseren Rechnungen noch nicht berücksichtigt. Eine verbesserte Übereinstimmung der berechneten  $g_{XX}$ -Werte mit den experimentellen erwarten wir deshalb von erweiterten g-Tensor-Berechnungen die Wasserstoffbrücken, z.B. zum Histidin L168, miteinbeziehen.

Die entscheidende Aussage der DFT-Rechnungen ist, dass bei der Rotation der Acetylgruppe um den Winkel  $\Theta_{ac}(L)$  zwischen  $0^\circ$  und  $30^\circ - 35^\circ$  ein Bereich existiert, in dem sowohl  $R_L$  als auch  $\Delta g$  zunehmen. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den experimentellen Werten. Ordnet man den Mutanten entsprechend zunehmender  $R_L$ - und  $\Delta g$ -Werte (siehe Tabelle 4.2 und die oben angegebenen experimentellen Werte für  $R_L$ ), unterschiedliche Winkel  $\Theta_{ac}(L)$  zu, so folgt daraus, dass  $\Theta_{ac}(L)$  von HL(M202) über R26 nach HE(M202) im Bereich von  $0^\circ \leq \Theta_{ac}(L) \leq 35^\circ$  zunimmt.<sup>2</sup>

Die aus der  $\Delta g$  bzw.  $R_L$  vs.  $\Theta_{ac}(L)$  Abhängigkeit vorhergesagte Reihenfolge

---

<sup>2</sup>Es ist nicht zu erwarten, dass die Reihenfolge  $\Delta g(\text{HL(M202)}) < \Delta g(\text{R26}) < \Delta g(\text{HE(M202)})$  entscheidend von der Tatsache beeinflusst wird, dass die Spindichte in R26 auf beide Dimer-Hälften verteilt ist, während sie in HL(M202) und HE(M202) nur auf der L-Seite lokalisiert ist. Die notwendige Korrektur von  $\Delta g$  (Dimer-Verschiebung) läßt sich aus der folgenden Relation abschätzen:  $g_{\text{Dimer}} \approx D_L g_L + (1 - D_L) g_M$  [125], wobei  $g_M$  im gleichen molekularen Koordinatensystem wie  $g_L$  berechnet werden muss.  $D_L$  steht für die totale Spindichte auf BChl(L). Für  $D_L = 0.7$  [98] und mit der Röntgenstruktur von R26 [116] erhält man folgende Korrektur der Hauptwerte von  $\hat{g}(\text{R26})$ :  $\delta g_{XX} \approx -3.0 \times 10^{-4}$ ,  $\delta g_{YY} \approx +3.0 \times 10^{-4}$ ,  $\delta g_{ZZ} \approx 0$ . Daher wäre  $\delta \Delta g \approx -3.0 \times 10^{-4}$ , was klein ist verglichen mit den durch die DFT errechneten Verschiebungen  $\Delta g \approx 17 \times 10^{-4}$  zwischen  $\Theta_{ac}(L) = 0^\circ$  und  $35^\circ$ .

$\Theta_{ac}(\text{HL}(\text{M202})) < \Theta_{ac}(\text{R26}) < \Theta_{ac}(\text{HE}(\text{M202}))$  wird durch die Röntgenstrukturen von HL(M202) und R26 bestätigt. Aus den Strukturen ergeben sich  $\Theta_{ac}(L) = 35^\circ$  (HL(M202)) und  $62^\circ$  (R26), mit Fehlern von  $\pm 15^\circ$ .

Durch die in diesem Kapitel dargestellte Untersuchung konnte gezeigt werden, dass durch die hohe spektrale Auflösung der Hochfeld-EPR kleine strukturelle Änderungen in Proteinkofaktoren untersucht werden können, die mit anderen Methoden nicht darstellbar sind. Darüberhinaus liefern die g-Tensor-Messungen, dank ihrer hohen Genauigkeit, Daten, mit deren Hilfe die Entwicklung molekularphysikalischer Methoden wie der DFT vorangetrieben werden können.

