

# Kapitel 7

## Zusammenfassung und Ausblick

Im folgenden Kapitel möchte ich auf der Grundlage der erzielten Ergebnisse und Fortschritte einen Ausblick auf zukünftige Hochfeld-EPR-Untersuchungen geben. Ziel der Arbeit war es, neue Methoden der Hochfeld-EPR bei 95 GHz, 180 GHz und 360 GHz zu entwickeln sowie die Anwendung bisher aus apparativen Gründen nicht durchführbarer EPR-Verfahren auf Probleme der Proteinforschung zu initiieren. Während bei 95 GHz und 180 GHz neue gepulste EPR- und ENDOR-Experimente an bereits bestehenden Spektrometern durchgeführt wurden, mussten viele apparative Voraussetzungen für die Experimente bei 360 GHz erst geschaffen werden. Deshalb wurden die Erweiterungen und Verbesserungen am 360-GHz-Spektrometer in einem eigenen Kapitel behandelt, um den erreichten Stand der Spektrometerentwicklung zu dokumentieren und künftigen Nutzern dessen Weiterentwicklung zu erleichtern. Im Folgenden werden die Fortschritte am 360-GHz-Spektrometer zusammengefasst sowie die entscheidenden neuen Erkenntnisse der Untersuchungen an den Kofaktorradiakalen  $P^{\bullet+}$ ,  $Q_A^{\bullet-}$  und  $Q_B^{\bullet-}$  in Reaktionszentren von *Rb. sphaeroides* und  $FADH^{\bullet}$  in der DNS-Photolyase von *E. coli* wiedergegeben.

### Weiterentwicklungen am 360-GHz-Spektrometer

Um die g-Tensoren von nur in kleinen Mengen verfügbaren Proteinen mit hoher Empfindlichkeit und spektraler Auflösung zu messen, wurde das in unserer Arbeitsgruppe aufgebaute 360-GHz-cw-EPR-Spektrometer überarbeitet und erweitert. Zur Diagnose stehender Wellen im Spektrometer sowie der Güte und Ankopplung der verwendeten Mikrowellenresonatoren wurde das Spektrometer um eine *sweep*-Option erweitert. Durch die Eliminierung von stehenden Wellen im Spektrometer und die Überarbeitung des Resonators konnte die Ankopplung des Resonators erleichtert, die Empfindlichkeit des Spektrometers um den Fak-

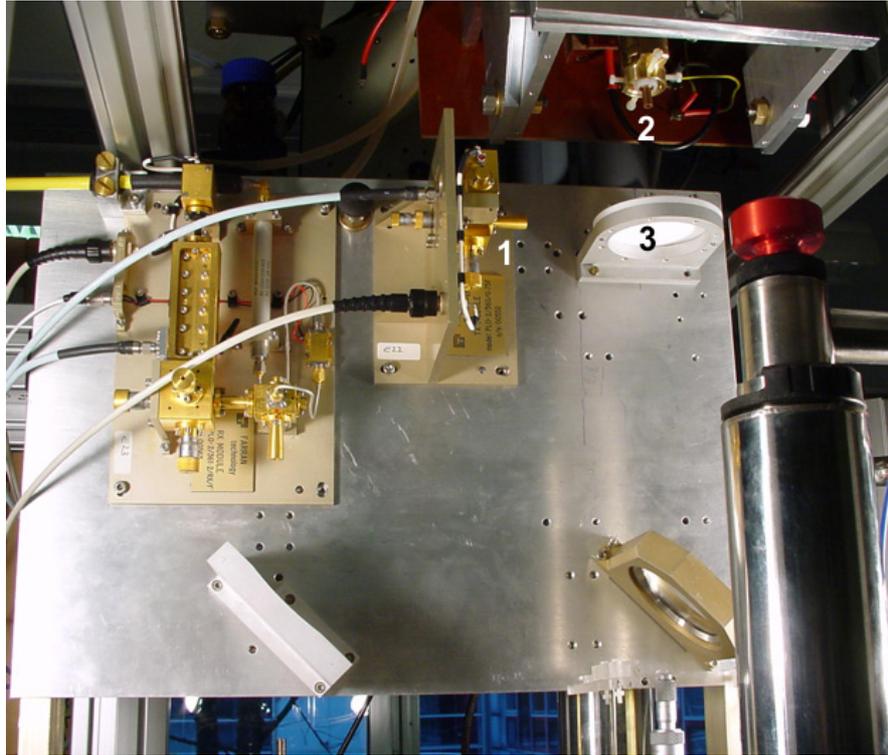


Abbildung 7.1: Fotografie der 360-GHz-Mikrowellenbrücke. Die Brücke kann sowohl im gepulsten als auch im cw-Modus betrieben werden. Als Mikrowellenquellen dienen im cw-Modus eine phasengeregelte Gunn-Diode (1, siehe Abschnitt siehe 3.2) und im gepulsten Betrieb ein gepulstes Orottron (2, siehe Abschnitt 3.3). Durch den Austausch der Linse (3) gegen einen elliptischen Spiegel kann vom gepulsten in den cw-Modus gewechselt werden.

tor fünf erhöht sowie die Langzeitstabilität während der Messung auf mehrere Stunden gesteigert werden. Die für eine Messung benötigte Probenmenge beträgt deutlich weniger als ein Mikroliter (für ein vergleichbares Experiment im X-Band benötigt man ca.  $100 \mu\text{l}$ ). In den Resonator wurde zusätzlich eine Lichtankopplung eingebaut, die die Beleuchtung gefrorener Lösungen im Resonator erlaubt. Mit dem Ziel, in Zukunft zeitaufgelöste EPR-Messungen bei 360-GHz durchführen zu können, habe ich eine neue quasiptische Mikrowellenbrücke zur phasenempfindlichen Detektion des EPR-Signals konstruiert.

Neben der Optimierung des cw-Spektrometers war der Aufbau des ersten 360-GHz-Spektrometers mit gepulster Mikrowellenanregung das Hauptziel des apparativen Teils meiner Arbeit. Erstmals wurde dabei ein gepulstes Orottron in einem EPR-Spektrometer als Mikrowellenquelle verwendet. Da es sich bei dem für unsere Arbeitsgruppe konstruierten Orottron um den Prototyp des ersten puls-

baren Orotrons überhaupt handelte, war vor dem Einbau in das Spektrometer eine aufwendige Optimierung und Spezifizierung des Orotrons notwendig. Für gepulste EPR-Messungen mit dem Orotron musste ebenfalls eine neue Konfiguration der Mikrowellenbrücke aufgebaut werden (siehe Abbildung 7.1), die eine quasioptische Einkopplung des Orotrons und eine empfindliche Mischerdetektion der Orotronpulse ermöglicht. Ein wichtiges Ziel bei der Konstruktion der Brücke war die Möglichkeit, durch den Austausch weniger Mikrowellenkomponenten zwischen gepulstem- und cw-Modus wechseln zu können. Mit dieser Konfiguration des Spektrometers konnten die ersten gepulsten Messungen bei 360 GHz durchgeführt werden.

### **Bestimmung der g-Tensor-Hauptwerte von P<sup>•+</sup> in HE(M202), HL(M202) und R26**

Die erhöhte Empfindlichkeit des Spektrometers und die Möglichkeit der Lichtbestrahlung im Resonator war die Voraussetzung für die Untersuchung der g-Tensoren von P<sup>•+</sup> in verschiedenen Mutanten von *Rb. sphaeroides*. Dabei konnten erstmals die Hauptwerte von P<sup>•+</sup> in der HE(M202)-Mutante bestimmt werden. Die g-Tensor-Hauptwerte von HL(M202) und R26 konnten hier mit erhöhter Genauigkeit gemessen werden. Die neue Resonatorkonfiguration erlaubt einen Vergleich von chemisch oxidierten mit lichtangeregten Proben. Für P<sup>•+</sup> konnten dadurch Verfälschungen der g-Werte durch die Art der Probenpräparation ausgeschlossen werden. Die aus den EPR-Spektren gewonnenen g-Tensor-Hauptwerte beider Präparationsarten stimmen im Rahmen des Fehlers überein. Die ermittelten g-Tensor-Hauptwerte von P<sup>•+</sup> sind für die HE(M202)-Mutante:  $g_{XX} = 2.00333(3)$ ,  $g_{YY} = 2.00236(2)$  und  $g_{ZZ} = 2.00191(2)$  (lichtangeregt) sowie  $g_{XX} = 2.00337(3)$ ,  $g_{YY} = 2.00236(2)$  und  $g_{ZZ} = 2.00190(2)$  (chemisch oxidiert), für HL(M202):  $g_{XX} = 2.00314(2)$ ,  $g_{YY} = 2.00230(2)$  und  $g_{ZZ} = 2.00200(2)$  (chemisch oxidiert und lichtangeregt), sowie für R26:  $g_{XX} = 2.00324(2)$ ,  $g_{YY} = 2.00236(2)$  und  $g_{ZZ} = 2.00195(2)$  (lichtangeregt)  $g_{XX} = 2.00322(2)$ ,  $g_{YY} = 2.00235(2)$  und  $g_{ZZ} = 2.00196(2)$  (chemisch oxidiert). Erstaunlicherweise gilt für die g-Tensor-Anisotropie,  $\Delta g = g_{XX} - g_{ZZ}$ ,  $\Delta g(\text{HL(M202)}) < \Delta g(\text{R26}) < \Delta g(\text{HE(M202)})$ . Der primäre Donor in R26 ist ein Bakteriochlorophyll  $\alpha$ -Dimer (BChl)<sub>2</sub>, während P<sup>•+</sup> in HE(M202) und HL(M202) ein BChl(L):BPhe(M)-Heterodimer ist. Der naheliegende Schluss, dass die Verschiebung des g-Tensors einfach eine Folge der Umwandlung des Bakteriochlorophylls in ein Bakteriopheophetin ist, muss wegen der entgegengesetzten Richtung der Verschiebungen von  $\Delta g$  in HE(M202) und HL(M202) gegenüber R26 ausgeschlossen werden. Dichtefunktionaltheorie-Rechnungen ergaben eine Korrelation der Drehung der Acetylgruppe des BChl(L)

mit der Verschiebung der g-Tensor-Hauptwerte. Damit konnte ein Einfluss dieser strukturellen Veränderung auf die Spindichte von  $P^{\bullet+}$  und die Verschiebung des g-Tensors erklärt werden.

### **Bestimmung des g-Tensors von FADH $\bullet$**

Durch die hohe spektrale Auflösung der 360-GHz-cw-EPR konnten erstmals die g-Tensor-Hauptwerte von FADH $\bullet$  spektral voneinander getrennt und  $g_{XX} = 2.00431(5)$ ,  $g_{YY} = 2.00360(5)$  und  $g_{ZZ} = 2.00217(7)$  eindeutig bestimmt werden. Trotz der schlechteren Auflösung im W-Band konnte mit Hilfe orientierungsselektiver 'Davies'-ENDOR-Messungen auf  $g_{ZZ}$  gezeigt werden, dass die  $g_{ZZ}$ -Komponente senkrecht zur Molekülebene steht. Die Orientierung der  $g_{XX}$ - und  $g_{YY}$ -Komponente konnte durch einen Vergleich der 360-GHz-Spektren von deuterierten und protonierten Proben bestimmt werden. Aus der Hyperfeinaufspaltung eines  $\alpha$ -Protons auf der  $g_{YY}$ -Komponente der protonierten Probe und dem Vergleich mit unabhängigen 'Davies'-ENDOR Messungen an FADH $\bullet$  im X-Band konnte der Betrag des Winkels zwischen  $A_{YY}$  und  $g_{YY}$  mit  $(16 \pm 2)^\circ$  festgelegt werden.

### **Die molekulare Dynamik von $Q_A^{\bullet-}$ und $Q_B^{\bullet-}$**

In einer Untersuchung der inter-und intramolekularen Dynamik von  $Q_A^{\bullet-}$  und  $Q_B^{\bullet-}$  in photosynthetischen Reaktionszentren wurde die zeitabhängige Modulation des g-Tensors als Sonde benutzt. Mit Hilfe von zwei-dimensionaler gepulster ESE-detektierter EPR wurde die Orientierungsabhängigkeit der Spin-Spin-Relaxationszeiten ermittelt. Auf Grund der Temperaturabhängigkeit der Relaxation konnten zwei verschiedene dynamische Mechanismen postuliert werden. Bei 120 K und bei 140 K dominiert entweder eine Auslenkung der Chinone um ihre Hauptbindungsrichtung, die annähernd parallel zu  $g_{XX}$  ist oder ein bisher nicht identifizierter feldunabhängiger Prozess. Oberhalb von 160 K beobachtet man Fluktuationen der Proteinumgebung mit isotroper Richtungsverteilung. Referenzmessungen an  $Q_A^{\bullet-}$  im G-Band (180 GHz) zeigten keine quadratische Feldabhängigkeit. Dieser Befund deutet darauf hin, dass sie sich im *slow motion limit* vollziehen.

### **Ausblick**

Als Ausblick auf zukünftige EPR-Untersuchungen an Proteinkofaktoren möchte ich im Folgenden vor allem auf durch meine Arbeit ermöglichte neue Experimente der 360-GHz-EPR eingehen. Durch die Erhöhung der Stabilität und Empfindlichkeit des cw-Modus des 360-GHz-Spektrometers konnten neue Probenklas-

sen erschlossen werden. In meiner Arbeit habe ich an zwei Beispielen die hohe Empfindlichkeit und spektrale Auflösung unseres 360-GHz-Spektrometers zur Bestimmung von g-Tensoren demonstriert; diese Untersuchungen sollen in Zukunft fortgesetzt werden. Vor allem g-Tensor-Untersuchungen an weiteren punktmutierten photosynthetischen Reaktionszentren versprechen umfassende Erkenntnisse über die zur Funktionalisierung der primären Donatoren beitragenden Wechselwirkungen. Geplant sind Untersuchungen an Mutanten, in denen durch gezielte Mutationen das Wasserstoffbrücken-Netzwerk von  $P_{865}^{\bullet+}$  in bakteriellen Reaktionszentren [88] verändert wurde, sowie eine Erweiterung auf  $P_{700}^{\bullet+}$  in pflanzlichen Reaktionszentren PS I [168]. Eine weitere Anwendung stellt die Bestimmung der Abstände von Nitroxid-Spinmarkern in *de novo* Proteinen aus cw-EPR-Spektren dar, wie sie im Moment von Celine Elsässer im Zuge ihrer Dissertation am Fachbereich Physik der FU-Berlin durchgeführt werden.

Durch die Integration einer optischen Anregung in den EPR-Resonator und die Konstruktion einer neuen Mikrowellenbrücke für eine phasenempfindliche Mikrowellendetektion wird es in Zukunft möglich sein, zeitaufgelöste Messungen an kurzlebigen Radikalen und Radikalpaaren durchzuführen. Vor allem spinpolarisierte Radikalpaare, wie sie z.B. in photosynthetischen Reaktionszentren nach Lichtanregung entstehen, erlauben die Identifikation von Proteinkofaktoren sowie die Bestimmung ihrer Abstände und relativen Orientierungen als wichtige strukturelle Proteineigenschaften [109, 134]. Bei niedrigeren EPR-Frequenzen und Magnetfeldern sind diese Informationen oft nicht zugänglich, weil sich auf Grund unaufgelöster g-Tensoren die Komponenten der zum Spektrum beitragenden Radikale überlappen. Durch die hervorragende Auflösung der 360-GHz-EPR können, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, auch sehr kleine Anisotropien aufgelöst werden. Eine wichtige Anwendung der hohen spektralen und zeitlichen Auflösung transientser 360-GHz-EPR wird in Zukunft die Untersuchung von Orientierungsänderungen des g-Tensors von  $P^{\bullet+}$  in photosynthetischen Reaktionszentren als Folge von ortsspezifischen Mutationen sein. Aus cw-Spektren können, wie weiter oben dargestellt wurde, in der Regel nur die Hauptwerte des g-Tensors ermittelt werden. Radikalpaarspektren erlauben zusätzlich die Bestimmung der relativen Orientierungen der g-Tensoren und damit weitere wichtige strukturelle Informationen. Als Beispiel für die hohe Orientierungsempfindlichkeit spinpolarisierter Radikalpaarspektren zeigt Abbildung 7.2 Simulationen des Spektrums von  $P_{865}^{\bullet+} Q_A^{\bullet-}$  in R26, für drei verschiedene Orientierungen des g-Tensors von  $P_{865}^{\bullet+}$  relativ zu  $Q_A^{\bullet-}$ <sup>1</sup>.

Das grösste Potential der Hochfeld-EPR liegt in der Entwicklung gepulster EPR

---

<sup>1</sup>Die Spektren wurden mit einem von Michael Fuhs geschriebenen Programm simuliert [169]

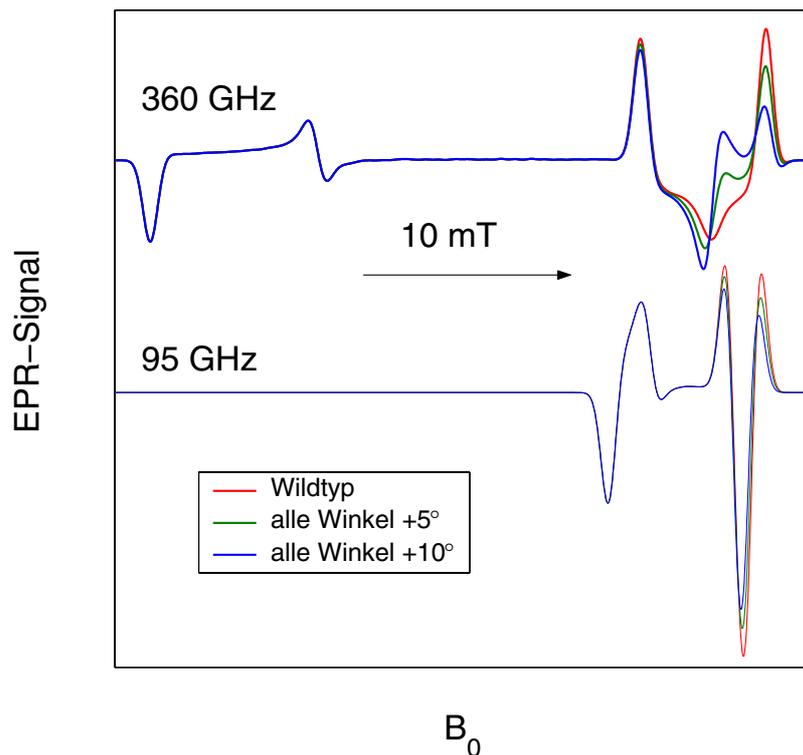


Abbildung 7.2: Simulation des spinkorrelierten Radikalpaarspektrums von  $P_{865}^{\bullet+}Q_A^{\bullet-}$  für verschiedene Orientierungen des g-Tensors von  $P_{865}^{\bullet+}$  relativ zu  $Q_A^{\bullet-}$  (siehe Abbildung 4.1 [109]) bei 360 GHz (oben) und 95 GHz (unten).

und ENDOR-Verfahren. Die wichtigste Vorarbeit für gepulste Messungen wurde im Rahmen dieser Arbeit durch den Aufbau eines gepulsten EPR-Spektrometers geleistet. Bei der Aufklärung der Zusammenhänge zwischen Struktur, Dynamik und Funktion von Proteinkomplexen spielen hochaufgelöste g-Tensoren nicht nur als Spinsonden eine Rolle, sondern auch bei der Selektion einzelner Molekülorientierungen, um die Richtung der magnetischen Wechselwirkungen zu bestimmen. Orientierungselektives ENDOR ist in der Lage, selbst an pulverförmigen Proben die Richtung und Stärke der für die Funktionalisierung von Proteinkofaktoren entscheidenden Wasserstoffbrücken zu ermitteln. In Zusammenarbeit mit Prof. Yuri Grishin (Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Novosibirsk, Rußland) wurde der in Abschnitt 3.6 beschriebene Probenkopf mit einer auf die Protonenlarmorfrequenz bei 12.8 T angepassten RF-Spule ausgestattet. Diese Neuentwicklung soll in Zukunft mit den erreichten Fortschritten beim Aufbau einer Mikrowellenbrücke für gepulste EPR-Experimente zu ersten gepulsten ENDOR-Experimenten bei 360 GHz zusammengeführt werden. Relaxationszeitmessungen bei verschiedenen hohen Feldern profitieren in besonderem Masse von

der Auflösung des g-Tensors. Zum einen erlaubt eine Auflösung des g-Tensors orientierungsselektive Relaxationszeitmessungen an bestimmten Molekülorientierungen und somit die Bestimmung der Richtungsabhängigkeit der Bewegung des Moleküls. Zum anderen können durch die Feldabhängigkeit die Relaxationsmechanismen identifiziert und somit weitere wichtige Aussagen über die Zeitskalen und Auslenkungen von Molekülfuktuationen gemacht werden. Fluktuationen zwischen verschiedenen Proteinkonformationen auf der Zeitskala des EPR-Experiments sind deshalb von so großer Bedeutung, weil gezeigt wurde, dass sie in vielen Proteinen die Funktion beeinflussen und z.B in photosynthetischen Reaktionszentren mit der Effizienz des Elektronentransfers korreliert sind. Mit dieser Arbeit wurde dieses neue Gebiet der Multifrequenz-Relaxationszeitmessung bei verschiedenen hohen Feldern auf die Dynamik von  $Q_A^{\bullet-}$  und  $Q_B^{\bullet-}$  in *Rb. sphaeroides* angewandt. Diese Untersuchungen sollen zukünftig bei weiteren Frequenzen durchgeführt werden, um ein möglichst vollständiges Bild der Moleküldynamik zu erhalten.

