

EPR-spektroskopische Untersuchung  
sauerstofftoleranter Hydrogenasen  
aus *Ralstonia eutropha*



Im Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin  
eingereichte Dissertation von

**Julia Löwenstein**

Juni 2016

1. **Gutachter:** Prof. Dr. Robert Bittl
  2. **Gutachter:** Prof. Dr. Peter Hildebrandt
- Disputation:** 22.07.2016

# PUBLIKATIONEN

---

## Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Löwenstein J., Lauterbach L., Teutloff C., Lenz O. und Bittl R.: Active Site of the NAD<sup>+</sup>-Reducing Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* Studied by EPR Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* 119(43), 13834–13841 (2015), doi: 10.1021/acs.jpcc.5b04144
- Frielingsdorf S., Fritsch J., Schmidt A., Hammer M., Löwenstein J., Siebert E., Pelmeshnikov V., Jaenicke T., Kalms J., Rippers, Y., Lenzian F., Zebger I., Teutloff C., Kaupp M., Bittl R., Hildebrandt P., Friedrich B., Lenz O. und Scheerer P.: Reversible [4Fe-3S] cluster morphing in an O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe] hydrogenase. *Nature Chemical Biology* 10(5), 378–385 (2014), doi: 10.1038/nchembio.1500

## Präsentationen auf wissenschaftlichen Konferenzen:

- Löwenstein J., Teutloff Ch., Lauterbach L., Lenz O. und Bittl R.: CW and pulse EPR on the active center of the soluble hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. 10<sup>th</sup> International Hydrogenase Conference. Szeged, Ungarn (8.–12. Juli 2013)
- Bittl R., Frielingsdorf S., Fritsch J., Hildebrandt P., Horch M., Kaupp, M., Lauterbach L., Lenzian F., Lenz O., Löwenstein J., Mroginski M. A., Pelmeshnikov V., Rippers Y., Scheerer P., Siebert E., Teutloff Ch. und Zebger I.: Biological hydrogen conversion (E3-1), UniCat's 3<sup>rd</sup> SAB Meeting. Berlin (9.–10. Oktober 2012)

- Löwenstein J., Teutloff Ch., Fritsch J., Frielingsdorf S., Lenz O., Lenzian F. und Bittl R.: Pulse EPR on the [FeS] clusters of the membrane-bound hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. A European Magnetic Resonance Meeting – Euromar 2012. Dublin, Irland (1.–5. Juli 2012)
- Löwenstein J., Teutloff Ch., Fritsch J., Friedrich B., Hildebrandt P., Lenz O., Zebger I., Lenzian F. und Bittl R.: Relaxation time dependent separation of EPR signals of the MBH from *Ralstonia eutropha*. A European Magnetic Resonance Meeting – Euromar 2011 / 8<sup>th</sup> European Federation of EPR Groups Meeting. Frankfurt am Main (21.–25. August 2011)
- Löwenstein J., Teutloff Ch., Fritsch J., Friedrich B., Lenz O., Zebger I., Lenzian F. und Bittl R.: EPR-spectroscopic investigations of the membrane-bound hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16. 5<sup>th</sup> European Federation of EPR Groups (EF-EPR) Summer School on Advanced EPR spectroscopy. Konstanz (5.–12. September 2010)

### **Vorträge auf wissenschaftlichen Konferenzen:**

- Löwenstein J.: Soluble hydrogenase of *R. eutropha* - HYSCORE and ENDOR on the active Ni-C state. E3/D3 Meeting – hydrogen activation. Berlin (9. Oktober 2014)

## Kurzfassung

Im Zuge der Energiedebatte steht Wasserstoff als potentieller Energiespeicher und saubere, erneuerbare Energiequelle im Fokus derzeitiger Untersuchungen.  $H_2$  dient diversen Organismen als Energielieferant, dafür nutzen sie u.a. Hydrogenasen. Deren Fähigkeit, Wasserstoff in Protonen und Elektronen zu spalten, ist für katalytische Anwendungen interessant, vor allem da spezielle Exemplare auch unter Luftsauerstoff aktiv bleiben können. Das Knallgasbakterium *Ralstonia eutropha* nutzt  $H_2$  auf diese Weise als Energiequelle und weist gleich drei Enzyme auf, die gegen eindringenden Sauerstoff unempfindlich sind: die membrangebundene (MBH), die  $NAD^+$ -reduzierende (SH) und die regulatorische (RH) Hydrogenase. Die Gründe der Toleranz sind erst teilweise bekannt und Gegenstand aktueller Forschung.

Die [NiFe]-Hydrogenasen enthalten unterschiedliche Kofaktoren – das aktive Zentrum und die Cluster der Elektronentransferkette –, die im Verlauf ihrer katalytischen Aktivität und im Umgang mit Sauerstoff diverse Redoxzustände durchlaufen. Einige treten paramagnetisch in Erscheinung, so dass sich Elektronenspinresonanzspektroskopie (EPR) als Untersuchungsmethode anbietet. Mit EPR und verwandten Techniken können selektiv die Interaktionen ungepaarter Elektronen mit ihrer unmittelbaren Umgebung charakterisiert werden:

Durch Q- und X-Band-PEANUT-Messungen an der MBH wurden die Spinzustände der am FSE beteiligten Cluster im reduzierten wie oxidierten Zustand festgestellt. Q-Band-Einkristall-EPR der oxidierten MBH ermöglichte die Bestimmung der  $g$ -Achsenorientierung des [NiFe]-Zentrums sowie die Abschätzung der Austauschkopplungen zwischen aktivem Zentrum, proximalem und medialem Cluster. Relaxationsmessungen zeigten, dass sich die Relaxationszeiten der Cluster durch diese  $J$ -Kopplungen einander angleichen. Mit Q-Band-ENDOR wurde sowohl eine Bindung des oxidierten, proximalen Clusters an das Proteinerückgrat nachgewiesen als auch die  $^{57}\text{Fe}$ -Hyperfeinparameter von proximalem und medialem Cluster. X-Band-ESEEM zeigte eine zusätzliche, mutmaßlich durch ein Hydroxid vermittelte, Bindung des oxidierten [4Fe3S]-Clusters an ein nahes Histidin. Isotopenausgetauschte Proben und proximale wie mediale Mutationsvarianten ermöglichten die Zuordnung der verschiedenen Signale zu den entsprechenden Clustern.

In der Brückenposition des aktiven Zentrums der SH wurde mit Q-Band-ENDOR- und X-Band-HYSCORE-Messungen an  $^1H_2O$ - und  $^2H_2O$ -enthaltenen Proben im  $Ni_a-C$ -Zustand ein photodissoziierendes Hydrid nachgewiesen und charakterisiert. X-Band-ESEEM- und -HYSCORE-Untersuchungen deckten zudem ein ungewöhnlich gebundenes Histidin in der zweiten Koordinationssphäre des aktiven Zentrums auf.

## Abstract

As part of the current energy debate, hydrogen is at the centre of attention of ongoing investigations. It is seen as a possible energy storage and clean renewable energy source. The molecule itself is used as energy supply by different organisms, e.g. by deploying so-called hydrogenases. Their ability to cleave hydrogen into protons and electrons is interesting for catalytic applications, particularly as some of them maintain their activity even under the influence of atmospheric oxygen. The “knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* thus uses hydrogen as an energy source and exhibits three kinds of those oxygen-insensitive enzymes: a membrane-bound (MBH), a NAD<sup>+</sup>-reducing (SH) and a regulatory (RH) hydrogenase. The reasons for their tolerance are only partially known and are subject of current research.

Those [NiFe] hydrogenases contain different cofactors, in particular the active site and the clusters of the electron transfer chain, which undergo various redox states in the course of their catalytic activity and while dealing with oxygen. Several of them can be paramagnetic, pointing to electron spin resonance spectroscopy (EPR) as a well-suited method of investigation. With EPR and related techniques interactions of unpaired electrons with their immediate environment can be revealed and characterised selectively:

Via Q- and X-band PEANUT measurements on the MBH the spin states of the clusters involved in the FSE signal in both the reduced and oxidised state were identified. Q-band single-crystal EPR on the oxidised MBH allowed for the determination of the [NiFe] centre’s *g* axes orientation and permitted an estimation of the exchange interactions between the active site, proximal and medial cluster. Relaxation measurements showed the convergence of the clusters’ relaxation times due to these *J* couplings. Q-band ENDOR investigations could detect both a bond of the oxidised proximal cluster to the protein backbone and the <sup>57</sup>Fe hyperfine parameters of the proximal and medial cluster. With X-band ESEEM an additional bond of the oxidised [4Fe3S] cluster to a nearby histidine was found, which is presumably mediated by a hydroxide. Isotope-exchanged samples and proximal and medial mutation variants helped to assign the various signals to the corresponding clusters.

While in the Ni<sub>a</sub>-C state, in the bridging position of the SH’s active site a photo-dissociating hydride was detected and characterised by Q-band ENDOR and X-band HYSORE measurements on <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O and <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O-containing samples. X-band ESEEM and HYSORE data additionally showed an anomalously bound histidine in the second coordination sphere of the active site.

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>Publikationen</b>	<b>i</b>
<b>Kurzfassung</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iv</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Hydrogenasen</b>	<b>5</b>
2.1 Allgemeiner Aufbau . . . . .	5
2.2 Sauerstofftolerante Hydrogenasen . . . . .	8
2.2.1 Hydrogenasen in <i>Ralstonia eutropha</i> : MBH . . . . .	10
2.2.2 Hydrogenasen in <i>Ralstonia eutropha</i> : SH . . . . .	12
<b>3 Theoretische und experimentelle Methoden</b>	<b>15</b>
3.1 Theorie zur Elektronenspinresonanz . . . . .	15
3.1.1 Freies Elektron . . . . .	16
3.1.2 Spin-Hamilton-Operator . . . . .	18
3.2 <i>cw</i> -EPR . . . . .	25
3.3 Puls-EPR . . . . .	27
3.3.1 Transiente Nutation . . . . .	28
3.3.2 Hahn-Echo-Pulsfolge . . . . .	29
3.3.3 Relaxation . . . . .	30

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.3.4	PEANUT . . . . .	36
3.3.5	ESEEM und HYSCORE . . . . .	38
3.3.6	ENDOR . . . . .	47
3.3.7	Trennung von Kopplungen . . . . .	51
3.4	Einkristallmessungen . . . . .	53
3.5	Probenvorbereitung . . . . .	54
3.5.1	MBH . . . . .	54
3.5.2	SH . . . . .	54
3.6	Instrumente . . . . .	55
<b>4</b>	<b>EPR-Eigenschaften der MBH</b>	<b>57</b>
4.1	Oxidierter, gefrorener MBH-Lösung . . . . .	57
4.1.1	Mutationsvarianten . . . . .	60
4.1.2	Relaxationsmessungen . . . . .	65
4.1.3	Nutationsmessungen . . . . .	70
4.2	Orientierungsabhängige Einkristallmessungen . . . . .	80
4.2.1	Übertragung der Parameter auf Lösungsspektren. . . . .	100
4.3	Reduzierter, gefrorener MBH-Lösung . . . . .	106
4.3.1	Nutationsmessungen . . . . .	110
4.3.2	Relaxationsmessungen . . . . .	112
4.3.3	Mutationsvarianten . . . . .	115
4.4	Zusammenfassung . . . . .	121
4.5	Ausblick . . . . .	122
<b>5</b>	<b>Stickstoffkopplungen des proximalen Clusters der MBH</b>	<b>123</b>
5.1	EPR der MBH . . . . .	124
5.2	Starke Kopplungen – ENDOR . . . . .	126
5.3	Schwache Kopplungen – ESEEM . . . . .	131
5.4	Zusammenfassung . . . . .	147
5.5	Ausblick . . . . .	148
<b>6</b>	<b>Bestimmung der <math>^{57}\text{Fe}</math>-Hyperfeinparameter der MBH</b>	<b>151</b>
6.1	$^{57}\text{Fe}$ -ENDOR der reduzierten Probe . . . . .	152
6.2	$^{57}\text{Fe}$ -ENDOR der oxidierten Probe . . . . .	157



6.3	Zusammenfassung . . . . .	162
6.4	Ausblick . . . . .	162
<b>7</b>	<b>Charakterisierung des aktiven Zentrums der SH</b>	<b>163</b>
7.1	EPR-Spektren der SH . . . . .	164
7.2	Hydrid als verbrückender Ligand . . . . .	167
7.2.1	ENDOR . . . . .	167
7.2.2	HYSCORE . . . . .	171
7.3	Stickstoffkopplung am aktiven Zentrum . . . . .	177
7.4	Zusammenfassung . . . . .	186
7.5	Ausblick . . . . .	186
<b>8</b>	<b>Fazit</b>	<b>187</b>
	<b>Anhang A Eulerwinkel</b>	<b>191</b>
	<b>Abkürzungen</b>	<b>193</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>195</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>198</b>
	<b>Literatur</b>	<b>199</b>



---

# EINLEITUNG

---

Mit Hinblick auf die zunehmende Klimaerwärmung und Verknappung fossiler Ressourcen wird seit geraumer Zeit Wasserstoff als nachhaltiger und sauberer Energiespeicher und -lieferant diskutiert. Die Reaktion von Wasserstoff mit Sauerstoff zu Wasser bietet dabei mehrere Vorteile: Erstens liegt der Ausgangsstoff in quasi unbegrenzten Mengen vor und ist typischerweise gebunden in Form von Biomasse oder Wasser. Selbst verschmutztes Wasser könnte verwendet werden, so dass der beispielsweise mittels Solarenergie und Elektrolyse gewonnene Wasserstoff als Energiequelle dienen kann und das Endprodukt nach der Rückreaktion mit Sauerstoff zusätzlich für die Versorgung mit sauberem Trinkwasser zur Verfügung steht. Zweitens findet die Reaktion dank Brennstoffzelle, Katalysator und der Einfachheit der Reaktionspartner ohne den Umweg über Turbinen und dergleichen statt. Es wird direkt chemische Energie in Strom umgewandelt, was Energieverluste stark reduziert. Drittens handelt es sich um eine saubere Reaktion, das heißt, es werden keine Treibhausgase wie  $\text{CO}_2$  oder Stickoxide erzeugt.

Natürlich gibt es auch Nachteile. Zum Einen ist dies die hohe Anregungsenergie, die notwendig ist, um das Wasserstoffmolekül in zwei Ionen zu spalten (436 kJ/mol [1]). Aus diesem Grund reagiert ein geeignetes Gemisch aus Sauerstoff und Wasserstoff nicht ohne zusätzliche Energiezufuhr oder Katalysator. Zum Zweiten setzt die schnelle Reaktion des Gasgemisches in sehr kurzer Zeit viel Energie frei, die schwierig zu nutzen ist. Nicht ohne Grund nennt man sie Knallgasreaktion. Ferner gestaltet sich die Lagerung von Wasserstoff als leicht diffundierendes und brennbares Gas schwierig.

Den ersten beiden Punkten kann man durch räumliche Trennung der Teilreaktionen und den Einsatz von Katalysatoren begegnen, dies ist beispielsweise in Brennstoffzellen realisiert.

Als Katalysatoren werden heutzutage mehrheitlich Edelmetalle wie Platin genutzt, die sowohl teuer und relativ selten sind, als auch meist ungünstige Reaktionsbedingungen wie hohe Temperaturen und Sauerstoffausschluss erfordern. Das natürliche Äquivalent – wasserstoffspaltende Enzyme wie Hydrogenasen – hingegen arbeitet unter normalen Umweltbedingungen, das heißt bei Temperaturen nahe Raumtemperatur, und mit sehr häufig vorkommenden Übergangsmetallen wie Eisen und Nickel. Eine technisch hergestellte Variante dieser Enzyme könnte den Einsatz von Katalysatoren vereinfachen und die Kosten senken, so dass der Gedanke, sich von konventionellen Energiequellen zu lösen, deutlich attraktiver und gewinnbringender wäre.

Besonders interessant für die Anwendung ist eine Subgruppe dieser Hydrogenasen, die auch unter Luftsauerstoff katalytisch aktiv bleiben kann und nicht wie Edelmetallkatalysatoren dadurch zerstört wird. Verschiedene Proteine dieser Untergruppe beherbergt das Knallgasbakterium *Ralstonia eutropha*, in erster Linie sind dies die membrangebundene, die lösliche sowie die regulatorische Hydrogenase. Alle gehören zur Gruppe der [NiFe]-Hydrogenasen. Um eine biotechnologische Verwendung und eventuell sogar eine speziellen Erfordernissen angepasste Konstruktion zu ermöglichen, ist es hilfreich und notwendig, die elementaren Vorgänge und Reaktionsabläufe zu verstehen, die die Hydrogenasen über Jahrtausende hinweg entwickelten.

Die für die Wasserstoffkatalyse wichtigen Zentren der genannten Hydrogenasen – das aktive Zentrum sowie die Eisen-Schwefel-Cluster – bestehen in erster Linie aus Eisen, Schwefel und Nickel, tragen demnach von Natur aus Elektronenspins verschiedener Größe, die als Sonden für ihre unmittelbare Umgebung und die jeweiligen Redoxzustände genutzt werden können. Hier setzt die Elektronenspinresonanzspektroskopie an, welche eine selektive Analyse dieser Zentren ermöglicht, um Rückschlüsse auf die elektronische Struktur, also die Art der Bindungen und Wechselwirkungen zu ziehen. Damit schlägt sie eine Brücke zwischen der Kristallstrukturanalyse und biochemischen Ansätzen (zum Beispiel Aktivitätsmessungen): Sie verbindet grundlegende Struktur und Funktionalität.

---

Zur Aufklärung der Hintergründe der Sauerstofftoleranz der membrangebundenen Hydrogenase MBH beschäftigt sich ein maßgeblicher Teil der vorliegenden Arbeit mit der Untersuchung der elektronischen Eigenschaften ihres proximalen Clusters und seiner Umgebung. Informationen darüber können nicht mittels Röntgenstrukturanalyse gewonnen werden, sondern müssen durch spektroskopische Methoden bestimmt werden. Der Fokus liegt dabei auf gepulsten Methoden der EPR wie ENDOR oder ESEEM, die in der Lage sind, unterschiedlich starke Hyperfeinkopplungen zwischen dem beobachteten Elektronenspin und den Kernen in seiner Nähe zu detektieren und so eventuelle Bindungen auszumachen. In erster Linie wird der oxidierte Zustand untersucht, um direkt den Sauerstoffeinfluss beurteilen zu können.

Für die  $\text{NAH}^+$ -reduzierende, lösliche SH ist eine grundlegendere Charakterisierung notwendig, da mangels Kristallstruktur kaum Daten zur räumlichen Lage und zum Aufbau des aktiven Zentrums sowie seiner Koordination vorliegen. Zudem ist die elektronische Umgebung des aktiven Zentrums relativ wenig untersucht. Auch in diesem Fall sind die Gründe für die Sauerstofftoleranz von Interesse, insbesondere im Vergleich zur MBH, sowie Unterschiede und Gemeinsamkeiten mit Standardhydrogenasen. Neben Puls-EPR-Methoden wie ENDOR findet hier HYSORE Anwendung, eine Erweiterung von ESEEM.

Diese Arbeit ist in verschiedene Abschnitte aufgeteilt:

Kapitel 2 gibt einen Überblick über die allgemeinen Eigenschaften verschiedener Hydrogenasen, ihre Unterschiede und Gemeinsamkeiten. Die diversen Nickelzustände und Kofaktoren werden vorgestellt, es folgt eine genauere Betrachtung der Besonderheiten der in dieser Arbeit untersuchten sauerstofftoleranten Hydrogenasen MBH und SH.

Danach wird in Kapitel 3 beleuchtet, welche Wechselwirkungen zwischen den Spins der Enzyme theoretisch zu erwarten sind, und es werden die EPR-Methoden eingeführt, die in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung dieser Wechselwirkungen genutzt wurden. Ebenso wird ein Überblick über die verwendeten Proben und Geräte gegeben.

In Kapitel 4 werden die Ergebnisse der Untersuchung des oxidierten und des reduzier-

ten Redoxzustandes der MBH vorgestellt, mit dem Ziel, Signalanteile der beteiligten paramagnetischen Zentren zu separieren. Zu diesem Zweck wurden sowohl gefrorene Lösungen als auch Kristalle des Enzym verwendet, es wurden Mutationsvarianten eingesetzt sowie verschiedene EPR-Techniken wie Relaxations- und Nutationsmessungen.

Kapitel 5 beschäftigt sich mit den Wechselwirkungen zwischen dem proximalen Elektronenspin der MBH und nahen Kernen. Dabei kamen Isotopenaustausch- und Mutationsvarianten des Enzyms zum Einsatz und wurden mit ENDOR und ESEEM untersucht. Es werden mögliche strukturelle Veränderungen des Clusters in Bezug auf die Sauerstofftoleranz diskutiert.

Eine genaue Analyse der einzelnen Cluster der MBH wird in Kapitel 6 vorgenommen. ENDOR-Messungen dienen der Bestimmung der  $^{57}\text{Fe}$ -Hyperfeinparameter sowohl im reduzierten als auch oxidierten Enzym.

In Kapitel 7 wird auf die mit *cw*- und Puls-EPR-Methoden erfolgte grundlegende Charakterisierung des aktiven Zentrums der löslichen Hydrogenase SH eingegangen. Das Hauptaugenmerk liegt auf dem verbrückenden Liganden im reduzierten, also katalytisch aktiven Zustand, sowie auf Wechselwirkungen des [NiFe]-Cluster mit seiner nahen Umgebung und den Implikationen für die Sauerstofftoleranz dieser Hydrogenase.

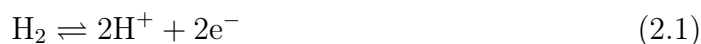
---

# HYDROGENASEN

---

## 2.1 Allgemeiner Aufbau

Trotz seiner Einfachheit, denn er besteht einzig aus zwei Protonen und zwei Elektronen, zeigt sich Wasserstoff als effizienter Energiespeicher und weit verbreitetes Intermediat im Stoffwechsel vieler Organismen. Die Verbindung von Sauerstoff und Wasserstoff zu Wasser durch eine Knallgasreaktion setzt eine Energie von 286 kJ/mol frei, dank der hohen Aktivierungsenergie findet diese stark exotherme Reaktion bei Raumtemperatur allerdings nicht ohne Weiteres statt. Innerhalb vieler Mikroorganismen katalysieren Enzyme die Umwandlung und machen so das Molekül für ihren Energiehaushalt nutzbar. Eine Untergruppe dieser Enzyme, sogenannte Hydrogenasen, ist in der Lage, molekularen Wasserstoff heterolytisch zu spalten und umgekehrt auch Protonen zu Wasserstoff zu reduzieren [2]:



Nach ihrem Gehalt an Übergangsmetallen teilt man Hydrogenasen in verschiedene Gruppen ein. Dabei enthalten [FeFe]-Hydrogenasen zwei Eisenatome im katalytischen Zentrum [3], [Fe]-Hydrogenasen weisen einen Fe-Guanylylpyridinol-Kofaktor auf [4] und [NiFe]-Hydrogenasen haben ein heterobimetallisch aufgebautes, aktives Zentrum [5–7]. Die vorliegende Arbeit widmet sich der letztgenannten Spezies.

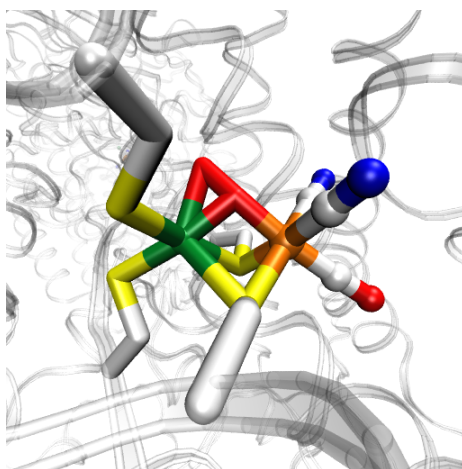
Die erste Kristallstruktur einer [NiFe]-Hydrogenase wurde 1995 veröffentlicht. Mit einer Auflösung von 2.85 Å konnte das aus dem sulfatreduzierenden Bakterium *Desulfovibrio gigas* (*D. gigas*) gewonnene Enzym analysiert werden [6]. Diese und die seitdem gelösten Kristallstrukturen anderer [NiFe]-Hydrogenasen, beispielsweise *D. vulgaris* Miyazaki F [8] und *D. fructosovorans* [9], verdeutlichen ihren Aufbau als heterodimeren Enzyme, die sich aus einer großen und einer kleinen Untereinheit zusammensetzen.

Die kleine Untereinheit ist mit mindestens einem [4Fe4S]-Cluster besetzt. [FeS]-Zentren können vielseitigen Funktionen dienen, wie der Substratbindung, Speicherung von Eisen und Schwefel oder dem Elektronentransfer [10, 11]. Typische Cluster setzen sich aus Eisenatomen und anorganischen Schwefeln zusammen, koordiniert sind sie meist durch umgebende Cysteine. Die Schwefelatome liegen stets in der Form  $S^{2-}$  vor, Eisen hingegen kann seinen Redoxzustand zwischen  $Fe^{2+}$  und  $Fe^{3+}$  ändern, so dass es zu unterschiedlichen Gesamtspins der Cluster kommen kann, je nach Kopplung der einzelnen Elektronenspins untereinander. Der teils hochsymmetrische Aufbau, wie er zum Beispiel bei einem kubanen [4Fe4S]-Cluster vorkommt, sowie die Modifikation eines Clusters durch koordinierende Aminosäuren (u.a. Histidin, Serin, Anbindung ans Peptidrückgrat), kann eine Delokalisation von Elektronen und das Einstellen bestimmter Redoxpotentiale zulassen. Dies wiederum ermöglicht einen kontrollierten Elektronentransfer oder eine Kopplung dessen an den Protonentransfer.

In der großen Untereinheit findet sich das katalytisch aktive [NiFe]-Zentrum, Abbildung 2.1 stellt die Beschaffenheit dar: Neben den beiden Metallen sind vier konservierte Cysteine als Thiolatdonoren enthalten, zwei von ihnen verbrücken Nickel und Eisen, die anderen beiden sind nur an Nickel gebunden. Eisen ist zudem von zwei Cyanidanionen und einem Carbonylliganden koordiniert, wie in erster Linie durch Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie (FTIR) festgestellt werden konnte [12–15]. Durch diese starken, anorganischen Liganden wird es in einem Low-Spin-Zustand  $Fe^{2+}$  ( $S=0$ ) gehalten. Dies konnte durch ENDOR-Spektroskopie an  $^{57}Fe$ -ausgetauschten Proben [16] und mit temperaturabhängigen EPR-Messungen [17] bestätigt werden, die zeigten, dass Eisen nur einen sehr geringen Teil der Spindichte trägt und zu Nickel eine vergleichsweise schwache Austauschkopplung besteht.

Nickel verändert im Gegensatz zu Eisen während der Katalyse seinen Redoxzustand zwischen  $Ni^{1+}$  ( $3d^7$ ,  $S=1/2$ ),  $Ni^{2+}$  ( $3d^8$ ,  $S=0, 1$ ) und  $Ni^{3+}$  ( $3d^9$ ,  $S=1/2$ ). Dabei





**Abbildung 2.1:** Aufbau des [NiFe]-Clusters der Standardhydrogenase *D. gigas* nach der pdb-Kristallstruktur 1YQ9 [18]. Hierbei handelt es sich um die oxidierte Spezies Ni<sub>u</sub>-A, wie an der mutmaßlichen, doppelten Sauerstoffspezies (rot) zu erkennen ist. Nickel (grün) ist von vier teils verbrückenden Cysteinen (gelb) koordiniert, die anorganischen Liganden am Eisen (orange) sind als Bälle dargestellt: CN in weiß-blau und CO in weiß-rot.

variiert das aktive Zentrum zwischen diversen katalytisch aktiven und inaktiven Zuständen. Ihre Bezeichnungen sind historisch gewachsen, Shafaat *et al.* [19] geben einen Überblick für verschiedene [NiFe]-Hydrogenasen. Die paramagnetischen Zustände sind Ni<sub>u</sub>-A, Ni<sub>r</sub>-B, Ni<sub>a</sub>-C und Ni-L, sie werden im Folgenden erklärt. Des weiteren gibt es sogenannte „silent“-Zustände, die kein EPR-Signal zeigen, da sie diamagnetisch sind. Viele tragen die Bezeichnung Ni-S\*, Folgebuchstaben geben Auskunft darüber, ob es sich zum Beispiel um inaktive oder reduzierte Zustände handelt. Teilweise wird das S aber auch weggelassen, so dass Ni-SR-Zustände aus der NAD<sup>+</sup>-reduzierenden Hydrogenase den Ni-R-Zuständen aus membrangebundenen oder Standardhydrogenasen entsprechen.

Der [NiFe]-Cluster verfügt über eine unbesetzte Koordinationsstelle, an der ein zusätzlicher Ligand verbrückend oder endständig gebunden werden kann. Im oxidierten, inaktiven Zustand handelt es sich um Sauerstoffspezies. Ni<sub>r</sub>-B weist einen Hydroxidliganden auf [18, 20, 21], es lässt sich in Anwesenheit von Wasserstoff sehr schnell aktivieren (r für „ready“). Für Ni<sub>u</sub>-A wird eine Peroxidgruppe vermutet [18, 22], in diesem Fall sind Stunden für die (Re-)Aktivierung notwendig (u für „unready“). Einelektro-

nenreduktion resultiert in einem oder mehreren diamagnetischen Ni–S-Zuständen, die wie Ni<sub>u</sub>–A und Ni<sub>r</sub>–B mehr oder weniger sauerstoffreiche Brückenliganden enthalten [15, 23].

Weitere Reduktion führt zu Ni<sub>a</sub>–C, dem mutmaßlich katalytisch aktiven Zustand (a für „active“), dessen Brückenposition mit einem Hydrid besetzt ist [24–30]. In dieser reduzierten Form ist ein Austausch zwischen Protonen und Deuteronen der Form  $H_2 + D_2O \rightleftharpoons HD + HDO$  möglich. Daraus lässt sich schließen, dass das aktive Zentrum zum einen für externe Protonen zugänglich ist und zum anderen die Wasserstoffspaltung heterolytisch über Proton und Hydrid erfolgt, welches dann an das Enzym bindet [31–33]. Nach vollständiger Reduktion sind weitere Ni–S-Zustände zu finden, teils werden sie auch mit Ni–R bezeichnet und zählen als katalytisch aktiv [34, 35]. Eine Hydrid- oder Dihydridspezies wird hier als Ligand angenommen [36]. Ausgehend von Ni<sub>a</sub>–C lässt sich außerdem bei kryogenen Temperaturen durch Beleuchtung ein nicht-physiologischer Zustand erzeugen, Ni–L (L für „light“). Die Brückenposition ist hier unbesetzt [25, 26], die Reaktion ist reversibel. Gegenwärtig wird untersucht, ob Ni–L oder ein Ni–L-ähnlicher Zustand katalytisch relevant sein könnte [19, 37, 38].

Eine Anzahl von [NiFe]-Hydrogenasen wird zu den sogenannten Standardhydrogenasen gezählt. Dies rührt daher, dass sie gemeinsame Motive in der Aminosäuresequenz teilen. So ist die kleine Untereinheit bezüglich des aktiven Zentrums mit einem proximalen [4Fe4S]-Cluster besetzt, der von vier Cysteinen koordiniert wird, mit einem medialen [3Fe4S]-Cluster und einem distalen [4Fe4S]-Cluster, der von drei Cysteinen und einem Histidin umgeben ist [39]. Bei diesen Standardhydrogenasen wird für Ni<sub>u</sub>–A, Ni<sub>r</sub>–B sowie Ni<sub>a</sub>–C von Ni<sup>3+</sup> ausgegangen, da diese Zustände paramagnetisch, also EPR-aktiv sind [40]. Ni–L verhält sich mit Ni<sup>1+</sup> auf dieselbe Weise, während sämtliche Ni–S- und Ni–R-Spezies EPR-inaktiv sind, weshalb man hier Ni<sup>2+</sup> annimmt. Die verschiedenen Nickelzustände werden meist mittels Infrarotspektroskopie über die charakteristischen Schwingungsmoden des CO-Liganden bestimmt [34].

## 2.2 Sauerstofftolerante Hydrogenasen

Standardhydrogenasen reagieren typischerweise empfindlich auf bereits geringe Mengen an Sauerstoff [18, 39, 41, 42], was mit ihrem Vorkommen in anaerob lebenden

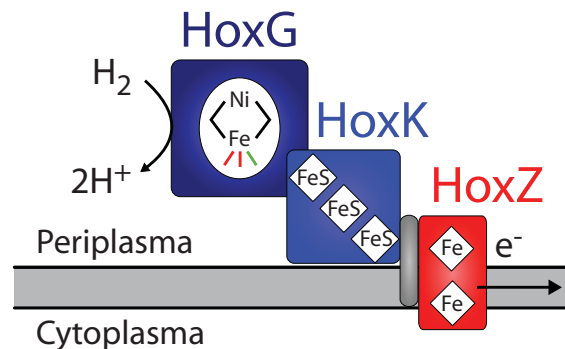
Bakterien wie denen der Gattungen *Desulfovibrio*, *Thiocapsa* oder *Allochromatium* einher geht. Ihre Inaktivierung wird durch die Bindung von Sauerstoffspezies an das katalytisch aktive Zentrum hervorgerufen.

Hingegen weisen einige Enzyme erstaunlich hohe Resistenzen gegen Sauerstoff auf, bleiben auch unter Sauerstoffkonzentrationen im Bereich normaler Luft katalytisch aktiv oder können sehr schnell reaktiviert werden [43]. Oft findet man sie in Knallgasbakterien wie *Ralstonia eutropha* oder *Hydrogenovibrio marinus*, teils auch in der (mikro-)aerophilen Variante, wie zum Beispiel *Aquifex aeolicus*. Hydrogenasen dieser Art weisen in der Regel kein Ni<sub>u</sub>-A auf, Ni<sub>r</sub>-B ist hier meistens der höchst oxidierte Zustand [44–46].

Das  $\beta$ -Proteobakterium *Ralstonia eutropha* H16 (*R. eutropha*, *Re*, auch *Cupriavidus necator*) ist fähig, an der Grenze zwischen aerober und anaerober Umgebung zu wachsen und kann sich sowohl heterotroph als auch autotroph ernähren. Im autotrophen Fall wird Wasserstoff als Energiequelle verwendet und von zwei Hydrogenasen im Bakterium verarbeitet. Dabei handelt es sich um eine membrangebundene und eine lösliche, beziehungsweise NAD<sup>+</sup>-reduzierende, Hydrogenase, *membrane-bound hydrogenase* (MBH) und *soluble hydrogenase* (SH). Eine dritte, die regulatorische Hydrogenase (RH), fungiert als Wasserstoffsensormolekül und ist an der Expression der anderen beiden beteiligt [47, 48].

Gründe für die Sauerstofftoleranz dieser Hydrogenasen sind Gegenstand derzeitiger Forschung. Diese Toleranz setzt voraus, dass entweder Sauerstoffmoleküle nicht zum aktiven Zentrum gelangen können, sie also mechanisch gehindert werden, oder dass der vordringende Sauerstoff schnellstmöglich reduziert wird. Beispielsweise kann er zu Wasser umgewandelt werden, dafür würden vier Elektronen sowie vier Protonen benötigt [49].

Die RH hat bezüglich der H<sub>2</sub>-Oxidation eine sehr geringe Aktivität, wird nicht durch Sauerstoff oder CO gehemmt und zeigt weder Ni<sub>u</sub>-A noch Ni<sub>r</sub>-B [47, 50]. Für sie wurde ein verengter Gaskanal postuliert, durch den zwar Wasserstoff, nicht aber größere Moleküle wie Sauerstoff zum aktiven Zentrum gelangen können [51]. Dies ist auch bei der regulatorischen Hydrogenase von *Rhodobacter capsulatus* der Fall [52].



**Abbildung 2.2:** Schema der MBH aus *R. eutropha*. HoxG bildet die große Untereinheit mit dem aktiven Zentrum, HoxK die kleine mit der Kette aus [FeS]-Clustern. HoxZ bindet an die Membran.

### 2.2.1 Hydrogenasen in *Ralstonia eutropha*: MBH

Für die MBH konnte mittels Protein-Film-Voltammetrie gezeigt werden, dass dieses Protein im Vergleich zu Standardhydrogenasen auch bei hohen Konzentrationen von Sauerstoff und Kohlenmonoxid seine katalytische Aktivität fortsetzt [53, 54].

Die MBH ist über die C-terminale Verlängerung von HoxK mit einem Cytochrom *b* (HoxZ) auf der periplasmatischen Seite an der cytoplasmatischen Membran fixiert, wie in Abbildung 2.2 zu erkennen ist. Elektronen aus der Wasserstoffspaltung werden hier direkt in die Atmungskette weitergeleitet.

Die große Untereinheit HoxG inklusive des aktiven Zentrums ist analog zu Standardhydrogenasen aufgebaut. Der [NiFe]-Cluster verfügt über die gleiche Ausstattung an Liganden, zwei  $\text{CN}^-$ - und eine CO-Gruppe, die Umgebung aus Cysteinen und Histidin stimmt überein [55]. Mutationen spezifischer Aminosäuren in der Nähe des Clusters zur Standardform schlossen aus, dass sterische Hinderung großer Moleküle als Ursache der Toleranz in Frage kommt [40].

Mittels FTIR-Messungen wurden zahlreiche Nickelredoxzustände gefunden, einerseits die paramagnetischen Zustände  $\text{Ni}_r\text{-B}$ ,  $\text{Ni}_a\text{-C}$  und  $\text{Ni-L}$ , zum anderen diverse aktive Ni-S-Spezies, die nicht mit EPR detektierbar sind. Hinzu kommen je eine „unready“ und eine „ready“ Ni-S-Spezies, bei ersterer handelt es sich mangels  $\text{Ni}_u\text{-A}$  um den höchstoxidierten Zustand [46].

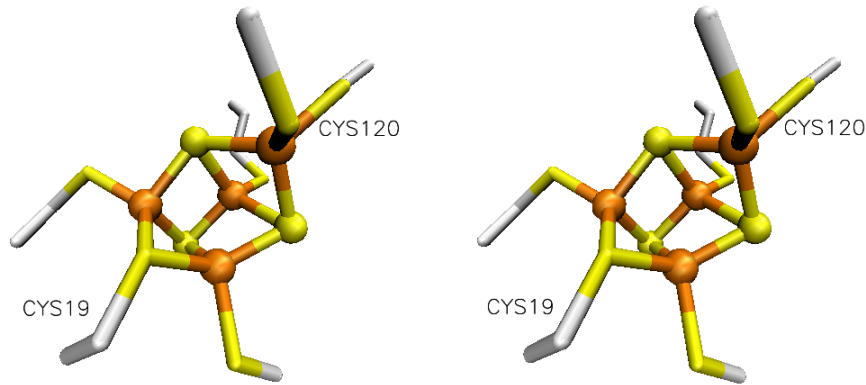
Die kleine Untereinheit HoxK ist ähnlich wie bei Standardhydrogenasen mit einer Kette aus drei [FeS]-Clustern besetzt, die vom aktiven Zentrum zur Membran und damit zur Atmungskette führen. Sie haben Abstände von etwa 10 Å und bilden so einen möglichen Elektronentransferpfad. Der distale [4Fe4S]-Cluster ist wie im Standardfall kubisch und im oxidierten Zustand diamagnetisch, also nicht mit EPR detektierbar. Der mediale [3Fe4S]-Cluster ist paramagnetisch.

### Proximaler Cluster

Für den proximalen Cluster wurde lange eine Standard-[4Fe4S]-Konfiguration angenommen, da jedoch auch er im oxidierten Zustand mittels EPR messbar ist, muss es sich um eine modifizierte Variante handeln. EPR-Messungen zeigten ein vierfach aufgespaltenes Ni<sub>r</sub>-B-Signal und Simulation der Daten unter Beachtung von Austauschkopplungen legte nahe, dass es sich eventuell um einen HIPIP-Cluster oder ein weiteres [3Fe4S]-Zentrum handelt [55].

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich neben den vier typischen Cysteinen zwei weitere finden, Cys19<sup>S</sup> und Cys120<sup>S</sup>, die aus der ursprünglichen [4Fe4S]-Form eine [4Fe3S]-Konformation machen. Mutation dieser beiden Cysteine zu Glycinen (C19G/-C120G) ließ darauf schließen, dass der sechsfach koordinierte Cluster stark an der Sauerstofftoleranz beteiligt ist [56]. Die erste Kristallstruktur der MBH im reduzierten Zustand von Fritsch *et al.* [57] (pdb-Struktur 3RGW) verdeutlicht den Austausch eines anorganischen Schwefels durch den Thiolatschwefel von Cys19<sup>S</sup>, der Cluster wird dadurch aufgeweitet (siehe Abbildung 2.3). Die vor kurzem von Frielingsdorf *et al.* [58] gelöste Kristallstruktur des voll oxidierten Zustandes (4IUB) lässt zusätzliche Strukturänderungen des proximalen Clusters vermuten. Im Zuge dessen scheint der Cluster zwei Redoxübergänge durchlaufen zu können, die in einem sehr kleinen Fenster von -60 mV bis +160 mV stattfinden [56, 59], wohingegen Redoxübergänge von 3+ nach 2+ und von 2+ nach 1+ im Fall eines [4Fe4S]-Clusters etwa 1000 mV umfassen. Allein durch diese beiden physiologisch gut erreichbaren Übergänge stünden für eine Reduktion eindringenden Sauerstoffs zwei der vier notwendigen Elektronen zur Verfügung.

Zusätzliche Cysteine finden sich auch in Hydrogenase I (Hase I) aus *A. aeolicus* [60],



**Abbildung 2.3:** Stereodarstellung des ungewöhnlichen proximalen [4Fe3S]-Clusters in der reduzierten MBH. Cys19<sup>S</sup> und Cys120<sup>S</sup> tauchen in der MBH zusätzlich auf. pdb-Struktur 3RGW [57].

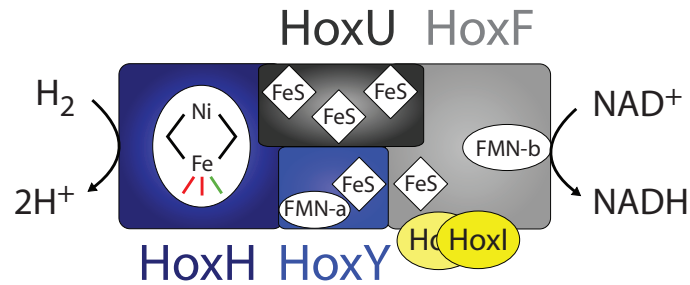
---

Hydrogenase-1 (Hyd-1) aus *E. coli* [61] oder der Hydrogenase aus *R. metallidurans* [45]. Zur MBH aus *Hydrogenovibrio marinus* existiert eine Kristallstruktur (pdb-Struktur: 3AYX), auch hier zeigt sich eine Öffnung des proximalen Clusters [62]. Bei allen handelt es sich um sauerstofftolerante, membrangebundene [NiFe]-Hydrogenasen, die zudem eng miteinander verwandt sind. Es ist also möglich, dass es sich hier um ein konserviertes Motiv zur Vermeidung einer Deaktivierung durch Sauerstoff handelt. Saggi *et al.* [46] führen im Anhang ihrer Veröffentlichung weitere Beispiele an.

### 2.2.2 Hydrogenasen in *Ralstonia eutropha*: SH

Als bidirektionale Hydrogenase im Cytoplasma gelegen ist die SH in der Lage, H<sub>2</sub>-Oxidation mit NAD<sup>+</sup>-Reduktion zu koppeln und somit die Zelle mit dem Reduktionsäquivalent NADH (reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotids) zu versorgen [63, 64]. Diese Reaktion kann auch unter Einfluss atmosphärischen Sauerstoffes aufrecht erhalten werden [65].

Die SH teilt strukturelle Gemeinsamkeiten mit Standardhydrogenasen und der MBH und besteht hauptsächlich aus einem NAD<sup>+</sup>-Reduktaseheterodimer HoxFU, welches



**Abbildung 2.4:** Schema der SH aus *R. eutropha*. HoxU und HoxF werden zum NAD<sup>+</sup>-Reduktasedimer zusammengefasst, HoxH und HoxY zum Hydrogenasedimer, das HoxI-Homodimer fungiert möglicherweise als Bindungspunkt für NADPH [66]. Die Zahl der [FeS]-Cluster ist bisher nicht genau bestimmt.

[FeS]-Cluster, unter anderem einen [2Fe2S]-Cluster, und FMN (Flavinmononukleotid) enthält, sowie aus einer großen, dimeren Hydrogenaseuntereinheit HoxHY, welche mit dem katalytisch aktiven [NiFe]-Zentrum sowie weiteren [FeS]-Clustern bestückt ist (siehe Abbildung 2.4). Nachdem zeitweise vermutet wurde, es würde zwei zusätzliche Cyanidliganden um das aktive Zentrum geben, die womöglich auch für die Sauerstofftoleranz der SH verantwortlich sein könnten, indem sie Nickel in einem festen Redoxzustand halten [67–69], zeigten FTIR-Messungen die Standardzusammenstellung von Liganden mit zwei CN<sup>-</sup> und einem CO und widerlegten die Hypothese [70, 71]. Zusätzlich ist das aktive Zentrum durch vier Cysteine mit dem Proteinintergrund verbunden, zwei dieser Cysteine bilden Brücken zwischen Nickel und Eisen [72].

Bisher gibt es nur wenige EPR-Untersuchungen mit Augenmerk auf der SH. Das paramagnetische Auftreten von Ni<sub>a</sub>-C und Ni-L unter leicht reduzierenden Bedingungen mit NADH konnte von Erkens *et al.* [73] gezeigt werden, auch ein [2Fe2S]-Cluster sowie FMN sind sichtbar. Dabei wurde ein relativ schmales Redoxfenster von -290 mV bis -325 mV gefunden, welches diese Nickelzustände aufweist. Dies entspricht den nativen Bedingungen in der Zelle. Im Gegensatz dazu finden sich Ni<sub>a</sub>-C und Ni-L bei sauerstoffempfindlichen Hydrogenasen wie *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F in dem deutlich größeren Bereich von etwa -300 bis -500 mV [74].

Van der Linden *et al.* [75] bestätigten das Vorhandensein von Ni<sub>a</sub>-C-Signalen, verschiedene Präparationen wiesen unterschiedlich große Anteile des Zustandes auf. Im

Folgenden wurden von Horch *et al.* [70] EPR- und FTIR-Untersuchungen an ganzen Zellen durchgeführt, die *in-situ*-EPR-Messungen bekräftigten das Vorliegen sowohl von Ni<sub>a</sub>-C als auch Ni-L im nativen Zustand der SH. FTIR-Messungen konnten zudem diverse diamagnetische Zustände aufspüren, unter anderem verschiedene Ni<sub>a</sub>-SR-Zustände und einen Ni<sub>r</sub>-B-ähnlichen Zustand.

Wie sich der Austausch von Tryptophan- und Cysteinresten in nächster Nähe des [4Fe4S]-Clusters im Hydrogenasemodul auswirkt, wurde von Karsten *et al.* [76] untersucht. Das Resultat war eine Verringerung der katalytischen Aktivität, die mit einer Verminderung der Signalintensität von Ni<sub>a</sub>-C verbunden ist. Des weiteren wurden Spuren von EPR-Signalen detektiert, die sich einer Ni<sub>r</sub>-B-Spezies zuordnen ließen. Unklar ist, ob es sich hierbei um eine diamagnetische Ni<sup>2+</sup>-Spezies handelt, oder ob Spinkopplung von Ni<sup>3+</sup> an ein weiteres paramagnetisches Zentrum hohen Potentials für das fehlende EPR-Signal sorgt.

Der katalytische Zyklus der SH verhält sich höchstwahrscheinlich analog zu dem anderer Hydrogenasen, darunter auch sauerstoffsensiblen. Es werden dieselben Redoxzustände des aktiven Zentrums durchlaufen, bei der SH sind dies namentlich Ni<sub>a</sub>-S, der reduzierte Zustand Ni<sub>a</sub>-C sowie einer oder mehrere der ebenfalls reduzierten Ni<sub>a</sub>-SR-Zustände [77]. Dabei wird angenommen, dass im Ni<sub>a</sub>-S-Zustand in die freie Verbrückungsstelle zwischen Nickel und Eisen Wasserstoff eingebaut wird, wodurch Ni<sub>a</sub>-SR entsteht. Für diesen Zustand wurde kürzlich gezeigt, dass ein verbrückendes Hydrid vorliegt, ebenso wie ein protoniertes terminales Cystein [78]. Abspaltung eines Protons und eines Elektrons führt zur Bildung von Ni<sub>a</sub>-C, Wiederholung dieses Vorgangs ergibt Ni<sub>a</sub>-S, was den katalytischen Zyklus vervollständigt.

Ebenso wie die regulatorische Hydrogenase und die [NiFeSe]-Hydrogenase aus *Desulfomicrobium baculatus* [79] zeigt die SH im oxidierten Zustand kein EPR-Signal. Die Abwesenheit dieser Zustände geht mit Sauerstoffunempfindlichkeit einher und der zu Grunde liegende Mechanismus ist bisher nicht geklärt. Einerseits könnte begrenzte Zugänglichkeit für größere Moleküle einen sauerstoffhaltigen Brückenliganden verhindern. Andererseits zeigte eine Studie, dass die Sauerstoffunempfindlichkeit mit der Fähigkeit der SH zusammenhängt, fortwährend Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid und Wasser zu reduzieren [72]. Möglicherweise steht eine reversible Oxygenierung von Cysteinen nahe dem aktiven Zentrum damit in Verbindung [77].



---

# THEORETISCHE UND EXPERIMENTELLE METHODEN

---

Dieses Kapitel gibt eine grundlegende Einführung in die Theorie der Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR, *engl.* Electron Paramagnetic Resonance, EPR) und die Basisprinzipien der verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten EPR-Methoden. Ausführliche Darstellungen des theoretischen Hintergrundes und experimenteller Methoden finden sich unter anderem bei Atherton [80], Weil, Bolton und Wertz [81], Poole [82], Hoff [83] oder Schweiger und Jeschke [84]. Weitere Literaturverweise werden an den entsprechenden Stellen angeführt. Darüber hinaus wird überblicksartig auf verwendete Geräte und die Probenpräparation eingegangen.

## 3.1 Theorie zur Elektronenspinresonanz

Bei der EPR-Spektroskopie handelt es sich um eine Methode, welche selektiv paramagnetische Substanzen detektieren und charakterisieren kann. Die Wechselwirkungen von Radikalen oder auch Übergangsmetallen mit einem äußeren Magnetfeld und der lokalen Umgebung werden dadurch untersucht, dass eingestrahlte Mikrowellen unterschiedlich stark absorbiert werden. Metalloproteine enthalten zumeist aus funktionellen Gründen Übergangsmetalle, so dass in diesen Enzymen natürlicherweise Sonden für die EPR vorliegen. Durch sie können Erkenntnisse über die elektronische

Struktur gewonnen werden: Über magnetische Parameter wie  $g$ -Werte, Hyperfein- oder Quadrupolwerte können Informationen über Bindungen, Strukturveränderungen und Funktionsmechanismen gewonnen werden. In den hier betrachteten [NiFe]-Hydrogenasen liegen mehrere spintragende Cluster vor, die je nach Redoxzustand paramagnetisch sind, zum einen das aktive [NiFe]-Zentrum selbst, zum anderen ein oder mehrere [FeS]-Cluster.

### 3.1.1 Freies Elektron

Das Elektron besitzt einen quantenmechanischen Eigendrehimpuls, den Spin  $\mathbf{S}$ , der über das Bohrsche Magneton  $\mu_B$  und den  $g$ -Faktor des freien Elektrons  $g_e$  mit einem magnetischen Moment verknüpft ist:

$$\boldsymbol{\mu}_e = -g_e\mu_B \mathbf{S} \quad (3.1)$$

Ohne äußeres Magnetfeld sind die beiden möglichen Spinorientierungen mit den Werten für die magnetische Spinquantenzahl  $m_s = \pm 1/2$  energetisch entartet. Durch Anlegen eines Magnetfeldes, dieses wählt man typischerweise in  $z$ -Richtung, wird die Entartung aufgehoben:  $\mathbf{B} = (0, 0, B_0)$ . Das magnetische Moment weist im Magnetfeld die Energie

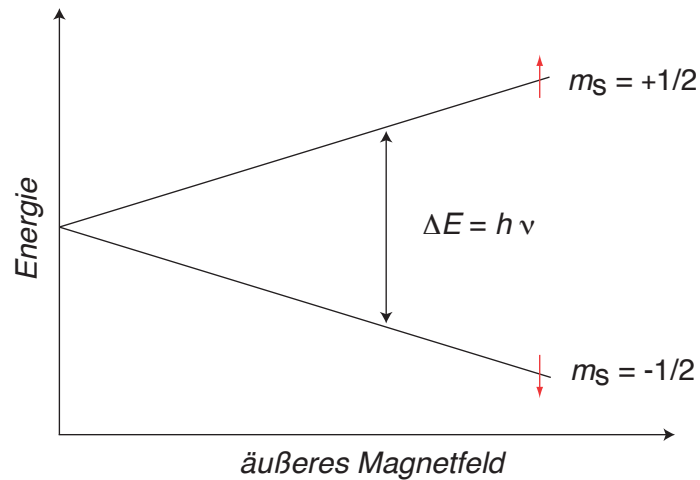
$$E = -\boldsymbol{\mu}_e^T \mathbf{B} \quad (3.2)$$

auf, woraus sich durch Gleichung 3.1 und Anwendung des Spinoperators  $S_z$  auf den Spinzustand der Ausdruck

$$E_{m_s} = m_s g_e \mu_B B_0 \quad (3.3)$$

ergibt.  $m_s = +1/2$  entspricht der Einstellung des Spins parallel zum äußeren Magnetfeld,  $m_s = -1/2$  hingegen antiparallel, verbunden mit den Energien  $E_{m_s}$ . Man spricht dabei von Zeeman-Aufspaltung. Der Energieunterschied  $\Delta E$  skaliert linear mit der Stärke des Feldes (Abbildung 3.1):

$$\Delta E = g_e \mu_B B_0 \quad (3.4)$$



**Abbildung 3.1:** Abhängigkeit der Zeeman-Aufspaltung vom äußeren Magnetfeld.

Betrachtet man ein Ensemble aus  $N$  Spins, zeigt sich, dass die Niveaus im thermischen Gleichgewicht der Temperatur  $T$  nicht gleich besetzt sind. Deren relative Besetzung folgt der Boltzmann-Verteilung:

$$\frac{N_{+1/2}}{N_{-1/2}} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad (3.5)$$

$N_{+1/2}$  ist die Anzahl der Elektronen im oberen,  $N_{-1/2}$  die im unteren Niveau,  $k_B$  ist die Boltzmann-Konstante. Damit ist das energetisch niedrigere Niveau stärker bevölkert.

Ein elektromagnetisches Wechselfeld passender Frequenz  $\nu$  und Polarisation kann einen Übergang zwischen den Energieniveaus induzieren und zwar genau dann, wenn die Resonanzbedingung 3.4 erfüllt ist:

$$h\nu = g_e \mu_B B_0 \quad (3.6)$$

Hierbei ist  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum.

### 3.1.2 Spin-Hamilton-Operator

Die unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen betrachtetem Spin und seiner Umgebung werden durch einen Spin-Hamilton-Operator angegeben, der die Energie des quantenmechanischen Systems beschreibt. Folgende Terme sind für die EPR-Spektroskopie hier zu berücksichtigen:

$$\mathcal{H}_{\text{Spin}} = \mathcal{H}_{\text{EZ}} + \mathcal{H}_{\text{NZ}} + \mathcal{H}_{\text{HFI}} + \mathcal{H}_{\text{NQI}} + \mathcal{H}_{\text{Ex}} + \mathcal{H}_{\text{ZFI}} \quad (3.7)$$

Dabei handelt es sich um:

- $\mathcal{H}_{\text{EZ}}$  Elektron-Zeeman-Wechselwirkung
- $\mathcal{H}_{\text{NZ}}$  Kern-Zeeman-Wechselwirkung
- $\mathcal{H}_{\text{HFI}}$  Hyperfeinwechselwirkung
- $\mathcal{H}_{\text{NQI}}$  Kernquadrupolwechselwirkung
- $\mathcal{H}_{\text{Ex}}$  Austauschwechselwirkung
- $\mathcal{H}_{\text{ZFI}}$  Nullfeldaufspaltung

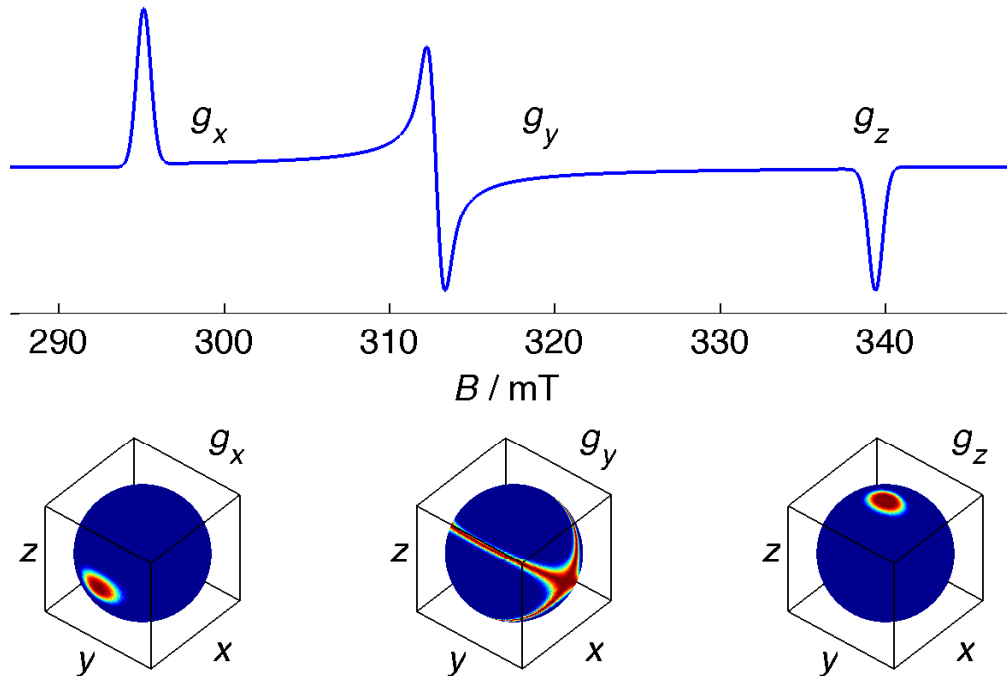
Diese Wechselwirkungen werden im Folgenden genauer erläutert.

#### Elektron-Zeeman-Wechselwirkung

Der Hamilton-Operator des freien Elektrons besteht einzig aus der Wechselwirkung des Spins mit dem äußeren Magnetfeld, der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung. Durch Einbindung des Elektrons in ein Molekül ist die Spin-Bahn-Kopplung zwischen Spin  $\mathbf{S}$  und Bahndrehimpuls  $\mathbf{L}$  nicht mehr zu vernachlässigen, so dass sich eine Richtungsabhängigkeit der Wechselwirkung ergibt. Zusätzliche, spezifische Magnetfelder können zum Beispiel durch ein Ligandenfeld erzeugt werden. Dies spiegelt sich in der Erweiterung des  $g$ -Wertes zur Wechselwirkungsmatrix  $\mathbf{g}$  wider, die stark von  $g_e$  des freien Elektrons abweichen kann. Der Elektron-Zeeman-Term wird demnach zu

$$\mathcal{H}_{\text{EZ}} = \mu_B \mathbf{B}^T \mathbf{g} \mathbf{S} \quad (3.8)$$

Durch Hauptachsentransformation ist die  $\mathbf{g}$ -Matrix diagonalisierbar, sie hat die drei Eigenwerte  $g_x$ ,  $g_y$  und  $g_z$ . Die Symmetrie des Spinsystems bestimmt ihr Verhältnis



**Abbildung 3.2:** Unten: Orientierungsselektion der  $g$ -Matrix mit voller Rhombizität. Oben: Im abgeleiteten EPR-Spektrum einer gefrorenen Lösungsprobe sind die drei Hauptwerte  $g_x$ ,  $g_y$  und  $g_z$  feldabhängig messbar.

zueinander. Bei einem kugelsymmetrischen System mit isotropem  $g$ -Faktor sind alle drei Werte identisch, das heißt, unabhängig von ihrer Orientierung zum  $B$ -Feld. Axiale Symmetrie bedeutet eine Verzerrung in eine Richtung und damit die Unterscheidung in zwei Hauptwerte,  $g_{\parallel}$  und  $g_{\perp}$ . Hier gibt es den oblaten Fall  $g_{\parallel} = g_z < g_{\perp} = g_y = g_x$  und umgekehrt den prolaten Fall  $g_{\parallel} = g_z > g_{\perp} = g_y = g_x$ . Bei einer rhombischen Matrix liegen drei verschiedene  $g$ -Werte vor, wie in Abbildung 3.2 dargestellt.

In Eisen-Schwefel-Clustern finden sich die ungepaarten Elektronen im  $d$ -Orbital der Metallionen, meist resultiert dies in axialen oder rhombischen  $g$ -Matrizen.

### Kern-Zeeman-Wechselwirkung

Genau wie dem Elektron kann dem Atomkern ein magnetisches Moment zugeordnet werden, welches über das Kernmagneton  $\mu_N$  und den Kern- $g$ -Faktor  $g_N$  mit dem

Kernspin  $\mathbf{I}$  koppelt. Analog zur Elektron-Zeeman-Wechselwirkung gibt somit der Kern-Zeeman-Term die Wechselwirkung des Kerns mit dem äußeren Magnetfeld wieder:

$$\mathcal{H}_{\text{NZ}} = -g_{\text{N}}\mu_{\text{N}}\mathbf{B}^{\text{T}}\mathbf{I} \quad (3.9)$$

Dieses magnetische Moment ist im Vergleich zu dem des Elektrons weit kleiner. Für ein Proton beträgt der Unterschied  $g_{\text{e}}\mu_{\text{B}}/g_{\text{N}}\mu_{\text{N}} = 658$ . Gleich dem  $g_{\text{e}}$ -Wert des freien Elektrons ist der  $g_{\text{N}}$ -Faktor des Kerns eine für ihn charakteristische Größe. In der EPR wird er aufgrund seines geringen Einflusses größtenteils als isotrope Konstante betrachtet. Eine Liste der für diese Arbeit relevanten Kernisotope ist in Tabelle 3.1 in Abschnitt 3.3.7 angegeben.

### Hyperfeinwechselwirkung

Befinden sich Kerne in der Umgebung des Elektrons, deren Kernspin  $\mathbf{I} \neq 0$  ist, kommt es zu einer Wechselwirkung des entsprechenden Kernmoments  $\boldsymbol{\mu}_{\text{N}}$  mit dem des ungepaarten Elektrons  $\boldsymbol{\mu}_{\text{e}}$ , ausgedrückt durch den Hyperfein-Hamilton-Operator:

$$\mathcal{H}_{\text{HFI}} = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar^2}g_{\text{e}}\mu_{\text{B}}g_{\text{N}}\mu_{\text{N}}\left[\frac{8\pi}{3}\mathbf{S}^{\text{T}}\delta(\mathbf{r}) + \frac{3(\mathbf{S}^{\text{T}}\mathbf{r})\mathbf{r}^{\text{T}}}{r^5} - \frac{\mathbf{S}^{\text{T}}}{r^3}\right]\mathbf{I} \quad (3.10)$$

Die beiden letzten Terme dieser dipolaren Kopplung lassen sich zusammenfassen, so dass sich folgende Form ergibt:

$$\mathcal{H}_{\text{HFI}} = \mathbf{S}^{\text{T}}\mathbf{A}\mathbf{I} = a_{\text{iso}}\mathbf{S}^{\text{T}}\mathbf{I} + \mathbf{S}^{\text{T}}\mathbf{T}\mathbf{I} \quad (3.11)$$

$\mathbf{A}$  ist hierbei die Hyperfeinmatrix, die sowohl den anisotropen Anteil der Dipol-Dipol-Wechselwirkung von Elektron und Kern als auch ihren singulären Anteil, die isotrope Fermi-Kontakt-Wechselwirkung, umfasst. Die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante  $a_{\text{iso}}$  ergibt sich aus der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons am Kernort, also seiner Spindichte  $|\psi_{\text{e}}(0)|^2$ , wie folgt:

$$a_{\text{iso}} = \frac{2\mu_0}{3\hbar}g_{\text{e}}\mu_{\text{B}}g_{\text{N}}\mu_{\text{N}}|\psi_{\text{e}}(0)|^2 \quad (3.12)$$

Im Wasserstoffatom gilt, dass nur kugelsymmetrische  $s$ -Zustände eine nicht verschwindende Spindichte am Kernort haben, andere Orbitalarten weisen dort Knoten auf. Allerdings kann durch Spinpolarisation Spindichte induziert werden [80], so dass der isotrope Beitrag eines  $p$ -,  $d$ - oder  $f$ -Orbitals durchaus von Bedeutung sein kann.

Der zweite Teil der Hyperfeinwechselwirkung gibt den rein anisotropen Teil der Dipol-Dipol-Interaktion von Kern und Elektron wieder [85]:

$$\mathbf{S}^T \mathbf{T} \mathbf{I} = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar} g_e \mu_B g_N \mu_N \left[ \frac{3(\mathbf{S}^T \mathbf{r})(\mathbf{r}^T \mathbf{I})}{r^5} - \frac{\mathbf{S}^T \mathbf{I}}{r^3} \right] \quad (3.13)$$

Die Matrix  $\mathbf{T}$  ist spurlos und kann allein aus den Grundzustandswellenfunktionen berechnet werden:

$$T_{ij} = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar} g_e \mu_B g_N \mu_N \left\langle \psi_0 \left| \frac{3r_i r_j - \delta_{ij} r^2}{r^5} \right| \psi_0 \right\rangle \quad (3.14)$$

Für Distanzen größer 0.25 nm zwischen Elektronen- und Kernspin lässt sich außerdem die Punkt-Dipol-Näherung anwenden, hierbei wird angenommen, dass alle Spins hinreichend genau lokalisiert sind:

$$\mathbf{T} = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar} g_e \mu_B g_N \mu_N \sum_{k \neq N} \frac{\rho_k (3\mathbf{n}_k^T \mathbf{n}_k - 1)}{r_k^3} \quad (3.15)$$

Die Summe läuft über alle Kerne mit Spinpopulation  $\rho_k$ , die sich im Abstand  $r_k$  befinden,  $\mathbf{n}_k$  ist der Einheitsvektor der Kern-Elektron-Verbindung. Bei axialer Wechselwirkung lässt sich  $\mathbf{T}$  wie folgt ausdrücken, auf diese Weise kann über die dipolare Kopplung der Abstand abgeschätzt werden:

$$\mathbf{T} = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar} \frac{g_e \mu_B g_N \mu_N}{r^3} \begin{pmatrix} -1 & & \\ & -1 & \\ & & 2 \end{pmatrix} \quad (3.16)$$

Die ausgezeichnete Achse dieser axialen Matrix ist die Verbindungsachse zwischen Elektron und Kern. Bei magnetisch gekoppelten Metallclustern ist die Interpretation der Hyperfeinwechselwirkung komplizierter. Koppeln mehrere Spins zu einem

Gesamtspin, muss ihre Ausdehnung gegenüber dem Abstand berücksichtigt werden, die Interaktion ist nicht mehr notwendigerweise axial. Fiege *et al.* [86] verwenden am Beispiel von Mangan eine Erweiterung des Modells. Unter Berücksichtigung der individuellen Beiträge der Atome in einem Cluster und Gewichtung durch ihre Spinprojektionsfaktoren  $k_i$  ergibt sich der Ausdruck:

$$\mathbf{A}_{\text{dip}} = \text{diag} \left( \sum_i k_i \cdot \mathbf{R}_i^T \mathbf{T}_i \mathbf{R}_i \right) \quad (3.17)$$

Die  $A_i$  sind durch die einzelnen  $\mathbf{T}_i$  mit den jeweiligen Abständen  $r_i$  gegeben. Weil die einzelnen dipolaren Matrizen nur noch in ihren eigenen Koordinatensystemen diagonal sind, werden sie in ein gemeinsames Koordinatensystem übertragen, Summierung und anschließende Diagonalisierung führen zu einer gesamten, dipolaren Kopplungsmatrix, die eine rhombische Hyperfeinwechselwirkung wiedergibt:

$$\mathbf{A}_{\text{dip}} = T \begin{pmatrix} -1 + \delta & & \\ & -1 - \delta & \\ & & 2 \end{pmatrix} \quad (3.18)$$

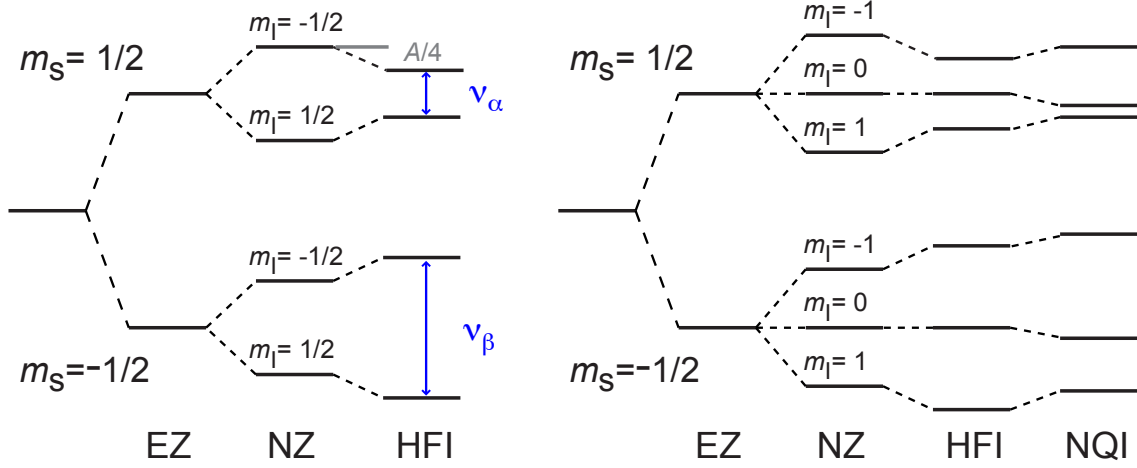
### Kernquadrupolwechselwirkung

Für Systeme, die Kernspins mit  $I > 1/2$  enthalten, spielt eine weitere Wechselwirkung eine Rolle. Die Richtung des magnetischen Moments eines Kerns hängt von seiner Geometrie, also insbesondere von seiner Ladungsverteilung ab. In diesem Fall kann jeder elektrische Feldgradient auf die elliptisch ausgerichteten Ladungen wirken und so die Richtung des Kernspins ändern. Dies geschieht in erster Linie durch die den Kern umgebenden Elektronen, wobei nur die nicht-kugelsymmetrischen Orbitale eine Rolle spielen. Die Kernquadrupolwechselwirkung stellt sich wie folgt dar:

$$\mathcal{H}_{\text{NQI}} = \mathbf{I}^T \mathbf{P} \mathbf{I} \quad (3.19)$$

Die Kernquadrupolkopplungsmatrix  $\mathbf{P}$  gibt sowohl die Ladungsverteilung des Kerns wieder als auch den Feldgradienten am Kernort und seine Asymmetrie. Ihre Spur ist unter orthogonalen beziehungsweise unitären Transformationen invariant, der Hamil-





**Abbildung 3.3:** Energieniveauschema für links:  $S = I = 1/2$  und rechts:  $S = 1/2, I = 1$  inklusive Elektronen- und Kern-Zeeman-Wechselwirkung, Hyperfeinkopplung und für  $I = 1$  Kernquadrupolkopplung.

ton-Operator kann umgeschrieben werden zu:

$$\mathcal{H}_{\text{NQI}} = P_x I_x^2 + P_y I_y^2 + P_z I_z^2 = \frac{e^2 Q q}{4\hbar I(2I - 1)} [(3I_z^2 - I(I + 1)^2) + \eta(I_x^2 - I_y^2)] \quad (3.20)$$

$eq$  ist der elektrische Feldgradient und  $\eta = (P_x - P_y)/P_z$  ist der Asymmetrieparameter und  $Q$  das skalare Quadrupolmoment des Kerns. Es gilt  $|P_z| \geq |P_y| \geq |P_x|$  und  $0 \leq \eta \leq 1$ . Der größte Hauptwert wird angegeben mit  $P_z = e^2 q Q / (2I(2I - 1)\hbar)$ . Analog zur Hyperfeinwechselwirkung lässt sich  $\mathbf{P}$  darstellen als:

$$\mathbf{P} = \frac{e^2 Q q}{4\hbar I(2I - 1)} \begin{pmatrix} -1 + \eta & & \\ & -1 - \eta & \\ & & 2 \end{pmatrix} \quad (3.21)$$

Experimentell können die nukleare Quadrupolkonstante  $e^2 Q q / \hbar = 4K$  und der Asymmetrieparameter  $\eta$  bestimmt werden. Abbildung 3.3 zeigt das Energieniveauschema mit den Aufspaltungen für  $S = 1/2$  und  $I = 1/2$  sowie  $S = 1/2$  und  $I = 1$ .

### Austauschwechselwirkung

Die Austauschwechselwirkung ist ein quantenmechanischer Effekt, der ausschließlich zwischen nicht unterscheidbaren Teilchen auftritt und damit ein Phänomen, zu dem es keine klassische Entsprechung gibt. Haben zwei Elektronen durch Überlapp ihrer Wellenfunktionen eine endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit im selben Orbital, so kommt es zu einer Wechselwirkung:

$$\mathcal{H}_{\text{Ex}} = -2J \mathbf{S}_i^T \mathbf{S}_k \quad (3.22)$$

Diese beschreibt, dass Zustände unterschiedlicher Symmetrie verschiedene Energien haben, es also zu einer Aufhebung der Entartung der Energiezustände kommt. Dadurch wird das Pauli-Prinzip erfüllt, welches verlangt, dass in einem System aus mehreren Fermionen die Gesamtwellenfunktion unter Teilchenaustausch antisymmetrisch ist. Meist ist nur der isotrope Anteil von Bedeutung, zudem nimmt die Interaktion mit zunehmendem Abstand rapide ab. Die Kopplungsart wird maßgeblich durch das Vorzeichen von  $J$  bestimmt: Für  $J > 0$  koppeln die Spins im Grundzustand ferromagnetisch zu einem maximalen Gesamtspin, ist  $J$  hingegen negativ, kommt es zu einer antiferromagnetischen Kopplung, also minimalem Gesamtspin.

In Hydrogenasen spielt die Austauschkopplung unter anderem zwischen nahegelegenen Clustern im Abstand von etwa  $10 \text{ \AA}$  eine Rolle. Hierbei handelt es sich um eine schwache Kopplung, die als Störung im Hamilton-Operator behandelt wird. Es sind zwei Grenzfälle zu betrachten:

I) Effekte erster Ordnung entstehen, wenn für zwei anisotrope, paramagnetische Zentren Folgendes gilt:  $|2J| \ll |\Delta g \mu_B B|$ , wobei  $\Delta g$  die Differenz der effektiven  $g$ -Werte der Zentren darstellt. Demnach spalten die Linien jedes Zentrums ( $S = 1/2$ ) in zwei Komponenten gleicher Intensität auf, mit dem Abstand  $\Delta B = J/g\mu_B$  [87].

II) Effekte zweiter Ordnung, hier fallen die zentralen Linien des Aufspaltungsmusters in der Mitte zusammen, und die Intensität der äußeren Linien ist stark verringert. Dies ist der Fall, wenn  $|2J| \approx |\Delta g \mu_B B|$ .

### Nullfeldwechselwirkung

Ergibt sich für ein Spinsystem ein Gesamtspin  $S > 1/2$ , wird die  $(2S + 1)$ -fache Entartung des Grundzustandes durch die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den Elektronen aufgehoben, sofern eine nichtkubische Symmetrie vorliegt. Diese Interaktion trägt den Namen Nullfeldwechselwirkung (engl. *zero-field interaction*, ZFI), da es sich um einen feldunabhängigen Effekt handelt. Er lässt sich mittels der spurlosen und symmetrischen ZFI-Matrix  $\mathbf{D}$  durch folgenden Hamilton-Operator ausdrücken:

$$\mathcal{H}_{\text{ZFI}} = \mathbf{S}^T \mathbf{D} \mathbf{S} \quad (3.23)$$

Im Hauptachsensystem von  $\mathbf{D}$  lautet diese Gleichung:

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_{\text{ZFI}} &= D_x S_x^2 + D_y S_y^2 + D_z S_z^2 \\ &= D \left[ S_z^2 - \frac{1}{3} S(S+1) \right] + E(S_x^2 - S_y^2) \end{aligned} \quad (3.24)$$

Der axiale Parameter  $D$  und der rhombische Parameter  $E$  setzen sich hierbei aus  $D = 3D_z/2$  beziehungsweise  $E = (D_x - D_y)/2$  zusammen. Im Fall kubischer Symmetrie verschwinden beide Größen, bei axialer Symmetrie verschwindet  $E$ , während  $D > 0$ . Ist der Symmetriegrad geringer, liegen sowohl  $D$  als auch  $E$  abweichend von Null vor. Aufgrund der Feldunabhängigkeit stellt die Nullfeldwechselwirkung für  $S > 1/2$  in niedrigen Frequenzbändern wie X-Band oder S-Band oft den dominierenden Anteil der vorhandenen magnetischen Wechselwirkungen dar.

## 3.2 cw-EPR

Wesentliches Merkmal der *continuous-wave*-EPR, kurz cw-EPR, ist die ununterbrochene Einstrahlung von Mikrowelle auf die zu untersuchende Probe. In der experimentellen Durchführung wird bei konstanter Frequenz das Magnetfeld variiert, da unterschiedliche Frequenzen Bauteile verschiedener Dimension benötigen. Insbesondere weisen Mikrowellenresonatoren eine geringe Frequenzbandbreite auf. Zudem decken Mikrowellenquellen nur kleine Frequenzbereiche weitgehend rauschfrei und mit gleich-

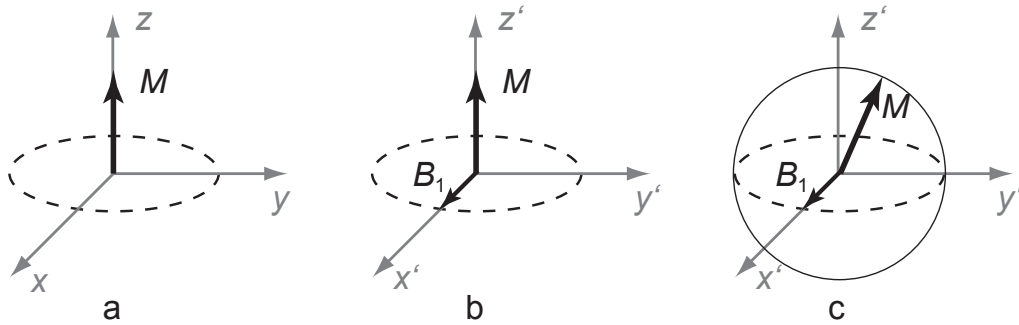
bleibender Leistung ab. Man misst somit die Abhängigkeit der Absorption von Mikrowelle durch die Probe vom äußeren Magnetfeld.

Typischerweise verwendet man einen Resonator, der zum einen den Zweck erfüllt, magnetischen und elektrischen Feldanteil der Mikrowelle räumlich zu trennen und ersteren am Ort der Probe zu konzentrieren. Zum anderen wird bei *cw*-EPR mit kritisch gekoppeltem Resonator gearbeitet, das heißt, keine Mikrowelle wird am Resonator reflektiert, sondern komplett in Wärme umgewandelt. Durch Veränderung des äußeren Magnetfeldes wird je nach  $g$ -Wert die Resonanzbedingung (Gleichung 3.6) erfüllt, es kommt zur Absorption von Mikrowellenenergie durch die Probe. Durch diese Impedanzänderung des Resonators ist seine kritische Kopplung nicht mehr gegeben und es kommt zur Reflexion am Resonatoreingang. Dieser zurückgeworfene Anteil der eingestrahlten Mikrowelle wird detektiert, zur Verstärkung des Effekts und zur Rauschunterdrückung wird eine sinusförmige Modulation des äußeren Magnetfeldes durchgeführt. Diese phasenempfindliche Lock-In-Detektion sorgt dafür, dass man die Signaländerung in Abhängigkeit von der Feldänderung beobachtet, also als Signal die erste Ableitung der Absorptionskurve erhält (siehe zum Beispiel Abbildung 3.2).

Im Vektormodell kann der Vorgang wie folgt beschrieben werden: Ein Ensemble von Spins kann über die Summe seiner einzelnen magnetischen Momente beschrieben werden, es ergibt sich die makroskopische Magnetisierung  $\mathbf{M} = \sum_i \boldsymbol{\mu}_i$ . Ihr Verhalten in einem Magnetfeld kann mit der klassischen Gleichung zur Beziehung zwischen Drehmoment, magnetischem Moment und Magnetfeld beschrieben werden:

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} = \mathbf{M} \times \frac{-g\mu_B}{\hbar} \mathbf{B} \quad (3.25)$$

Entsprechend dieser Gleichung ist die Magnetisierung im thermischen Gleichgewicht unter Einfluss des statischen Magnetfeldes  $B_0 \parallel z$  in  $z$ -Richtung ausgerichtet. Ist  $\mathbf{B}$  nicht parallel zu  $\mathbf{M}$ , kommt es zu einer Präzession der Magnetisierung um  $\mathbf{B}$  mit der sogenannten Larmor-Frequenz  $\omega_L$ . Die präzedierende Magnetisierung ist in Form eines emittierten Wechselfeldes detektierbar. Ein statisches Feld  $B \parallel z$  könnte diese Auslenkung nicht hervorrufen, weil sich sein Effekt über die Zeit ausmittelt. Ein magnetisches Wechselfeld hingegen, welches von der  $z$ -Richtung abweicht, erzeugt die gewünschte Präzession der Magnetisierung um die  $z$ -Achse. Diesen Effekt macht



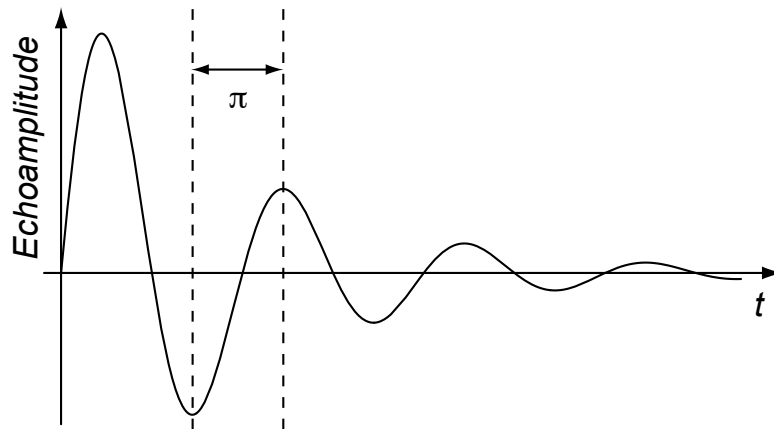
**Abbildung 3.4:** Transiente Nutation des Spins unter Einfluss von  $B_0$  und  $B_1$ .  
a: Ohne Einfluss von  $B_1$ , die Magnetisierung  $M$  ist entlang  $B_0$  ( $z$ ) ausgerichtet.  
b: Mitrotierendes Koordinatensystem,  $B_1$  ist darin statisch. c: Die Magnetisierung nutiert um das eingeschaltete  $B_1$ .

man sich in der EPR zunutze: Mit Hilfe eines magnetischen Wechselfeldes  $B_1$  wird die Auslenkung von  $M$  erzeugt, um danach die Emission von Mikrowelle zu detektieren.

Wegen des Kreuzproduktes in Gleichung 3.25 ist der Einfluss eines solches Wechselfeldes senkrecht zu  $z$  am größten, daher wird senkrecht zu  $B_0$  und  $z$  das oszillierende Feld  $B_1$  eingestrahlt. Es ist linear polarisiert und lässt sich in zwei zirkular polarisierte Komponenten aufteilen. Der eine Teil ist als hochfrequente Störung vernachlässigbar, der andere Teil rotiert mit der Magnetisierung um die  $z$ -Achse. In diesem mitrotierenden Koordinatensystem ist  $B_1$  zeitunabhängig und statisch entlang  $x'$  ausgerichtet. Als Folge beginnt die Magnetisierung, um die  $B_1$ -Achse ( $x'$ ) zu nutieren (Abbildung 3.4, [88]). Sie wird um die  $x'$  zur  $y'$ -Achse gedreht, ihre  $z'$ -Komponente verringert sich also auf Null, wächst dann im Negativen auf ihr Maximum, verringert sich wieder ( $-y'$ ), um anschließend ihren Ursprungswert wieder zu erreichen [83]. In der *cw*-EPR wird ein  $B_1$ -Feld mit relativ geringer Leistung verwendet, welches sich als nur kleine Auslenkung der Magnetisierung auswirkt.

### 3.3 Puls-EPR

Die Verwendung von gepulster Mikrowelle ermöglicht es, Spinübergänge direkt in Absorption zu messen. Mikrowellenpulse definierter Länge wirken auf den Spin-Hamilton-Operator als Störung, auf diese Art können gewisse Wechselwirkungen un-



**Abbildung 3.5:** Transiente Nutation, die Dauer einer Periode gibt die Pulsdauer zum Umklappen der Magnetisierung.

---

terdrückt und andere verstärkt detektiert werden. Spezielle Pulssequenzen gestatten es, verschiedene Wechselwirkungen des Spin-Hamilton-Operators zu entkoppeln und folglich getrennt zu messen.

### 3.3.1 Transiente Nutation

Die Einwirkung eines Wechselfeldes  $B_1$  senkrecht zu  $B_0$  und  $z$  sorgt für eine Nutation der Magnetisierung. Ein zeitlich begrenzt wirkendes  $B_1$ -Feld erzeugt also eine Verkipfung der Magnetisierung um einen bestimmten Winkel  $\varphi = \omega_1 t_p$ . Hier gibt  $t_p$  die Länge der Einwirkzeit von  $B_1$ , also die Pulsdauer, an. Die Nutationsfrequenz (Rabi-Frequenz)  $\omega_1$  ist durch die Amplitude des Mikrowellenfeldes  $B_1$  gegeben [88, 89].

Zur Bestimmung von Pulszeiten mit einem bestimmten Einfluss auf die Magnetisierung variiert man im Experiment die Länge eines Mikrowellenpulses fester Leistung. Man detektiert zum Beispiel mit der im folgenden Abschnitt erklärten Hahn-Echo-Sequenz, die Echoamplitude wird gegen die Pulslänge aufgetragen. Aus der halben Periodendauer der beobachteten Oszillation ergibt sich die optimale Länge, die ein Puls zum Invertieren der Magnetisierung nach  $-z'$  haben sollte (Abbildung 3.5). Dies entspricht für  $S = 1/2$  einer Umkehr der Populationen von  $m_S = +1/2$  nach  $m_S = -1/2$ , also quasi dem Elektronenspinübergang. Weil hier eine Drehung um  $180^\circ$  erzeugt wird, spricht man auch von einem  $\pi$ -Puls. Der Drehwinkel hängt mit der Pulslänge

und über die Rabi-Frequenz mit der Feldstärke des Wechselfeldes zusammen. Das bedeutet auch, dass man entsprechend der Nutation statt der Pulslänge die Leistung eines Pulses verändern kann. Zwei  $\pi$ -Pulse unterschiedlicher Leistung haben also unterschiedliche Längen.

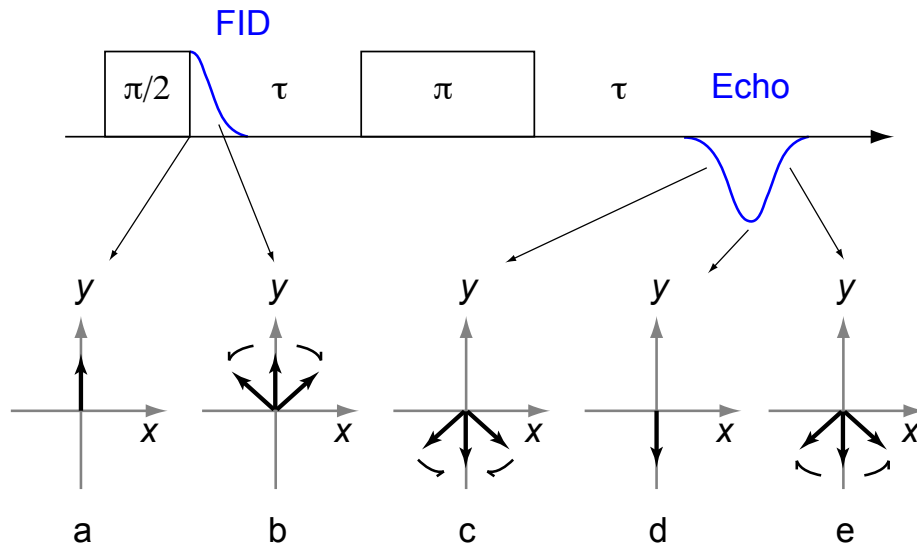
Analog dazu kann man mit einer zeitlichen Variation eines Radiofrequenzpulses (RF-Puls) die Zeitkonstante finden, mit der man bei gegebener Leistung einen Kernspinübergang induziert. In diesem Fall spricht man von einer Kern-Rabi-Nutation, welche durch das RF-Feld  $B_2$  und die Kern-Rabi-Frequenz  $\omega_2$  charakterisiert ist. Dieses Vorgehen nutzt man, um passende RF-Pulse für ENDOR zu bestimmen (Abschnitt 3.3.6).

### 3.3.2 Hahn-Echo-Pulsfolge

Für das *field-swept-echo*-Experiment (FSE) wird meist die Hahn-Echo-Sequenz verwendet, die dabei erhaltenen Informationen ähneln für  $S = 1/2$  denen der *cw*-EPR [84]. Als erste Echo-Sequenz 1950 von Hahn entwickelt [90], lässt sie sich von der NMR im Wesentlichen auf die EPR übertragen. Abbildung 3.6 verdeutlicht das Prinzip.

Der erste Puls,  $\pi/2$ -Puls genannt, dreht die makroskopische Magnetisierung um  $x$  herum um  $90^\circ$  auf die  $y$ -Achse. Aufgrund unterschiedlicher effektiver Larmor-Frequenzen der einzelnen Spinpakete beginnt sie in der  $xy$ -Ebene zu dephasieren, dies nennt man den freien Induktionszerfall (*free induction decay*, FID). Der nach einer Wartezeit  $\tau$  angesetzte  $\pi$ -Puls dreht die Magnetisierung aus der  $xy$ -Ebene über  $z$  in dieselbe Ebene zurück, allerdings um  $180^\circ$  rotiert. Da die Phasengeschwindigkeiten jedoch erhalten bleiben, kommt es nach einem weiteren Zeitintervall  $\tau$  zur Refokussierung der Magnetisierung. Das so gemessene Echo hat demnach die Form zweier spiegelsymmetrischer FIDs und visualisiert, wie sich die Magnetisierung zeitlich in der  $xy$ -Ebene entwickelt. Bis auf Relaxationseffekte wird die Kohärenz wieder hergestellt. Integriert man für jede durchgefahrene Magnetfeldposition (*field sweep*) ein solches Echo, erhält man das FSE, also die Echointensität in Abhängigkeit von der Feldstärke.

Es ist möglich, direkt den FID zu messen, dies unterliegt jedoch der Einschränkung, dass zum Schutz des Detektors eine Totzeit nach dem Puls notwendig ist. Während dieser zerfällt bereits ein Teil des Signals, so dass es in vielen Fällen schwer ist, über-



**Abbildung 3.6:** Prinzip der Hahn-Echo-Sequenz. Oben: Schema der Pulsfolge und Signalprofil, unten: Manipulation der Magnetisierung im rotierenden Koordinatensystem. a) Drehen der Magnetisierung in die  $xy$ -Ebene mittels  $\pi/2$ -Puls. b) Dephasieren der Magnetisierung. c) Zusammenlaufen der Magnetisierung nach dem  $\pi$ -Puls. d) Refokussiertes Echo. e) Dephasieren wie in b).

haupt ein Signal aufzunehmen. Die Refokussierung durch einen zweiten Puls umgeht dieses Problem, indem das Maximum der Signalintensität aus dem Bereich der Totzeit herausgeschoben wird. Darüber hinaus ermöglicht sie eine Detektion des Echomaximums, so dass zum Beispiel Echomodulationen durch Wechselwirkungen mit Kernen (siehe Abschnitt 3.3.5) gemessen werden können, ohne dass eine Integration des gesamten Echos nötig ist.

Der Vorteil der Pulsmethode gegenüber der *cw*-EPR zeigt sich zum Beispiel bei breiten Spektren. Durch die Filterwirkung der Feldmodulation und Lock-In-Detektion kommt es zu Verzerrungen von Intensitäten, die so während einer Echodetektion nicht auftreten.

### 3.3.3 Relaxation

In einem realen System wechselwirken Spins stets mit ihrer Umgebung. Kommt es dabei zu einem Energieübertrag, spricht man von longitudinaler Relaxation. Sie ist



mit einer Zeitkonstanten, der Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$  behaftet. Bindung des Spins an das Gitter ermöglicht den Austausch von Energie in Form von Phononen, das Gitter nimmt durch diese strahlungslos erzeugten Gitterschwingungen die Energie eines Spinübergangs auf oder stellt sie bereit.

Bei der Spin-Spin-Relaxation findet kein Energieübertrag statt. Es kommt zu einem gleichzeitigen Umklappen zweier Spins, jeder Spin geht in den Zustand des jeweils anderen über. Die beobachteten Spins verlieren ihre feste Phasenbeziehung, das heißt, ihre Kohärenz zerfällt. Dieser Vorgang entspricht dem Zerfall der transversalen Magnetisierung, weshalb die zugehörige Zerfallszeit  $T_2'$  auch transversale Relaxationszeit genannt wird.

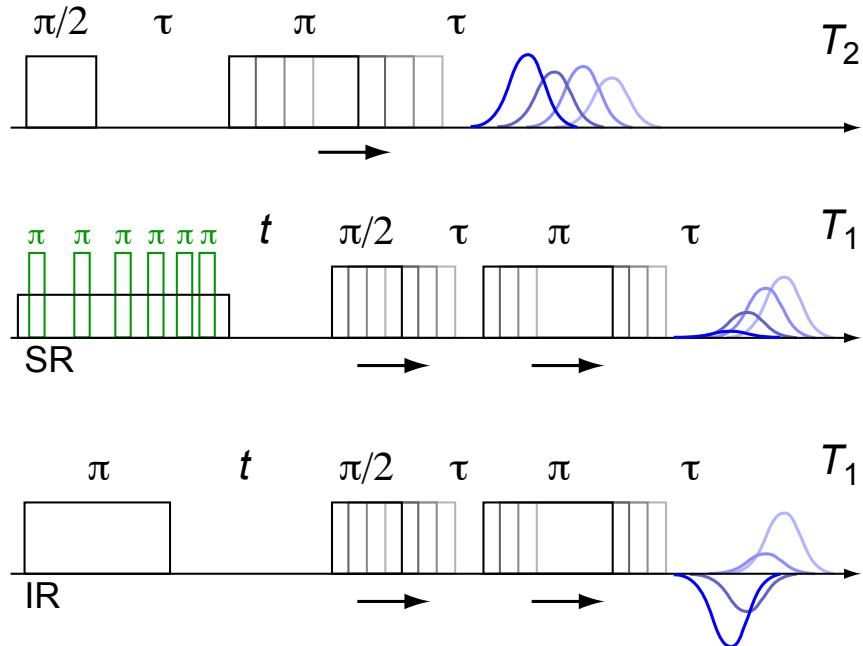
Beide Relaxationszeiten werden in der Zerfallszeit  $T_2$  zusammengefasst, die einer effektiven Lebensdauer der Spinzustände gleich kommt:

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2'} \quad (3.26)$$

Im Fall von *cw*-EPR ist die  $T_1$ -Relaxation notwendig, um Messungen durchzuführen. Absorption und Emission werden nicht getrennt voneinander angeregt, es müsste also sehr schnell zu einem Gleichgewicht zwischen den beteiligten Niveaus kommen. Ein Abbau der Polarisation wäre die Folge, was die Detektion einer Nettoabsorption unterbinden würde. Die Kopplung der Spins an das Gitter stört demnach das sich einstellende Gleichgewicht, ein Nettobesetzungsunterschied wird messbar. Dies ist so lange der Fall, wie die eingestrahlte Leistung klein genug ist, andernfalls kommt es zu dem beschriebenen Gleichgewicht, also zu einer Sättigung des Übergangs.

In Puls-EPR-Experimenten wirkt sich die Relaxation so aus, dass das durch eine Pulsfolge erzeugte Echo an Intensität verliert, es zerfällt. Das bedeutet eine Einschränkung für verwendbare Pulslängen und -abstände. Im Gegenzug kann man diesen Zerfall messen und so Informationen über das Spinsystem gewinnen.

Die  $T_2'$ -Zeit kann über ein modifiziertes Hahn-Echo-Experiment gemessen werden. Der Abstand des  $\pi$ -Pulses wird im Vergleich zum  $\pi/2$ -Puls sukzessive vergrößert, die Amplitude des entstehenden Echo wird in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet (Abbildung 3.7, oben). Der exponentielle Zerfall gibt die Zerfallskonstante  $T_2'$ . Dem



**Abbildung 3.7:** Relaxationsmessungen. Oben:  $T_2$ -Messung mit Hahn-Echo, dessen Abstand vergrößert wird. Mitte:  $T_1$ -Messung durch *saturation recovery* (SR). Ein langer, niederenergetischer Puls oder eine Folge breitbandiger Pulse mit abnehmendem Abstand (grün) erzeugt die Sättigung, das Hahn-Echo dient der Detektion. Unten: Messung von  $T_1$  mittels *inversion recovery* (IR). Eine Hahn-Echo-Sequenz fragt das vom ersten Puls invertierte Echo nach einer Zeit  $t$  ab.

Zerfall kann eine Modulation überlagert sein, dies wird im Abschnitt 3.3.5 näher ausgeführt.

Zur Bestimmung der Relaxationszeit  $T_1$  eignen sich zwei Experimente, zum einen eine *saturation-recovery*-Messung, zum anderen ein *inversion-recovery*-Experiment. Im ersten Fall wird ein EPR-Übergang durch einen langen, niederenergetischen Puls gesättigt und die Rückkehr der Nettomagnetisierung in den thermischen Gleichgewichtszustand wird mit einer Hahn-Echo-Pulsfolge detektiert. Die Echoamplitude wird als Funktion der Zeit zwischen erstem und zweitem Puls aufgezeichnet, ihr exponentielles Verhalten liefert die Relaxationszeit  $T_1$  (Abbildung 3.7 (mittig)). Alternativ kann der erste Puls auch durch eine Folge von nichtselektiven  $\pi$ -Pulsen mit kurzen Abständen ersetzt werden (*picket fence*), was eine höhere Anregungsbandbreite und eine bessere Sättigung nach sich zieht [91].

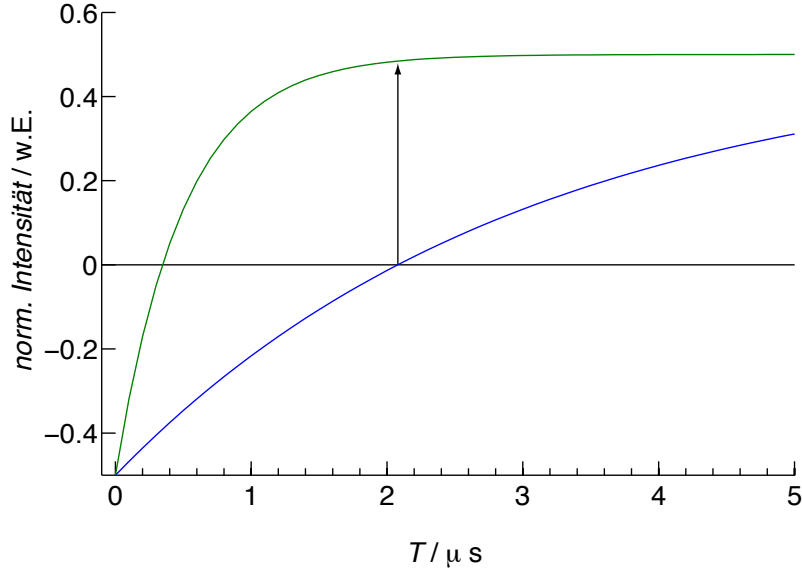
Das zweite Experiment trägt seinen Namen wegen der Änderung der Besetzungszahldifferenz von maximal negativer Polarisation zurück zur Polarisation im thermischen Gleichgewicht. Dies ist in Grafik 3.7 (unten) dargestellt. Einem initialen  $\pi$ -Puls folgt eine Hahn-Echo-Sequenz, deren zeitlicher Abstand zum ersten Puls im Laufe des Experiments vergrößert wird. Das zunächst invertierte Echo durchläuft einen Nulldurchgang und kehrt zum vollen positiven Echo zurück.

Während die Inversionsmessung den Vorteil bietet, die komplette Populationsdifferenz zu nutzen und somit ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis aufweist, ist sie im Vergleich zum Sättigungsexperiment anfälliger für Einflüsse von spektraler und Spindiffusion [84, 92]. Typischerweise äußert sich das in Zeitkonstanten, die kleiner als  $T_1$  sind und ist verursacht durch Kernspin- und Kreuzrelaxationen [93, 94]. Es ist abzuwägen, welche Vorteile bei der jeweiligen Fragestellung die größere Rolle spielen, gegebenenfalls bietet es sich an, beide Experimente durchzuführen, um sich ergänzende Informationen zu erhalten.

## REFINE

In biologischen Systemen kommt es oft zum Überlapp der Signale verschiedener paramagnetischer Zentren, die deshalb schwer getrennt zu untersuchen sind. Diese Limitierung kann in einigen Fällen dadurch umgangen werden, dass man bei sich teilweise überlappenden Spektren die individuell unterschiedlichen Relaxationszeiten  $T_1$  der beteiligten Zentren ausnutzt. Diese können sich um Größenordnungen unterscheiden. Basierend auf dem *inversion-recovery*-Experiment macht man sich hierbei zunutze, dass das Echo eines Zentrums einen Nulldurchgang hat, während das andere eine Intensität verschieden von Null zeigt (Abbildung 3.8). Aus einer  $T_1$ -Messung an einer Position ohne spektrale Überlappung lässt sich bestimmen, bei welchem Pulsabstand der Nulldurchgang erreicht wird, das Echo eines Zentrums verschwindet. Ein  $\pi$ -Puls wird dann mit diesem zeitlichen Abstand, der sogenannten Filterzeit  $T_F$ , vor die eigentliche Pulsfolge gesetzt und blendet damit das Signal dieses Zentrums aus.

Diese aus der NMR stammende Idee [95] wurde unter dem Namen *inversion recovery filter* (IRf) zuerst von Maly *et al.* an biologischen Systemen erfolgreich demonstriert, unter anderem auch an [FeS]-Clustern [96–99] und kann für diverse EPR-Techniken



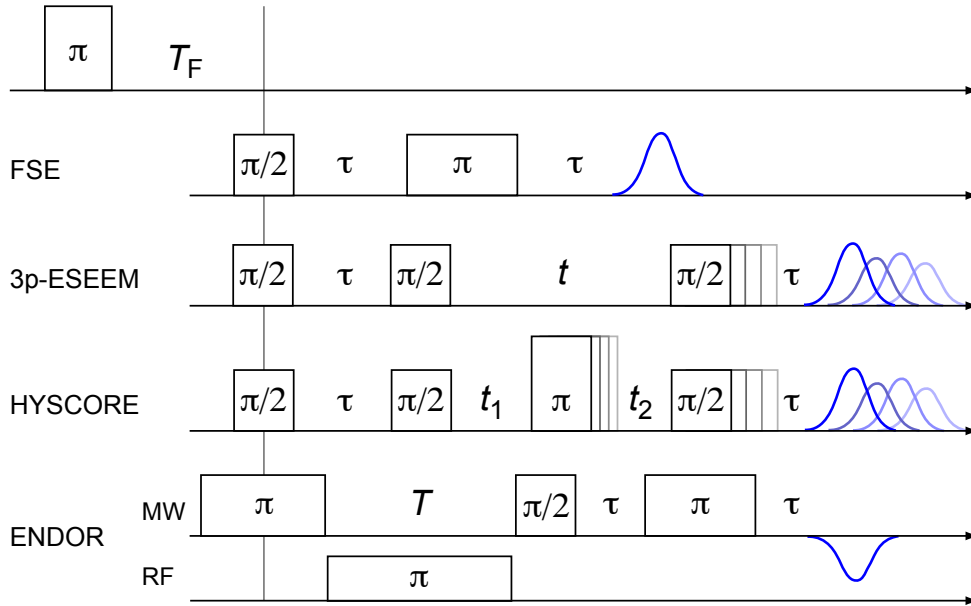
**Abbildung 3.8:** Relaxationszeiten zweier paramagnetischer Zentren zur Bestimmung der Filterzeit  $T_F$ . Während die langsamere Spezies (blau) ihren Nulldurchgang hat, zeigt die schnelle Spezies (grün) detektierbare Echointensität, angedeutet durch den Pfeil.

angewandt werden (Abbildung 3.9). Der Erfolg der Trennung ist stark von dem Verhältnis der Relaxationszeiten abhängig. Bei nur leichtem Unterschied der beteiligten Zentren ist eine Abschwächung der Signale eines Zentrums möglich, die bei der Zuordnung charakteristischer Signale hilfreich sein mag.

Unterscheiden sich die Relaxationszeiten zweier Zentren um mindestens den Faktor 2, ist es möglich, durch Inversionsoperationen die einzelnen Spektren zu trennen. Der zugrunde liegende, zweidimensionale experimentelle Datensatz lässt wie folgt darstellen [95, 100]:

$$S(B_0, \tau, T) = \iint I(B_0, \nu, R) e^{i\nu 2\tau} G(R, T) d\nu dR \quad (3.27)$$

Dabei gibt  $R$  die Relaxationsraten an,  $I(B_0, \nu, R)$  sind die gesuchten, nach Raten sortierten Einzelspektren und  $G(R, T)$  beschreibt den Relaxationsprozess. Für einen exponentiellen Zerfall, wie er bei  $T_2$ -Messungen auftritt, hat  $G$  die Form  $G(R, T_2) = e^{-RT_2}$ , im Fall von *saturation* oder *inversion recovery* wird die Funktion  $G(R, T_1) =$



**Abbildung 3.9:** REFINE-Sequenzen für diverse EPR-Methoden, nach [99]. Der  $\pi$ -Puls wird im Abstand der Filterzeit  $T_F$  vor die eigentliche Pulsfolge gesetzt. Die einzelnen Methoden werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

$1 - e^{-RT_1}$  gewählt. Um aus  $S(B_0, \tau, T)$  die Einzelspektren  $I(B_0, \nu, R)$  zu erhalten, wird im Allgemeinen zuerst eine inverse Fourier-Transformation (iFT) bezüglich  $\tau$  durchgeführt, der eine inverse Laplace-Transformation (iLT) bezüglich  $T$  folgt:

$$S(B_0, \tau, T) \xrightarrow{\text{iFT}(\tau)} P(B_0, \nu, T) \xrightarrow{\text{iLT}(T)} I(B_0, \nu, R) \quad (3.28)$$

Je nach Messmethode vereinfachen sich die Funktionen und die an ihnen durchzuführenden Transformationen. Die Magnetfeldabhängigkeit entfällt beispielsweise für ESEEM-Spektren, die typischerweise an einer festen Feldstelle aufgenommen werden. Im Gegensatz dazu ist es für magnetfeldabhängige Messungen mit festem  $\tau$  unnötig, die iFT durchzuführen. Es liegt bereits  $P(B_0, T)$  vor [99]. In der vorliegenden Arbeit kommt der zweite Fall zur Anwendung.

Während sich Fourier-Transformationen meist problemlos durchführen lassen, zeigen sich Laplace-Transformationen häufig unterbestimmt und instabil [101]. Um dieses Problem zu umgehen, kann  $P$  durch eine endliche Summe einzelner Relaxationsfunk-

tionen angenähert werden:

$$P(B_0, T) = \sum_i A^i(R^i)G(R^i, T) \quad (3.29)$$

Die nicht-negativen Amplituden  $A^i$  der einzelnen Relaxationsraten  $R^i$  geben in Verbindung mit diesen Raten über den Feldverlauf betrachtet die getrennten Spektren der beteiligten Spezies wieder. Die Amplituden werden dabei über die Methode kleinster Quadrate bestimmt, das heißt für jede Feldposition  $B_0$  wird die Funktion  $\sigma^2$  minimiert:

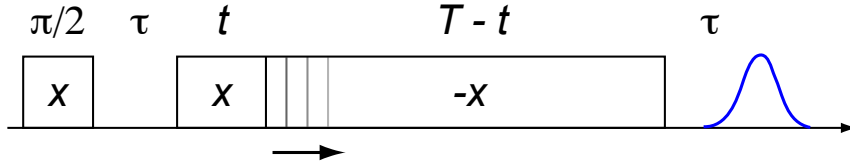
$$\sigma^2 = \sum_T \left( P(B_0, T) - \sum_i A^i(R^i)G(R^i, T) \right) \quad (3.30)$$

Bei Verwendung von Matlab (The MathWorks) bieten sich die Funktionen *lsqcurvefit* und *lsqnonlin* an. Die Unter- und Obergrenzen der zu bestimmenden Raten sind durch die maximale Zeit  $T$  und die Schrittweite der Relaxationsmessung vorgegeben und es werden 50-100 logarithmisch größer werdende Raten verwendet.

Das Signal-Rausch-Verhältnis des Ausgangsdatensatzes hat einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität des verwendeten Algorithmus, was in der Beispielstudie von Cernescu *et al.* [100] deutlich wird: Es konnten bis zu fünf Spezies erfolgreich getrennt werden, unter der Voraussetzung, dass sich ihre  $T_1$ -Zeiten um mindestens den Faktor 3 unterschieden und ein Signal-Rausch-Verhältnis von wenigstens 100:1 vorliegt.

### 3.3.4 PEANUT

Eine andere Methode, sich im FSE überlappende Signale verschiedener paramagnetischer Zentren zu entflechten, besteht darin, das FSE-Experiment zu einem 2D-Experiment auszuweiten. Indem man die Signalamplitude sowohl abhängig vom Magnetfeld aufnimmt, als auch von einem geeigneten, zusätzlichen Parameter, ist es möglich, spektrale Anteile anhand dieses Parameters zu trennen. Liegen in einer Probe verschiedene Spinzustände vor ( $S = 1/2, 1, 3/2, \dots$ ), bietet es sich an, als Trennungspareparameter die Nutationsfrequenz zu verwenden. Sie ist abhängig vom Spin  $S$  und seiner Spinquantenzahl  $m_S$ , so dass für unterschiedliche Übergänge verschiedene Frequenzen



**Abbildung 3.10:** PEANUT-Pulssequenz. Die Abschnitte des HTA-Pulses mit unterschiedlicher Phase  $x$  werden in der Länge variiert, die Gesamtpulslänge bleibt konstant. Die Modulation des Echos wird als Funktion von  $t$  aufgenommen.

zu erwarten sind [84]:

$$\omega_{\text{nut}}(m_S, m_S + 1) = \frac{g_1 \mu_e B_1}{\hbar} \sqrt{S(S+1) - m_S(m_S + 1)} \quad (3.31)$$

Für  $S = 1/2$  ergibt diese Gleichung für den einzigen Übergang  $(-1/2, +1/2)$  die Frequenz  $\omega_{1/2} = g_1 \mu_e B_1 / \hbar$ . Wenn ein Zentrum mit  $S = 1/2$  vorliegt, eignet sich diese Frequenz gleichermaßen als Referenz für andere Übergänge. Beispielsweise haben die beiden Übergänge  $(-1, 0)$  und  $(0, 1)$  von  $S = 1$  die Frequenz  $\omega_1 = \sqrt{2} \omega_{1/2}$ . Bei  $S = 3/2$  hingegen gibt es zwei Frequenzen, je nach Übergang:  $(-3/2, -1/2)$  und  $(1/2, 3/2)$  sind mit  $\omega_{3/2a} = \sqrt{3} \omega_{1/2}$  korreliert, während sich  $(-1/2, 1/2)$  bei  $\omega_{3/2b} = 2 \omega_{1/2}$  zeigt.

Ein Experiment, bei welchem man sich diese Nutationsfrequenzen als Trennungsparameter zunutze macht, trägt das Akronym PEANUT (engl. *phase-inverted echo-amplitude detected nutation*). Darunter versteht man ein feldabhängiges Nutationsexperiment, bei dem die Auswirkungen von Phaseninversion innerhalb eines sehr langen Pulses auf die Echoamplitude gemessen werden [102]. Es handelt sich um eine  $\pi/2$ - $\pi$ -Sequenz: Ein nicht-selektiver, also breitbandiger  $\pi/2$ -Puls dient als Präparationspuls, was den Vorteil bietet, auch hohe Nutationsfrequenzen beobachten zu können, welche durch diesen Puls angeregt werden. Es folgt ein *high-turning-angle*-Puls (HTA-Puls), der einem Winkel von mehr als  $360^\circ$  entspricht [103]. Im Gegensatz zu vorherigen Sequenzvarianten, bei denen die Gesamtlänge eines Pulses variiert wird [104–106], ist hier diese Länge fix. Der Puls ist in zwei Teile mit entgegengesetzter Phase aufgeteilt, die Länge dieser Abschnitte wird während des Experimentes verändert (Abbildung 3.10). Damit werden Totzeiten für kleine  $T$ -Werte vermieden und Einflüsse durch Kernmodulationseffekte vermindert [102].

Um die in der Mitte der Zeitspur auftretenden resonanten Anteile der Nutation sauber von den nichtresonanten zu trennen, welche sich am Rand des Spektrums befinden, ist eine hohe Mikrowellenfeldstärke ratsam. Zur Unterdrückung von FID-Anteilen nach dem HTA und Basislinienversatz findet ein zweistufiger Phasenzzyklus mit Invertierung des Präparationspulses Anwendung [102]. Zur Auswertung wird nur der mittlere Teil der Zeitspur betrachtet, die Flanken werden abgeschnitten. Nach einer Hintergrundkorrektur wird eine  $\sin^2$ -Fensterfunktion angewandt und das Spektrum beidseitig mit Nullen aufgefüllt. Die folgende Fourier-Transformation liefert das Frequenzspektrum.

Die Interpretation von PEANUT-Frequenzspektren ermöglicht die Zuordnung der Gesamtspins der beteiligten paramagnetischen Spezies sowie eine Aufgliederung einzelner Spinübergänge innerhalb dieser Gesamtspins. Signale von Spezies mit gleichem Gesamtspin bleiben weiterhin überlagert. Erschwert wird die Analyse durch Verbreiterungen und Kopplungen wie Austauschwechselwirkung und Nullfeldaufspaltung. Letztere macht besonders im X-Band einen bedeutenden Anteil der Signale aus. Laut Schweiger und Jeschke [84] gilt Gleichung 3.31 nur, wenn ein einzelner Spinübergang angeregt wird. Liegt  $B_1$  hingegen in der gleichen Größenordnung wie der Frequenzunterschied zweier Übergänge, also ihrer Aufspaltung, kann es zu einer Vermischung von Nutationsfrequenzen kommen, die nicht mehr eindeutig zuzuordnen sind [107, 108]. So kann es zum Beispiel durch den Einfluss von Nullfeldwechselwirkung zu Artefaktsignalen kommen [107, 109]. Zusätzlich kann die Feldabhängigkeit von Wechselwirkungen zu Verzerrungen im Verlauf eines Spektrums führen.

#### 3.3.5 ESEEM und HYSCORE

Gemessen an der Größenordnung der Zeeman-Aufspaltung sind vergleichsweise kleine Kopplungen wie Hyperfein- oder Kernquadrupolwechselwirkung nur selten in *cw*- oder FSE-Messungen aufgelöst. Diese Informationen können allerdings durch gewisse Pulstechniken gewonnen werden. Namentlich sind dies ESEEM- (*electron spin-echo envelope modulation*) und ENDOR-Experimente (*electron-nuclear double resonance*). Beide Methoden ermöglichen über den EPR-Übergang die indirekte Bestimmung der NMR-Übergänge der beteiligten Kerne. ESEEM ist hierbei gut geeignet, schwach



hyperfeingekoppelte, also weiter entfernte Kerne zu detektieren.

## 2-Puls-ESEEM

Wie im vorherigen Abschnitt erklärt, können basierend auf der Hahn-Echo-Sequenz Relaxationsmessungen vorgenommen werden. Ein weiteres Ergebnis dieser  $T_2'$ -Messung sind Modulationen der Echointensität, welche durch Kopplungen zwischen vermessenen Elektronen und den Kernen des Systems entstehen. Dieser Effekt wurde zuerst von Rowan und Mims entdeckt, die Theorie und Techniken folgend von Mims und Dikanov beschrieben [110–114]. Deligiannikis *et al.* [115] geben einen umfangreichen Überblick über den Hintergrund und diverse ESEEM-Anwendungen. Es stellte sich heraus, dass das  $T_2'$ -Experiment gleichzeitig eine 2-Puls-ESEEM-Messung ist (Abbildung 3.7). Es werden erlaubte und verbotene Übergänge gleichzeitig angeregt, weil letztere durch Hyperfeinanisotropie oder das Vorhandensein von Kernquadrupolkopplung ( $I \geq 1$ ) teilweise erlaubt sind.

Bezogen auf ein Elektron-Kern-System mit  $S = 1/2$  und  $I = 1/2$  kann die Echoeinhüllende wie folgt beschrieben werden [112, 116]:

$$E_{\text{mod}}(\tau) = 1 - \frac{k}{4} \left( 2 - 2 \cos \omega_\alpha \tau - 2 \cos \omega_\beta \tau + \cos(\omega_\alpha - \omega_\beta) \tau + \cos(\omega_\alpha + \omega_\beta) \tau \right) \quad (3.32)$$

Die Frequenzen  $\omega_\alpha$  und  $\omega_\beta$  sind gegeben durch:

$$\omega_\alpha = \sqrt{\left(\frac{1}{2}a - \omega_I\right)^2 + \frac{1}{4}b^2}, \quad \omega_\beta = \sqrt{\left(\frac{1}{2}a + \omega_I\right)^2 + \frac{1}{4}b^2} \quad (3.33)$$

Hierbei sind  $a = A_{zz}$  und  $b = \sqrt{A_{zx}^2 + A_{zy}^2}$  säkularer und pseudosäkularer Anteil der Hyperfeinmatrix, für den Fall axialer Hyperfeinwechselwirkung können sie als  $a = a_{\text{iso}} + T(1 + 3 \cos 2\theta)$  und  $b = 3T \sin \theta \cos \theta$  formuliert werden. Ersterer ist durch den isotropen Teilbetrag bestimmt,  $b$  hingegen rein anisotrop. Durch die Abhängigkeit der Modulationstiefe  $k$  von  $b$  wird deutlich, warum ein ESEEM-Effekt nur bei

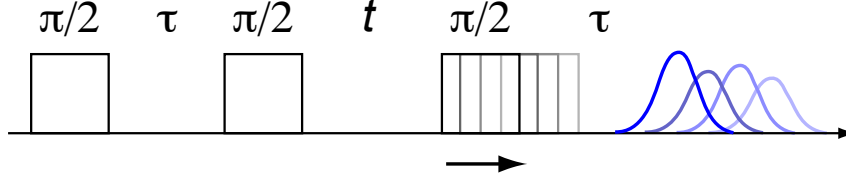
vorhandener Anisotropie zu beobachten ist:

$$k = \left( \frac{\omega_I b}{\omega_\alpha \omega_\beta} \right)^2 \quad (3.34)$$

Qualitativ kann der ESEEM-Effekt wie folgt beschrieben werden [114]. Durch einen sehr kurzen  $\pi/2$ -Puls wird der Elektronenspin geflippt, ein umliegender Kern kann der plötzlichen Veränderung seines lokalen Magnetfeldes nicht schnell genug folgen und beginnt zu präzedieren. Dadurch werden am Ort des Elektronenspins oszillierende Feldveränderungen induziert. Die durch den zweiten Puls angestrebte Rephasierung der Spins unterliegt jetzt zusätzlich der Bedingung, dass der Pulsabstand  $\tau$  ein Vielfaches der nuklearen Präzessionszeit sein muss. Dies ist nur für gewisse Werte von  $\tau$  gegeben, so dass das Echo teilweise durch unvollständige Rephasierung an Intensität verliert und mit der Präzessionsfrequenz des Kerns moduliert ist.

Zur Transformation von der Zeit- in die Frequenzdomäne werden die ESEEM-Spektren biexponentiell oder mit einem Polynom dritter Ordnung hintergrundkorrigiert, um die Modulation vom Relaxationszerfall zu trennen. Es folgt Faltung mit einer Hamming-Fensterfunktion, die hochfrequente Transformationsartefakte verringert, die dadurch entstehen, dass das gemessene Signal nichtganzzahlige Vielfache der enthaltenen Perioden umfasst [117]. Nach einem Auffüllen mit Nullen bis zur vierfachen Punktzahl wird das Spektrum durch Fast-Fourier-Transformation (FFT) in die Frequenzdomäne überführt.

Dieses Experiment ist  $T_2'$ -abhängig, da während der Mischungszeit  $\tau$  die Magnetisierung transversal gespeichert wird. Für kurze  $T_2'$ -Zeiten kann nur eine geringe Anzahl an Modulationsperioden beobachtet werden, was zu Linienbreiten führen kann, die deutlich breiter sind als die eigentlichen Kernlinienbreiten. Im 2-Puls-ESEEM treten zudem die Summen und Differenzen der Grundfrequenzen auf, was die Übersichtlichkeit des entstehenden Spektrums deutlich einschränken kann, aber auch Rückschlüsse auf die einzelnen Kopplungen ermöglicht.



**Abbildung 3.11:** 3-Puls-ESEEM. Der Abstand der ersten beiden Pulse bleibt konstant, der zwischen Puls 2 und 3 wird vergrößert. Die Modulation des stimulierten Echos wird als Funktion von  $t$  aufgenommen.

### 3-Puls-ESEEM

Alternativ kann ein 3-Puls-Experiment verwendet werden. Hier werden drei  $\pi/2$ -Pulse verwendet, der Abstand der letzten beiden wird inkrementiert. Eine Zeit  $\tau$  nach dem letzten Puls entsteht das stimulierte Echo (Abbildung 3.11).

Analog zu Gleichung 3.32 kann die Echoeinhüllende des 3-Puls-ESEEMs für  $S = 1/2$  und  $I = 1/2$  angegeben werden als [112]:

$$E_{\text{mod}}(\tau, t) = 1 - \frac{k}{4} \left( (1 - \cos \omega_{\alpha} \tau) (1 - \cos \omega_{\beta} (\tau + t)) + (1 - \cos \omega_{\beta} \tau) (1 - \cos \omega_{\alpha} (\tau + t)) \right) \quad (3.35)$$

Die Frequenzen  $\omega_{\alpha}$  und  $\omega_{\beta}$  sind identisch zu denen im vorherigen Fall, Gleichung 3.33, auch die Modulationstiefe  $k$  bleibt gleich (Gl. 3.34). Im Gegensatz zum 2-Puls-Experiment liegen keine Summen- und Differenzsignale vor, was meist das Spektrum vereinfacht. Auch besteht die Möglichkeit längerer Messzeit aufgrund der Abhängigkeit von der meist längeren longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$  und somit schmalere Linienbreiten im Frequenzspektrum.  $\tau$  ist weiterhin von  $T_2'$  abhängig, sehr lange Pulsabstände sind also nicht realisierbar.

Zudem gibt es  $\tau$ -bedingt sogenannte *blind spots*. Gleichung 3.35 wird durch Kosinusterme in Abhängigkeit von  $\tau$  bestimmt (Modulationsamplituden  $1 - \cos \omega_i \tau$ ), was bedeutet, dass Frequenzen mit einer Periode von  $\nu = n/\tau$  ( $n = 0, 1, 2, \dots$ ) ausgeblendet werden. Dies kann umgangen werden, indem man mehrere Experimente mit unterschiedlichen  $\tau$ -Werten durchführt. So kann ein 2vs3-Puls-ESEEM durchgeführt

werden, also ein zweidimensionales Experiment, bei dem gleichzeitig die bei 2- sowie 3-Puls-ESEEM inkrementierten Pulsabstände  $\tau$  wie  $t$  variiert werden.

Andererseits kann der Effekt aber auch dazu genutzt werden, Teile des Spektrums zu unterdrücken, wie zum Beispiel den Einfluss von Matrixprotonen, die von Wasser herrühren. Das eben beschriebene 2vs3-Puls-Experiment zeigt dabei die Periodizität der einzelnen Signale unterschiedlicher Spezies auf und ermöglicht so eine Selektion.

Da jeder zusätzliche Puls ein weiteres Echo hervorruft, für  $n$  Pulse sind dies  $z = 3^{n-1} - 2^{n-1}$  Echos, wird zur Unterdrückung ein Phasenzklus angewandt, hier in vier Schritten [118].

### Sonderfall *exact cancellation*

Das effektive Feld am Kernort setzt sich aus dem Beitrag des äußeren Feldes und dem Hyperfeinfeld zusammen. Wenn Hyperfeinkopplung und Kern-Zeeman-Aufspaltung ähnlicher Größe sind,  $A/2 \approx |\nu_I|$ , spricht man von *exact cancellation*. Eine  $m_S$ -Mannigfaltigkeit erfährt ein erhöhtes Feld, für die andere hingegen ergibt sich eine Art Nullfeld, weil es zu einer gegenseitigen Aufhebung der Einzelbeiträge kommt.

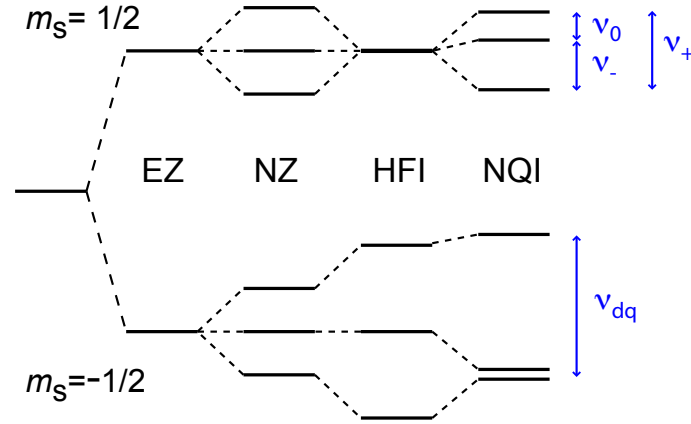
Im Fall von  $S = 1/2$  und  $I = 1/2$  lässt sich die Bedingung für eine axiale Hyperfeinmatrix auch als  $4\nu_I = 2a_{\text{iso}} + T$  schreiben [119]. Das ESEEM-Spektrum besteht aus einer schmalen, intensiven sowie einer sehr schwachen, breiten Linie, die Gleichungen 3.33 vereinfachen sich bei axialer Symmetrie der Hyperfeinmatrix zu:

$$\nu_\alpha = 3T/4, \quad \nu_\beta = 2\nu_I \quad (3.36)$$

Sollte die Hyperfeinwechselwirkung eher rhombischer Natur sein, kommt es zu Abweichungen in der *cancellation*-Bedingung. Reijerse *et al.* [120] haben dafür eine Erweiterung der axialen Formel erarbeitet:

$$\nu_\alpha = 3/4T(1 \pm \delta/3) \quad (3.37)$$

Für  $I = 1$  wirkt sich die *exact cancellation*-Bedingung so aus, dass der Hamilton-Operator der  $m_S = 1/2$ -Mannigfaltigkeit in erster Linie von der Kernquadrupolwech-



**Abbildung 3.12:** Energienivauschema bei *exact cancellation*  $A/2 \approx |\nu_I|$  für  $S = 1/2$  und  $I = 1$  im externen Magnetfeld. (Vergleiche Abbildung 3.3).

selwirkung dominiert wird (siehe Abbildung 3.12). Es zeigen sich folgende schmale Signale, sogenannte Nullfeldübergänge [121]:

$$\nu_0 = 2K\eta, \quad \nu_- = K(3 - \eta), \quad \nu_+ = K(3 + \eta), \quad (3.38)$$

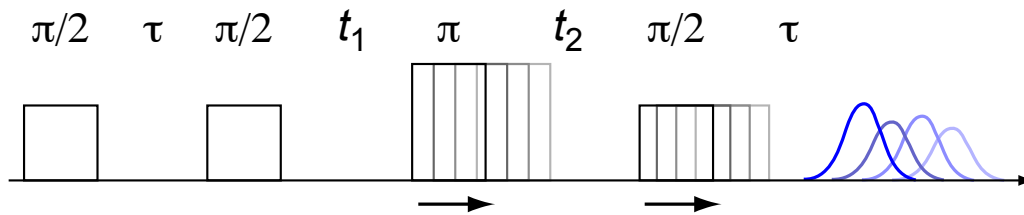
aus denen man direkt die Quadrupolkopplung  $4K = e^2Qq/\hbar$  und den Asymmetrieparameter  $\eta$  ablesen kann. Es gilt  $\nu_0 + \nu_- = \nu_+$ .

In der anderen Spinmannigfaltigkeit mit  $m_S = -1/2$  hingegen addieren sich Kern-Zeeman- und Hyperfeinaufspaltung, bei  $|\nu_I + A/2| \gg K$  spricht man vom Hochfeldfall. Es kommt zu deutlich breiteren Linien, von denen nur der Doppelquantenübergang ( $\Delta m_I = 2$ ) auflösbar ist [114, 122, 123]:

$$\nu_{dq} = 2\sqrt{(\nu_I + a/2)^2 + K^2(3 + \eta^2)} \quad (3.39)$$

Dieser Übergang wird in erster Linie vom säkularen, also vergleichsweise isotropen Teil  $a$  der Hyperfeinmatrix bestimmt. Im Vergleich zur Linienbreite wird die Frequenz des Übergangs nicht von (geringer) Hyperfeinanisotropie beeinflusst.

Da die Kern-Zeeman-Wechselwirkung im Gegensatz zur Hyperfeinkopplung feldabhängig ist, sind für unterschiedliche Kerne je nach Bindungssituation verschiedene Magnetfelder günstig, um diese Bedingung zu erreichen. Für schwach gebundene



**Abbildung 3.13:** 4-Puls-ESEEM ( $t_1 = t_2$ ) bzw. HYSCORE ( $t_1 \neq t_2$ ). Der Abstand der ersten beiden Pulse bleibt konstant, der zwischen Puls 2 und 3 ( $t_1$ ) sowie 3 und 4 ( $t_2$ ) wird vergrößert. Die Modulation des stimulierten Echos wird als Funktion von  $t_1$  und  $t_2$  aufgenommen.

Stickstoffe in der zweiten Koordinationssphäre ( $A \approx 2$  MHz) ist dies meist im X-Band der Fall, hier beträgt die Kern-Larmor-Frequenz von Stickstoff  $^{14}\text{N}$  etwa 1.1 MHz, die von  $^{15}\text{N}$  circa 1.5 MHz.

## HYSCORE

Eine Erweiterung des 3-Puls-ESEEM-Experimentes auf zwei Dimensionen ist 4-Puls-ESEEM. Diese Methode wird verwendet, um tiefere Modulation der Basisfrequenzen und höhere Harmonische ihrer Kombination zu erreichen, um zusätzliche Informationen über Hyperfein- und Kernquadrupolparameter zu gewinnen [124, 125]. Zwischen zweitem und drittem Puls wird ein  $\pi$ -Puls hinzugefügt und es werden die Pulsabstände  $t_1$  und  $t_2$  gleichartig inkrementiert (Grafik 3.13). Durch die ersten beiden  $\pi/2$ -Pulse werden Kernkohärenzen „erzeugt“, welche dann durch den  $\pi$ -Puls-induzierten Populationsübertrag zwischen beiden  $m_S$ -Mannigfaltigkeiten gemischt werden. Der letzte  $\pi/2$ -Puls erzeugt wieder das stimulierte Echo, dessen Modulationen als Funktion der beiden variierten Zeiten aufgezeichnet werden. Unerwünschte, durch die Anzahl der Pulse zusätzlich erzeugte Echos können mit einem 4- oder 16-stufigen Phasenzyklus unterdrückt werden [126].

Erfolgt die Vergrößerung der Pulsabstände unabhängig voneinander, handelt es sich um ein HYSCORE-Experiment (*hyperfine sublevel correlation spectroscopy*), das von Höfer *et al.* [127] eingeführt wurde. Nach zweidimensionaler Fourier-Transformation zeigen sich in der Frequenzdomäne *cross peaks*, die auf Korrelationen zwischen Kernübergängen der verschiedenen Spinmannigfaltigkeiten hinweisen. Dadurch ist es mög-

lich, überlagerte Beiträge einzelner Spins voneinander zu trennen. Gegenüber ESEEM besteht zudem der Vorteil, dass man mit HYSORE große Hyperfeinanisotropien detektieren kann.

Nach Gemperle *et al.* hat der theoretische Ausdruck der Modulationsfunktion für ein zweidimensionales 4-Puls-ESEEM- beziehungsweise HYSORE-Experiment, bei dem ein Elektronenspin  $S = 1/2$  und ein Kernspin  $I = 1/2$  vorliegen, die Form [124, 126]:

$$V(\tau, t_1, t_2) = \frac{1}{2} \left( V_\alpha(\tau, t_1, t_2) + V_\beta(\tau, t_1, t_2) \right) \quad (3.40)$$

Mit den Summen- und Differenzfrequenzen  $\omega_+ = \omega_\alpha + \omega_\beta$  und  $\omega_- = \omega_\alpha - \omega_\beta$  ergeben sich dabei die Teilfunktionen zu:

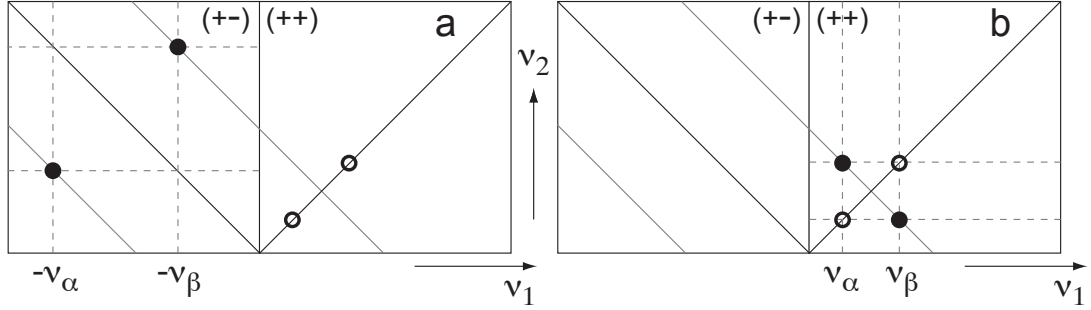
$$\begin{aligned} V_\alpha(\tau, t_1, t_2) &= 1 - k \left[ \frac{C_0}{4} + \frac{C_\alpha}{2} \cos \left( \omega_\alpha t_1 + \frac{\omega_\alpha \tau}{2} \right) + \frac{C_\beta}{2} \cos \left( \omega_\beta t_2 + \frac{\omega_\beta \tau}{2} \right) \right. \\ &\quad \left. + \frac{C_c}{2} \left\{ c^2 \cos \left( \omega_\alpha t_1 + \omega_\beta t_2 + \frac{\omega_+ \tau}{2} \right) - s^2 \cos \left( \omega_\alpha t_1 - \omega_\beta t_2 + \frac{\omega_- \tau}{2} \right) \right\} \right] \\ V_\beta(\tau, t_1, t_2) &= 1 - k \left[ \frac{C_0}{4} + \frac{C_\alpha}{2} \cos \left( \omega_\alpha t_2 + \frac{\omega_\alpha \tau}{2} \right) + \frac{C_\beta}{2} \cos \left( \omega_\beta t_1 + \frac{\omega_\beta \tau}{2} \right) \right. \\ &\quad \left. + \frac{C_c}{2} \left\{ c^2 \cos \left( \omega_\alpha t_2 + \omega_\beta t_1 + \frac{\omega_+ \tau}{2} \right) - s^2 \cos \left( \omega_\beta t_1 - \omega_\alpha t_2 - \frac{\omega_- \tau}{2} \right) \right\} \right], \end{aligned} \quad (3.41)$$

mit den Koeffizienten

$$\begin{aligned} C_0 &= 3 - \cos \omega_\beta \tau - \cos \omega_\alpha \tau - s^2 \cos \omega_+ \tau - c^2 \cos \omega_- \tau, \\ C_\alpha &= c^2 \cos \left( \omega_\beta \tau - \frac{\omega_\alpha \tau}{2} \right) + s^2 \cos \left( \omega_\beta \tau + \frac{\omega_\alpha \tau}{2} \right) - \cos \left( \frac{\omega_\alpha \tau}{2} \right), \\ C_\beta &= c^2 \cos \left( \omega_\alpha \tau - \frac{\omega_\beta \tau}{2} \right) + s^2 \cos \left( \omega_\alpha \tau + \frac{\omega_\beta \tau}{2} \right) - \cos \left( \frac{\omega_\beta \tau}{2} \right), \\ C_c &= -2 \sin \left( \frac{\omega_\alpha \tau}{2} \right) \sin \left( \frac{\omega_\beta \tau}{2} \right) \end{aligned} \quad (3.42)$$

Der Term  $C_0$  ist konstant und hat keinen Beitrag zur Modulation. In Gleichung 3.41 beschreiben die Terme mit dem Koeffizienten  $C_c$  die eigentliche Kreuzkorrelation zwischen  $\omega_\alpha$  und  $\omega_\beta$  und erzeugen die *cross peaks*  $(\omega_\alpha, \omega_\beta)$  und  $(\omega_\beta, \omega_\alpha)$  sowie  $(\omega_\alpha, -\omega_\beta)$

### 3. THEORETISCHE UND EXPERIMENTELLE METHODEN



**Abbildung 3.14:** a) Starke und b) schwache Hyperfeinkopplung in der Frequenzdomäne von HYSORE für  $S = 1/2$  und  $I = 1/2$ . Volle Kreise zeigen die Doppelquantenkorrelationen zwischen  $\nu_\alpha$  und  $\nu_\beta$  an. Leere Kreise sind die Korrelationen zwischen  $\nu_\alpha$  und  $\nu_\alpha$  sowie  $\nu_\beta$  und  $\nu_\beta$ , die durch nicht ideale Pulse hervorgerufen werden.

und  $(\omega_\beta, -\omega_\alpha)$ . Die Ausdrücke mit  $C_\alpha$  und  $C_\beta$  erzeugen Signale bei  $(0, \omega_\alpha)$ ,  $(0, \omega_\beta)$ ,  $(\omega_\alpha, 0)$  und  $(\omega_\beta, 0)$ .  $\delta$  gibt den Winkel der durch die beiden  $m_S$ -Zustände erzeugten, effektiven Felder am Kernort an und ist Teil der Modulationstiefe  $k = 4s^2c^2$ , die sich aus den Übergangswahrscheinlichkeiten der erlaubten und verbotenen Kernübergänge zusammensetzt:

$$I_e = c^2 = \cos^2 \frac{\delta}{2} = \frac{|\omega_I^2 - \frac{1}{4}(\omega_\alpha - \omega_\beta)^2|}{\omega_\alpha \omega_\beta}, \quad I_v = s^2 = \sin^2 \frac{\delta}{2} = \frac{|\omega_I^2 - \frac{1}{4}(\omega_\alpha + \omega_\beta)^2|}{\omega_\alpha \omega_\beta} \quad (3.43)$$

Grafik 3.14 stellt das Verhalten der Signale bei unterschiedlich starken Hyperfeinwechselwirkungen dar. Im Fall schwacher Hyperfeinkopplung, das heißt bei  $|\nu_I| < A/2$ , treten die Signale im ersten Quadranten, mit  $(++)$  bezeichnet, auf, weil die Anteile mit positiver Phasenmodulation ( $\sim c^2$ ) dominieren. Starke Hyperfeinwechselwirkungen  $|\nu_I| > A/2$  hingegen finden sich aufgrund hauptsächlich negativer Phasenmodulation ( $\sim s^2$ ) im zweiten Quadranten,  $(+-)$ , wieder [128]. Die Signalpunkte verbreitern sich mit zunehmender Hyperfeinanisotropie und werden zu Bögen. In den experimentellen Frequenzspektren sind die Signale, die mit 0 korreliert sind ( $(0, \omega_\alpha)$ ,  $(0, \omega_\beta)$ , etc.), nicht sichtbar, weil sie durch die Hintergrundkorrektur in beide Richtungen ausgelöscht werden. Man sieht also nur die Kreuzkorrelationen zwischen  $\omega_\alpha$  und  $\omega_\beta$ .

Für einen Kernspin  $I = 1$  komplizieren sich die Terme in einem Maße, wie es bereits



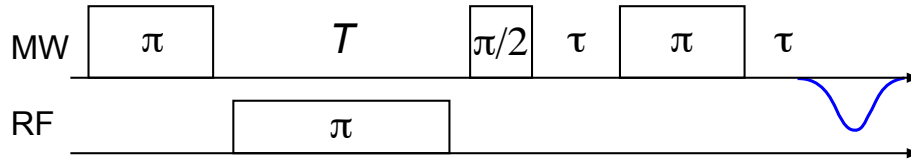
Mims für das 3-Puls-ESEEM zeigte (vergleiche Ausdruck (50) und (54) in [112]). Tyryshkin *et al.* fanden eine Lösung für Deuterium mit schwacher Kernquadrupolkopplung und beliebiger Hyperfeinkopplung, dabei wurde die Quadrupolkopplung als Störung behandelt. Aufgrund seiner Länge soll dies hier nicht wiedergegeben werden, Quelle [124] enthält den Ausdruck im Anhang. Für Stickstoff werden wegen der nicht vernachlässigbaren Kernquadrupolkopplung 18 Korrelationsübergänge erwartet, meist ist das experimentelle Spektrum jedoch von den Doppelquantenübergängen dominiert [129].

Die  $\pi$ -Puls wird durch ein Inversionsoptimierungsexperiment bestimmt, welches auf transienter Nutation beruht, wie im Abschnitt 3.3.1 erläutert wird. Ist keine vollständige Inversion des Echos möglich oder wird der Puls falsch gewählt, gibt es Korrelationen innerhalb der einzelnen Spinmannigfaltigkeiten, welche als Maxima auf der Diagonale von Quadrant (+ +) auftreten (Abbildung 3.14). Ein HYSORE-Experiment ist genau wie 3-Puls-ESEEM empfindlich auf *blind spots*, wie aus Gleichungsblock 3.41 ersichtlich ist. Sie zeigen sich in der Frequenzdomäne als Gitter, bei dem Frequenzen ausgeblendet werden, der Abstand beträgt  $\nu = n/\tau$  ( $n=0, 1, 2, \dots$ )

HYSORE unterliegt der Beschränkung, dass große Hyperfeinkopplungen weniger gut detektiert werden können. Begrenzungen bezüglich Leistung und Resonatorbandbreite sind Ursachen dafür, dass keine ausreichend große Anregungsbandbreite erreicht werden kann. Ein weiterer Nachteil der Modulationsmethoden zeigt sich anhand der ESEEM-Modulationstiefe  $k = (\omega_1 b / \omega_\alpha \omega_\beta)^2$  (Gleichung 3.34). Durch ihre Abhängigkeit von  $b$ , welches wiederum winkelabhängig ist, verschwindet die Modulation nicht nur für den Fall isotroper Hyperfeinkopplung, sondern auch, wenn Matrixhauptwerte erreicht werden. Dies bewirkt eine Verzerrung der Intensitäten im ESEEM-Spektrum. Die im folgenden beschriebene Methode ENDOR unterliegt diesen Einschränkungen nicht.

### 3.3.6 ENDOR

ENDOR verbindet als Mehrfachresonanzverfahren die Elektronenspinresonanz mit der Kernspinresonanz, die Abkürzung steht dementsprechend für *electron-nuclear double resonance*. Das Auflösungsvermögen der Kernspinresonanz wird genutzt, in-



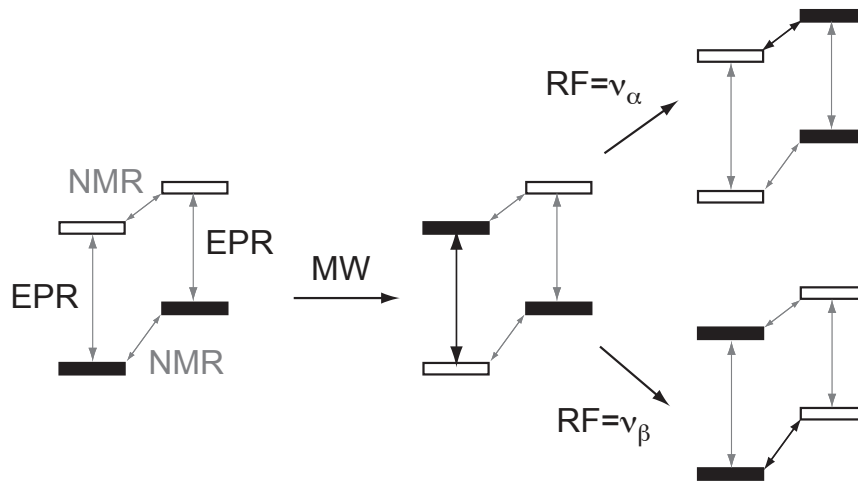
**Abbildung 3.15:** Pulssequenz im Davies-ENDOR mit Mikrowellen- und Radiofrequenzpulsen. Die Änderungen der Echoamplitude in Abhängigkeit von der Radiofrequenz ergeben das ENDOR-Spektrum.

---

dem Veränderungen der Kernniveaubesetzungen erzeugt werden, die man als Änderung der Echoamplitude eines EPR-Überganges detektiert. Gleichzeitig kommt einem die Empfindlichkeit der Elektronenspinresonanz dadurch zugute, dass Polarisation vom EPR-Übergang auf den Kernübergang übertragen wird [130, 131].

Abbildung 3.15 zeigt die Pulssequenz von Davies-ENDOR. Einem weichen, das heißt selektivem, Mikrowellen- $\pi$ -Puls (MW- $\pi$ -Puls) geringer Bandbreite folgt ein selektiver Radiofrequenz- $\pi$ -Puls (RF- $\pi$ -Puls), danach ein Hahn-Echo zur Abfrage [132]. Der RF-Puls wird während des Experimentes in seiner Frequenz verändert, typischerweise stochastisch verteilt, um Aufheizeffekte zu mindern. Diese kommen dadurch zustande, dass die ENDOR-Spulen sich wie Schwingkreise verhalten, in bestimmten Frequenzfenstern also Energie absorbieren und sich aufheizen. Durch die zufällige Verteilung der RF-Frequenzen wird die Einwirkdauer der Pulse in diesen kritischen Frequenzbereichen in deutlich kürzere Zeitintervalle zerlegt und immer wieder von Phasen ohne Aufheizung unterbrochen, so dass eine Retemperierung der Spulen stattfinden kann. Weiterhin ermöglicht die stochastische Verteilung eine höhere Schusswiederholrate, da nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit dieselben Kernspins direkt hintereinander angeregt werden. Man muss also nicht die Relaxation dieser Spins abwarten, um mit dem Experiment fortzufahren, sondern regt stattdessen bisher unbeeinflusste Spins an.

Anhand eines Systems mit  $S = I = 1/2$  wird in Abbildung 3.16 schematisch die Auswirkung der Pulse erklärt. Durch das äußere Magnetfeld sind sowohl elektronische als auch nukleare Energieniveaus nicht mehr entartet. Der weiche MW- $\pi$ -Puls regt selektiv einen der elektronischen Übergänge an, das heißt die Polarisation wird invertiert. Damit haben die beteiligten Kernniveaus, welche sich zuvor in ihrer Besetzung nur



**Abbildung 3.16:** Schematische Darstellung der Populationsänderungen beim ENDOR für  $S = I = 1/2$ . Für die Elektronenübergänge gilt  $\Delta m_S = \pm 1$ ,  $\Delta m_I = 0$ , für die NMR-/ENDOR-Übergänge, deren Frequenzen sich aus den hyperfeinverschobenen Kernfrequenzen ergeben (Gleichung 3.44), gilt  $\Delta m_S = 0$ ,  $\Delta m_I = \pm 1$ .

wenig unterschieden, nun einen deutlichen Besetzungszahlunterschied. Im Fall passender Frequenz transferiert der folgende, selektive RF-Puls Population zwischen den beiden zugehörigen Kernniveaus. Dies bewirkt eine Verringerung der Populationsdifferenz des EPR-Überganges, die Spinechoamplitude nimmt ab [133]. Voraussetzung für das Experiment ist, dass die longitudinale Relaxationszeit des Elektronenspins groß ist gegen den zeitlichen Abstand  $T$  zwischen erstem Puls und Hahn-Echo-Sequenz.

Für den Fall isotroper Hyperfeinwechselwirkung vereinfachen sich die Übergangsfrequenzen (Gleichung 3.33, Grafik 3.3) zu [134]:

$$\nu_\alpha = \left| \nu_I - \frac{A}{2} \right|, \quad \nu_\beta = \left| \nu_I + \frac{A}{2} \right| \quad (3.44)$$

Man kann also das Ausmaß der Hyperfeinaufspaltung direkt aus dem Linienabstand im Spektrum bestimmen. Eine veränderte Position der Linien kann entstehen, sofern die Hyperfeinaufspaltung die nukleare Zeeman-Wechselwirkung um mehr als das Doppelte übersteigt. Ist  $\nu_n > A/2$ , ordnen sich die Linien symmetrisch um die freie Frequenz an und sind mit  $A$  aufgespalten. Gilt jedoch  $\nu_n < A/2$ , findet eine Aufspaltung um das Zentrum  $A/2$  statt, wobei die Linien nun einen Abstand von  $2\nu_n$  haben.

Kerne mit  $I > 1/2$  zeigen zusätzlich eine Aufspaltung entsprechend der Kernquadrupolwechselwirkung [135–137], mit  $-I + 1 \leq m_I \leq I$ :

$$\nu_{\alpha,\beta} = \left| \nu_I \mp \frac{A}{2} + \frac{3}{2}P(2m_I - 1) \right| \quad (3.45)$$

Die Intensitätsverteilung von ENDOR-Spektren kann durch verschiedene Effekte beeinflusst werden. Neben Temperatureffekten und dem frequenzabhängigen Leistungsprofil des RF-Verstärkers, der sehr kleine Frequenzen durch die technische Umsetzung in Form eines Schwingkreises vergleichsweise wenig verstärkt, kann die Länge des MW- $\pi$ -Pulses  $t_p$  beispielsweise für eine Abschwächung oder Verstärkung von großen Hyperfeinkopplungen gegenüber kleinen gemäß [136, 138] sorgen. Hierbei wird  $A$  in MHz und  $t_p$  in  $\mu\text{s}$  angegeben:

$$I_{\text{ENDOR}} \propto \frac{1.4At_p}{0.7^2 - (At_p)^2} \quad (3.46)$$

Zur Asymmetrie der Spektren trägt auch das sogenannte *hyperfine enhancement* bei. Das eingestrahlte RF-Feld beeinflusst neben dem Kernspin auch den Elektronenspin, welcher wiederum am Kernort für eine Veränderung des effektiven RF-Feldes sorgt. Dadurch wird das Intensitätsverhältnis verschiedener Spinmannigfaltigkeiten zueinander beeinflusst, sowie jenes unterschiedlich starker Hyperfeinkopplungen. Dies spielt insbesondere dann eine Rolle, wenn die Hyperfeinwechselwirkung deutlich größer ist als die freie Frequenz des Kerns [84]:

$$\epsilon = \left| 1 + \frac{m_S a_{\text{iso}}}{\nu_I} \right| \quad (3.47)$$

Die vergleichsweise hohe Empfindlichkeit der EPR gegenüber der NMR hat ihre Ursache in der unterschiedlichen Besetzung der beteiligten Niveaus. Aus der Boltzmann-Verteilung für elektronische Niveaus (vergleiche Gleichung 3.5) geht ihr Besetzungsunterschied hervor, welcher über Gleichung 3.4 mit dem Bohrmagneton  $\mu_B$  zusammenhängt. Für Kernniveaus existiert ein analoger Ausdruck, in den das Kernmagneton  $\mu_N$  eingeht. Wie in Abschnitt 3.1.2 erklärt, besteht zwischen den beiden ein Unterschied von drei Größenordnungen, der sich demnach auch in den Boltzmann-Verteilungen

niederschlägt.

Der NMR-Anteil von ENDOR hingegen liefert die Auflösung. Bei etwa 350 mT, für Elektronenspins entspricht das X-Band, beispielsweise liegt die Linienbreite von NMR-Übergängen bei etwa 10 kHz. Sie ist um ein Vielfaches kleiner als die von EPR-Übergängen, welche im MHz-Bereich anzusiedeln ist.

Der wesentliche Vorteil von ENDOR gegenüber der EPR liegt in der erheblich geringeren Linienzahl. Die Anzahl  $n_e$  der erlaubten EPR-Übergänge wächst mit der Zahl  $n$  der Kernspins  $I_k$  multiplikativ:

$$n_e = \prod_{k=1}^n (2I_k + 1), \quad (3.48)$$

Hingegen vergrößert sich die Anzahl  $n_N$  der mit ENDOR beobachteten Kernübergänge nur additiv:

$$n_N = 2(2S + 1) \cdot \sum_{k=1}^n I_k \quad (3.49)$$

Das ENDOR-Spektrum vereinfacht sich weiter, wenn es sich um äquivalente Kerne handelt. Diese werden nicht unterschieden und sind im Spektrum als eine einzige Linie zu sehen. Das erhaltene Spektrum ist somit übersichtlicher und es kommt zu weniger Überschneidungen einzelner Linien.

### 3.3.7 Trennung von Kopplungen

Meist überlagern sich in einem Spektrum diverse Wechselwirkungen und Spezies, so dass eine Zuordnung der einzelnen Signale erschwert ist. Dem kann man entgegen wirken, indem man eine Trennung gemäß der Magnetfeldabhängigkeit beziehungsweise -unabhängigkeit vornimmt. Während die Zeeman-Wechselwirkung für Kerne und Elektronen mit zunehmendem Feld größere Aufspaltungen verursacht (Gleichungen 3.8 und 3.9), bleiben Aufspaltungen durch Hyperfein-, Kernquadrupol- und Austauschwechselwirkung unbeeinflusst. So macht man sich zum Beispiel bei der in Abschnitt 3.3.5 beschriebenen *exact cancellation* zu Nutze, dass durch die Feldabhängigkeit der Kern-Zeeman-Wechselwirkung diese mit der Wahl des richtigen äußeren

**Tabelle 3.1:** Für ENDOR relevante, ausgewählte Isotope mit Kernspin sowie Larmor-Frequenz im X- und Q-Band, was für den elektronischen Übergang etwa 9 GHz und 34 GHz bedeutet.

Kern	Spin $I$	$\nu_N$ in MHz bei	
		0.35 T	1.2 T
$^1\text{H}$	$1/2$	14.90	51.09
$^2\text{H}$	1	2.29	7.84
$^{14}\text{N}$	1	1.08	3.69
$^{15}\text{N}$	$1/2$	1.51	5.18
$^{56}\text{Fe}$	0	-	-
$^{57}\text{Fe}$	$1/2$	0.48	1.65

Magnetfeldes in die gleiche Größenordnung gebracht werden kann wie die Hyperfeinkopplung. Als Resultat kann man die Kern-Quadrupolkopplung unbeeinflusst beobachten.

Eine weitere Möglichkeit liegt im Isotopenaustausch. Durch eine unterschiedliche Neutronenanzahl im Kern kommt es für verschiedene Isotope zu unterschiedlichen Kernspins  $I$ . Wenn ein spinfreier Kern durch ein Isotop mit Kernspin ausgetauscht wird, wie es bei  $^{56}\text{Fe}$  und  $^{57}\text{Fe}$  der Fall ist, schafft man die Möglichkeit, ein ENDOR-Experiment durchzuführen. Andererseits lässt sich ein ENDOR- oder ESEEM-Spektrum stark vereinfachen, indem durch einen Wechsel von  $I = 1$  auf  $I = 1/2$  die Kernquadrupolkopplung ausgelöscht wird. Dies wird beispielsweise mit  $^{14}\text{N}$  und  $^{15}\text{N}$  durchgeführt.

Schließlich kann auch der Wechsel des Isotops betreffende Wechselwirkungen in ein komplett anderes Frequenzregime verschieben, so dass Überlagerungen mit anderen Signalen des Spektrums vermindert werden. Diesen Effekt macht man sich bei Wasserstoff und Deuterium zu Nutze, weil sich beide durch ihre gyromagnetischen Verhältnisse stark unterscheiden. So findet man im X-Band Protonenkopplungen um etwa 15 MHz wieder, während entsprechende Deuteronenwechselwirkungen um 2.3 MHz angeordnet sind. Tabelle 3.1 gibt die Kernspins und Larmor-Frequenzen der genannten Kerne im X- und Q-Band wieder, um die erläuterten Unterschiede zu verdeutlichen.

Separation von Signalen über die Relaxationszeiten der einzelnen Spezies stellt eine weitere Option dar, diese wurde in Abschnitt 3.3.3 dargelegt.

### 3.4 Einkristallmessungen

Die  $\mathbf{g}$ -Matrix ist durch ihre drei Hauptwerte  $g_x$ ,  $g_y$  und  $g_z$  charakterisiert. Findet das EPR-Experiment an einem Einkristall statt, fließt außerdem die Orientierung der Hauptachsen gegenüber dem Laborsystem, also zum äußeren Magnetfeld, in die Messung ein. Sind das Hauptachsensystem von  $\mathbf{g}$  ( $x, y, z$ ) und das Referenzachsensystem ( $a, b, c$ ) kollinear, ist die Orientierung der Hauptwerte:

$$g^2 = g_{xx}^2 l_a^2 + g_{yy}^2 l_b^2 + g_{zz}^2 l_c^2 \quad (3.50)$$

Dabei sind die  $l_i$  die Richtungskosini zwischen der Richtung des Magnetfeldes  $\mathbf{B}$  und den  $\mathbf{g}$ -Hauptachsen. Normalerweise sind die beiden Achsensysteme aber nicht kollinear, so dass sich der Ausdruck erweitert zu:

$$\begin{pmatrix} g_{xx}^2 & & \\ & g_{yy}^2 & \\ & & g_{zz}^2 \end{pmatrix} = \mathbf{R} \cdot \begin{pmatrix} g_{aa}^2 & g_{ab}^2 & g_{ac}^2 \\ g_{ba}^2 & g_{bb}^2 & g_{bc}^2 \\ g_{ca}^2 & g_{cb}^2 & g_{cc}^2 \end{pmatrix} \cdot \mathbf{R}^T, \quad (3.51)$$

$$\text{mit } \mathbf{R} = \begin{pmatrix} l_{xa} & l_{xb} & l_{xc} \\ l_{ya} & l_{yb} & l_{yc} \\ l_{za} & l_{zb} & l_{zc} \end{pmatrix} \quad (3.52)$$

Diese Richtungskosini lassen sich kürzer durch Euler-Winkel ausdrücken, es ist allerdings darauf zu achten, in welcher Reihenfolge man die einzelnen Rotationen hintereinander durchführt. In der vorliegenden Arbeit wird die ZYZ-Konvention verwendet (siehe Anhang A).

Zur Bestimmung der jeweiligen Orientierungen werden einzelne, beliebig im Probenröhrchen ausgerichtete Kristalle um eine Achse senkrecht zum äußeren Magnetfeld um mindestens  $180^\circ$  gedreht und die Winkelabhängigkeit der EPR-Übergänge bestimmt. Dabei entspricht aus Symmetriegründen das Spektrum bei  $0^\circ$  dem bei  $180^\circ$ , jenes bei  $10^\circ$  dem bei  $190^\circ$  und so weiter. Man hat also ein Maß, ob die Drehung präzise ausgeführt wurde.

Je nach Symmetrie des vorliegenden Kristallsystems wird eine unterschiedliche An-

zahl von magnetisch äquivalenten Molekülen (*sites*) in der Einheitszelle erwartet. Die in Hydrogenasen vorliegende  $P2_12_12_1$ -Raumgruppe [57, 139] lässt die Linien vier solcher Moleküle erwarten. Sollte das Magnetfeld in einer kristallografischen Ebene liegen, fallen jeweils zwei der Linien zusammen, bei Übereinstimmung der Magnetfeldachse mit einer kristallografischen Achse bleibt eine vierfach überlagerte Linie. Die Anzahl der Linien kann sich durch Aufspaltungen, wie sie aus  $J$ - oder Hyperfeinkopplung resultieren, vervielfachen, so dass komplexe Muster sichtbar sind.

Die Orientierungen der vier *sites* sind durch Verschraubungen miteinander verbunden, das heißt, man kann aus einer Ausrichtung durch  $180^\circ$ -Rotation um jeweils eine Kristallachse die drei weiteren Ausrichtungen errechnen.

## 3.5 Probenvorbereitung

### 3.5.1 MBH

Die Proben der MBH und ihre Mutationsvarianten wurden freundlicherweise von Johannes Fritsch und Stefan Frielingsdorf aus der AG Lenz/Friedrich der HU Berlin präpariert. Eine ausführliche Darstellung findet sich in der Dissertation von Johannes Fritsch [140] sowie bei Goris *et al.* [56] und Frielingsdorf *et al.* [58]. Die Kristallproben wuchsen im Beisein von Luftsauerstoff aus aerob gewachsenem Protein [57]. Die  $^{15}\text{N}$ -enthaltenden MBH-Proben entstanden aus Zellen, die in Fruktose-Glyzerin-Minimalmedium aufwuchsen, welches mit  $^{15}\text{N}$ -haltigem (99.9%) Ammoniumchlorid versetzt wurde.

Portionen der einzelnen Proteinlösungen mit einer Proteinkonzentration von jeweils etwa  $500\ \mu\text{M}$  wurden in Quarzröhrchen mit 3 beziehungsweise 4 mm Außendurchmesser abgefüllt (30 bzw.  $100\ \mu\text{l}$ ) und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 3.5.2 SH

Die SH-Proben wurden von Lars Lauterbach, ebenfalls aus der AG Lenz/Friedrich, zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigungsprozedur wurde von Lauterbach *et al.* [72]



beschrieben. Um den Austausch zwischen  $^1\text{H}_2\text{O}$ - und  $^2\text{H}_2\text{O}$ -Puffer zu vollziehen, wurde die entsprechende Probe 5-fach mit 50 mM  $\text{KPO}_4$  in  $^2\text{H}_2\text{O}$  (pD 7.0), 5% Glycerin, aufgefüllt. Durch Ultrafiltration mit Millipore-Amicon-Ultra-0.5-Filtern wurde die Probe zurück auf das Ausgangsvolumen konzentriert. Dieser Vorgang erfolgte vier Mal bis zu einer schlussendlichen Konzentration von  $>99\%$   $^2\text{H}_2\text{O}$ . Die Kontrollprobe wurde identisch behandelt, jedoch mit  $^1\text{H}_2\text{O}$ -Puffer gewaschen.

Anschließend wurden die Proteinlösung (etwa 70  $\mu\text{M}$ ) mit 120 mM NADH unter anaeroben Bedingungen reduziert, in Quartz-EPR-Röhrchen abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 3.6 Instrumente

*Continuous-wave*-EPR-Messungen wurden an einem Eigenbau-X-Band-Spektrometer ausgeführt. Dieses umfasste eine ER 041 MR Mikrowellenbrücke der Firma Bruker BioSpin (Rheinstetten, Deutschland), welche von einem ER 048 R Brückenkontroller derselben Firma gesteuert wurde, einen E088 100-gesteuerten (Bruker) Elektromagneten von AEG, sowie einen Mikrowellenresonator des Typs 4122 SHQE-W1, ebenfalls von Bruker. Lock-in-Verstärkung wurde durch einen SR810 DSP Lock-in-Verstärker von Stanford Research Systems erreicht, die Mikrowellenfrequenz wurde durch einen Agilent 53181A Frequenzzähler bestimmt. Ein ESR 910-Kryostat ermöglichte kryogene Temperaturen, die mittels einer ITC503S-Temperatursteuereinheit reguliert wurden. Beide Geräte wurden von Oxford Instruments hergestellt.

Die *cw*-Spektren wurden bei 10 K beziehungsweise 80 K aufgenommen, dabei wurde eine Modulationsamplitude von 1 mT und eine Modulationsfrequenz von 100 kHz verwendet, die Leistung belief sich auf  $P_{\text{mw}} = 2 \text{ mW}$ .

Für gepulste Q-Band-EPR- und ENDOR-Messungen stand ein Elexsys E580-Spektrometer von Bruker zur Verfügung, welches mit einer SuperQ-FT-U-Mikrowellenbrücke und einem selbstgebauten Q-Band-ENDOR-Resonator ausgerüstet war. Niedrige Temperaturen wurden durch einen Oxford CF935-Flusskryostaten erreicht und mit einem ITC503S kontrolliert. Die Davies-ENDOR-Experimente wurden mit einer ENDOR-DICE-Box von Bruker aufgenommen, unter Zuhilfenahme eines Amplifier

Research 250A250A RF-Verstärkers.

Bei 34 GHz wurde für die field-swept-echo-Spektren (FSE) eine Hahn-Echo-Pulssequenz verwendet, mit 32 oder 40 ns  $\pi$ -Pulslänge. Die ENDOR-Messungen im stochastischen Modus basierten auf der Davies-ENDOR-Sequenz  $\pi_{\text{mw},1} - \pi_{\text{rf}} - (\pi/2)_{\text{mw},2} - \tau - \pi_{\text{mw},2}$ , mit den Pulslängen  $\pi_{\text{mw},1} = 128$  ns,  $\pi_{\text{mw},2} = 40$  ns und  $\pi_{\text{rf}} = 20$   $\mu$ s für Protonen bzw. 60  $\mu$ s für Stickstoff.

Gepulste X-Band-EPR-, ESEEM-, sowie HYSCORE-Spektroskopie wurde an einem Eleksys E680 Spektrometer mit einer SuperX-FT Mikrowellenbrücke von Bruker durchgeführt, dabei kamen dielektrische Ringresonatoren von Bruker der Typen ER 4118X-MD4-EN5 oder ER 4118X-MD4-EN3 zur Anwendung. Mikrowellenverstärkung erfolgte durch einen TWT von Applied Systems Engineering, Inc., Modell 117X, mit einer Ausgangsleistung von 1 kW.

Für die FSE-Messungen wurde eine Hahn-Echo-Pulssequenz genutzt, die ESEEM-Messungen basieren auf der Dreipuls-ESEEM-Sequenz  $\pi/2 - \tau - \pi/2 - t_1 - \pi/2$ . Typischerweise wurde  $\pi/2 = 16$  ns verwendet, sowie ein vierschrittiger Phasenzzyklus. Die HYSCORE-Spektren wurden mit der HYSCORE-Pulssequenz  $\pi/2 - \tau - \pi/2 - t_1 - \pi - t_2 - \pi/2$  aufgenommen. Ein 16-stufiger Phasenzzyklus wurde angewandt. Der  $\pi$ -Puls wurde jeweils durch Inversionsoptimierung angepasst und weicht teilweise von der doppelten Länge des  $\pi/2$ -Pulses (16 ns) ab.

Auswertung und Bearbeitung der Spektren und Simulationen wurden mit der Toolbox EasySpin (Version 5.0.2) [141, 142] für MATLAB (R2012b, The MathWorks) durchgeführt.

---

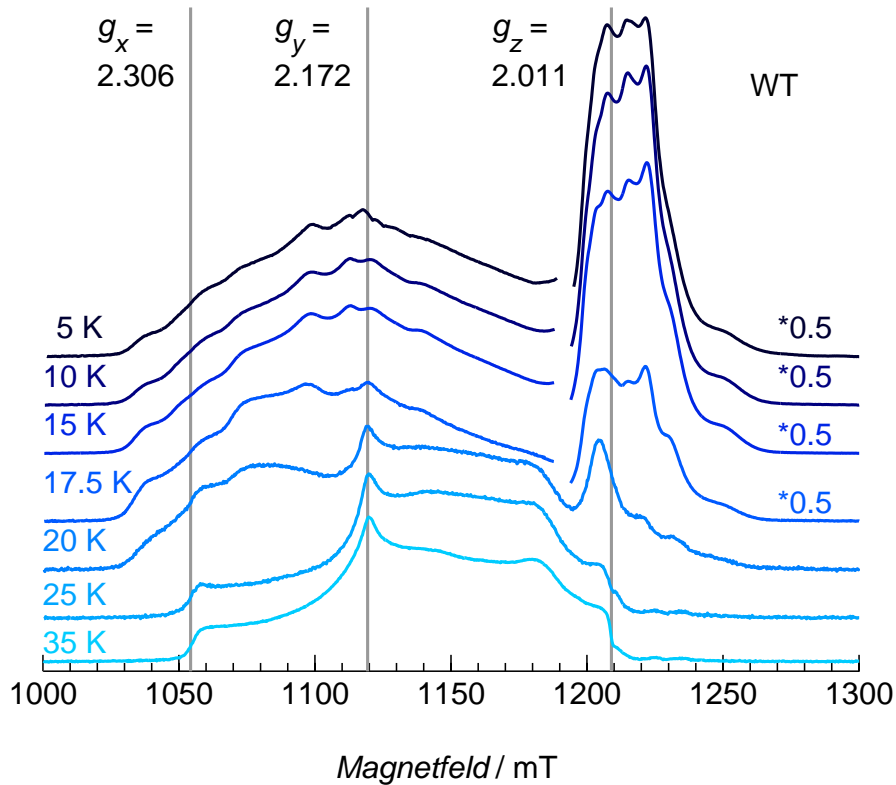
# EPR-EIGENSCHAFTEN DER MBH

---

Zur Bestimmung der elektronischen Struktur der Eisen-Schwefel-Cluster und des aktiven Zentrums eignen sich temperaturabhängige Feldspektren (FSE, *field-swept echo*) an gefrorenen MBH-Lösungen ebenso wie an Einkristallen. Erstere können Auskunft geben über die Hauptwerte der  $g$ -Matrizen der einzelnen Cluster. PEANUT-Messungen ermöglichen die Zuordnung von Spinzuständen dieser Cluster. Aus den Kristallen hingegen lassen sich die Orientierungen der  $g$ -Matrizen gegenüber dem Laborsystem und den Achsen der Elementarzelle bestimmen und die Wechselwirkung der Cluster untereinander, namentlich die Austauschwechselwirkung, welche im vorliegenden Abstandsbereich von 10 Å eine bedeutende Rolle spielt.

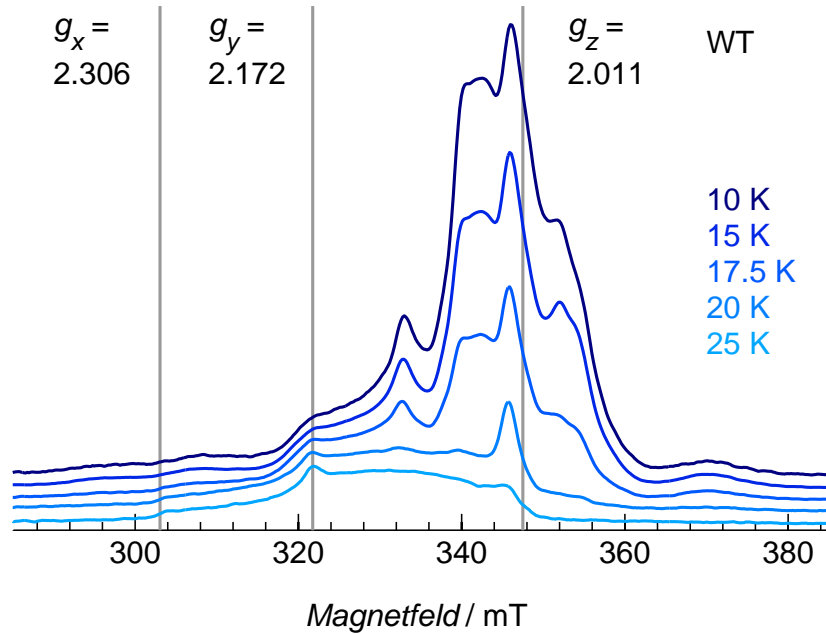
## 4.1 Oxidierte, gefrorene MBH-Lösung

Im *as-isolated*-Zustand der MBH sind [NiFe]- sowie proximaler und medialer Cluster paramagnetisch, also mittels EPR detektierbar. Abbildung 4.1 gibt Q-Band-Feldspektren des Wildtyps von 5 K bis 35 K wieder. Die [FeS]-Cluster sind aufgrund der schnelleren Relaxation nur bei tiefen Temperaturen zu finden, sie weisen eine geringe  $g$ -Anisotropie auf und haben Signale nahe  $g = 2$  (um 1220 mT). Korreliert mit dem Sichtbarwerden der [FeS]-Cluster zeigt sich im Temperaturbereich  $\leq 20$  K auch



**Abbildung 4.1:** Q-Band-FSEs des Wildtyps (WT) der MBH bei verschiedenen Temperaturen (kalt nach warm: dunkel- bis hellblau). Grau markiert sind die  $g$ -Werte von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ . Messbedingungen: MW-Frequenz 34.003 MHz.

eine Aufspaltung der  $g$ -Werte des Nickels, verursacht durch die Austauschkopplungen der drei paramagnetischen Spezies [55]. Mit zunehmender Temperatur vermindert sich aufgrund der  $T$ -Abhängigkeit der Boltzmannverteilung die Intensität der Nickel-signale. Es sind mehr Mittelungen notwendig, um ein vergleichbares Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Ab etwa 35 K zeigt sich ausschließlich das entkoppelte aktive Zentrum in Form von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ , mit den  $g$ -Werten  $g = (2.306, 2.172, 2.011) \pm 0.001$ . Dies stimmt mit Werten überein, die zuvor für die MBH gefunden wurden:  $g = (2.300, 2.173, 2.010)$  [55]. Auch andere Hydrogenasen weisen derartige  $g$ -Hauptwerte auf, als Vertreter sauerstofftoleranter Hydrogenasen sind dies zum Beispiel Hydrogenase I (Hase I) aus *A. aeolicus* mit  $g = (2.300, 2.171, 2.010)$  [143] und Hydrogenase-1 (Hyd-1) aus *E. coli* mit  $g = (2.314, 2.174, 2.010)$  beziehungsweise  $g = (2.297, 2.172, 2.010)$  [61]. Sauerstoffempfindliche Hydrogenasen, wie jene aus *D. vulgaris* Miyazaki F oder



**Abbildung 4.2:** X-Band-FSEs des Wildtyps (WT) der MBH bei verschiedenen Temperaturen, Farben entsprechen denen in Abbildung 4.1. Grau markiert sind die  $g$ -Werte von Ni<sub>r</sub>-B. Messbedingungen: MW-Frequenz 9.781 MHz.

*D. fructosovorans*, haben ähnliche Werte:  $g = (2.333, 2.161, 2.010) \pm 0.001$  [22, 144] und  $g = (2.336, 2.157, 2.005)$  [18].

Auch die X-Band-Spektren bei verschiedenen Temperaturen zeigen die mit dem Auftreten der schnell relaxierenden [FeS]-Cluster bei  $\leq 20$  K sichtbar werdende Wechselwirkung der einzelnen Cluster untereinander (Abbildung 4.2). Hier sind die  $g$ -Werte aufgrund der geringeren Frequenz und Magnetfeldstärke weniger gut separiert, dafür tritt die  $J$ -Kopplung dominanter in Erscheinung. Es kommt zu charakteristischen Signalen, die so in den Q-Band-Spektren nicht auftreten, zum Beispiel bei  $g = 1.89$  oder  $g = 2.1$  (370 mT beziehungsweise 332 mT).

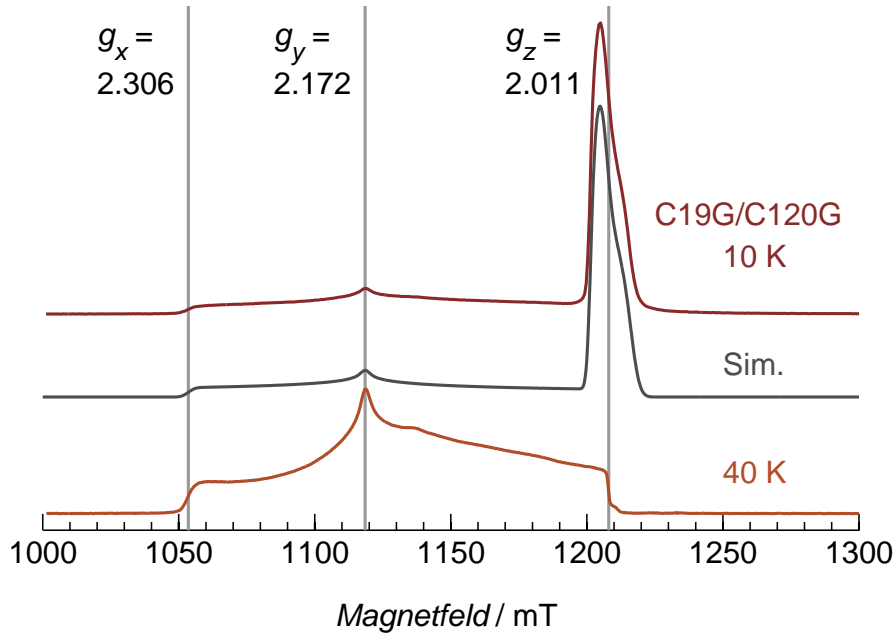
Die von Saggiu *et al.* [55] durchgeführten Q-Band-Messungen und Simulationen an der MBH zeigten, dass die beobachtete Aufspaltung der Nickelsignale nicht durch zwei  $S = 1/2$ -Spezies allein hervorgerufen werden, sondern wahrscheinlich ein drittes paramagnetisches Zentrum beteiligt ist. Während zu diesem Zeitpunkt von zwei Zentren ausgegangen wurde, die direkt an das aktive Zentrum koppeln, zeigte die Kristall-

struktur von Fritsch *et al.* [57], dass es neben dem proximalen Cluster kein Zentrum in vergleichbarer Nähe zum [NiFe]-Cluster gibt. Es steht demnach zu vermuten, dass über den proximalen Cluster eine  $J$ -Kopplung vom medialen Cluster an das aktive Zentrum vermittelt wird. Demnach würde der proximale Cluster für eine relativ starke Aufspaltung der Nickelsignale sorgen, die dann von einer schwächeren Aufspaltung überlagert wird. Bei einer Beteiligung von ausschließlich  $S = 1/2$ -Zentren würde man vier Linien pro  $g$ -Wert von Nickel erwarten. Für die sauerstofftolerante Hydrogenase I aus *Aquifex aeolicus*, die ebenso wie die MBH einen proximalen [4Fe3S]-Cluster enthält, wird ein derartiges lineares Kopplungsschema vermutet [143].

Um die einzelnen, an der Kopplung beteiligten Cluster zu separieren und zu charakterisieren, wird im Folgenden auf verschiedene Trennungsmöglichkeiten eingegangen. Zum einen werden durch Mutationen unterschiedliche Cluster für die EPR ausgeblendet, zum anderen soll beleuchtet werden, ob es möglich ist, die Zentren anhand ihrer Relaxationseigenschaften zu unterscheiden. Nutationsmessungen können Auskünfte über die Spinzustände der Cluster geben und gegebenenfalls auf diese Weise eine Abgrenzung von Teilspektren gestatten. Über Kristallmessungen können Orientierungen der  $g$ -Hauptwerte der Cluster zueinander und möglicherweise innerhalb der einzelnen Cluster selbst bestimmt werden.

##### 4.1.1 Mutationsvarianten

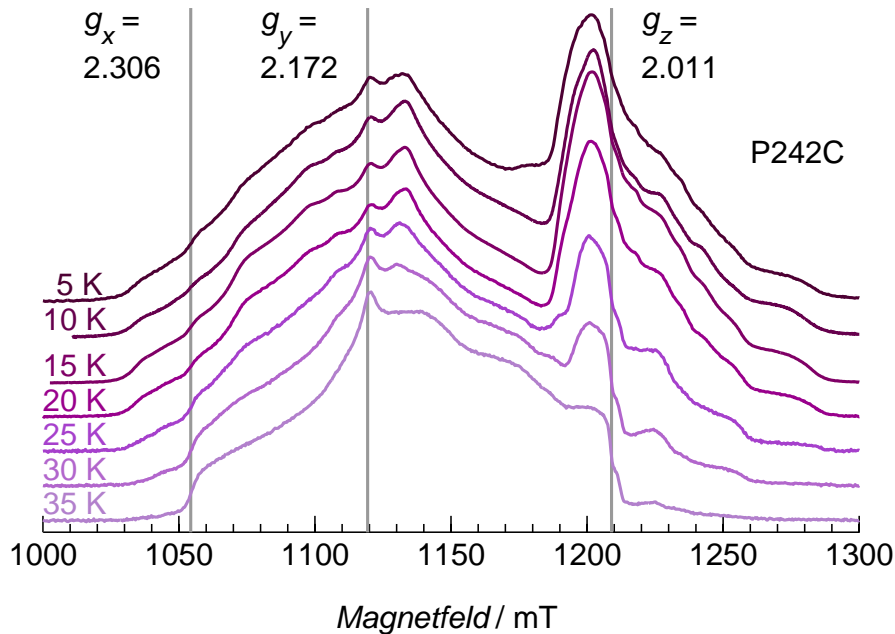
Die proximale C19G/C120G-Mutante zeigt ausschließlich ungekoppeltes  $\text{Ni}_r\text{-B}$ , auch die Clusterregion ist weniger strukturiert als beim Wildtyp (Abbildung 4.3). Durch den Austausch zweier Cysteine durch Glycine, wie sie in Standardhydrogenasen vorkommen, erfährt der proximale Cluster keine Aufweitung aus der kubanen Form heraus und ist im oxidierten Zustand nicht EPR-aktiv. Diese Mutante verhält sich stark wie Standardhydrogenasen, insbesondere was ihre Sauerstofftoleranz betrifft [56] und weist auch in der EPR viele Ähnlichkeiten zur Standardform aus *D. vulgaris* Miyazaki F auf [55]. Abbildung 4.3 stellt das 10 K- und 40 K-Spektrum dar, ebenso enthalten ist die Simulation der beiden paramagnetisch vorliegenden Cluster. Das Feldspektrum oberhalb von 35 K bestätigt die  $\text{Ni}_r\text{-B}$ - $g$ -Werte des Wildtyps aus dem vorherigen Abschnitt, zudem können aus dem Tieftemperaturspektrum die  $g$ -Hauptwerte



**Abbildung 4.3:** Q-Band-FSEs der C19G/C120G-Variante der MBH bei 10 K (dunkelbraun) und 40 K (hellbraun). In Grau die Simulation des 10-K-Spektrums mit folgenden  $g$ -Werten:  $g(\text{Ni}_r\text{-B}) = (2.306, 2.172, 2.011)$ , zusätzlich senkrecht markiert, und  $g([\text{3Fe4S}]) = (2.022, 2.016, 1.997)$ .

des ungekoppelten medialen Clusters bestimmt werden zu  $g = (2.022, 2.016, 1.997) \pm 0.001$ . Für  $\text{Ni}_r\text{-B}$  wurde eine FWHM-Linienbreite von 1.2 mT und ein  $g$ -Strain von  $(0.010, 0.005, 0.003)$  verwendet, beim  $[\text{3Fe4S}]$ -Zentrum belaufen sich diese Werte auf 2.3 mT und  $(0.0020, 0.0065, 0.0085)$ . Die hier vorliegenden Q-Band-Messungen bestätigen die X-Band-*cw*-Messungen von Jaqueline Priebe ( $g = (2.020, 2.012, 1.995)$ , [145]) und sind vergleichbar mit den  $g$ -Werten anderer Hydrogenasen. Für die Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F wurde  $g = (2.0257, 2.0174, 2.0110)$  ermittelt [146–148], in Hase I aus *A. aeolicus* belaufen sich die Werte auf  $g = (2.022, 2.018, 2.010)$  [143].

Die Messungen verdeutlichen, dass der ungewöhnliche proximale Cluster der MBH essentiell für die Kopplung an das aktive Zentrum ist. Liegt er modifiziert in einer nicht paramagnetischen Form vor, kann auch der mediale Cluster keine Aufspaltung der Nickelsignale hervorrufen.

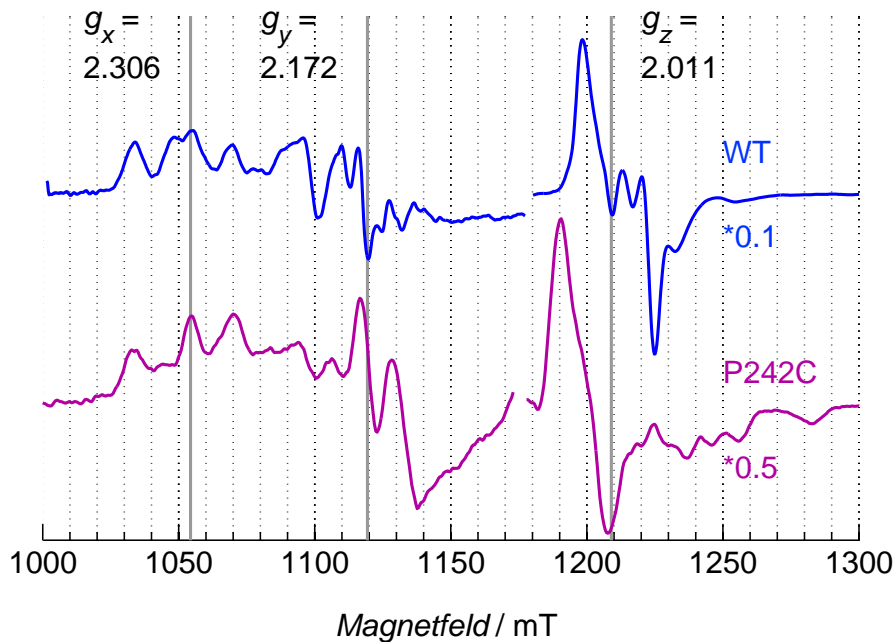


**Abbildung 4.4:** Q-Band-FSEs der P242C-Variante der MBH bei 5 K (dunkelviolett) bis 35 K (flieger). In Grau die  $g$ -Werte von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ .

Als nächstes soll die Mutationsvariante P242C des medialen Clusters betrachtet werden. Nach Rousset *et al.* [9] bewirkt ein Austausch des Prolins 242 gegen ein Cystein an diesem Cluster seine Umwandlung in einen  $[\text{4Fe4S}]$ -Cluster mit gleichzeitiger Absenkung seines Mittelpunktpotentials. Dieser neue Cluster sollte also unter oxidierenden Bedingungen diamagnetisch sein und keine Austauschwechselwirkung zeigen. Es wird erwartet, dass die Transformation des medialen Clusters das Aufspaltungsmuster der Nickelsignale deutlich vereinfacht und Rückschlüsse auf die Natur des proximalen Clusters und sein Bindungsverhalten an das aktive Zentrum ermöglicht.

Abbildung 4.4 gibt die Q-Band-Feldspektren der P242C-Probe zwischen 5 K und 35 K wieder. Der Bereich der  $[\text{FeS}]$ -Cluster zeigt im Vergleich zum Wildtyp deutlich verminderte Signalintensität, was wie erwartet darauf hindeutet, dass der mediale Cluster nicht mehr am Spektrum beteiligt ist. Es gibt hingegen keine Vereinfachung der Aufspaltungsstruktur von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ : Es liegt keine Zweierstruktur vor, wie sie bei  $J$ -Kopplung zwischen zwei  $S = 1/2$ -Zentren auftreten würde. Das Ausmaß der Aufspaltung auf  $g_x$  von  $\text{Ni}_r\text{-B}$  ist mit dem Wildtyp vergleichbar ( $\approx 1030\text{-}1075\text{ mT}$ ), allerdings



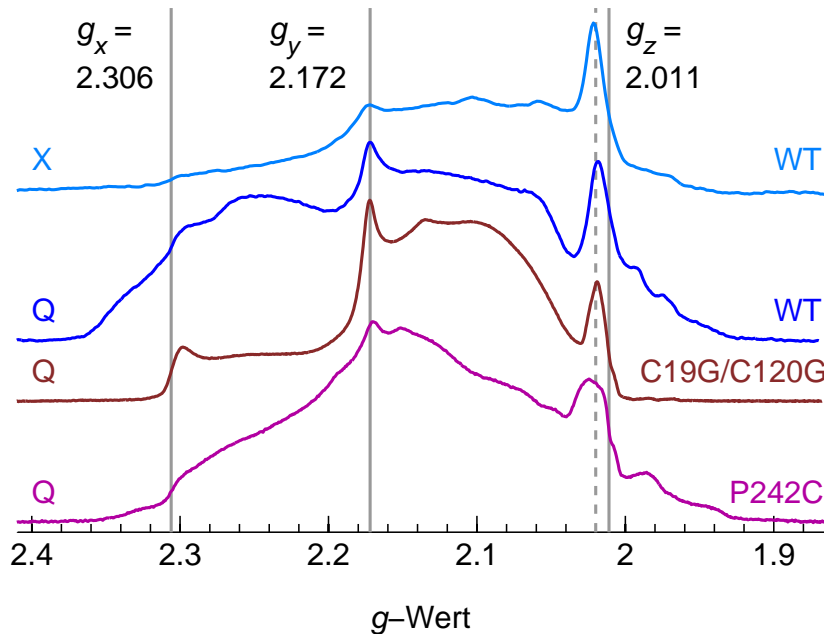


**Abbildung 4.5:** Pseudomodulierte Q-Band-FSEs der P242C-Variante (violett) und des Wildtyps (blau) bei 5 K. In Grau die  $g$ -Werte von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ .

gibt es direkt um  $g_x$  herum Unterschiede, die in den pseudomodulierten Spektren offenkundig werden (Abbildung 4.5). Während die Signale um  $g = 2.35$ ,  $2.27$  und  $2.21$  in Wildtyp wie Mutante identisch sind, weist die P242C direkt bei  $g_x$  und  $g_y$  Signale auf, die auf ungekoppeltes Nickel hinweisen. Dies könnte, wie von Jacqueline Priebe bereits aus den X-Band-*cw*-Messungen vermutet [145], darauf hindeuten, dass Heterogenitäten innerhalb der Probe vorliegen, die in erster Linie den proximalen Cluster und seine Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum betreffen. Möglich sind auch Defekte, so dass nur ein Teil der Proteine intakt und funktionsfähig ist. Die gegenüber dem Wildtyp stark verminderte Aktivität (15%, [140]) stützt diese Annahme.

Neben seiner geringeren Intensität zeigt der [FeS]-Bereich der Mutationsvarianten auch eine andere Struktur als der Wildtyp und umfasst einen größeren Feldbereich als dieser. Oberhalb von 1230 mT treten mehr Signale auf, sie ziehen sich bis zu 1290 mT hin, wohingegen sie im Wildtyp nur bis etwa 1270 mT reichen.

Entweder liegt in der P242C ein weiteres Spinzentrum vor, welches mit Nickel und dem proximalen Cluster koppelt und dadurch den als Kopplungspartner entfallenden



**Abbildung 4.6:** FSEs der MBH. Blau: WT, X- bzw. Q-Band, 20 K. Braun: C19G/C120G-Variante, Q-Band, 22.5 K. Violett: P242C-Variante, Q-Band, 30 K.

[3Fe4S]-Cluster kompensiert – möglicherweise handelt es sich um eine abweichende Form des medialen [4Fe4S]-Clusters –, oder der proximale Cluster hat einen Spin  $S > 1/2$ , der für das komplexe Aufspaltungsmuster sowohl in der Mutationsvarianten als auch im Wildtyp sorgt. Auf diese Möglichkeit wird in Abschnitt 4.1.3 eingegangen.

Vergleicht man das Spektrum der C19G/C120G-Variante im Q-Band bei 22.5 K mit denen des Wildtyps bei 20 K in X- und Q-Band (Abbildung 4.6 blau und braun), also in dem Temperaturbereich, in dem die [FeS]-Cluster erstmals auftreten, wird eine ähnliche Struktur um etwa  $g = 2.02$  (gestrichelte Linie) offenbar. In der vorherigen Auswertung der C19G/C120G-Variante wurde hierfür eine Zuordnung zum medialen Cluster getroffen. Es ist wahrscheinlich, dass es sich auch im Wildtyp um den medialen Cluster handelt. Seiner geringen Breite nach zu urteilen ist er deutlich weniger stark durch Austauschkopplung mit dem proximalen Cluster verbunden als dieser mit dem aktiven Zentrum.

Zieht man das entsprechende Spektrum der P242C-Variante hinzu (Abbildung 4.6 violett), fällt auf, dass diese Probe auch bei 30 K noch [FeS]-Signale zeigt (vergleiche

Abbildung 4.4). Sie befinden sich in einem ähnlichen Bereich wie er für den medialen Cluster bestimmt wurde, sind aber klar breiter. Da in dieser Mutationsvariante kein medialer Cluster in paramagnetischer Form vorliegt, steht zu vermuten, dass der proximale Cluster zumindest teilweise ähnliche  $g$ -Werte aufweist, wie sie zuvor für den medialen Cluster gefunden wurden.

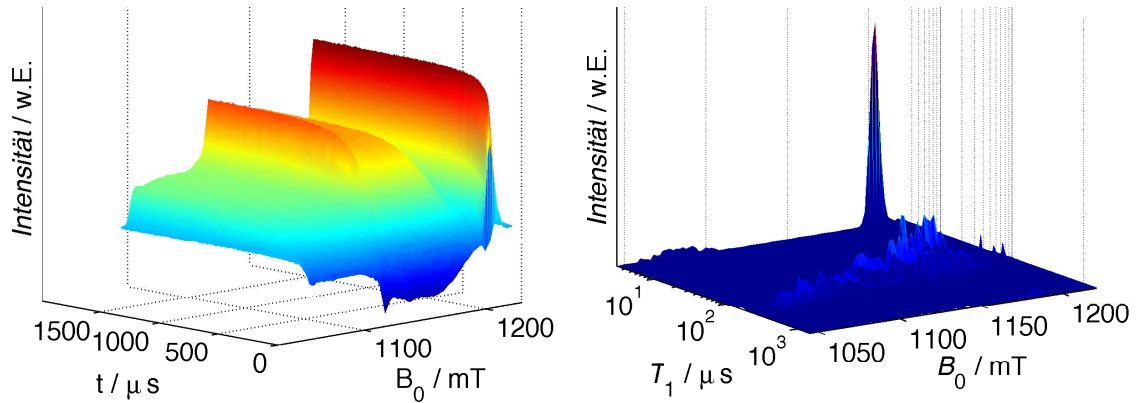
Das Auftreten von [FeS]-Signalen bei höherer Temperatur deutet außerdem darauf hin, dass der Wegfall des medialen Clusters über die veränderte Austauschkopplung auch die Relaxationseigenschaften der anderen Cluster beeinflusst. Im folgenden Abschnitt wird daher das Relaxationsverhalten von Wildtyp und Mutationsvarianten betrachtet.

### 4.1.2 Relaxationsmessungen

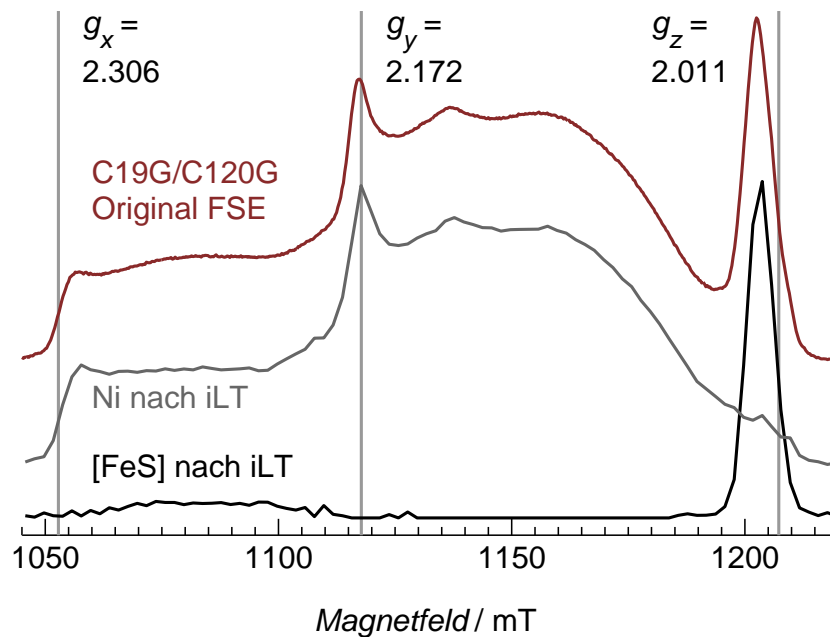
**C19G/C120G.** Feldabhängige  $T_1$ -Messungen wurden zuerst für die C19G/C120G-Variante der MBH vorgenommen, da hier aufgrund der relativ großen Distanz die Cluster ungekoppelt vorliegen und sich kaum gegenseitig beeinflussen. Das bei 20 K durchgeführte *inversion-recovery*-Experiment ist in Abbildung 4.7 links gezeigt, bereits hier ist die unterschiedliche Relaxation von Nickel und medialem Cluster sichtbar. Wie im theoretischen Teil dieser Arbeit beschrieben (Abschnitt 3.3.3), wurde an diesem Datensatz das Äquivalent einer inversen Laplace-Transformation (iLT) durchgeführt, also summierte, exponentielle Zerfallskurven der Form  $G(R, T_1) = 1 - e^{-RT_1}$  an die einzelnen Zeitspuren angepasst. Die Raten der Relaxationszeiten wurden daraufhin gegen das Magnetfeld aufgetragen, um nach  $T_1$  getrennte Teilspektren zu erhalten (Abbildung 4.7 rechts).

Folgend wurden die Feldspektren für verschiedene Relaxationszeiten summiert, dabei wurde  $T_1 = 20 \mu\text{s}$  als Grenze gewählt: Die langsamen Komponenten, deren maximale Intensität sich um  $T_1 = 100 \mu\text{s}$  konzentriert, werden Nickel zugeordnet, der schnelle mediale Cluster hingegen  $T_1$ -Zeiten unterhalb von  $20 \mu\text{s}$ . Abbildung 4.8 stellt diese Teilsummen dem normalen Feldspektrum gegenüber. Es ist ersichtlich, dass in beiden so gewonnenen Spektren jeweils nur das gewünschte paramagnetische Zentrum sichtbar ist. Für den Fall der C19G/C120G-Variante eignet sich die inverse Laplace-Transformation also zur spektralen Trennung.

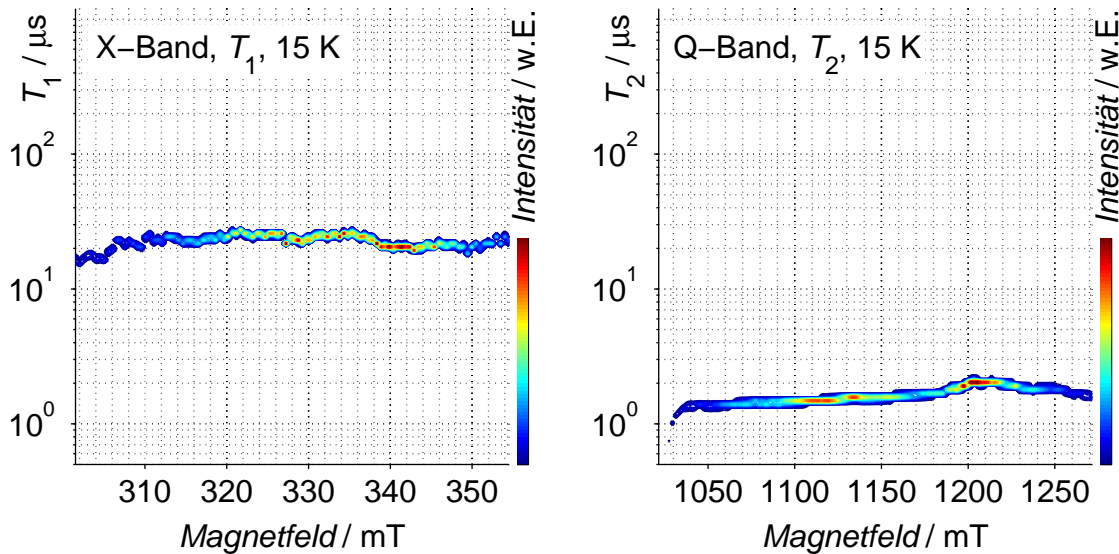
#### 4. EPR-EIGENSCHAFTEN DER MBH



**Abbildung 4.7:** Links: Feldabhängiges  $T_1$ -inversion-recovery-Spektrum im Q-Band der C19G/C120G-Probe. Messbedingungen:  $T = 20$  K. Inv.-Puls: 40 ns,  $\pi/2 = 20$  ns, 499 Inkremente à 3000 ns für  $t = 300$  ns,  $\tau = 200$  ns. Rechts: Inverse Laplace-Transformation der  $T_1$ -Messung.



**Abbildung 4.8:** Q-Band-FSE der C19G/C120G-Variante (braun) bei 20 K und Teilsummen des 2D-Spektrums nach der iLT (dunkelgrau und schwarz). In Grau die  $g$ -Werte von  $\text{Ni}_r$ -B.



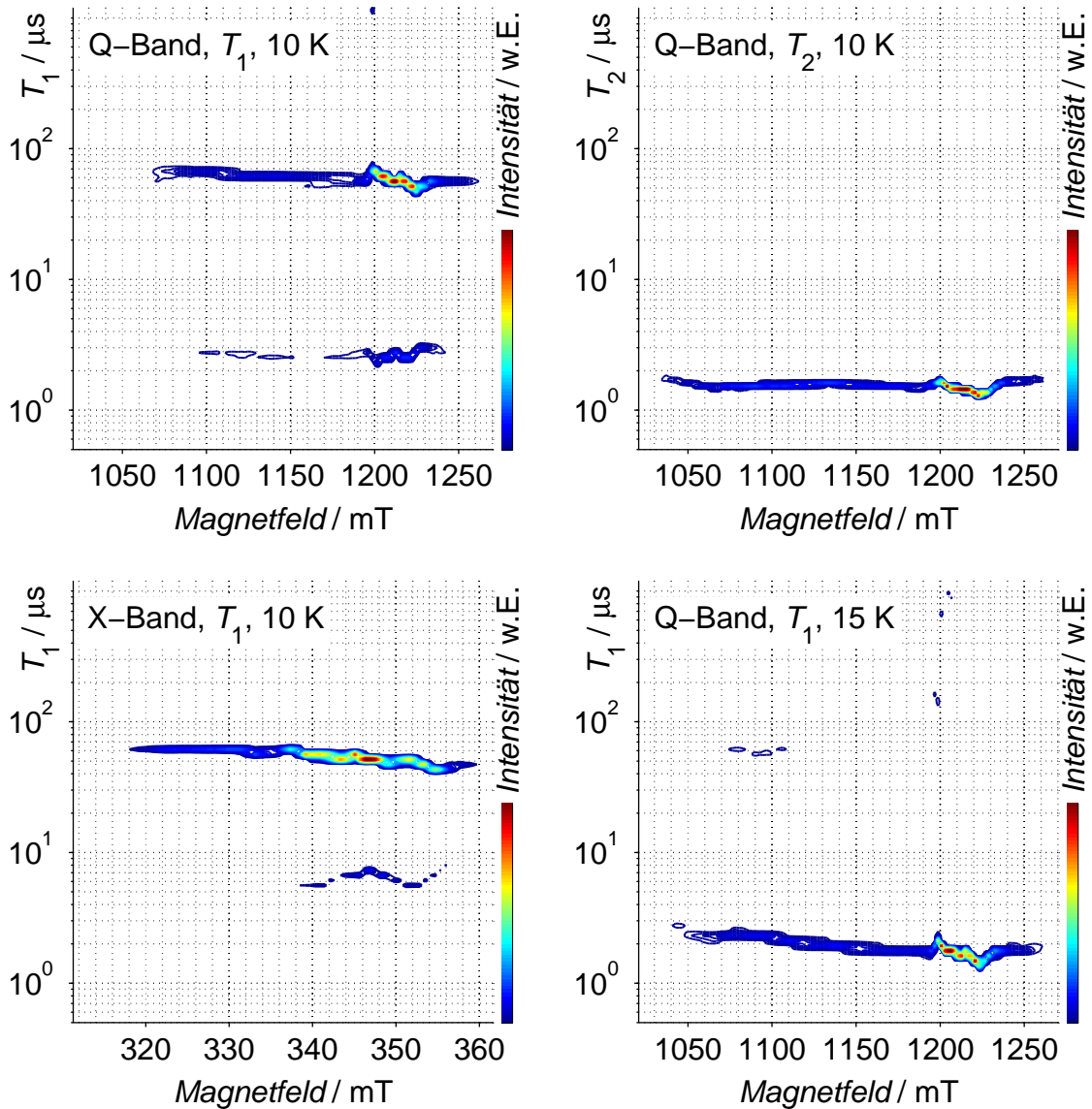
**Abbildung 4.9:** Aufsicht der inversen Laplace-Transformationen der Relaxationsmessungen der P242C-Probe. Links:  $T_1$ -inversion-recovery-Messung im X-Band. Messbedingungen der  $T_1$ -Messung:  $T = 15$  K, Inv.-Puls: 32 ns,  $\pi/2 = 16$  ns, 40 Inkremente à 160 ns, dann 260 Inkremente à 2000 ns für  $t = 1000$  ns,  $\tau = 204$  ns. Rechts:  $T_2$ -Messung im Q-Band. Messbedingungen der  $T_2$ -Messung:  $T = 15$  K,  $\pi/2 = 20$  ns, 499 Inkremente à 16 ns für  $\tau = 200$  ns.

**P242C.** Auch an der medialen Mutationsvarianten P242C wurden Relaxationsmessungen durchgeführt, einerseits ein  $T_1$ -Experiment im X-Band, andererseits ein  $T_2$ -Experiment im Q-Band. Beide Datensätze wurden wie zuvor beschrieben durch exponentielle Zerfälle angenähert, als Funktion für den  $T_2$ -Zerfall wurde dabei  $G(R, T_2) = e^{-RT_2}$  verwendet. Abbildung 4.9 gibt für beide Zerfälle die gegen das Magnetfeld aufgetragenen Raten der Relaxationskonstanten wieder, links für  $T_1$ , rechts für  $T_2$ . Der  $T_2$ -Zerfall ist wie erwartet deutlich schneller als die  $T_1$ -Relaxation. Weder im Q-Band noch im X-Band zeigen sich Unterschiede zwischen den beteiligten paramagnetischen Zentren, der Zerfall ist jeweils gleichförmig über den gesamten Feldbereich. Im Gegensatz zur C19G/C120G-Variante lassen sich für die P242C keine Teilspektren separieren. Es ist anzunehmen, dass die Austauschwechselwirkung zwischen proximalem Cluster und aktivem Zentrum ein Angleichen der verschiedenen Relaxationszeiten bewirkt und in einer gemeinsamen Relaxationskonstanten resultiert, die zwischen denen der beiden beteiligten Zentren liegt ( $T_1$ : etwa 100  $\mu$ s für Nickel und  $< 10$   $\mu$ s für den

[FeS]-Cluster).

**Wildtyp.** *Inversion-recovery*-Experimente am Wildtyp bei 10 K in X- und Q-Band und die darauf folgenden iLT lassen erkennen, dass bis auf einen geringen Anteil im [FeS]-Clusterbereich sämtliche paramagnetischen Zentren sehr ähnliche Relaxationszeiten haben (Abbildung 4.10 links). Die geringen spektralen Anteile bei etwa 3  $\mu\text{s}$  beziehungsweise 7  $\mu\text{s}$  haben ihre Ursache in Spin- und spektralen Diffusionsprozessen. Auch das  $T_2$ -Experiment weist nur eine gemeinsame Relaxationszeit für alle Cluster auf (Abbildung 4.10 rechts oben). Der Wildtyp verhält sich damit sehr ähnlich der P242C-Varianten. Auch hier sorgt die Austauschkopplung der Cluster untereinander für eine Annäherung der sonst unterschiedlichen  $T_1$ - und  $T_2$ -Zerfälle und schließt damit die vollständige Trennung der Spektren über eine inverse Laplace-Transformation aus. Allerdings lässt sich in den  $T_1$ -Messungen eine leichte Tendenz erkennen: Die Relaxation im Nickelbereich verläuft etwas langsamer als die der FeS-Cluster, so dass es möglich sein könnte, mit einem REFINE-Puls in Messungen wie ESEEM eine leichte Abschwächung von Signalanteilen zu bewirken und damit ihre Zuordnung zu erleichtern.

Die aus der iLT enthaltenen  $T_1$ -Werte sind bei gleicher Temperatur im X-Band wie im Q-Band nahezu identisch, das heißt, es gibt in diesem Bereich keinen Einfluss des äußeren Magnetfeldes auf diese Relaxationszeit. Damit können für die gleiche Temperatur von 15 K die Q-Band-Messung des Wildtyp (Abbildung 4.10 rechts unten) und die X-Band-Messung der P242C-Variante (Abbildung 4.9 links) verglichen werden. Während der Wildtyp eine longitudinale Relaxationszeit von circa 2  $\mu\text{s}$  aufweist, ist die Mutationsvariante mit 20  $\mu\text{s}$  deutlich langsamer. Das deutet darauf hin, dass im Wildtyp durch die Kopplung des intakten medialen [3Fe4S]-Cluster an den proximalen Cluster und dadurch indirekt ans aktive Zentrum die Relaxationszeit herabgesetzt wird. Dies spiegelt sich auch in den beiden  $T_2$ -Messungen wider: Im Wildtyp wird bereits bei 10 K eine  $T_2$ -Zeit von 1.5  $\mu\text{s}$  erreicht (Abbildung 4.10 rechts oben), in der P242C ist das erst bei 15 K der Fall (Abbildung 4.9 rechts).



**Abbildung 4.10:** Aufsicht der inversen Laplace-Transformationen der Relaxationsmessungen der Wildtypprobe bei 10 K und 15 K im X- und Q-Band. Details sind in den Grafiken vermerkt. Messbedingungen (X,  $T_1$ , 10 K): Inv.-Puls: 32 ns,  $\pi/2 = 16$  ns, 40 Inkremente à 300 ns, dann 216 Inkremente à 9000 ns für  $t = 1500$  ns,  $\tau = 240$  ns. (Q,  $T_1$ , 10 K & 15 K): Inv.-Puls: 32 ns,  $\pi/2 = 16$  ns, 40 Inkremente à 300 ns, dann 216 Inkremente à 9000 ns für  $t = 300$  ns,  $\tau = 280$  ns. (Q,  $T_2$ , 10 K):  $\pi/2 = 20$  ns, 249 Inkremente à 12 ns für  $\tau = 240$  ns.

### 4.1.3 Nutationsmessungen

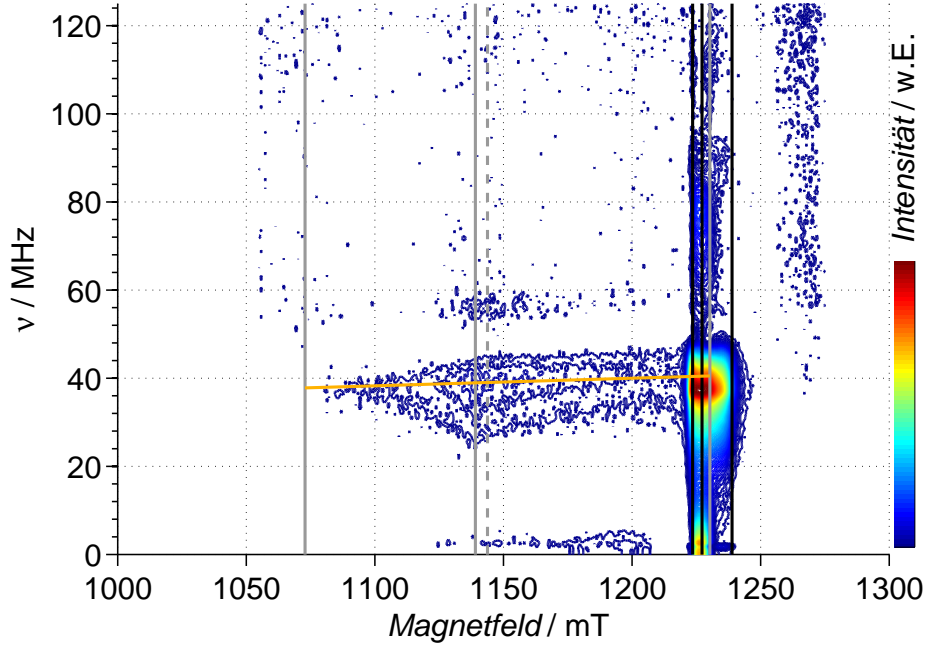
Sowohl Wildtyp als auch P242C-Mutationsvariante der MBH zeigen im oxidierten Zustand im FSE ein komplexes Aufspaltungsmuster. Das ist insofern erstaunlich, als dass in der Mutante nur zwei paramagnetische Zentren erwartet werden, die miteinander wechselwirken. Für zwei Zentren mit  $S = 1/2$  würde sich im Fall schwacher  $J$ -Kopplung, wie sie sich über die Distanz von etwa 11 Å ergibt [57], eine Aufspaltung in zwei Sublinien zeigen. Zu vermuten steht, dass der proximale Cluster einen Spin  $S > 1/2$  aufweist. Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit, Anteile des FSEs der Wildtyp-MBH zu separieren, da verschiedene Spinzustände und -übergänge mit unterschiedlichen Nutationsfrequenzen einhergehen (Gleichung 3.31).

**C19G/C120G.** Beginnend mit der C19G/C120G-Variante wurden feldabhängige Nutationsexperimente durchgeführt, sogenannte phaseninvertierte echoamplituden-detektierte Nutationen, kurz PEANUT-Messungen, wie in Abschnitt 3.3.4 erläutert. Die genannte Probe wurde für den Anfang gewählt, da das aktive Zentrum und der mediale Cluster entkoppelt und als  $S = 1/2$  vorliegen [40, 149, 150]: Der Vergleich zwischen Q- und X-Band-FSE-Messungen und Simulation (Abbildungen 4.3 und 5.12, beziehungsweise [145]) zeigt keinen Einfluss durch Nullfeldaufspaltung oder  $J$ -Wechselwirkung, wie er bei höheren Spinzuständen typisch ist: Beide Spektren können mit denselben zwei ungekoppelten  $g$ -Matrizen simuliert werden, ohne dass eine feldunabhängige Wechselwirkung eingeführt werden muss. Damit kann die Messung als Eichung für die Frequenzposition des zu  $S = 1/2$  gehörigen Übergangs zwischen  $m_S = +1/2$  und  $m_S = -1/2$  fungieren.

Abbildung 4.11 gibt die Fourier-Transformierte der Q-Band-Messung bei 10 K wieder. Um 40 MHz herum erstrecken sich zwischen den grau markierten  $g$ -Hauptwerten von Ni<sub>r</sub>-B schwache Nickelsignale, die von den starken Signalen des medialen Clusters teilweise überlagert sind. Dessen Hauptwerte sind durch schwarze Linien wiedergegeben, es zeigt sich eine prinzipiell gute Übereinstimmung der beiden ungekoppelten Cluster mit den zuvor ermittelten Werten.

Entsprechend der  $g$ -Anisotropie zeigt sich insbesondere bei den Nickelsignalen eine Feldabhängigkeit der Nutationsfrequenz (Abbildung 4.11, orange Linie). Nach Glei-





**Abbildung 4.11:** Q-Band-PEANUT der C19G/C120G-Variante bei 10 K. In Grau die  $g$ -Werte von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ , gestrichelt  $g_{\text{iso}} = 2.163$ , schwarz jene des medialen Clusters. Die Feldabhängigkeit der Nickelsignale ist durch den Verlauf der orangen Linie angedeutet. Messbedingungen:  $\pi/2 = 6$  ns, HTA = 1024 ns,  $\tau = 200$  ns, Inkr. 2 ns.

chung 3.31 ist diese Frequenz für einen Spin  $S = 1/2$  mit  $\omega_1 = g_{1\text{eff}}\mu_e B_1/\hbar$  anzugeben, dabei ist  $g_{1\text{eff}}$  entsprechend der Richtung von  $B_1$  senkrecht zu  $B_0$  (mit  $g_{0\text{eff}}$ ) ausgerichtet. Bei der Transformation der  $\mathbf{g}_1$ -Matrix ins Hauptachsensystem von  $B_0$  bleibt ihre Spur erhalten:  $g_{\text{iso}} = 1/3 \text{Sp}(\mathbf{g}_1) = 1/3 \text{Sp}(\mathbf{R}^T \mathbf{g}_1 \mathbf{R}) = 1/3 (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})$ . Über die Stärke des Magnetfeldes  $B_0$  wird  $g_{0\text{eff}}$  ausgewählt, so dass sich folgender Effektivwert für die Kopplung an  $B_1$  ergibt:

$$g_{1\text{eff}} = 1/2 (3g_{\text{iso}} - g_{0\text{eff}}) \quad (4.1)$$

Dabei wurde über alle  $g$ -Werte senkrecht zu  $g_{0\text{eff}}$  gemittelt. Dies rührt daher, dass sich die linear polarisierte Welle  $B_1$  auch als Summe zweier zirkular polarisierter Wellen darstellen lässt, deren eine Komponente genau diese zeitliche Mittelung bewirkt. Das bedeutet, dass bei einem äußeren Magnetfeld, welches die kanonische  $g_x$ -Orientierung selektiert, die Nutationsfrequenz durch  $g_y$  und  $g_z$  bestimmt ist. Im Gegenzug ist

die Frequenz bei  $g_z$  durch  $g_x$  und  $g_y$  bestimmt. Mit zunehmendem äußeren Feld, also abnehmenden  $g$ -Werten, vergrößert sich die Nutationsfrequenz  $\omega_1$ . Für kleine  $g$ -Unterschiede ist dieses Verhalten auf der Magnetfeldachse quasi linear.

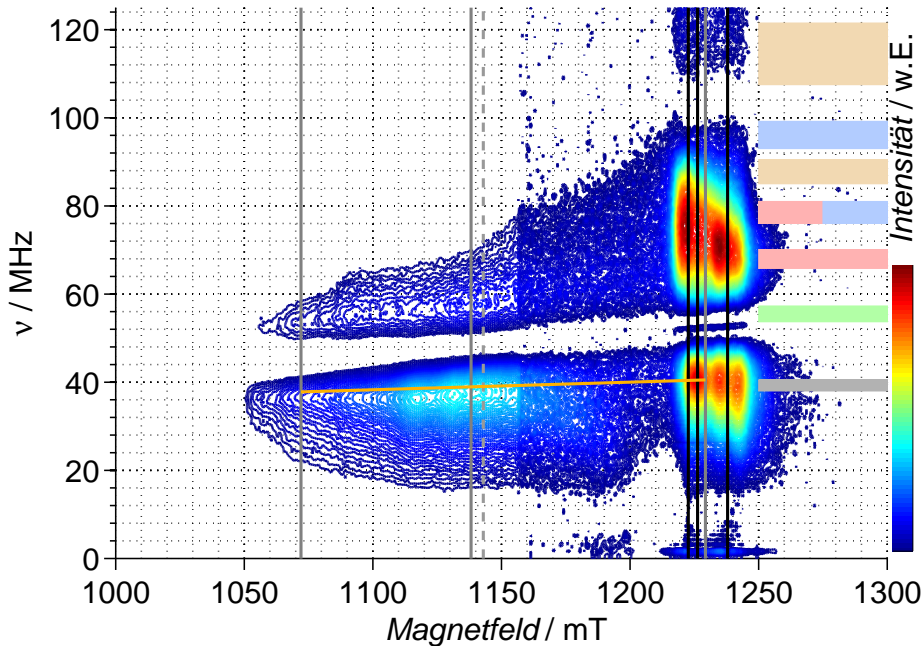
Aufgrund der größeren  $g$ -Anisotropie tritt dieser Effekt für die Nickelsignale stärker in Erscheinung als für den [FeS]-Cluster. Der größte  $g_{\text{eff}}$ -Unterschied zwischen den  $g$ -Hauptwerten  $g_x$  und  $g_z$  von Nickel beträgt  $((g_x + g_y)/2 - (g_y + g_z)/2) = (g_z - g_x)/2 = 0.15$ , also knapp 7% des isotropen  $g$ -Wertes. Ausgehend von diesem Wert, welcher sich ungefähr bei 39 MHz ansiedeln lässt, kann man eine Frequenzänderung zwischen  $g_x$  und  $g_z$  von etwa 2.7 MHz abschätzen. Dieser Verlauf ist im Spektren in Abbildung 4.11 als orange Linie eingezeichnet.

Der Schwerpunkt der [FeS]-Clustersignale liegt bei 38 MHz, aufgrund der geringen  $g$ -Anisotropie ist keine signifikante Frequenzänderung erkennbar ( $\approx 0.6\%$ ). Beide Signalgruppen erstrecken sich über einen relativ großen Frequenzbereich von nahezu 20 MHz. Dies ist in erster Linie durch  $B_1$ -Inhomogenitäten hervorgerufen [102, 151].

Die Messung bestätigt, dass beide Zentren wie angenommen mit dem gleichen Spin vorliegen. Zwischen 1220 mT und 1250 mT treten auch bei geringeren und höheren Frequenzen Signale auf, es handelt sich dabei höchstwahrscheinlich um Artefakte durch die hohe Leistung des HTA-Pulses.

**Wildtyp.** Mit identischen Parametern wurde die Q-Band-PEANUT-Messung am Wildtyp durchgeführt. Das zugehörige Frequenzspektrum ist in Abbildung 4.12 dargestellt. Das leicht erhöhte Rauschniveau ab 1160 mT ist durch Instabilitäten des Spektrometers verursacht, welches auf Temperaturänderungen durch das Anschalten der laborinternen Klimaanlage reagiert. Es handelt sich im Wesentlichen um zwei Bereiche, die Signalintensität zeigen. Zum ersten gibt es Signale um 40 MHz, der Frequenz also, wie sie aus der Messung für die Mutationsvariante C19G/C120G für  $S = 1/2$  gefunden wurde (Abbildung 4.11). Sie erstrecken sich von knapp 50 MHz bis unterhalb von 20 MHz. Der zweite Signalbereich umfasst im Wesentlichen 60-90 MHz, Ausläufer ziehen sich bis 50 MHz beziehungsweise 100 MHz.

Der  $S = 1/2$ -Bereich um 40 MHz setzt sich zusammen aus Signalen von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ , welche von etwa 1050 mT bis mindestens 1230 mT reichen, sowie den deutlich stärkeren



**Abbildung 4.12:** Q-Band-PEANUT-Messung des Wildtyps bei 10 K. In Grau die  $g$ -Werte von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ , gestrichelt  $g_{\text{iso}}$ , in Schwarz jene des medialen Clusters. Die Feldabhängigkeit der Nickelsignale entsprechend der C19G/C120G-Variante ist durch den Verlauf der orangen Linie angedeutet. Farbige Flächen (siehe Text): grau  $S = 1/2$ , grün  $S = 1$ , rot  $S = 3/2$ , blau  $S = 2$ , beige  $S = 5/2$ . Messbedingungen:  $\pi/2 = 6$  ns, HTA = 1024 ns,  $\tau = 200$  ns, Inkrement 2 ns.

Signalen des medialen [FeS]-Clusters zwischen 1210 mT und 1255 mT. Die Feldabhängigkeit der Nutationsfrequenz der  $\text{Ni}_r\text{-B}$ -Signale besteht im Wildtyp ebenso wie in der Mutationsvarianten, offenbar aber etwas stärker (Abbildung 4.12, orange Linie wie ein Abbildung 4.11). Dies könnte eine Auswirkung der Austauschkopplung zwischen aktivem Zentrum und proximalem Cluster sein, die sich auch an anderen Stellen des Spektrums zeigt: Die Nickelsignale sind durch diese Wechselwirkung aufgespalten und reichen klar über  $g_x$  hinaus. Eine ebensolche Ausdehnung über  $g_z$  hinweg ist anzunehmen, aber durch die Überlagerung mit anderen Signalen nicht getrennt beobachtbar.

Der mögliche Einfluss der zweiten Austauschwechselwirkung zeigt sich beim medialen Cluster. Seine Signale treten in einem Feldbereich auf, der deutlich breiter ist als die Spanne der erwarteten  $g$ -Hauptwerte, und der Schwerpunkt dieser Signale ist

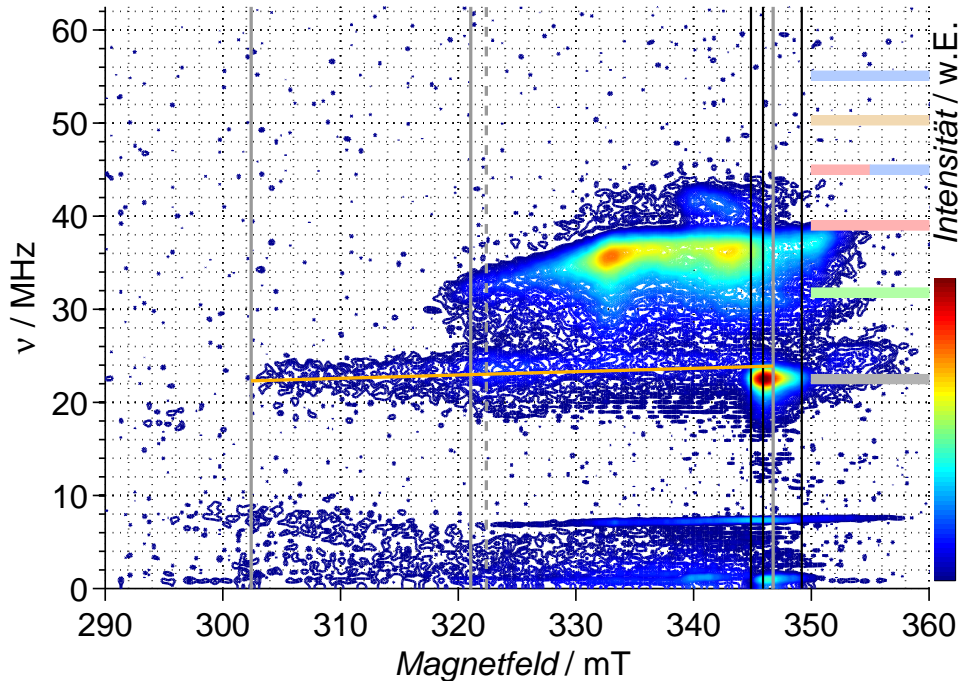
außerdem zu einer höheren Nutationsfrequenz verschoben, von 38 MHz nach 40.5 MHz.

Deutlich von der  $S = 1/2$ -Region getrennt zeigt sich der von Spins  $S > 1/2$  hervorgerufene Signalbereich. Es werden höhere Frequenzen erreicht, 50-100 MHz, und es gibt Parallelen zum  $S = 1/2$ -Bereich: Der umfasste Feldbereich ist nahezu ebenso groß und auch hier ist das Areal der [FeS]-Cluster am intensivsten, mit ähnlicher Breite auf der Feldachse. Es zeigt sich außerdem eine gleichartige Feldabhängigkeit für die Signale zwischen 1050 mT und 1220 mT, die höchstwahrscheinlich Nickel zuzuordnen sind. Diese Nickelsignale sind schwächer als die bei kleinerer Frequenz und vermutlich der Kopplung des aktiven Zentrums an die anderen Cluster geschuldet. Um 120 MHz und 1240 mT tauchen weitere, schwache Signale auf, hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um Artefakte, wie sie schon bei der vorherigen Messung beobachtet wurden. Auch um 2 MHz und 1240 mT gibt es schwache Intensität, die eventuell in dieselbe Kategorie fällt.

Anhand der relativen Frequenzen für gewisse Spinübergänge lässt sich eine erste Zuordnung der Signale treffen. Die möglichen Übergänge sind in Abbildung 4.12 farblich eingezeichnet. Sie markieren die Spanne zwischen dem aus der C19G/C120G-Probe bestimmten Schwerpunkt der Grundfrequenz und dem für den Wildtyp, der leicht dazu verschoben ist, (38-40.5 MHz, grau), sowie Vielfache davon.  $S = 1$  (grün) würde Signale bei  $\sqrt{2}\omega_1$  zeigen,  $S = 3/2$  (rot) hingegen bei  $\sqrt{3}\omega_1$  und  $2\omega_1$ . Ein Gesamtspin von  $S = 2$  (blau) würde in den Frequenzen  $2\omega_1$  und  $\sqrt{6}\omega_1$  resultieren. Für  $S = 5/2$  (beige) gäbe es bereits die drei Frequenzen  $\sqrt{5}\omega_1$ ,  $\sqrt{8}\omega_1$  und  $3\omega_1$  zu erwarten. Die Ausschmierung der Signale durch  $J$ -Kopplungen und Nullfeldaufspaltung muss bei der Zuweisung berücksichtigt werden.

Die Lücke zwischen den beiden Signalbereichen befindet sich etwa dort, wo Signale von  $S = 1$  (grün,  $\approx 55$  MHz) auftreten würden. Es ist also unwahrscheinlich, dass dieser Spinzustand im Wildtyp für den proximalen Cluster vorliegt. Der [FeS]-Clusterbereich um 40 MHz und die Signale bei höheren Frequenzen weisen eine ähnliche Intensitätsverteilung über einen relativ breiten Frequenzbereich auf. Ein Spin  $S = 3/2$  (rot) würde derartig ausgeschmierte Signale im notwendigen Ausmaß erzeugen.

Hingegen ist  $S = 2$  (blau) tendenziell auszuschließen, da im Experiment bereits ober-



**Abbildung 4.13:** X-Band-PEANUT-Messung des Wildtyps bei 10 K. In Grau die  $g$ -Werte von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ , gestrichelt  $g_{\text{iso}}$ , in Schwarz jene des medialen Clusters. Die Feldabhängigkeit der Nickelsignale entsprechend der C19G/C120G-Variante ist durch den Verlauf der orangenen Linie angedeutet. Farbige Flächen (siehe Text): grau  $S = 1/2$ , grün  $S = 1$ , rot  $S = 3/2$ , blau  $S = 2$ , beige  $S = 5/2$ . Messbedingungen:  $\pi/2 = 8 \text{ ns}$ ,  $\text{HTA} = 2048 \text{ ns}$ ,  $\tau = 200 \text{ ns}$ , Inkrement  $4 \text{ ns}$ .

halb von 98 MHz kaum noch Signale vorhanden sind, während laut theoretischer Abschätzung inklusive Verbreiterung mindestens bis 105 MHz Intensität erwartet würde.  $S = 5/2$  (beige) entfällt ebenso, weil einerseits die experimentelle Intensität um 70 MHz nicht abgebildet wird, andererseits auch hier unterhalb von 110 MHz Signale erwartet werden, wo das Experiment eine Lücke aufweist.

Zur Ergänzung des Spektrums und Erleichterung der Auswertung wurde an derselben Probe ein X-Band-PEANUT aufgenommen (Abbildung 4.13). Da im X-Band die Konversion von eingestrahelter Mikrowellenleistung in am Probenort nutzbares Magnetfeld schlechter ist als im Q-Band, liegt trotz höherer Leistung ein geringeres  $B_1$ -Feld vor. Daher befindet sich die Nutationsfrequenz für  $S = 1/2$  bei etwa 23 MHz. Die Signalbereiche sind im Vergleich zum Q-Band nicht derart klar getrennt. Sowohl

durch die geringere Frequenz als auch durch die im Vergleich zum äußeren Magnetfeld stärker zu Tage tretenden Austauschkopplungen kommt es zu Überlagerungen.

Der mediale Cluster bei 22.5 MHz und etwa 345 mT ist gut erkennbar, ungewöhnlicherweise zeigt er nahezu keine Kopplungsverbreiterung, wie der Vergleich mit den  $g$ -Hauptwerten zeigt. Die Gründe dafür sind nicht bekannt, insbesondere da es verglichen mit dem Q-Band stärkere Auswirkungen der Austauschwechselwirkungen und somit Aufspaltungen geben sollte.

Die Nickelsignale zwischen den grau markierten  $g$ -Hauptwerten von Ni<sub>r</sub>-B zeigen die berechnete Feldabhängigkeit der Nutationsfrequenz von etwa 7% (Abbildung 4.13, orange Linie). Eine durch die Austauschkopplung zwischen aktivem Zentrum und proximalem Cluster verursachte Aufspaltung der Nickelsignale über  $g_x$  hinaus ist nicht zu erkennen, möglicherweise ist dies der vergleichsweise geringen Signalintensität an dieser Stelle geschuldet. Die Signale scheinen sich jedoch jenseits von  $g_z$  fortzusetzen. Dies ist bei der Q-Band-Messung aufgrund des breiten medialen Clusters weniger gut erkennbar.

Auch im X-Band-Spektrum sind die möglichen Übergänge für verschiedene Spinzustände mit identischer Farbkodierung eingezeichnet. In diesem Fall ergibt sich allerdings keine Spanne, da die Nutationsfrequenz des medialen Clusters offenbar keine Verschiebung erfährt. Zwischen 45 MHz und 62 MHz gibt es keine Signale, damit können die Spinzustände mit  $S = 2$  (blau) und  $S = 5/2$  (beige) klar ausgeschlossen werden.

Bei Frequenzen zwischen 34 MHz und 45 MHz treten starke Signale auf, die sich teilweise bis unter 30 MHz ziehen. Um 36 MHz sowie weit schwächer um 42 MHz zeigen sich zwei voneinander getrennte Bereiche, die den Übergängen  $-3/2 \leftrightarrow -1/2$  und  $+1/2 \leftrightarrow +3/2$  beziehungsweise  $-1/2 \leftrightarrow +1/2$  von  $S = 3/2$  zuzuordnen sein könnten. Allerdings sind beide Frequenzen gegen die erwarteten Vielfache  $\sqrt{3}\omega_1 = 39$  MHz und  $2\omega_1 = 45$  MHz der Grundfrequenz um etwa 6-8% verschoben. Vermutlich sorgen die sich im Vergleich zum Q-Band stärker auswirkenden Austauschkopplungen zwischen den Clustern für eine Verzerrung der Nutationsfrequenzen. Gleichermaßen zeigt sich bei  $\sqrt{2}\omega_1 = 32$  MHz Signalintensität, wo dem Q-Band-Spektrum nach in Ermangelung eines Spins  $S = 1$  eine Lücke zu erwarten wäre. Eine entsprechende Verschiebung der grünen Markierung für  $S = 1$  in Abbildung 4.13 hätte allerdings keinen großen Ein-

fluss auf das Auffinden einer Signallücke. Zwischen 22 MHz und 35 MHz gibt es keinen Bereich, der einem klaren Intensitätsminimum zuzuordnen wäre.

Unterhalb von 10 MHz gibt es weitere Signale, prominent sind hierbei jenes um 7.5 MHz, welches sich von zwischen 320 mT und 360 mT erstreckt, sowie ein schmales bei etwa 1 MHz und 345-350 mT. Deutlich schwächer erstreckt sich ein Intensitätsbereich zwischen 300 mT und 350 mT und zeigt eine ungewöhnliche gegenläufige Feldabhängigkeit insbesondere zu geringeren Feldstärken hin. Es liegt nahe, dies aufgrund seiner Ausdehnung Nickel zuzuordnen, um welchen Übergang es sich handeln könnte und warum ein solcher Feldverlauf besteht, ist jedoch unklar.

Die X- und Q-Band-Messungen zusammen betrachtet, ist ein Spinzustand  $S = 3/2$  für den proximalen Cluster am wahrscheinlichsten. Die Ursachen des von der Erwartung abweichenden Verhaltens der Messungen können durch verschiedene Erklärungsansätze beleuchtet werden, die von der Größe der Nullfeldwechselwirkung gegenüber dem Mikrowellenfeld abhängen. Letzteres lässt sich durch  $\omega_1$  abschätzen, so dass im X-Band  $\omega_1 = 22.5$  MHz als Vergleichsgröße zu betrachten ist, im Q-Band hingegen  $\omega_1 = 38$  MHz.

Zum einen wäre es möglich, dass für die X-Band-Messung der Fall großer Nullfeldaufspaltung gilt. Für  $\mathcal{H}_D > \mathcal{H}_1$ , also  $D > \omega_1$ , ist Gleichung 3.31 uneingeschränkt gültig, es gäbe also eine klare Trennung der einzelnen Frequenzen, weil die beteiligten Übergänge einzeln angeregt werden. Eine Verschiebung der Quartettfrequenzen von  $S = 3/2$  und das Fehlen der für  $S = 1$  vorgesehenen Lücke könnten durch die vergleichsweise starken Austauschkopplungen zwischen den Clustern hervorgerufen werden. Zusätzlich kann es im Fall starker Nullfeldwechselwirkung zu Doppel- oder Dreifachquantenübergängen kommen, die für  $S = 3/2$  durch die Frequenzen  $\omega_{n2} = \omega_1(7\omega_1/4\omega_D)$  und  $\omega_{n3} = \omega_1(3\omega_1^2/8\omega_D^2)$  gekennzeichnet sind [152]. Unter Berücksichtigung von  $D > \omega_1$  ließe sich mit  $D = 120$  MHz das Signal bei 7.5 MHz als  $\omega_{n2}$  nachbilden, während jenes bei 1-2 MHz mit  $D = 600$  MHz ( $\omega_{n2}$ ) übereinstimmen würde. Beide Charakteristika zugleich lassen sich nicht mit einem  $D$  nachbilden.

Im Q-Band gibt es keine Entsprechung des 7.5 MHz-Signals, und ob die schwache Q-Band-Intensität bei 2 MHz der bei 1 MHz im X-Band entspricht, ist zweifelhaft. Die zu vergleichenden Feldparameter sind sich ähnlicher, so dass möglicherweise die Be-

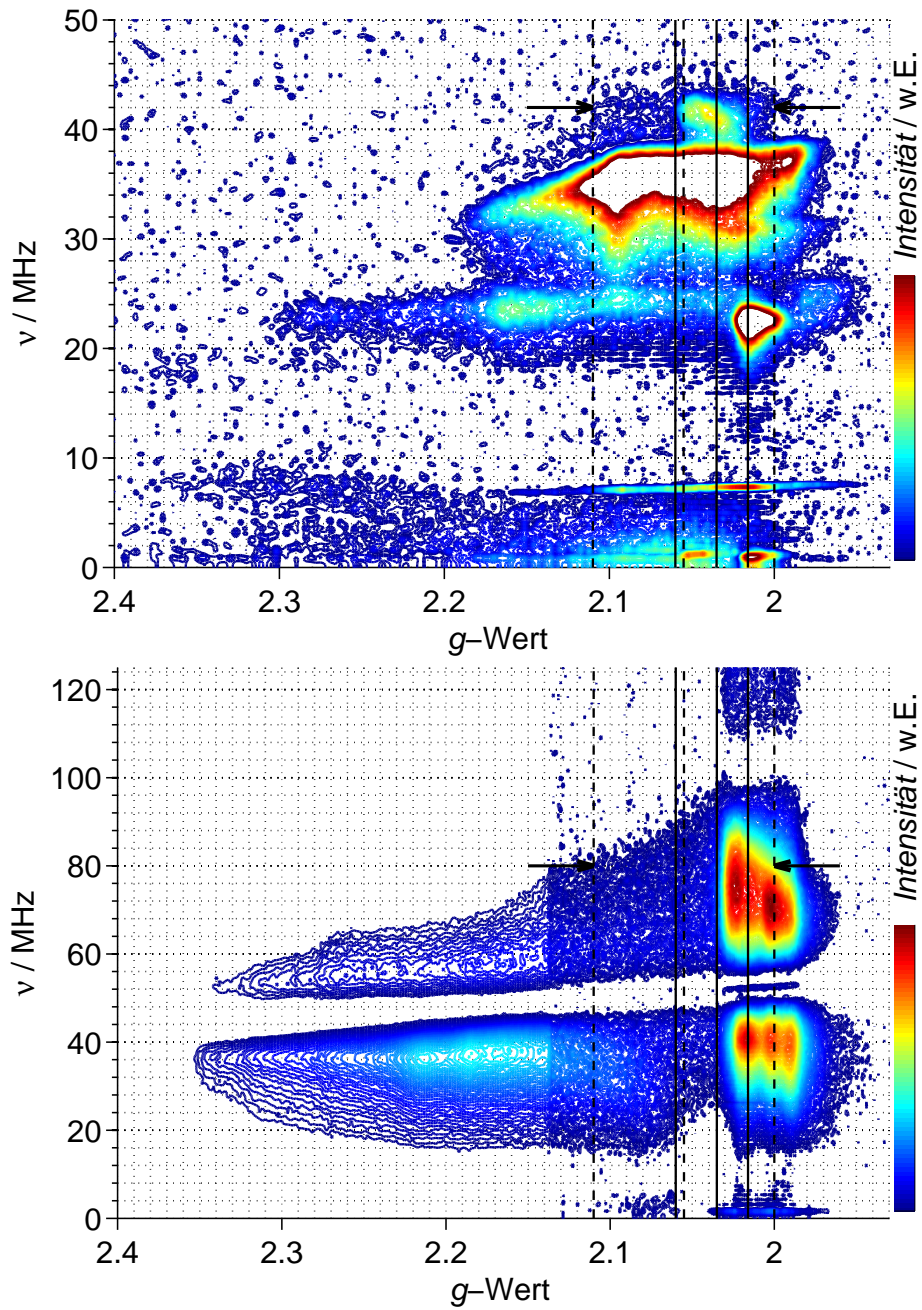
dingung  $D \approx \omega_1$  denkbar wäre. Es käme dadurch zu einer Abweichung von Gleichung 3.31 und einer Überlagerung und Ausschmierung der Nutationsfrequenzen [84]. Im Fall des proximalen Clusters des Wildtyps wäre dies daran zu beobachten, dass die Frequenzbereiche für den  $-1/2 \leftrightarrow +1/2$ -Übergang sowieso die Übergänge  $-3/2 \leftrightarrow -1/2$  und  $+1/2 \leftrightarrow +3/2$  zwischen 60 MHz und 90 MHz offenbar nahtlos ineinander übergehen. Unter Umständen tritt dann auch die Grundfrequenz  $\omega_1$  stärker in Erscheinung, was die erhöhte Intensität um den medialen Cluster (40 MHz, 1220-1250 mT) erklären könnte, sollte diese nicht durch  $J$ -Wechselwirkung zwischen diesem Cluster und dem proximalen zustande kommen. Durch die im Vergleich zum äußeren Magnetfeld und  $B_1$  kleineren Austauschkopplungen gibt es eine klare Lücke für  $S = 1$ .

Die zweite Betrachtungsvariante zieht  $D \approx \omega_1$  für X-Band sowie Q-Band heran, letzteres mit Tendenz zu  $D < \omega_1$ . Die Verzerrung der Frequenzen im X-Band rührt in diesem Fall von der unvollständigen Mischung der verschiedenen Übergänge her, welche sich im Q-Band noch verstärkt. Nutationsmessungen von Shohoji *et al.* [109] zeigen bei den Frequenzen für Spins  $S > 1/2$  Abweichungen der Nutationsfrequenz von 4-8 % im Vergleich zum erwarteten Wert. Dies wurde von Drew *et al.* [107] als ein Fall mittlerer Kopplung gedeutet. In der hier vorliegenden X-Band-Messung kommt es zu einer Abweichung der Quartettfrequenzen von etwa 6-8 %, was damit übereinstimmen würde. Der Hauptunterschied zwischen Q- und X-Band besteht dann in erster Linie in den sich unterschiedlich stark auswirkenden  $J$ -Kopplungen, die im X-Band für stärkere Verschmierung in Richtung der Nutationsfrequenz von  $S = 1$  sorgen.

Widersprüchlich ist, dass es entgegen dieser beiden Fällen im X-Band zu einer Verbreiterung der Frequenz bei 36 MHz in Richtung der Frequenz für  $S = 1$  kommt, die Frequenz bei 42 MHz davon jedoch unbeeinflusst bleibt. Auch die Frequenzen des medialen Clusters und des aktiven Zentrums zeigen wenig Auswirkung der  $J$ -Kopplungen in Bezug auf ihre Nutationsfrequenz. Ungewöhnlich ist zudem die Frequenzbreite der Signale für  $S = 1/2$  im Q-Band, vor allem zu Frequenzen  $< \omega_1$  hin.

**Mögliche Abschätzung von  $g$ -Werten.** Abbildung 4.14 stellt die PEANUT-Messungen in Q- und X-Band auf gleicher  $g$ -Skala gegenüber, Augenmerk liegt auf dem  $-1/2 \leftrightarrow +1/2$ -Übergang von  $S = 3/2$  (schwarze Pfeile). Das Signal ist vergleichsweise schmal, da hier kein Einfluss der Nullfeldwechselwirkung zu erwarten ist. Aus





**Abbildung 4.14:** PEANUT-Messungen des Wildtyps aus den Abbildungen 4.13 (oben, intensivste Signale abgeschnitten) und 4.12 (unten), identische  $g$ -Achse. Erläuterungen siehe Text.

diesem Grund eignet sich dieser Übergang prinzipiell dafür, zumindest eine Einschränkung der  $g$ -Werte des proximalen Clusters vorzunehmen.

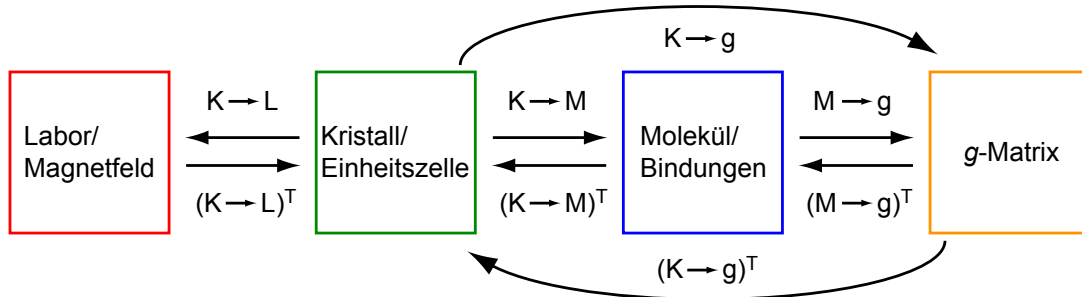
Es gibt zwei Möglichkeiten für die Abschätzung der  $g$ -Werte, die anhand der X-Band-Messung (um 42 MHz) getroffen werden kann: Einerseits kann man den intensiven Signalbereich heranziehen, gekennzeichnet durch die schwarzen, durchgezogenen Linien. Die Bereiche geringerer Intensität werden dabei als durch Kopplungs- und Verzerrungseffekte des PEANUTs vernachlässigt. Andererseits kann dieses Areal mit einbezogen werden, mit der Begründung, dass die Intensitätsverteilung ein ähnliches Verhalten zeigt wie die anisotropen Nickelsignale. Dies ist durch die gestrichelten schwarzen Linien verdeutlicht.

Zieht man die Q-Band-Messung (um 80 MHz) zum Vergleich heran, zeigt sich, dass dort der Großteil der Intensität in einem höheren Feldbereich auftritt, es also eine deutliche Abweichung zum X-Band gibt. Es gibt höchstwahrscheinlich Einflüsse der  $\pm 1/2 \leftrightarrow \pm 3/2$ -Übergänge und es ist nicht klar, in welchem Maße sich die Austauschkopplungen zum aktiven Zentrum und medialen Cluster auswirken. Möglich ist in diesem Feldbereich auch eine Kopplung der drei einzelnen Spins zu einem Gesamtspin. Im Fall der vorliegenden Spins  $S_1 = 1/2$ ,  $S_2 = 3/2$  und  $S_3 = 1/2$  sind das die Möglichkeiten  $S_{\text{ges}} = 1/2$  und  $3/2$ , da  $S_{\text{ges}} = 5/2$  bereits ausgeschlossen werden konnte (siehe oben). So könnte genannter  $-1/2 \leftrightarrow +1/2$ -Übergang nicht zwangsläufig allein dem Spin des proximalen Clusters zuzuordnen sein, was eine Bestimmung der  $g$ -Werte nicht verlässlich machen würde. Dieses Kopplungsverhalten würde in Anbetracht der Clusterabstände von  $10 \text{ \AA}$  eine vergleichsweise starke Austauschwechselwirkung erfordern.

Im Folgenden werden aus diesem Grund Messungen an MBH-Einkristallen vorgestellt, Ziel ist eine Abschätzung der  $J$ -Kopplungen zwischen den einzelnen Clustern sowie ihre Orientierung untereinander und gegenüber den Bindungsachsen im Molekül.

## 4.2 Orientierungsabhängige Einkristallmessungen

Vorab wird ein Überblick über die unbekannt Parameter gegeben, welche davon mit FSE-Kristallmessungen gewonnen werden können und welche Einschränkungen eine exakte Analyse erschweren oder einschränken. Es wird dabei auf Aspekte der



**Abbildung 4.15:** Bei Einkristallmessungen und -simulationen verwendete Koordinatensysteme und ihre Transformationen untereinander.

Kristallsymmetrie und der Proben selbst eingegangen, auf die verschiedenen, verwendeten Koordinatensysteme und auf Möglichkeiten, die Anzahl der Unbekannten einzuschränken.

**Koordinatensysteme.** Bei Kristallanalysen werden verschiedene Koordinatensysteme verwendet, die Bezeichnung erfolgt wie bei EasySpin üblich [141, 142]. Abbildung 4.15 gibt einen Überblick über die Systeme und ihre Transformationen untereinander. Neben dem Laborsystem L, das sich am äußeren Magnetfeld orientiert, sind dies folgende: Das Kristallachsensystem K bestimmt die Ausrichtung der Elementarzellenachsen und wird mittels  $K \rightarrow L$  in das Laborsystem transformiert, so dass sich der Bezug zum Magnetfeld und der Rotationsachse ergibt. Das Molekülachsensystem M ist die Ausrichtung der Clusterachsen gegenüber der Elementarzelle ( $K \rightarrow M$ ) und die Systeme der einzelnen  $g$ -Matrizen geben ihre Orientierung bezüglich des Molekülsystems ( $M \rightarrow g$ ) wieder. Prinzipiell existiert zudem das Achsensystem des makroskopischen Kristalls (nicht gezeigt). Während bei kubischer Kristallsymmetrie in vielen Fällen von der Elementarzelle auf dessen Struktur geschlossen werden kann, ist bei der vorliegenden Raumgruppe  $P2_12_12_1$  diese Korrelation nicht zwangsläufig gegeben. EPR allein kann diese Verbindung nicht herstellen, dafür ist eine kombinierte Analyse von Röntgenspektroskopie und Mikroskopie erforderlich. Für die MBH liegen derartige Messungen nicht vor. Nicht gezeigt sind die Systeme verschiedener Wechsel-

wirkungen, also zum Beispiel Hyperfein- oder Nullfeldwechselwirkung. Diese beziehen sich typischerweise auf das  $g$ -Achsensystem.

Aus den experimentellen EPR-Daten lässt sich prinzipiell die Orientierung von  $g$ -Matrizen der einzelnen Cluster sowohl gegenüber dem Laborsystem (äußeres Magnetfeld) als auch zueinander festlegen. Zur Bestimmung der Orientierung der  $g$ -Systeme gegenüber dem Kristallachsensystem aus diesen Parametern müssen mindestens zwei Kristalle mit verschiedener Ausrichtung im Probenröhrchen untersucht werden. Bei der Vermessung von unterschiedlich positionierten Kristallen ändert sich nur diese Ausrichtung, alle anderen Simulationsparameter bleiben unverändert. Aus diesen Positionen gegenüber dem Laborsystem kann dann auf das Verhältnis von  $g$ -Systemen zu Kristallsystem geschlossen werden.

**Parameterzahl und erste Einschränkungen.** Im oxidierten Wildtyp liegen drei paramagnetische Zentren vor, die mit jeweils drei  $g$ -Hauptwerten sowie drei Eulerwinkeln für die  $g$ -Ausrichtung in der Elementarzelle behaftet sind. Hinzu kommen Austauschkopplungen  $J$ , die zwischen medialem und proximalem Cluster sowie zwischen proximalem Cluster und aktiven Zentrum wirken, und die Nullfeldaufspaltung des proximalen Clusters. Schließlich gibt es pro Kristallprobe die Ausrichtung der Kristallachsen im Laborsystem.

Aus Vorexperimenten (Abschnitt 4.1) und der dort genannten Literatur sind die  $g$ -Werte für Ni<sub>r</sub>-B ( $g = (2.306, 2.172, 2.011)$ ) und den medialen Cluster ( $g = (2.022, 2.016, 1.997)$ ) bekannt, ebenso gibt es einen Größenordnungsbereich für die  $J$ -Kopplungen zwischen den drei Clustern (zwischen 500 und 1300 MHz, [55, 143]).

Des Weiteren wird die Orientierung der Ni<sub>r</sub>-B- $g$ -Matrix gegenüber dem Kristallsystem aus der Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F verwendet, wie sie in der Kristallanalyse von Trofanchuk *et al.* [144] bestimmt wurde. Die Rechtfertigung dieses Vorgehens beruht auf folgender Überlegung: Die aktiven Zentren der MBH und der Hydrogenase aus *D.v.* weisen starke Ähnlichkeiten auf, ihr Aufbau und die unmittelbare Umgebung sind laut Röntgenstrukturanalysen nahezu identisch [8, 57]. Es werden die gleichen Redoxzustände durchlaufen, was sich durch sehr ähnliche  $g$ -Werte sowie CO- und CN<sup>-</sup>-Schwingungsmoden äußert [46, 55].

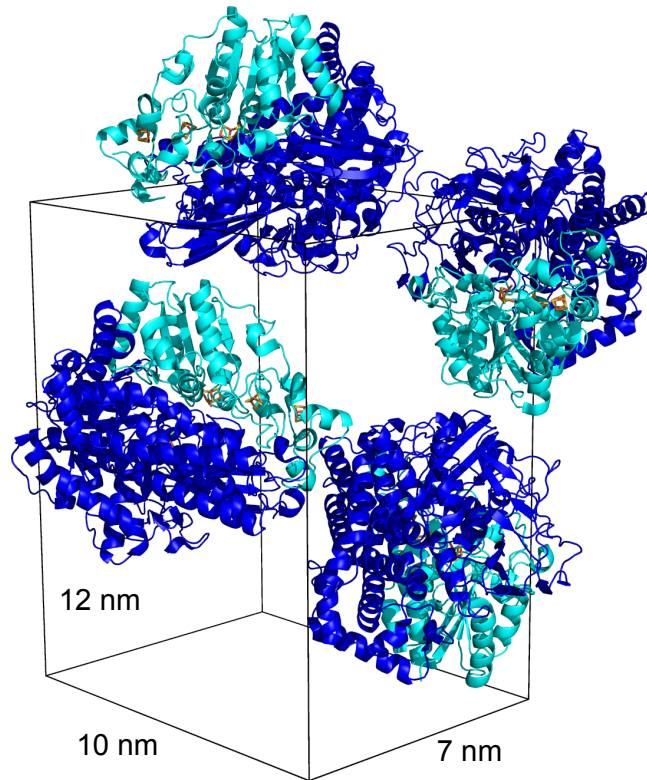
Die Positionen von Nickel und seinen koordinierenden Cysteinen sowie von Eisen und seinen Kofaktoren wurden bestimmt, für die MBH aus der Struktur pdb 4IUB [58] und für *D.v.* aus pdb 1WUJ [22]. Im Anschluss wurden die Winkel berechnet, die durch Kombinationen verschiedener Atome aufgespannt werden. Dies umfasst Nickel mit den Schwefeln von Cystein 597 und Cystein 598 (kurz: Cys597–Ni–Cys598, *D.v.*: Cys546–Ni–Cys549), dazu Cys597–Ni–Cys75 (*D.v.*: Cys546–Ni–Cys81), Ni–Fe–CO, Ni–Fe–CN1 und –CN2 sowie alle Winkel zwischen Fe, CO und den beiden CN. Bei CO und CN wurden die Kohlenstoffe als Referenzpunkte verwendet; es ist darauf zu achten, dass in der 1WUJ-Struktur eine andere Zuordnung und Benennung dieser Liganden erfolgte. Die Abweichungen zwischen den beiden Organismen betragen in allen Fällen weniger als 7°. Da sich die elektronische Struktur eines Clusters in seiner *g*-Matrix widerspiegelt und sie mit gewissen Bindungsachsen korreliert ist, sollten die Orientierungen der Nickel-*g*-Matrizen in MBH und *D.v.* bezüglich der [NiFe]-Zentren im Großen und Ganzen identisch sein.

Als Nächstes wurde für beide aktiven Zentren aus den Koordinaten von Nickel, Cystein 598 und Cystein 597 (*D.v.*: Cys549 und Cys546) über Kreuzprodukte eine Orthonormalbasis erstellt und somit die Transformation von Kristallachsen- in Molekülachsensystem bestimmt. Die Transformation von Kristallachsen- zu *g*-System ( $K \rightarrow g$ ) lässt sich auch als zwei aufeinander folgende Transformationen von Kristall- in Molekülsystem ( $K \rightarrow M$ ) und von Molekül- in *g*-System ( $M \rightarrow g$ ) darstellen. Die ersten beiden sind für *D.v.* bekannt, ebenso wie  $K \rightarrow M$  für die MBH. Aus der Identität der beiden  $M \rightarrow g$ -Transformationen lässt sich dann für die MBH die Orientierung der *g*-Matrix in ihrem Kristallsystem bestimmen ( $K \rightarrow g$ ). Ein Orthonormalsystem aus Fe, CO und CN1 wurde zur Überprüfung und Verifizierung der Daten genutzt. In ZYZ-Notation lauten die Eulerwinkel  $(8^\circ, 121^\circ, -105^\circ) \pm (6^\circ, 0^\circ, 5^\circ)$ , die Abweichung rührt aus leichten strukturellen Unterschieden und der begrenzten Genauigkeit der beiden Kristallstrukturen her.

Abzüglich der genannten Werte bleiben als unbekannte Parameter die *g*-Hauptwerte des proximalen Clusters, die Orientierungen der zwei [FeS]-Cluster mit jeweils drei Euler-Winkeln, die Orientierungen der einzelnen Kristalle im Laborsystem, sowie genannte zwei *J*-Kopplungen und die Nullfeldaufspaltung.

**Symmetrie und Linienzahl.** MBH-Kristalle unterliegen der unter Proteinen sehr häufig auftretenden orthorhombischen Symmetrie der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  [57, 139], das heißt, vier MBH-Moleküle haben Anteil an einer Elementarzelle und sind durch  $2_1$ -Schraubungen entlang der drei ausgezeichneten Achsen jeweils ineinander überführbar. Dies entspricht  $180^\circ$ -Drehungen um je eine der Elementarzellachsen. Die vier MBH-Moleküle bilden vier magnetisch inäquivalente *sites* (Abbildung 4.16). Für den Wildtyp werden demnach je Clustertyp vier Linien erwartet. Durch die  $J$ -Kopplungen zwischen [NiFe]-Zentrum und proximalem sowie proximalem und medialem Cluster kommt es zu zusätzlichen Aufspaltungen, im einfachsten Fall, das heißt im Fall von Spinsystemen mit  $S = 1/2$  und bei Aufspaltungseffekten erster Ordnung, wird eine Zweieraufspaltung verursacht. Damit erhöht sich die Zahl der erwarteten Linien für den proximalen Cluster, der zwei Wechselwirkungen erfährt, auf 16. Dieser Cluster selbst hingegen liegt mit einem Spin von  $S = 3/2$  vor, seine intrinsische Nullfeldwechselwirkung fügt dieser Zahl weitere Linien hinzu. Außerdem erzeugt er eine Vierfachaufspaltung der Linien der zwei angrenzenden Cluster. Zusätzlich kann der proximale Cluster Wechselwirkungen weiter vermitteln, so dass zum Beispiel die Auswirkung der Austauschwechselwirkung zwischen proximalem und medialen Cluster auch für den [NiFe]-Cluster beobachtbar sein kann [143]. Das heißt, für das aktive Zentrum und den medialen Cluster werden bereits 32 Linien erwartet.

Die Vielzahl dieser unbestimmten Werte erschwert eine Auswertung erheblich, vor allem da es durch die Kopplungen zu starken Überlagerungen von Signalen einerseits und zu einer Verbreiterung und damit Intensitätsabnahme andererseits kommt. Zudem hängt die Aufspaltung durch  $J$  vom jeweiligen  $g$ -Wert ab, so dass es für die Kombination von nicht bestimmten  $g$ -Werten und unbekanntem Kopplungen mehrere Lösungsmöglichkeiten gibt. Es können somit nicht in allen Fällen eindeutige Ergebnisse erzielt werden. Je nach  $\Delta g$ -Wert der beteiligten Cluster ändert sich auch die Art der Aufspaltung, die durch ein  $J_i$  hervorgerufen wird, so dass sowohl Effekte erster als auch zweiter Ordnung in Betracht zu ziehen sind (siehe Abschnitt 3.1.2). In der folgenden Auswertung werden zunächst isotrope Austauschwechselwirkungen angenommen und sowohl Anisotropie und Ausrichtung dieser vernachlässigt, um die Zahl der Parameter nicht weiter in die Höhe zu treiben.



**Abbildung 4.16:** Elementarzelle der MBH mit den vier inäquivalenten *sites*, pdb-Struktur 4IUB [58]. Cyan: Kleine Untereinheit, dunkelblau: Große Untereinheit.

**Probenbeschaffenheit.** Bei der folgenden Analyse der Ausrichtung der  $g$ -Matrizen der einzelnen Cluster gegeneinander und gegenüber dem Laborkoordinatensystem wurden Feldspektren von Einkristallen der MBH aufgenommen. Hierfür lagen zum einen Wildtypproben vor, zum anderen auch ein C19G/C120G-Kristall. Die Kristalle wachsen nadelförmig und haben Ausmaße von  $1 \text{ mm} \times 0.3 \text{ mm} \times 0.3 \text{ mm}$  oder kleiner, sie enthalten also mit vier Enzymen pro Elementarzelle des Volumens  $12 \text{ nm} \times 10 \text{ nm} \times 7 \text{ nm}$  höchstens  $4 \cdot 10^{14}$  Spins pro Clustertyp. Eine typische Lösungsprobe mit einer Konzentration von  $500 \mu\text{mol}$  Protein in  $30 \mu\text{l}$  Probe enthält hingegen ungefähr  $9 \cdot 10^{15}$  Spins, so dass ein deutlich schwächeres Signal von den Kristallen erwartet wird. Diese wurden mit Pufferlösung in beidseitig offene Quarzröhrchen mit Innen- und Außendurchmesser von  $2.0 \text{ mm}$  und  $2.9 \text{ mm}$  gesaugt. Ihre Orientierung darin kann grob per Auge abgeschätzt werden und gibt Hinweise auf die gewünschte unterschiedliche

Ausrichtung zweier Kristalle.

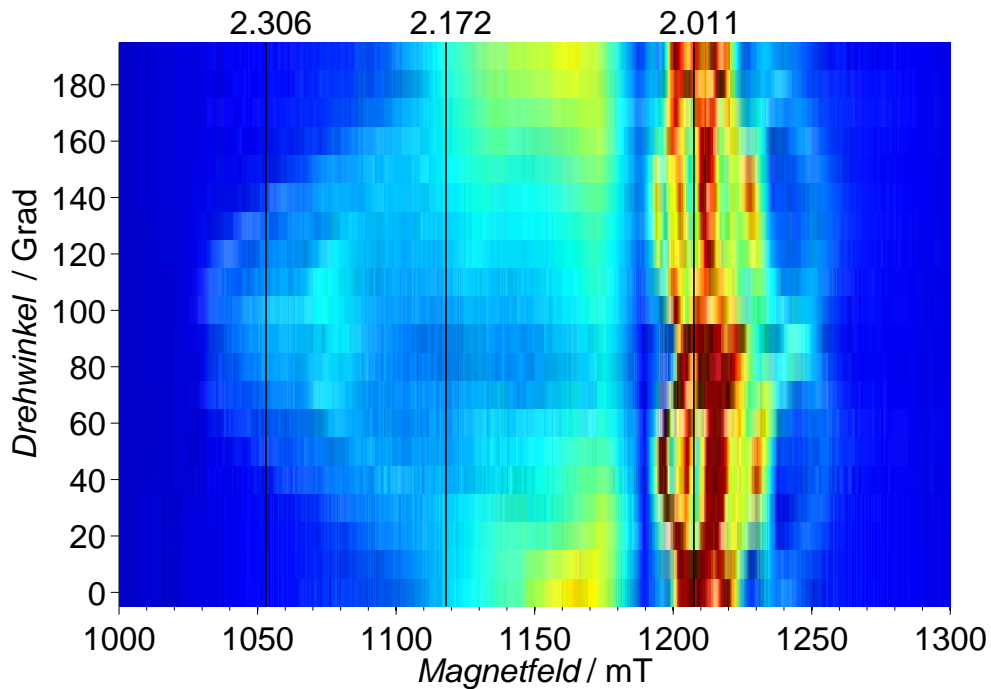
Zur verringerten Signalintensität durch die geringere Spinanzahl kommt die große  $g$ -Anisotropie der Nickelsignale im Vergleich zum [FeS]-Clusterbereich hinzu. Nach Integration haben zwar beide Clustertypen die gleiche Gesamtintensität, über den breiten Feldbereich des Q-Bands gesehen sind jedoch die relativ schwach ausgeprägten Randsignale, zum Beispiel um  $g_x$  von Nickel, stärker vom Rauschen beeinflusst. Ein zusätzlicher Einfluss ist durch veränderte Röhrenbeschaffenheit möglich, da die Kristallröhren aufgrund ihrer Wandstärke zu einer anderen  $B_1$ -Feldverteilung führen können.

**Aktives Zentrum.** Um aktives Zentrum und medialen Cluster entkoppelt untersuchen zu können, wurden EPR-Messungen am C19G/C120G-Kristall angestrebt, da hier der proximale Cluster nicht in paramagnetischer Form vorliegt. Aufgrund der geringen Signalstärke der Kristalle waren jedoch keine brauchbaren Ergebnisse zu gewinnen.

Alternativ wurde der Ansatz gewählt, die temperaturabhängige Entkopplung der Cluster bei den etwas signalstärkeren Wildtypkristallen zu beobachten. Aus den Lösungsproben ist bekannt, dass oberhalb von 35 K die Signale der [FeS]-Cluster aufgrund ihrer geringen Relaxationszeit verschwinden, ebenso wie ihre magnetische Kopplung an das aktive Zentrum. Da hier wie bei allen vorliegenden Kristallen das Problem einer kleinen Signalintensität besteht, wurden als Kompromiss Messungen bei 25 K durchgeführt, so dass zumindest eine teilweise Entkopplung der paramagnetischen Zentren zu erwarten ist und fast ausschließlich Nickel vorliegen sollte (vergleiche Abbildung 4.1). Oberhalb der Temperaturen, bei denen die [FeS]-Cluster (10 K und 15 K) vorliegen, trat allerdings eine so deutliche Verringerung der kristallbedingt bereits kleinen Signalintensität auf, dass auch mit dieser Methode keine Informationen extrahiert werden konnten.

Im Folgenden wurden Tieftemperatur-EPR-Messungen an Wildtypkristallen vorgenommen. Der zuerst untersuchte Kristall Nr. 2 ist schätzungsweise um  $45^\circ$  gegen die lange Achse des Probenröhrchens verkippt, welche senkrecht zur ausgezeichneten Magnetfeldachse steht, und wurde bei 15 K vermessen. In  $10^\circ$ -Schritten wurde das Probenröhrchen um insgesamt  $190^\circ$  um die lange Röhrchenachse gedreht, bei





**Abbildung 4.17:** Winkelabhängigkeit der FSEs im Q-Band des oxidierten MBH-Wildtyp-Kristalls Nr. 2. Schwarze Linien:  $g$ -Werte von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ , von links nach rechts:  $g_x = 2.306$ ,  $g_y = 2.172$ ,  $g_z = 2.011$ . Die Nickelsignale umfassen den Feldbereich von 1030–1190 mT. Weitere Erläuterungen im Text. Messbedingungen:  $T = 15$  K.

jedem Winkel wurde ein EPR-Spektrum aufgenommen. Grafik 4.17 zeigt die Feldspektren in Abhängigkeit vom Drehwinkel, sie sind auf die jeweilige Gesamtintensität normiert. Es handelt sich um eine Fehlfarbendarstellung, blau bedeutet geringe Intensität, während sie über grün und gelb nach rot hin zunimmt. Als Bezugspunkte sind die bekannten  $g$ -Werte von  $\text{Ni}_r\text{-B}$  ( $g = (2.306, 2.172, 2.011)$ ) als senkrechte schwarze Linien eingezeichnet. Bis auf leichte Intensitätsunterschiede sind die Spektren bei  $0^\circ$  und  $180^\circ$  sowie  $10^\circ$  und  $190^\circ$  gleich, die Drehung erfolgte also korrekt und spiegelt die erwartete  $180^\circ$ -Symmetrie wider. Für alle beteiligten Cluster ist in den Spektren durch den verzerrt kosinusartigen Verlauf der Signale über alle Winkel hinweg diese  $180^\circ$ -Periodizität ersichtlich, sie ist mit der Symmetrie der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  in Einklang.

Die Intensitätsunterschiede, die sich zwischen  $60^\circ$  und  $70^\circ$  zwischen den Spektren andeuten, haben wahrscheinlich ihren Ursprung in leicht unterschiedlicher Kopplung

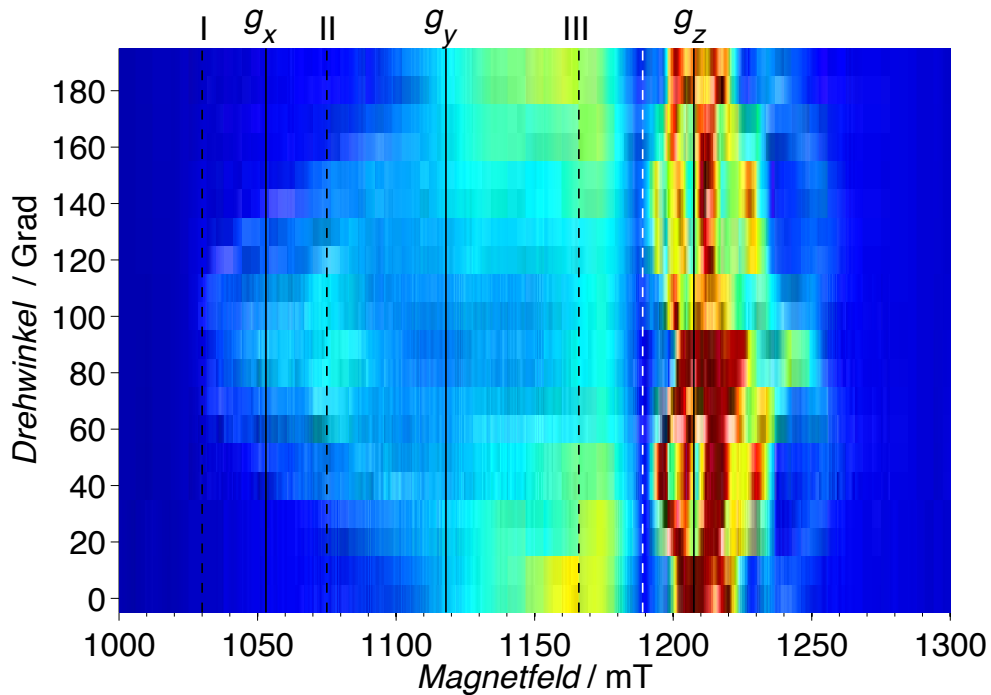
des Resonators und damit einem teils stärkeren und teils schwächeren Echo. Andererseits könnte auch eine leichte Abweichung von der  $10^\circ$ -Drehung diese Unterschiede hervorrufen.

Abbildung 4.18 zeigt eine Darstellung derselben Messung, in diesem Fall erfolgte die Normierung der Spektren je Winkel auf die integrale Intensität des Nickelbereiches unterhalb von 1190 mT. Zwischen  $50^\circ$  und  $140^\circ$  treten links des größten  $g$ -Wertes ( $g_x = 2.306$ ) EPR-Signale auf, die bis zu 1030 mT reichen (gestrichelte Linie I in Abbildung 4.18). Der Verlauf zu etwa 1110 mT (nahe  $g_y$ ) bei  $0^\circ/10^\circ$  bzw.  $180^\circ/190^\circ$  weist grundlegend auf das Ausmaß der Winkelabhängigkeit zweier magnetisch inäquivalenter *sites* gegenüber dem äußeren Magnetfeld hin. Es werden  $g$ -Werte von  $g_x$  bis unterhalb von  $g_y$  erreicht. Bei etwa 1190 mT zieht sich über den gesamten Winkelbereich ein lokales Minimum in der EPR-Intensität (gestrichelte, weiße Linie). Das bedeutet, dass in der vorliegenden Orientierung des Kristalls keine der vier erwarteten Linien während der Drehung den Wert von  $g_z$  erreicht.

Dieses bei allen Winkeln zu beobachtende Intensitätsminimum bei 1190 mT deutet darauf hin, dass der vorliegende Kristall aufgrund seiner Orientierung keine oder nur sehr geringe Überlappung der Signale von [NiFe]-Zentrum und [FeS]-Clustern zeigt. Demnach kann der Feldbereich unterhalb von 1190 mT für eine vorläufige Betrachtung der Nickel- $g$ -Matrixorientierung getrennt betrachtet werden.

Das Auftreten der gesamten Nickelsignalintensität über einen relativ schmalen Feldbereich bei den Winkeln  $0^\circ/10^\circ$  und  $180^\circ/190^\circ$  ist ein Zeichen dafür, dass man sich hier nahe einer Symmetrieachse befindet, was zum Zusammenlaufen aller Linien führt. Gleichmaßen deutet das Überschneiden der Linien zweier *sites* bei  $90^\circ$  auf eine Symmetrieebene hin. Bis auf leichte Intensitätsunterschiede scheint die Gesamtheit der Spektren spiegelsymmetrisch um jenes bei  $90^\circ$  angeordnet.

Der Verlauf der Signale um  $70^\circ$  und  $110^\circ$  bei 1030 mT und ihre Abweichung von  $g_x$  zu größeren  $g$ -Werten spiegelt sich in den relativen Intensitätsmaxima bei  $70^\circ$  und  $110^\circ$  und 1075 mT wider. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf die Größenordnung der Austauschkopplungen  $J$  zwischen den einzelnen Clustern. Die Aufspaltung der Signale zwischen diesen Extremwerten beträgt etwa 40 mT im Q-Band (Abbildung 4.18, Linie I und II). Eine vorläufige Simulation ohne explizit angegebene  $J$ -Werte



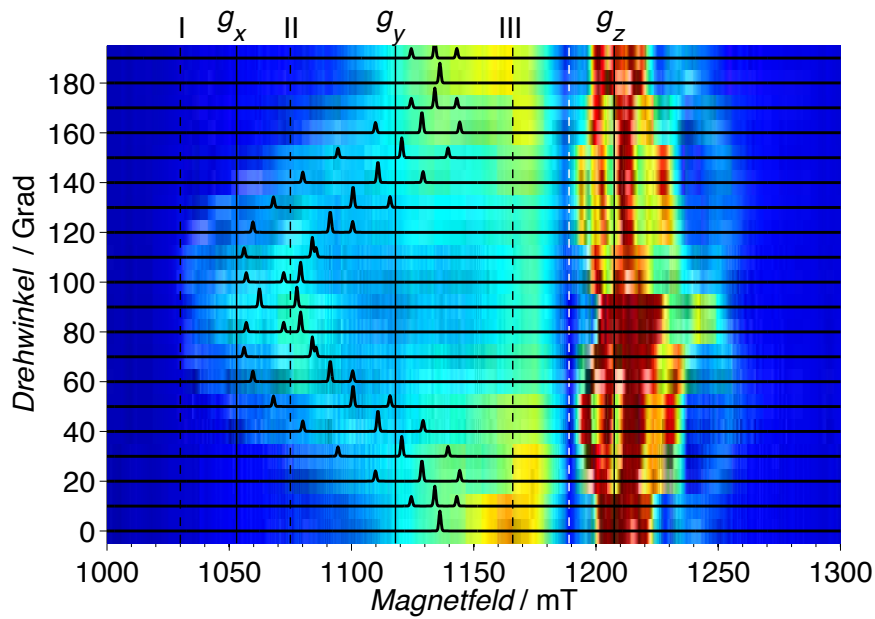
**Abbildung 4.18:** WT Kristall 2, FSEs wie in Abbildung 4.17 mit Grenzbereichen für die Orientierung der  $g$ -Matrix von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ , dessen  $g$ -Werte  $g = (2.306, 2.172, 2.011)$  als schwarze Linien eingezeichnet sind. Zur Erklärung der gestrichelten Linien siehe Text.

muss dies mit einbeziehen. Das heißt, auch die kleinsten erreichten  $g$ -Werte zwischen  $g_y$  und  $g_z$  müssen etwa 20 mT vom Minimum bei 1190 mT entfernt sein. Die bei der Drehung erreichten  $g$ -Werte der einzelnen vier *sites* sollten sich also zwischen 1053 mT ( $g_x$ ) und etwa 1166 mT ( $g \approx 2.082$ , gestrichelte Linie III in Grafik 4.18) befinden.

Da insbesondere der Bereich um  $g_y$  zwischen  $50^\circ$  und  $130^\circ$  keine deutliche Struktur aufweist, gibt es für eine vorläufige Simulation mehrere Möglichkeiten. Hierbei werden sowohl die  $P2_12_12_1$ -Symmetrie als auch die bekannten  $\text{Ni}_r\text{-B}$ - $g$ -Werte ( $g = (2.306, 2.172, 2.011)$ ) und ihre Orientierung aus der Veröffentlichung von Trofanchuk *et al.* [144] einbezogen. Der bestimmte Winkelbereich für  $\text{Ni}_r\text{-B}$  ist  $(8^\circ, 121^\circ, -105^\circ) \pm (6^\circ, 0^\circ, 5^\circ)$ , mehrere Möglichkeiten sind in den Abbildungen 4.19 - 4.23 gezeigt. Hauptaugenmerk liegt auf dem Verlauf der linken Intensitätskante, die sich zwischen 1030 mT und 1100 mT bewegt. In allen Fällen wird das Durchlaufen von Symmetrieebenen durch das Überschneiden je zweier Linien bei  $90^\circ$  korrekt wiedergegeben, sowie das

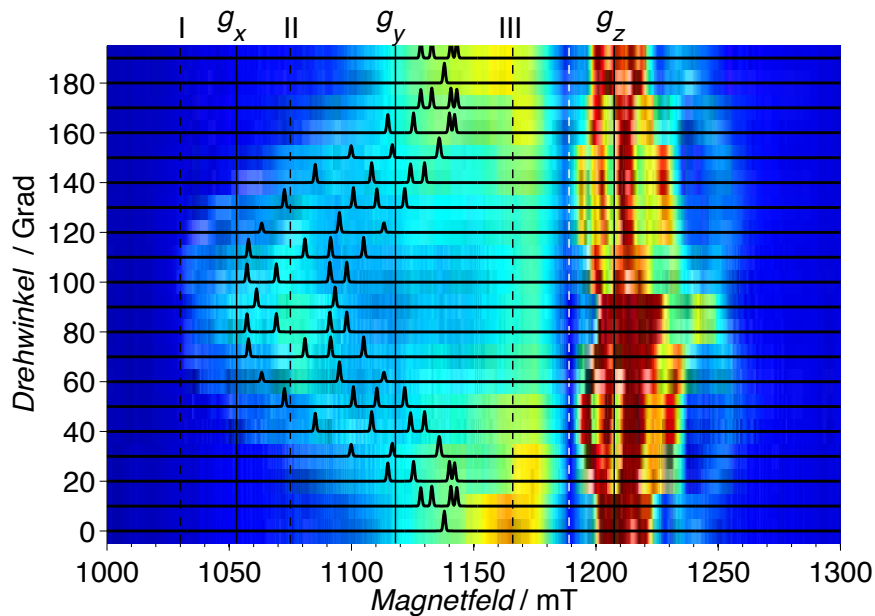
#### 4. EPR-EIGENSCHAFTEN DER MBH

---



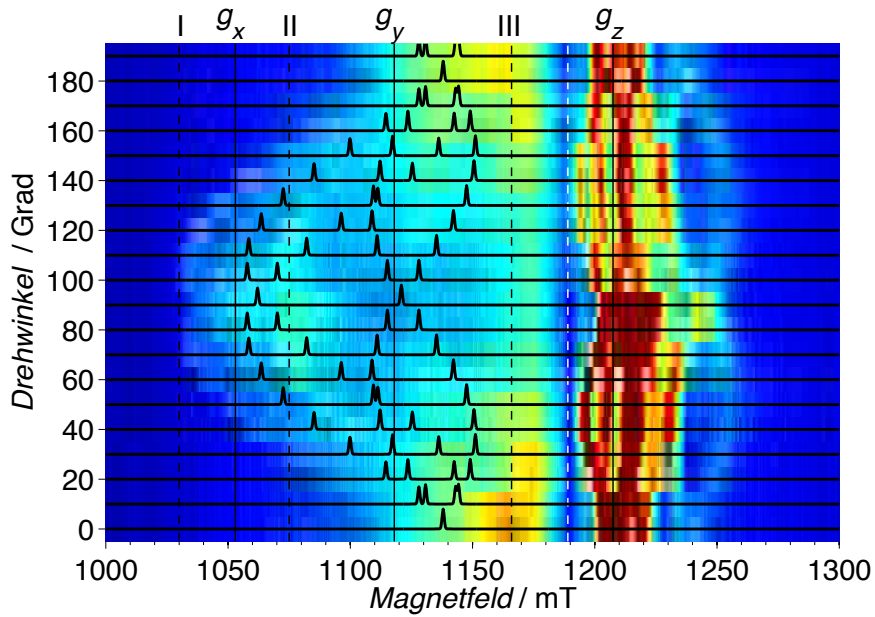
**Abbildung 4.19:** WT Kristall 2, FSEs aus Abb. 4.17 mit vorläufiger Simulation des Nickelbereiches ohne  $J$ -Kopplung. K $\rightarrow$ g-Euler-Winkel:  $(2^\circ, 121^\circ, -105^\circ)$ , K $\rightarrow$ L-Euler-Winkel:  $(20^\circ, 0^\circ, 0^\circ)$ . Weitere Erläuterungen im Text.

---

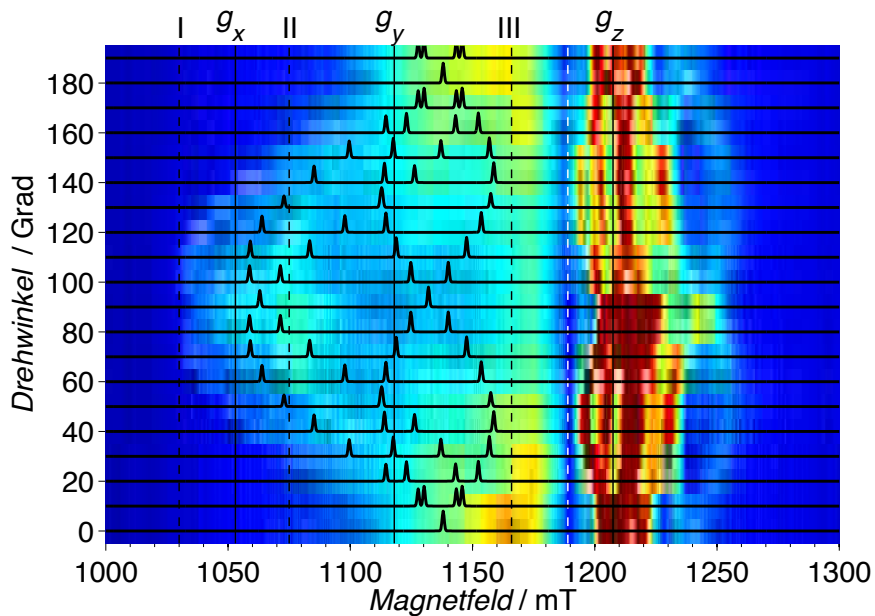


**Abbildung 4.20:** WT Kristall 2, FSEs aus Abb. 4.17 mit vorläufiger Simulation des Nickelbereiches ohne  $J$ -Kopplung. K $\rightarrow$ g-Euler-Winkel:  $(8^\circ, 121^\circ, -100^\circ)$ , K $\rightarrow$ L-Euler-Winkel:  $(25^\circ, 0^\circ, 0^\circ)$ . Weitere Erläuterungen im Text.

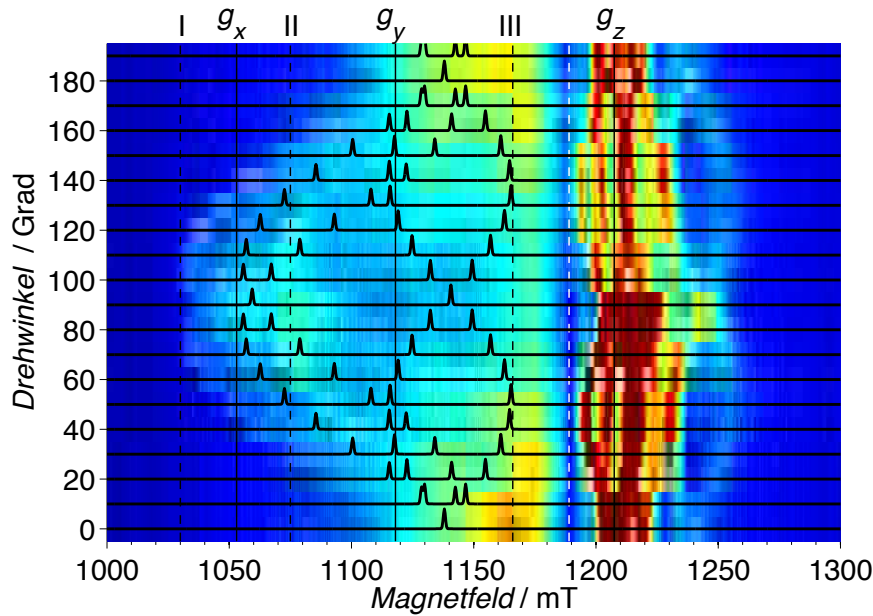
---



**Abbildung 4.21:** WT Kristall 2, FSEs aus Abb. 4.17 mit vorläufiger Simulation des Nickelbereiches ohne  $J$ -Kopplung.  $K \rightarrow g$ -Euler-Winkel:  $(14^\circ, 121^\circ, -100^\circ)$ ,  $K \rightarrow L$ -Euler-Winkel:  $(32^\circ, 0^\circ, 0^\circ)$ . Weitere Erläuterungen im Text.



**Abbildung 4.22:** WT Kristall 2, FSEs aus Abb. 4.17 mit vorläufiger Simulation des Nickelbereiches ohne  $J$ -Kopplung.  $K \rightarrow g$ -Euler-Winkel:  $(16^\circ, 121^\circ, -100^\circ)$ ,  $K \rightarrow L$ -Euler-Winkel:  $(35^\circ, 0^\circ, 0^\circ)$ . Weitere Erläuterungen im Text.



**Abbildung 4.23:** WT Kristall 2, FSEs aus Abb. 4.17 mit vorläufiger Simulation des Nickelbereiches ohne  $J$ -Kopplung.  $K \rightarrow g$ -Euler-Winkel:  $(20^\circ, 121^\circ, -100^\circ)$ ,  $K \rightarrow L$ -Euler-Winkel:  $(35^\circ, 0^\circ, 0^\circ)$ . Weitere Erläuterungen im Text.

Auftreten einer Symmetrieachse, gekennzeichnet durch den Schnittpunkt aller vier Linien bei  $0^\circ/180^\circ$ .

1. Im ersten Beispiel überlagern sich zwei der vier *sites*, deshalb ist ihre Intensität um den Faktor zwei größer als die der anderen beiden *sites* (Abbildung 4.19). Der mittlere Bereich um  $g_y$  bleibt weitestgehend ausgespart. Diese Simulation wurde mit den  $g$ -Euler-Winkeln  $(2^\circ, 121^\circ, -105^\circ)$  erstellt, die Orientierung von Kristall- gegenüber Laborsystem beträgt  $(20^\circ, 0^\circ, 0^\circ)$ .
2. Im zweiten Fall liegen alle vier *sites* ohne Überlagerung vor, sie weisen gleiche Intensität auf (Abbildung 4.20). Mit den Euler-Winkeln  $(25^\circ, 0^\circ, 0^\circ)$  ist hier die Verkipfung von Kristall- zu Laborsystem etwas größer, die  $g$ -Euler-Winkel betragen  $(8^\circ, 121^\circ, -100^\circ)$ . Das Areal rechts von  $g_y$  ist wie im vorherigen Fall nicht abgedeckt.
3. Ein weiter aufgefächertes Verhalten der vier inäquivalenten *sites* findet sich für die Kombination der  $g$ -Euler-Winkel  $(14^\circ, 121^\circ, -100^\circ)$  mit der Kristallausrichtung  $(32^\circ, 0^\circ, 0^\circ)$ . Auch hier gibt es nur Schnittpunkte der Linien bei  $0^\circ/180^\circ$ .

und  $90^\circ$  und keine kompletten Überlagerungen wie im ersten Fall (Abbildung 4.21). Diese Simulation formt sowohl die linken Außenkanten der Nickelsignale gut nach als auch den Verlauf der intensiveren Gebiete um 1140-1175 mT bei  $0^\circ$ - $50^\circ$  und  $140^\circ$ - $190^\circ$  (gelb).

4. Mit zunehmendem ersten Euler-Winkel ( $16^\circ$ ,  $121^\circ$ ,  $-100^\circ$ ) wird ein etwas größerer Bereich abgedeckt. Die Schnittpunktcharakteristika bei  $0^\circ/180^\circ$  und  $90^\circ$  sind weiterhin erfüllt, zu einer Verschiebung dieser Punkte zu kleineren  $g$ -Werten kommt es dadurch nicht (Abbildung 4.22). Die Ausrichtung von Kristall- zu Laborsystem beträgt hier ( $35^\circ$ ,  $0^\circ$ ,  $0^\circ$ ).
5. Der Grenzfall liegt mit der Kombination der  $g$ -Euler-Winkel ( $20^\circ$ ,  $121^\circ$ ,  $-100^\circ$ ) und der Kristallausrichtung ( $35^\circ$ ,  $0^\circ$ ,  $0^\circ$ ) vor. Die unaufgespaltenen Signale erreichen das zuvor festgelegte Limit für die kleinsten  $g$ -Werte (Abbildung 4.23). Auch hier verlaufen die mittleren Linien durch den relativ intensitätsarmen Bereich um  $g_y$ , sie formen allerdings den gelben Bereich weniger gut nach.

Die erste Möglichkeit kann ausgeschlossen werden, da es keine deutlich intensiveren Merkmale im Spektrum gibt, die sich durch die  $J$ -Aufspaltung je 20 mT rechts und links um Linie II befänden. Eine vollständige Überlagerung zweier Linien kommt also nicht in Frage. Außerdem zeigen sich im Experiment flächige Signale zwischen  $50^\circ$  und  $130^\circ$  um  $g_y$  und vor allem rechts davon, welche von der Intensität her mit denen am Niederfeldrand (zum Beispiel zwischen 1030 mT und 1050 mT) vergleichbar und teils stärker sind. Dies legt nahe, dass beide Bereiche gleichermaßen von der Simulation umfasst werden sollten. Dies ist ein Ausschlusskriterium sowohl für Option 1. als auch 2. (Abbildungen 4.19 und 4.20).

Die Tendenz der letzten drei Fälle fortsetzend würde eine Verschiebung des  $g_y$ -nahen Schnittpunktes bei  $90^\circ$  zu kleineren  $g$ -Werten hin entweder auch kleinere  $g$ -Werte dieser beiden Linien bei  $50^\circ$  und  $140^\circ$  über den Grenzwert III hinaus bewirken, oder zu einem Auseinanderdriften der anderen beiden Linien führen, so dass diese nicht mehr die Niederfeldkante der Intensität nachbilden würden. Eine Aussparung der mittleren Region um  $g_y$  ist also mit den vorliegenden Parametern nicht möglich.

Die Varianten 3.-5. werden bei der weiteren Auswertung in Betracht gezogen (Abbildungen 4.21 bis 4.23).

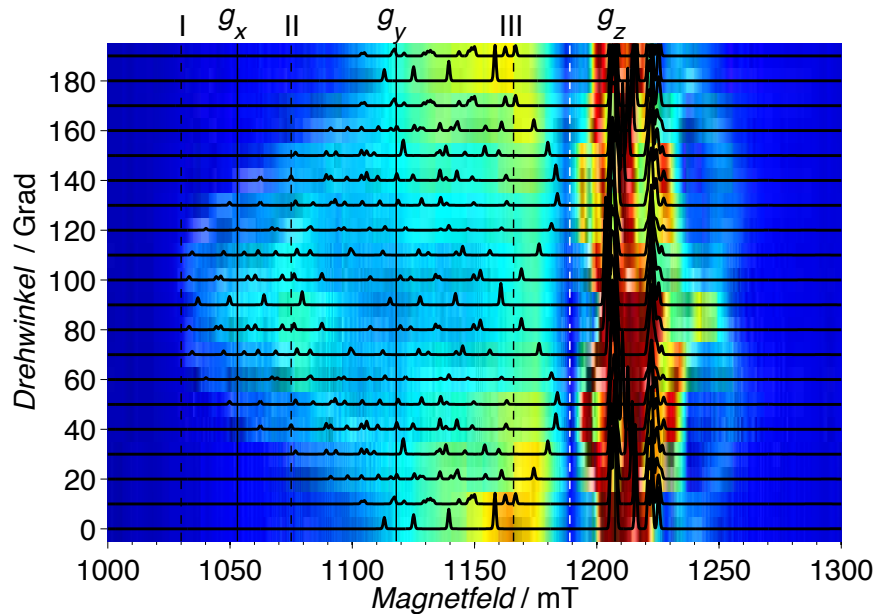
**Austauschkopplungen.** Der nächste Schritt ist die Bestimmung der auf das aktive Zentrum wirkenden  $J$ -Kopplungen. Das zuvor genutzte Modell beruht auf der Annahme, dass das [NiFe]-Zentrum direkt mit zwei Zentren wechselwirkt [55]. In der vorliegenden Arbeit wird hingegen eine lineare Kopplungskette zu Grunde gelegt, in der das aktive Zentrum an den proximalen Cluster bindet und dieser wiederum an den medialen Cluster. Dieses Modell ist in Übereinstimmung mit den Abständen der Cluster in der Kristallstruktur [57, 58]. Während der proximale Cluster etwa 11 Å vom aktiven Zentrum und 10 Å vom medialen Cluster entfernt ist, beträgt die Distanz zwischen aktivem Zentrum und medialem Cluster etwa 20 Å, also ungefähr das Doppelte. Damit ist es unwahrscheinlich, dass das Nickelzentrum mit vergleichbarer Stärke an die beiden anderen Cluster koppelt.

Zunächst wurde die  $J$ -Kopplung vom aktiven Zentrum zum proximalen Cluster abgeschätzt, da sie den stärksten Einfluss auf die Aufspaltung der Nickelsignale hat. Für  $g_x$  von Nickel werden im Q-Band Aufspaltungseffekte erster Ordnung erwartet, wie sie in den theoretischen Grundlagen zur Austauschwechselwirkung bei schwacher Kopplung für zwei Spins  $S = 1/2$  beschrieben sind (Abschnitt 3.1.2, Seite 24, Fall I). Der zuvor aus den Spektren entnommene Abstand  $\Delta B = J_{12}/g_x\mu_B \approx 40$  mT entspräche einer  $J$ -Kopplung von etwa 1300 MHz. Die Überprüfung mit  $|2J_{12}| \ll |\Delta g\mu_B B_0| \approx 5000$  MHz bestätigt, dass es sich im Fall von  $g_x$  um eine vergleichsweise schwache Wechselwirkung mit Effekten erster Ordnung handeln würde. Für einen Partnerspin  $S = 3/2$  wird eine kleinere Kopplung erwartet, da durch die Aufspaltung in ein Quartett bereits ein größerer Bereich abgedeckt wird.

Die Simulation, die sich vorrangig an der Niederfeldkante der Nickelspektren orientiert, ergibt einen Kopplungswert von  $J_{12} = 460 \pm 20$  MHz. Es wurde zuerst die fünfte Möglichkeit der zuvor genannten Winkelkombinationen betrachtet, da sie die größtmögliche Übereinstimmung mit den Messdaten vermuten lässt (Abbildung 4.24). Der proximale Cluster wird dabei durch einen fiktiven, isotropen  $g$ -Wert bei  $g = 2$  repräsentiert. Eine Variation dieses  $g$ -Wertes hat im Vergleich zu einer  $J_{12}$ -Änderung nur einen geringen Einfluss auf den Niederfeldbereich der Spektren.

Obwohl die Niederfeldkante gut wiedergegeben ist und die Größe der  $J_{12}$ -Wechselwirkung rechtfertigt, zeigen sich Abweichungen zwischen Simulation und Messung. In der vorliegenden Darstellung wurde zu Zwecken der Sichtbarkeit auf eine größere



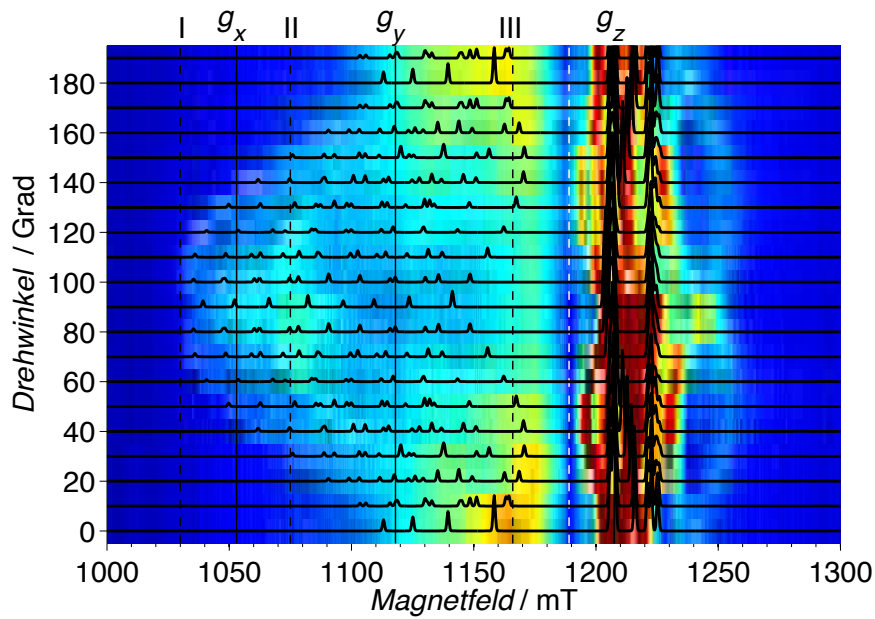


**Abbildung 4.24:** WT Kristall 2, winkelabhängige FSEs mit vorläufiger Simulation des Nickelbereiches mit  $J_{12}$ -Kopplung zum proximalen Cluster. Im [FeS]-Bereich zeigt sich das Ausmaß der Aufspaltung für  $g = 2$ .  $g$ -Euler-Winkel ( $20^\circ$ ,  $121^\circ$ ,  $-100^\circ$ ) und Kristallausrichtung ( $35^\circ$ ,  $0^\circ$ ,  $0^\circ$ ).

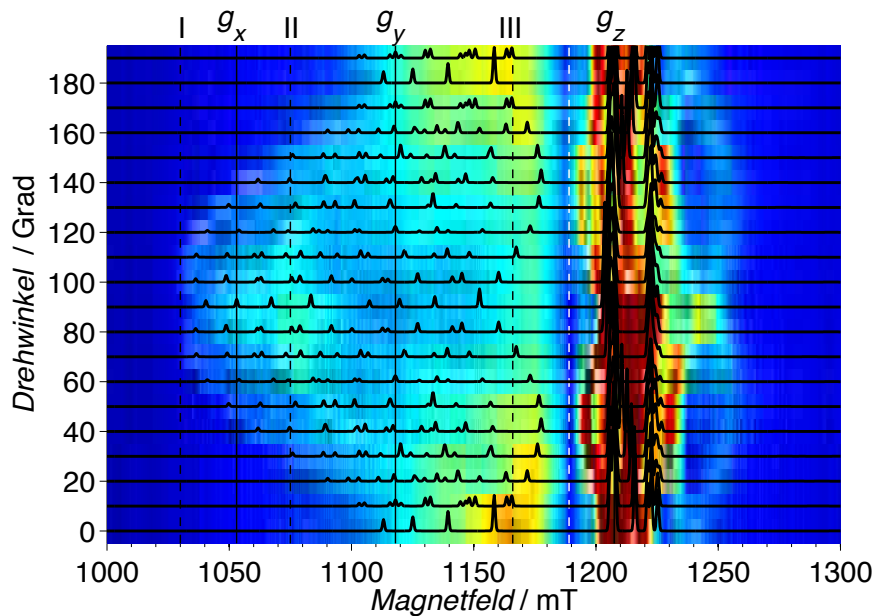
Linienbreite verzichtet, zieht man diese jedoch notwendigerweise in Betracht, ragt die Simulation stellenweise klar zu weit in die Intensitätslücke bei 1190 mT hinein ( $40^\circ$ - $50^\circ$  und  $130^\circ$ - $140^\circ$ ). Auch wird zwischen 1160 mT und 1180 mT der Intensitätsverlauf (gelb) schlecht nachverfolgt, die fünfte Variante ist also nicht optimal.

Die verbleibenden zwei Optionen betrachtend (Abbildungen 4.25 und 4.26), bildet die erstgenannte Simulation die gelben Intensitätsbereiche um Linie III besser nach, während die zweite Möglichkeit etwas mehr vom Hochfeldbereich der Nickelsignale abdeckt. In beiden Fällen fehlt jedoch Intensität um 1175 mT ( $0^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $180^\circ$ ).

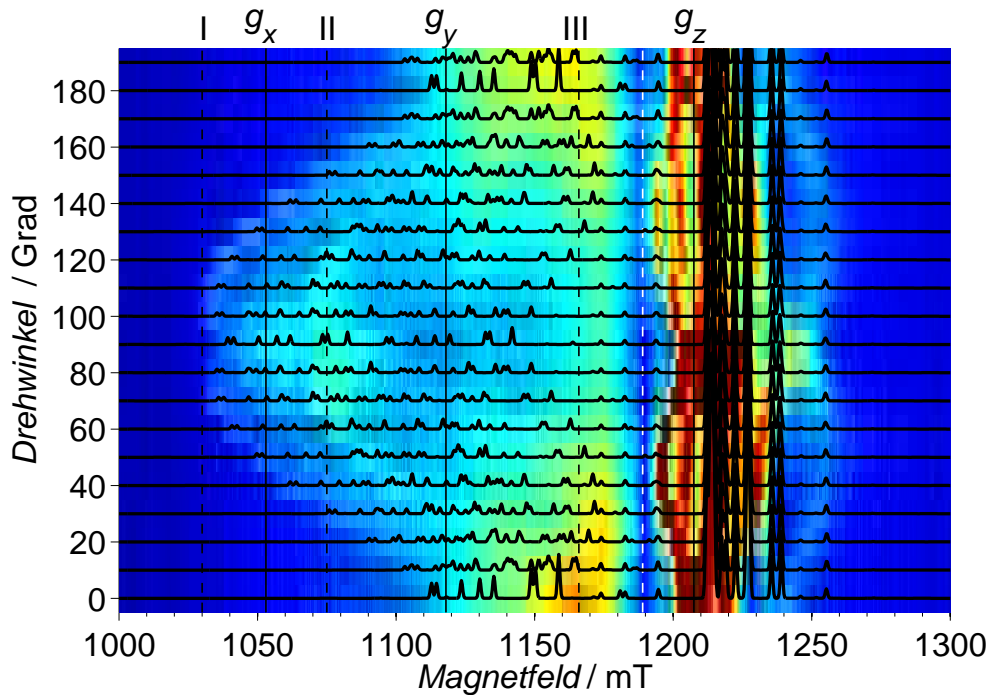
Der nächste Schritt ist die Abschätzung der Austauschwechselwirkung  $J_{23}$  zwischen proximalem und medialem Cluster, in erster Linie anhand einer zusätzlichen Aufspaltung oder Verbreiterung der bereits aufgespaltenen Nickelsignale. Außerdem wird das Ausmaß einer möglichen Aufspaltung des [FeS]-Bereiches hinzugezogen, das heißt, wie weit dieser Bereich durch die Kopplung verbreitert wird und eventuell mit dem Nickelbereich überlappt.



**Abbildung 4.25:** WT Kristall 2, winkelabhängige FSEs mit vorläufiger Simulation des Nickelbereiches mit  $J_{12}$ -Kopplung zum proximalen Cluster.  $g$ -Euler-Winkel ( $14^\circ, 121^\circ, -100^\circ$ ) und Kristallausrichtung ( $32^\circ, 0^\circ, 0^\circ$ ).



**Abbildung 4.26:** WT Kristall 2, winkelabhängige FSEs mit vorläufiger Simulation des Nickelbereiches mit  $J_{12}$ -Kopplung zum proximalen Cluster.  $g$ -Euler-Winkel ( $16^\circ, 121^\circ, -100^\circ$ ) und Kristallausrichtung ( $34^\circ, 0^\circ, 0^\circ$ ).



**Abbildung 4.27:** WT Kristall 2, winkelabhängige FSEs mit vorläufiger Simulation des Nickelbereiches mit  $J_{12}$ -Kopplung (460 MHz) zum proximalen Cluster und  $J_{23}$ -Kopplung (520 MHz) zwischen proximalen und medialem Cluster.  $g$ -Euler-Winkel ( $14^\circ$ ,  $121^\circ$ ,  $-100^\circ$ ) und Kristallausrichtung ( $32^\circ$ ,  $0^\circ$ ,  $0^\circ$ ).

Für die folgende Simulation wurden vereinfachende Annahmen gemacht, um das Spektrum übersichtlicher zu gestalten. Die relativ nah beieinander liegenden  $g$ -Hauptwerte des medialen Clusters (2.022, 2.016, 1.997) wurden durch den isotropen Wert 2.012 ersetzt, für den proximalen Cluster wurde der Wert 1.985 gewählt. Dies dient dem Zweck, zum einen die Orientierungsabhängigkeit und Nullfeldaufspaltung außen vor zu lassen, zum anderen eine Überlagerung der beiden Spezies zu vermeiden, so dass einzelne  $J$ -Aufspaltungskomponenten besser zuzuordnen sind.

Eine Simulation mit der Austauschwechselwirkung  $J_{23} = 520$  MHz ist in Abbildung 4.27 gezeigt. Diese Kopplung bewirkt eine zusätzliche Aufspaltung der Nickelsignale, da die magnetische Wechselwirkung zwischen aktivem Zentrum und proximalen Cluster die zweite Bindung vermittelt. Die Signale werden unspezifischer, flächiger, während Grundcharakteristika wie die Nachformung der Intensität zwischen  $g_x$  und  $g_y$  von  $\text{Ni}_F\text{-B}$  bestehen bleiben.

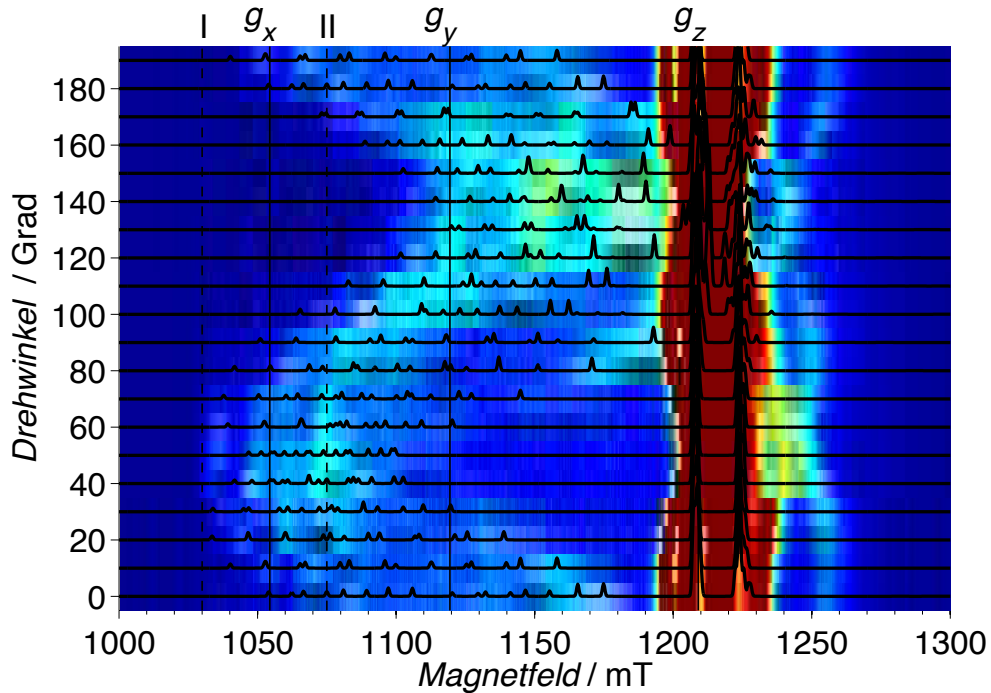
Zusätzlich kommt es zu einer Aufspaltung der Signale des medialen Clusters. Besonders interessant sind dabei jene in Richtung höherer  $g$ -Werte. Während für Nickel aufgrund seiner großen  $g$ -Anisotropie bei 1190 mT eine Grenze besteht, ist diese für den medialen Cluster nicht derart bindend. Sofern seine Signale nur eine geringe Winkelabhängigkeit zeigen – was die geringe Anisotropie seiner  $g$ -Werte annehmen lässt – kann es Signalanteile dieses Clusters im Bereich von 1170-1185 mT geben. Gleichzeitig bleibt bei passender Stärke von  $J_{23}$  das genannte Intensitätsminimum im Spektrum (weiße, gestrichelte Linie) bestehen, es zeigen sich nur links und rechts davon Signale des medialen Clusters. Durch diese zusätzlichen Signale können die Lücken im Nickelbereich des Spektrum zumindest teilweise ausgeglichen werden.

Die hier angenommene Kopplung  $J_{23}=520$  MHz stimmt grundlegend mit folgender Überlegung überein: Ohne Berücksichtigung der Nullfeldaufspaltung und der  $g$ -Werte des proximalen Clusters kann man über die Kristallstruktur zu einer sehr groben Abschätzung der Austauschwechselwirkung zwischen den beiden [FeS]-Cluster gelangen. Da der Abstand zwischen beiden etwa die gleiche Größe hat wie die Distanz zwischen proximalem Cluster und aktivem Zentrum ( $9.7 \text{ \AA}$  und  $10.7 \text{ \AA}$ ), ist es möglich, dass auch die zweite Kopplung die Größenordnung 450-550 MHz haben könnte.

Der Tatsache geschuldet, dass beide [FeS]-Cluster mit anisotropen, teils unbekanntenen  $g$ -Werten vorliegen und sich höchstwahrscheinlich aufgrund ihrer Orientierungen und der Nullfeldaufspaltung des proximalen Clusters sehr stark überlagern, ist an diesem Punkt die Datenlage nicht ausreichend, um weitere Parameter aus dieser Kristallmessung zu bestimmen.

**Zweiter Kristall.** Die Überprüfung der gewonnenen Parameter erfolgte mittels des zweiten Kristalls (Nr. 4). Dieser wurde bei 10 K vermessen, demzufolge treten die Signale der [FeS]-Cluster stärker hervor als der Nickelbereich. Das heißt wiederum, dass aufgrund des ungünstigeren Signal-Rausch-Verhältnisses die Intensitätsverteilung der Nickelregion stärker mit Fehlern behaftet ist. Vorrangig spielt hier die mögliche Einwirkung des Kupferhintergrundes des Resonators eine größere Rolle.

Abbildung 4.28 zeigt das Spektrum und die zugehörige Simulation. Der annähernd spiegelsymmetrische Verlauf der Linien wie im Fall des Kristalls Nr. 2 ist nicht gegeben, allerdings lässt auch hier die Orientierung des Kristalls im Probenröhrchen



**Abbildung 4.28:** WT Kristall 4, winkelabhängige FSEs mit vorläufiger Simulation des Nickelbereiches mit  $J_{12}$ -Kopplung zum proximalen Cluster. Skalierung auf den Nickelbereich. Schwarze, durchgezogene Linien zeigen die  $g$ -Werte von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ , weitere Erklärungen im Text. Messbedingungen:  $T = 10$  K.

zu, dass  $g$ -Werte bis  $g_x$  erreicht werden. Darauf deutet die Signalintensität bis zu 1030 mT (30-70°, Linie I) hin. Zugleich wird dadurch das Ausmaß der Kopplung  $J_{12}$  bestätigt (zwischen Linie I und II, identisch mit Abbildung 4.25). Im Gegensatz zum vorherigen Kristall werden jetzt jedoch auch Werte bis  $g_z$  erreicht: Es liegt keine spektrale Lücke um 1190 mT vor. Der verzerrte, kosinusartige Verlauf der Linien zwischen 80° und 180° zieht sich bis in den [FeS]-Clusterbereich hinein. Gleichzeitig schließt dieser Punkt aus, dass es sich bei der für Kristall Nr. 2 über alle Winkel festgestellten Signalintensität bei 1180 mT um den Kupferhintergrund handelt. Bei der tieferen Temperatur, bei der die Messung an Kristall Nr. 4 unternommen wurde, müsste dieser – so vorhanden – stärker in Erscheinung treten. Dies ist nicht der Fall.

Die Simulation gibt die Charakteristika der Messung gut wieder und bestätigt sowohl die Austauschwechselwirkung  $J_{12} = 460$  MHz als auch die  $g$ -Euler-Winkel von Nickel mit (14°, 121°, -100°). Aus Symmetriegründen ist außer der gezeigten Orientierung

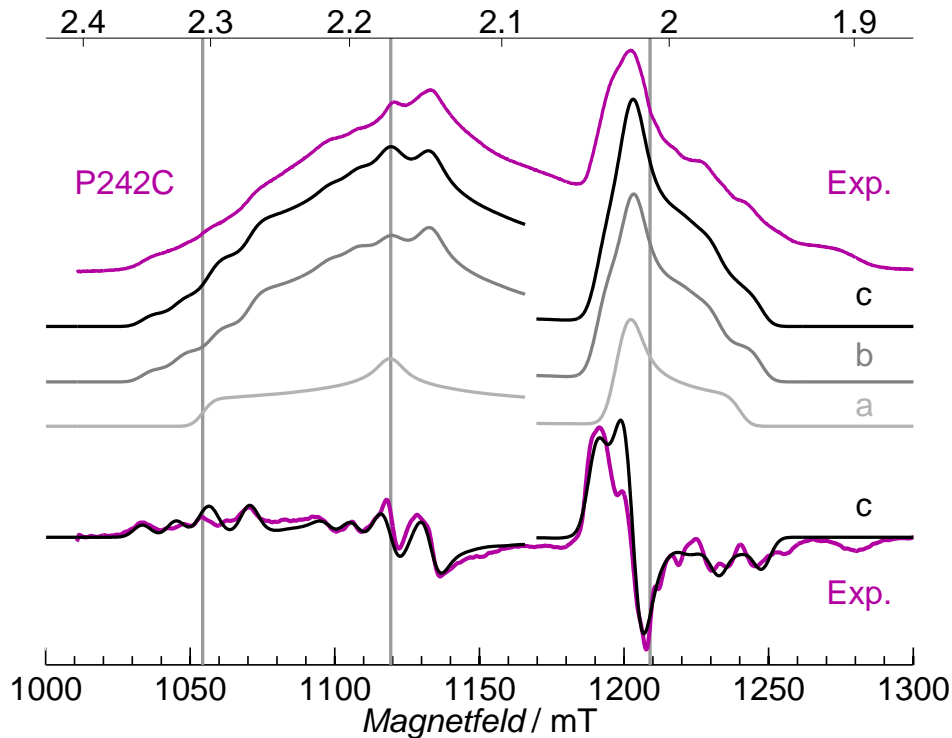
des Kristalls gegenüber dem Laborsystem mit den Winkeln ( $45^\circ, 85^\circ, 25^\circ$ ) auch eine Ausrichtung mit den Winkeln ( $135^\circ, 85^\circ, 155^\circ$ ) möglich.

### 4.2.1 Übertragung der Parameter auf Lösungsspektren.

Die in Sektion 4.1.1 vorgestellten Tieftemperaturspektren von Wildtyp und P242C-Mutationsvariante sollen an dieser Stelle noch einmal aufgegriffen werden. In den vorherigen Abschnitten wurden folgende Informationen gewonnen beziehungsweise bestätigt:

- Das aktive Zentrum ist dem von Standardhydrogenasen sehr ähnlich, es weist nahezu gleiche  $g$ -Werte wie diese auf ( $g_{\text{Ni}} = (2.310, 2.176, 2.011)$ ) und ist gleichermaßen bezüglich der Elementarzelle des Kristalls orientiert. Es hat einen Spin  $S = 1/2$ .
- Der proximale Cluster hat den Spin  $S = 3/2$ . Er ist mit einer Austauschkopplung der Stärke  $J_{12} \approx 460$  MHz mit dem aktiven Zentrum verbunden.
- Der mediale Cluster liegt mit  $S = 1/2$  vor und hat die  $g$ -Werte  $g_{\text{med}} = (2.022, 2.016, 1.997)$ .
- Die Austauschkopplung zwischen medialem und proximalem Cluster lässt sich wie folgt abschätzen. Die Relaxationszeitmessungen zeigen einander angepasste  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeiten der drei Cluster und lassen auf das Vorhandensein der Kopplung schließen ( $|J_{23}| > 0$ ). Die Simulation der Einkristallmessungen lässt eine ähnliche Größe wie  $J_{12}$  zu. Die temperaturabhängigen FSEs deuten auf eine geringere Austauschkopplung  $J_{23} < J_{12}$  hin.

Die neu gewonnenen Parameter werden in die Simulation der Lösungsspektren integriert, angefangen bei der Mutationsvarianten P242C (Abbildung 4.29). Die Asymmetrie der [FeS]-Region im Q-Band-Spektrum deutet auf eine anisotrope  $J$ -Kopplung zwischen aktivem Zentrum und proximalem Cluster hin, dabei zeigt der  $g_x$ -Wert des proximalen Clusters (mutmaßlich bei etwa 1200 mT) eine deutliche geringere  $J$ -Aufspaltung als sein  $g_z$ -Wert (ca. 1240 mT). Aus diesem Grund wurde eine gewisse Orientierungsabhängigkeit dieser Wechselwirkung bei den Simulationen berücksichtigt.



**Abbildung 4.29:** Q-Band-FSE der P242C-Variante der MBH bei 10 K (violett) und Simulationen (grau) mit folgenden Parametern: **a)** [NiFe]- und proximaler Cluster ungekoppelt:  $g_{\text{Ni}} = (2.306, 2.172, 2.011)$ ,  $g_{\text{pr}} = (1.960, 2.032, 2.022)$ . **b)** Beide gekoppelt:  $g_{\text{Ni}} = (2.310, 2.176, 2.011)$ ,  $g_{\text{pr}} = (1.960, 2.032, 2.022)$ ,  $J_{12} = (400, 360, 340)$  MHz. **c)** Summe aus a und b, Verhältnis 1:6. Unten: Jeweilige Pseudomodulation. Die grauen Linien geben die  $g$ -Werte von Nickel wieder,  $g$ -Achse oben. Weitere Erläuterungen im Text.

Der Nickelbereich der P242C-Varianten kann durch einen Spin  $S = 1/2$  mit den leicht veränderten  $g$ -Werten von  $\text{Ni}_r\text{-B}$  ( $g_{\text{Ni}} = (2.310, 2.176, 2.011)$ ) simuliert werden, der durch die Austauschwechselwirkung  $J_{12} = (400, 360, 340)$  MHz an den proximalen Cluster mit Spin  $S = 3/2$  gekoppelt ist (Abbildung 4.29, b). Zusätzlich tragen ungekoppelte Nickelanteile mit den ursprünglichen  $g$ -Werten zum Spektrum bei (Abbildung 4.29, a), ihr Anteil beträgt etwa  $1/6$  der anderen Nickelspezies. Hier und im Folgenden belaufen sich die Fehler der  $g$ -Werte auf  $\pm 0.001$ , die der verschiedenen Wechselwirkungen auf  $\pm 20$  MHz.

Die Nachbildung des [FeS]-Bereiches gestaltet sich schwieriger. Prinzipiell wird der mediale Cluster als diamagnetisch angenommen, es sollte neben  $g_z$  von Nickel also

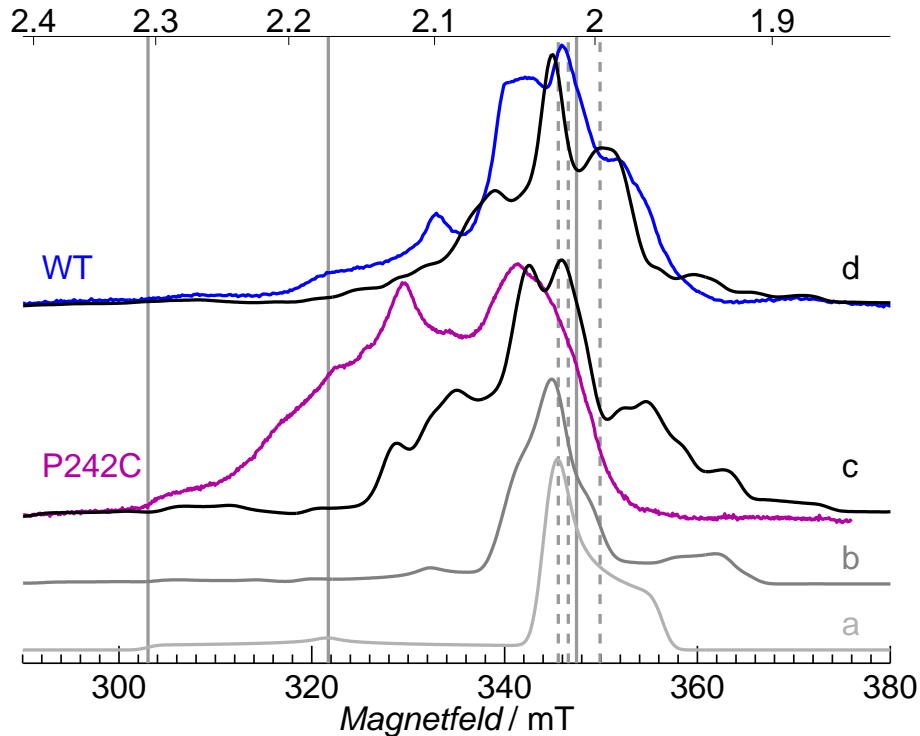
nur eine paramagnetische Spezies vorliegen: der proximale Cluster. Die hier gefundene  $g$ -Matrix  $g_{\text{pr}} = (1.960, 2.032, 2.022)$  ist nahezu axial und gibt die wesentlichen Strukturmerkmale wieder. Bei den größeren  $g$ -Werten gibt es eine vergleichsweise geringe  $J$ -Aufspaltung, bei  $g_z$  tritt sie stärker in Erscheinung: Entsprechend der beschriebenen Asymmetrie koppelt  $g_x$  von Nickel an  $g_z$  des proximalen Clusters und ruft durch die größte  $J$ -Komponente die weiteste Aufspaltung hervor. Außer acht gelassen wurden hierbei kleinere Charakteristika zwischen 1210 und 1250 mT, welche sich im Gegensatz zur Aufspaltung auf  $g_x$  von Nickel temperaturabhängig verändern (vergleiche Abbildung 4.4).

In diesem Bereich ist ein Einfluss der Nullfeldaufspaltung des proximalen Clusters wahrscheinlich, diese wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit bisher nicht einbezogen. Im X-Band tritt diese Wechselwirkung ebenso wie die  $J$ -Aufspaltung aufgrund der Feldunabhängigkeit im Vergleich zur  $g$ -Aufspaltung stärker zutage. Dies ist in Abbildung 4.29 ersichtlich, insbesondere bei der P242C-Mutationsvarianten gibt es im X-Band keine klare Trennung von Nickel und [FeS]-Bereich wie im Q-Band. Während sich dort die [FeS]-Region stark an der mutmaßlichen  $g$ -Matrix  $g_{\text{pr}} = (1.960, 2.032, 2.022)$  des proximalen Clusters orientiert (vergleiche Abbildung 4.29), ist im X-Band eine deutliche Verschiebung zu kleinerem Magnetfeld festzustellen (Abbildung 4.30, Experiment in Violett und Spur a).

Durch Kristallproben könnten Nullfeldaufspaltung und ihre Orientierung bestimmt werden, aufgrund der geringen Größe und Signalintensität der vorliegenden Proben waren X-Band-Messungen jedoch nicht praktikabel. Eine Aufklärung der überlagerten, gekoppelten [FeS]-Clustersignale im Q-Band konnte also nicht erreicht werden, so dass hier stattdessen eine prinzipielle Betrachtung durchgeführt wird. Die beobachtete Verschiebung innerhalb des P242C-Spektrums kann bereits teilweise durch die asymmetrische Austauschkopplung  $J_{12}$  erreicht werden (Abbildung 4.30, Spur b). Deutlich stärker wird sie unter Einbeziehung der Nullfeldwechselwirkung, hier am Beispiel von  $D = (350, 0\ 0)$  MHz (Spur c).

Den Wildtyp betreffend gibt es weitere Parameter zu beachten, namentlich die Austauschwechselwirkung mit dem medialen Cluster und ihre Ausrichtung. Beispielhaft ist dieser Cluster mit den zuvor bestimmten  $g$ -Werten  $g_{\text{med}} = (2.022, 2.016, 1.997)$  mit der isotropen Wechselwirkung  $J_{23} = -200$  MHz an den proximalen Cluster gekoppelt





**Abbildung 4.30:** X-Band-FSE des Wildtyps (blau) und der P242C-Varianten (violett) bei 10 K und Simulationen (grau) mit folgenden Parametern: **a)** [NiFe]- und proximaler Cluster ungekoppelt. **b)** Beide gekoppelt. (a und b identisch zu Abbildung 4.29, a und b). **c)** Wie b, dazu  $D_{\text{pr}} = (350, 0, 0)$  MHz. **d)** Wie c, zusätzliche Kopplung zwischen proximalem und medialem Cluster:  $g_{\text{med}} = (2.022, 2.016, 1.997)$ ,  $J_{23} = -200$  MHz. Die grauen Linien geben die  $g$ -Werte von Nickel wieder, gestrichelt jene des medialen Clusters,  $g$ -Achse oben. Weitere Erläuterungen im Text.

(Abbildung 4.30, Spur d). In diesem Fall verhalten sich Austausch- und der Nullfeldwechselwirkung gegenläufig, das simulierte Wildtypspektrum d ist schmäler als sein Pendant c. Es zeigt sich, dass die ungewöhnliche spektrale Form des Wildtyps prinzipiell auf diese Weise nachgebildet werden kann: Von leichten Verschiebungen abgesehen ist sowohl der dem medialen Cluster zugeordnete schmale Bereich um 345 mT wiedergegeben, als auch die breiteren Flügel an den Flanken dieses Signals. Wie genau sich die beteiligten Parameter allerdings ausnehmen, muss in weiterführenden Messungen bestimmt werden.

**Diskussion.** Die aktiven Zentren in MBH und Standardhydrogenasen stimmen sowohl bezüglich ihrer elektronischen Struktur als auch ihrer Orientierung im Kristall miteinander überein, hier gibt es keine Hinweise auf ein ungewöhnliches Verhalten, welches die Sauerstofftoleranz der MBH erklären könnte.

Der proximale Cluster hingegen zeigt im oxidierten Zustand deutliche Abweichungen, trägt in der MBH einen untypischen Spin  $S = 3/2$ , im Gegensatz zum Standardfall mit  $S = 0$  oder  $1/2$ . Dieser Spinzustand geht Hand in Hand mit der zuvor in Spinquantifizierungsmessungen festgestellten Abweichung, dass zusammen mit dem medialen Cluster nur 1.2-1.8 Spins pro Enzym vorlägen [46], weniger als für zwei Spins  $S = 1/2$  erwartet würden. Standardhydrogenasen tragen am Ort des proximalen Clusters Kubane, welche nur schwach an die anderen Kofaktoren koppeln. Bei der MBH handelt es sich hingegen um einen verzerrten  $[4Fe3S]$ -Cluster, der im oxidierten Zustand neben seinem außergewöhnlichen Spinzustand zudem verhältnismäßig starke Wechselwirkungen zu seinen Nachbarn zeigt und damit offenbar wesentlichen Anteil an der Sauerstoffverträglichkeit trägt.

Das ungewöhnliche Verhalten der MBH-Spektren zwischen Q-Band und X-Band der P242C-Mutationsvarianten kann prinzipiell durch eine orientierungsabhängige, anisotrope Austauschwechselwirkung zwischen aktivem Zentrum und proximalem Cluster erklärt werden. Die Einbeziehung der Nullfeldaufspaltung, und im Fall des Wildtyps der zweiten Austauschkopplung, sowie ihrer Orientierungen erhöhen die Zahl möglicher Parameterkombinationen, die derartige Spektren hervorrufen können, so dass an dieser Stelle nur eine Abschätzung der Werte möglich ist. Verschiedene weiterführende Analysen können in Zukunft der Festlegung der Parameter dienen.

In früheren Untersuchungen an der MBH ermittelten Saggu *et al.* [55] Wechselwirkungen von  $J_{12} = 780$  MHz und  $J_{13} = 550$  MHz. Das aktive Zentrum wurde als direkt an zwei Cluster gekoppelt betrachtet, einmal an den medialen Cluster und einmal an ein unbekanntes paramagnetisches Zentrum, von dem vermutet wurde, es könne sich um einen veränderten proximalen Cluster handeln. Pandelia *et al.* [143] hingegen erhielten für Hase I aus *A. aeolicus* die Werte  $J_{12} = 1250$  MHz und  $J_{23} = 550$  MHz und legten eine lineare Kopplungskette zugrunde. Die Spannweite der wenigen Literaturwerte macht klar, dass im Bereich der sauerstofftoleranten Hydrogenasen noch deutlich Raum für weitere Forschung ist (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1:** Austauschkopplungen zwischen den Clustern im WT der MBH aus den Einkristallsimulationen und Literaturwerte zu *A. aeolicus* [143] und alten MBH-Messungen [55]).

Cluster	gekoppelt an	$J$	Ref.
<i>Re</i> MBH			
[NiFe]	– prox. [4Fe3S] <sup>5+</sup>	$\approx 400$ MHz	
prox. [4Fe3S] <sup>5+</sup>	– med. [3Fe4S] <sup>1+</sup>	200-450 MHz	
<i>Re</i> MBH alt			
[NiFe]	– prox. [4Fe4S] mod./ [3Fe4S] <sup>1+</sup>	780 MHz	[55]
[NiFe]	– med. [3Fe4S] <sup>1+</sup>	550 MHz	
<i>Aa</i> Hase I			
[NiFe]	– prox. [4Fe3S] <sup>5+</sup>	1250 MHz	[143]
prox. [4Fe3S] <sup>5+</sup>	– med. [3Fe4S] <sup>1+</sup>	550 MHz	

Beide Arbeiten beruhen auf der Annahme dreier Spins  $S = 1/2$ . Ein Vergleich der in der vorliegenden Arbeit bestimmten  $J$ -Kopplungen mit diesen Literaturwerten ist aufgrund des abweichenden Spinzustandes des proximalen Clusters und des teils anderen Kopplungsschemas also nur bedingt aussagekräftig (vergleiche Tabelle 4.1). Die Einschätzung der ersten Wechselwirkung  $J_{12}$  aus den Kristalldaten zeigte, dass ein Wert von 460 MHz bei  $S = 3/2$  in etwa einem Wert von 1300 MHz entspräche, würde es sich um eine Spinspezies mit  $S = 1/2$  handeln. Diese Größe ist vergleichbar mit der von Pandelia *et al.* [143] gefundenen Kopplung zwischen proximalen Cluster und aktivem Zentrum.

Insbesondere ist diese Wechselwirkung deutlich größer als jene, die im reduzierten Zustand gefunden wurde. Pandelia *et al.* [147] erhielten für *A. aeolicus* etwa 100 MHz als Kopplung des reduzierten proximalen Clusters an das [NiFe]-Zentrum (Ni<sub>r</sub>-B), für die sauerstoffempfindliche [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas* ergab sich zwischen Ni<sub>a</sub>-C und dem proximalen [4Fe4S]<sup>1+</sup>-Cluster eine Wechselwirkung von  $J = 120$  MHz [153]. Ein eventueller Transfer von Elektronen zur Neutralisierung von O<sub>2</sub> am aktiven Zentrum könnte durch eine stärkere Bindung des proximalen Clusters an dieses erleichtert werden. Möglicherweise ist dies dem Mechanismus der Sauerstofftoleranz in der MBH und in Hase I zuzuschreiben.

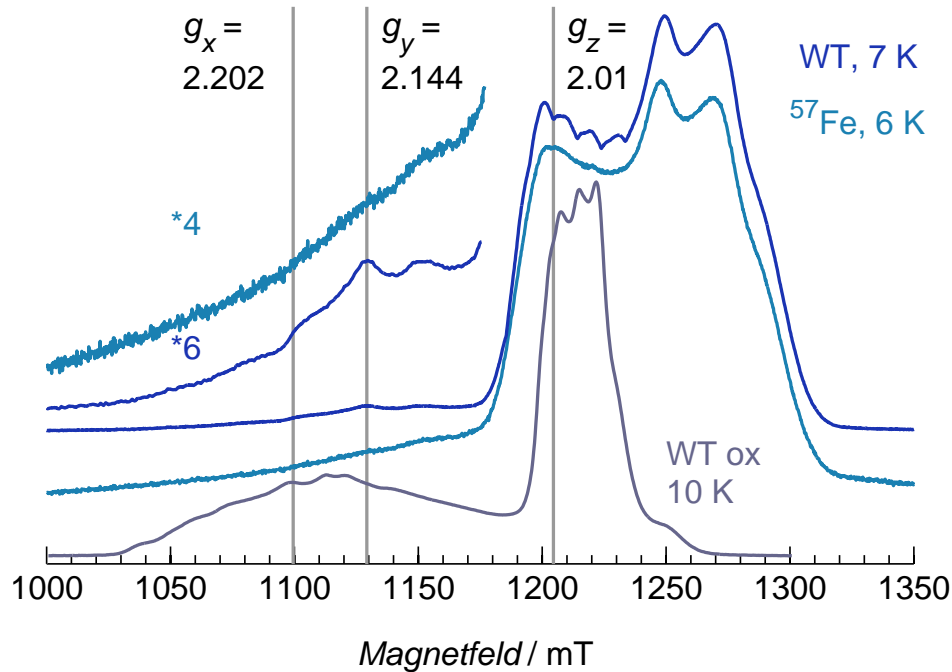
Das Vorhandensein der linearen Bindung, wie sie hier und für *A. aeolicus* vorliegt, kann zudem die bei Saggi *et al.* [55] aufgeworfene Fragestellung erklären, warum bei Teilreduktion mit  $\beta$ -Mercaptoethanol beide *J*-Bindungen verloren gehen: Wird der proximale Cluster reduziert, steht er nicht mehr als vermittelnder Bindungspartner zwischen medialem Cluster und aktivem Zentrum zur Verfügung.

### 4.3 Reduzierte, gefrorene MBH-Lösung

Das Q-Band-FSE-Spektrum der Wildtyp-MBH im reduzierten Zustand (Abbildung 4.31) zeigt deutliche Unterschiede zur oxidierten Variante (Abbildung 4.31, blau-grau, vergleiche Abbildung 4.1). Der [FeS]-Clusterbereich ist wesentlich breiter, das Nickelareal ist schmaler und weist eine weniger komplexe Struktur auf. Nickel liegt als  $\text{Ni}_a\text{-C}$  mit  $g = (2.202, 2.144, 2.010) \pm 0.001$  vor.  $g_x$  und  $g_y$  lassen sich gut bestimmen,  $g_z$  verschwindet unter den starken Signalen der [FeS]-Cluster. Es gibt keine sichtbare Kopplung zwischen  $\text{Ni}_a\text{-C}$  und proximalem Cluster, da keine Aufspaltung auf  $g_x$  oder  $g_y$  von Nickel erkennbar ist. Diese Beobachtung stimmt überein mit vorherigen Messungen an der MBH, das Enzym verhält sich in diesem Punkt anders als seine Entsprechung in Standardhydrogenasen [46, 153–155].

An der Position von  $\text{Ni}_a\text{-C-}g_z$  überlagern Störsignale von freiem  $\text{Mn}^{2+}$  das Wildtypspektrum.  $\text{Mn}^{2+}$  hat einen Elektronenspin von  $S = 5/2$ , wobei außer jenem für  $m_S = -1/2 \leftrightarrow m_S = +1/2$  alle  $m_S$ -Übergänge durch die Nullfeldwechselwirkung *D* sehr stark verbreitert sind. Durch den Kernspin  $I = 5/2$  und die große, meist isotrope, Hyperfeinwechselwirkung wird der nicht verbreiterte Spinübergang in sechs Linien aufgespalten, die als regelmäßige Struktur mit einem Abstand von etwa 90 MHz dem Spektrum aufgeprägt sind [156, 157]. Zu Verzerrungen des Spektrums kann es auch durch einen oft auftretenden Resonator-Kupferhintergrund kommen, der als breites Signal mit einem Maximum bei etwa 1180 mT vorliegt (Abbildung 4.31, WT- $^{57}\text{Fe}$ ). Gerade bei Proben mit geringer Signalintensität kann es durch diese Zusatzsignale zu Schwierigkeiten bei der Interpretation der Spektren kommen.

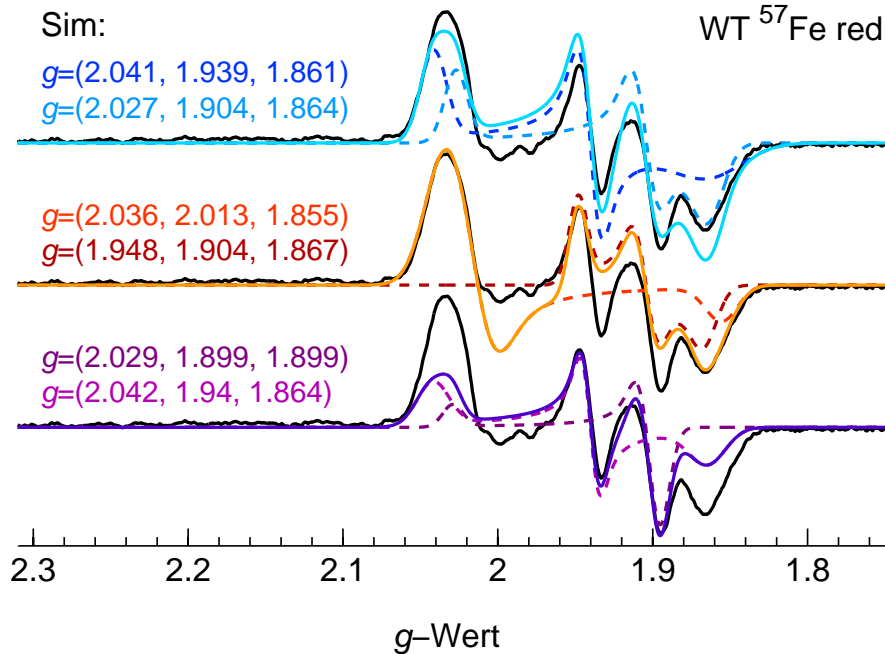
Der [FeS]-Clusterbereich ähnelt nicht der typischen rhombischen *g*-Matrix eines einzelnen Clusters, ein zusätzliches Signal deutet auf wenigstens ein weiteres paramagnetisches Zentrum hin. Insbesondere das vergleichsweise breite Signal bei 1190 mT



**Abbildung 4.31:** FSE im Q-Band der reduzierten MBH WT- und WT-<sup>57</sup>Fe-Proben bei 7 K bzw. 6 K.  $g$ -Werte von Ni<sub>a</sub>-C in Grau. Zum Vergleich die 10 K-Messung der oxidierten Probe aus Abbildung 4.1, blaugrau.

( $g \approx 2.03$ ) verdeutlicht, dass es sich hierbei um eine Überlagerung zweier ungekoppelter Cluster handeln könnte. Simulationen ergeben für das Q-Band-Feldspektrum die  $g$ -Hauptwerte  $g_1 = (2.041, 1.939, 1.861)$  sowie  $g_2 = (2.027, 1.904, 1.864) (\pm 0.001)$ . Zur besseren Zuordnung der Signale ist die Pseudomodulation des Spektrums zusammen mit dieser Simulation in Grafik 4.32 (oben) gezeigt.

Die simulierten Werte stimmen mit denen überein, die Pandelia *et al.* für die sauerstofftolerante Hydrogenase Hase I aus *A. aeolicus* fanden ( $g_1 = (2.044, 1.934, 1.854)$  und  $g_2 = (2.033, 1.910, 1.862)$  [30, 147]).  $g_2$  wurde dem distalen Cluster zugeordnet,  $g_1$  dem proximalen, sie überlagern sich ungekoppelt. Der mediale Cluster soll in seiner reduzierten Form  $[3\text{Fe}4\text{S}]^0$  den Gesamtspin  $S = 2$  haben, er weist kein EPR-Signal um  $g = 2$  auf und relaxiert zudem sehr schnell [154, 158, 159]. Die proximalen Cluster in *A. a.* Hase I und *R. e.* MBH ähneln in reduzierter Form mehr einem Kuban als es im oxidierten Zustand der Fall ist, was die Annäherung ihrer  $g$ -Werte an die der mutmaßlich distalen Cluster erklären könnte. Das Maximum des FSE-Spektrums weist

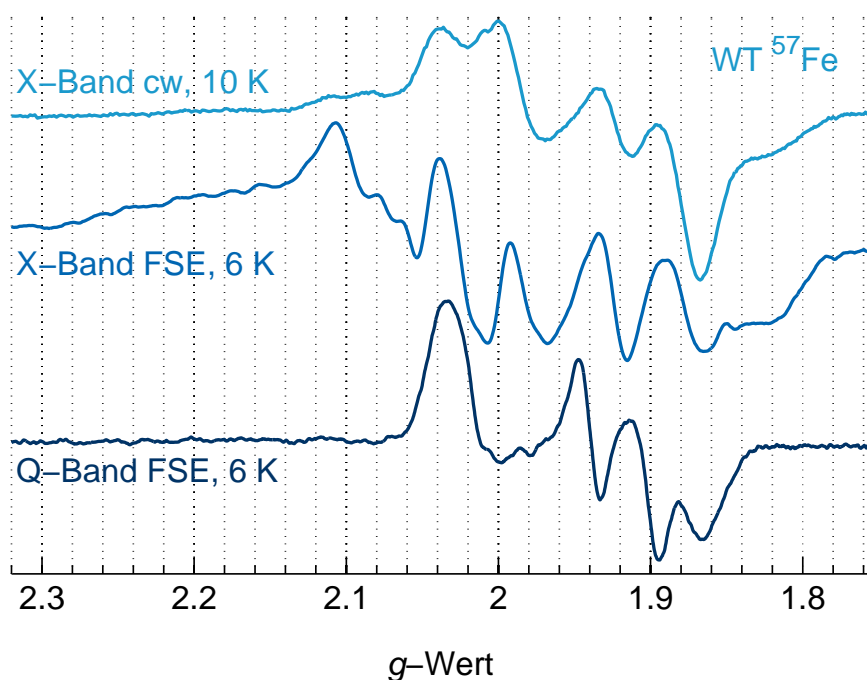


**Abbildung 4.32:** Pseudomodulation des Q-Band-FSE der reduzierten MBH WT- $^{57}\text{Fe}$ -Probe bei 6 K (schwarz) mit möglichen Simulationen (farbig). Die  $g$ -Werte der ungekoppelten Cluster sind in der Farbe der jeweiligen Teilsimulation (gestrichelt) angegeben.

mit  $g \approx 1.94$  einen  $g$ -Wert auf, der als typisch für  $[\text{4Fe4S}]^{1+}$ -Cluster betrachtet wird [154, 160–162].

Die Zuordnung ist allerdings nicht eindeutig, wie alternative Simulationen zeigen (Abbildung 4.32, mittig und unten). X-Band-Messungen können hier Aufschluss darüber geben, ob wirklich eine Überlagerung ungekoppelter Cluster vorliegt oder ob eine magnetische Wechselwirkung vorhanden ist, da zum Beispiel ein Austauschterm feldunabhängig wäre und im X-Band-Spektrum dominanter zu Tage träte.

Der Vergleich zwischen Q- und X-Band-Spektren bestätigt die Vermutung: In der Auftragung beider Spektren gegen die  $g$ -Achse wird klar, dass das X-Band-Spektrum breiter ist als sein Äquivalent im Q-Band (Abbildung 4.33) und nicht mehr durch dieselben, ungekoppelten  $g$ -Matrizen simuliert werden kann. Die Signale bei  $g = 2.035$  und  $g = 1.865$  bleiben erhalten, jene dazwischen verschieben sich und neue Kompo-



**Abbildung 4.33:** Pseudomodulationen der X- und Q-Band-FSE-Messungen sowie X-Band-*cw*-Spektrum der reduzierten MBH WT- $^{57}\text{Fe}$ -Probe.

nennten bei  $g = 2.105$  und  $g = 1.82$  kommen hinzu. Die Gegenüberstellung von X-Band-FSE-Messung und entsprechenden *cw*-Daten, die bereits aus der Literatur bekannt sind [45, 163], gibt einen Hinweis darauf, dass die beiden äußeren, neu hinzugekommenen Signale möglicherweise zum selben paramagnetischen Zentrum gehören. In der *cw*-Messung werden diese breiten Signale unterdrückt und sind deshalb nur schwach zu erkennen (Abbildung 4.33). Für das *cw*-Spektrum wurde bereits zuvor aufgrund von Redox titrationen vermutet, dass zwei gekoppelte  $[\text{4Fe4S}]^{+1}$ -Cluster vorhanden sind [45, 163]. Die betrachteten Signale bei  $g = 1.86$  und  $g = 1.83$  zeigen jedoch über den gesamten Redoxbereich ein gleichartiges Verhalten und sind auf diese Art nicht zu trennen.

Die starken Abweichungen zwischen X-Band-*cw*- und Q-Band-FSE-Spektren wurden auch für Hase I aus *A. aeolicus* festgestellt [147], es wird argumentiert, dass die Kopplung der beiden  $[\text{4Fe4S}]$ -Cluster an den mutmaßlich reduzierten  $[\text{3Fe4S}]^0$ -Cluster mit  $S = 2$  durch dessen schnelle Relaxation entfällt. Das Q-Band-Spektrum ließe sich im

Gegensatz zum *cw*-X-Band-Spektrum durch zwei ungekoppelte Cluster simulieren. Diese Argumentation greift jedoch nicht für das bei der MBH vorliegende X-Band-FSE, welches bei gleicher Temperatur aufgenommen wurde wie die Q-Band-Messung. Wäre die Kopplung an den medialen Cluster durch seine zu schnelle Relaxation aufgehoben, müssten sich X- und Q-Band-FSE mit identischen  $g$ -Werten ohne weitere Parameter simulieren lassen. Stattdessen weist das X-Band-FSE mehr Signale auf als die *cw*-Variante und die Q-Band-Messung und nicht etwa gleich viele oder weniger.

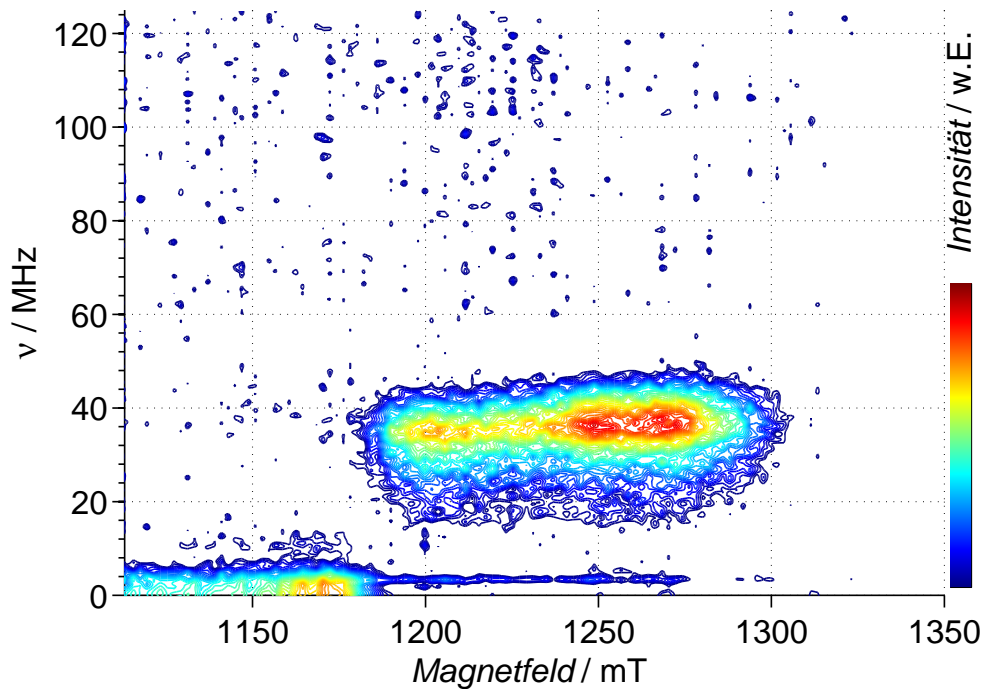
Um die zum gesamten Spektrum beitragenden Komponenten zu entkoppeln und Auskunft über die beteiligten Cluster und ihr Wechselwirkungen zu gewinnen, können mehrere Methoden angewandt werden: PEANUT-Messungen können Aufschluss über die einzelnen Spinzustände geben und sie separieren, Relaxationszeitmessungen könnten Signale nach ihrem Relaxationsverhalten trennen und Mutationsvarianten können es ermöglichen, Signalanteile dadurch auszublenden, dass ausgewählte Cluster durch diamagnetische Äquivalente ersetzt werden.

### 4.3.1 Nutationsmessungen

Bereits von Knüttel *et al.* [45] wurde vermutet, dass im reduzierten Zustand der mediale Cluster als  $[3\text{Fe4S}]^0$ -Clusters mit  $S = 2$  vorliegt. Pandelia *et al.* [147] nutzen dies in ihrer Argumentation bezüglich der spektralen Unterschiede zwischen Puls- und *cw*-EPR. Rößler *et al.* [164] argumentieren zusätzlich, dass der reduzierte (mutmaßlich) distale Cluster einen Spin  $S > 1/2$  besitzen muss. So weist in ihrer Untersuchung die proximalen Mutationsvariante C19G/C120G keinerlei Signal im Bereich  $g = 2$  auf, dagegen werden bei tiefen Temperaturen FSE-Signale bis zu 800 mT (X-Band) beobachtet. Über starke Reduktion mit Eu(II)DTPA konnte ausgeschlossen werden, dass medialer und distaler Cluster in der medialen Mutationsvariante P242C nicht ausreichend reduziert wurden und aus diesem Grund nicht detektiert werden konnten. Es wird geschlossen, dass alle gemessenen  $S = 1/2$ -Signale ihren Ursprung ausschließlich im proximalen Cluster haben.

Zur Klärung dieser Fragen wurden wie für die oxidierten Wildtyp auch für den reduzierten Fall PEANUT-Messungen durchgeführt. Ziel ist eine Trennung der beteiligten  $[\text{FeS}]$ -Cluster nach ihren Nutationsfrequenzen, welche sich je nach Gesamtspin





**Abbildung 4.34:** PEANUT-Spektrum im Q-Band der reduzierten MBH WT-Probe bei 6 K. Logarithmische Intensitätsachse. Messbedingungen identisch zu denen in Abbildungen 4.11 und 4.12. Für Feldbereich vergleiche FSE in Abbildung 4.31.

und Übergang unterscheiden. Die Messbedingungen stimmen mit denen der Q-Band-Messungen des oxidierten Wildtyps und der proximalen C19G/C120G-Mutationsvarianten überein (Abbildungen 4.12 und 4.11), letztere kann gewissermaßen als Standard für die Frequenz von  $S = 1/2$  im Spektrum fungieren. Abbildung 4.34 gibt die Nutationsmessung in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke wieder. In Anbetracht der im Vergleich zum oxidierten Fall geringeren Signalintensität, die sich insbesondere im Nickelbereich widerspiegelt, wurde ein verkleinerter Ausschnitt um den [FeS]-Clusterbereich für die Messung gewählt.

Im Spektrum zeigt sich über die gesamte [FeS]-Clusterbreite des zuvor gemessenen FSEs ein Signal bei  $\omega_1 = 35\text{-}40$  MHz, was dem  $m_S$ -Spinübergang  $-1/2 \leftrightarrow +1/2$  eines Gesamtpins  $S = 1/2$  entspricht. Bei geringen Frequenzen tauchen insbesondere im Niederfeldbereich Signale auf, die sich entweder durch das ungünstigere Signal-Rausch-Verhältnis in der FFT als Artefakte niederschlagen oder verbotene Übergänge

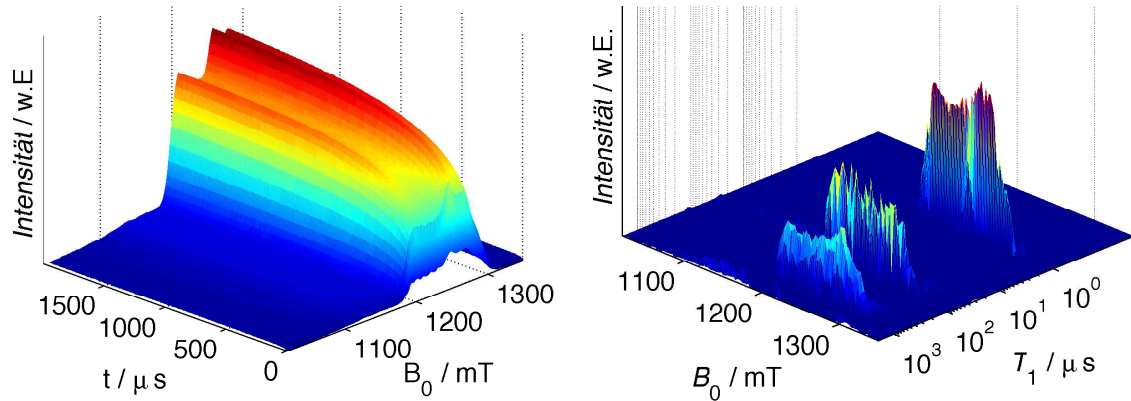
darstellen. Im Gegensatz zur oxidierten Wildtypprobe sind bei Frequenzen größer als  $\omega_1$  keine Signale zu finden, die auf höhere Spinzustände hinweisen.

Die Abwesenheit solcher Signale bedeutet zum einen, dass alle am FSE-Signal um  $g = 2$  beteiligten Cluster über einen Gesamtspin  $S = 1/2$  verfügen und keine Nullfeldaufspaltung wie im oxidierten Fall zu erwarten ist. Zum anderen lässt sich die Aussage treffen, dass über diese Methode die beteiligten Spezies nicht getrennt werden können. Ein möglicher Cluster mit  $S = 2$  ist entweder nicht vorhanden oder so breit und weist daher so eine geringe spektrale Dichte auf, dass er in der Messung nicht mehr nachweisbar ist. Möglicherweise tritt er auch deutlich außerhalb des Messbereiches in Erscheinung und wirkt sich allein durch seine Kopplung an den proximalen und/oder distalen Cluster auf das gezeigte Spektrum aus. Allerdings konnte in den X-Band-*cw*-Messungen am reduzierten Wildtyp der MBH bei 10 K bis  $g < 12$  kein Signal festgestellt werden, wie es in den von Rousset *et al.* [9] beziehungsweise Teixeira *et al.* [154] durchgeführten Untersuchungen an den Hydrogenasen in *D. fructosovorans* und *D. gigas* bei Temperaturen kleiner als 40 K auftrat.

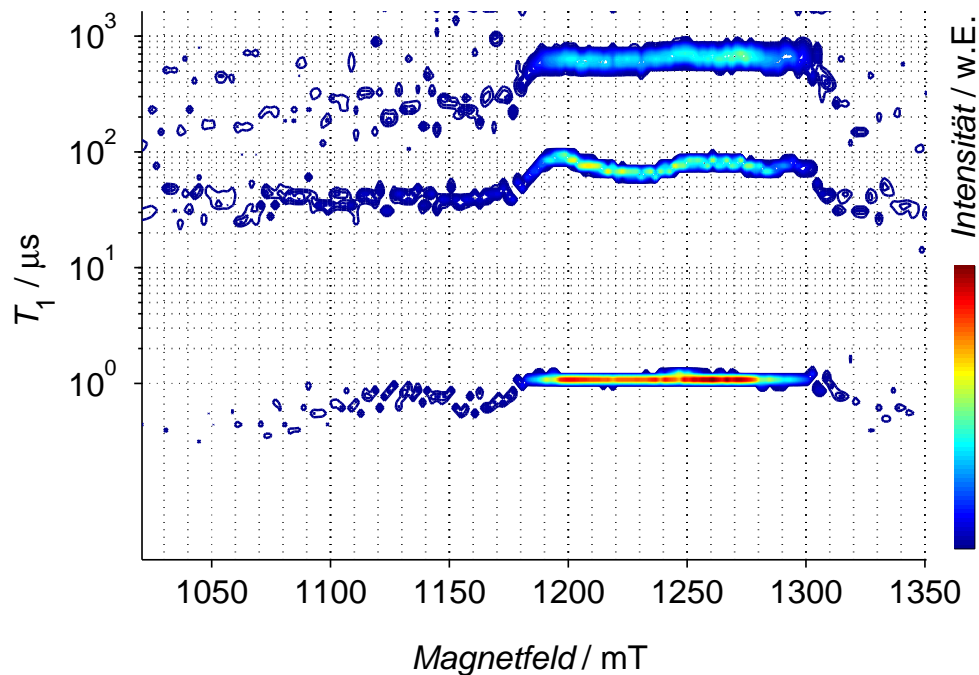
### 4.3.2 Relaxationsmessungen

Dass sich verschiedene Cluster aufgrund ihrer unterschiedlichen unmittelbaren Umgebungen auch in ihrem Relaxationsverhalten unterscheiden, bietet die Möglichkeit, sie auf diese Weise zu separieren. Für die reduzierte WT-Probe wurden bei 7 K  $T_1$ -*inversion-recovery*-Messungen über den in Abbildung 4.31 angegebenen Feldbereich durchgeführt (Abbildung 4.35 links). Nach dem im Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Verfahren der inversen Laplace-Transformation (iLT) wurden den einzelnen Spuren der Messung Summen von exponentiellen Zerfallskurven der Form  $G(R, T_1) = 1 - e^{-RT_1}$  angenähert. Anschließend wurden die anteiligen Raten der einzelnen Zerfallskonstanten gegen das Magnetfeld aufgetragen, so dass sich nach Relaxationszeiten getrennte Feldspektren ergeben (Abbildung 4.35 rechts).

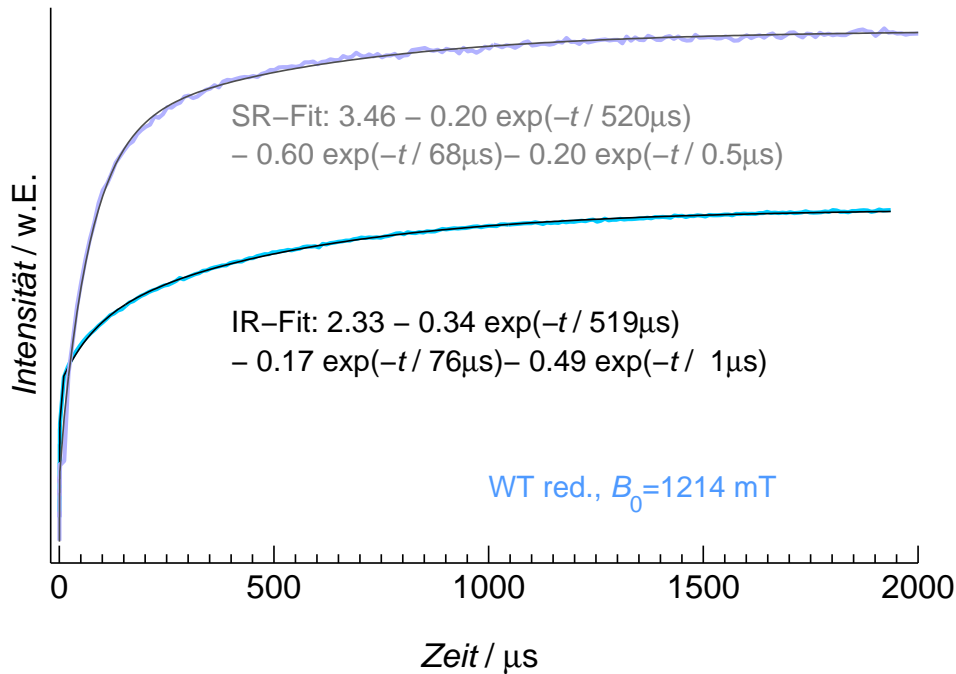
Es lassen sich Signale in drei Zeitgebieten ausmachen, die deutlich von einander getrennt sind: um etwa 1  $\mu$ s, bei circa 80  $\mu$ s sowie bei ungefähr 550  $\mu$ s (Abbildung 4.36). Alle drei Teilspektren erstrecken sich dabei über den gesamten von den [FeS]-Clustern bestimmten Feldbereich (vergleiche Abbildung 4.31). Neben der gleichen Breite mögli-



**Abbildung 4.35:** Links:  $T_1$ -inversion-recovery-Spektrum im Q-Band der reduzierten MBH WT-Probe bei 7 K. Messbedingungen:  $T = 7$  K, Inversionspuls: 60 ns,  $\pi/2 = 16$  ns, 40 Inkremente à 30 ns, dann 216 Inkremente à 9000 ns für  $t = 300$  ns,  $\tau = 280$  ns. Rechts: Inverse Laplace-Transformation der  $T_1$ -Messung.



**Abbildung 4.36:** Konturdarstellung der iLT aus Abbildung 4.35. Vergleiche FSE aus Abbildung 4.31.



**Abbildung 4.37:** *Saturation- und inversion-recovery- $T_1$ -Messungen* (aus Abbildung 4.35) der reduzierten MBH WT-Probe bei 1214 mT sowie zugehörige Fits. Messbedingungen SR:  $T = 7 \text{ K}$ , Sättigungspulskamm und Detektionsfolge:  $\pi - 330 \text{ ns} - \pi - 310 \text{ ns} - \pi - 290 \text{ ns} - \pi - 270 \text{ ns} - \pi - 250 \text{ ns} - \pi - 230 \text{ ns} - \pi - 210 \text{ ns} - \pi - 190 \text{ ns} - \pi - 170 \text{ ns} - \pi - 150 \text{ ns} - \pi - 130 \text{ ns} - \pi - 110 \text{ ns} - \pi - 90 \text{ ns} - \pi - 70 \text{ ns} - \pi - 50 \text{ ns} - \pi - t - \pi/2 - \tau - \pi$ . Mit  $\pi = 40 \text{ ns}$ ,  $\tau = 180 \text{ ns}$ , 120 Inkrementen à 10 ns, dann 330 Inkrementen à 10000 ns für  $t = 200 \text{ ns}$ .

cher  $g$ -Werte ist auch ungewöhnlich, dass es sich um drei Teilsignale handelt, während aufgrund der Zahl der Komponenten im FSE tendenziell eher zwei Cluster erwartet werden, namentlich der proximale und der distale. Möglicherweise muss man hier mit dem Einfluss von spektraler Diffusion und Spindiffusion rechnen [93, 94].

Um dies zu überprüfen, wurden ergänzend *saturation-recovery*-Messungen aufgezeichnet, beispielhaft ist die Zeitspur bei 1214 mT gegenüber der der IR-Messung in Abbildung 4.37 dargestellt. Die entsprechend angepassten Triexponentialfunktionen zeigen, dass sich der spektrale Anteil der kleinsten Relaxationszeit (0.5-1  $\mu\text{s}$ ) an der gesamten Zeitspur von 49% auf 20% verringert, was die Annahme bestätigt, dass es sich hierbei um Signale handelt, die von Diffusionsprozessen herrühren. Klar wird auch, dass die Sättigungsmessung wie zuvor beschrieben ein stärkeres Rauschen aufweist.

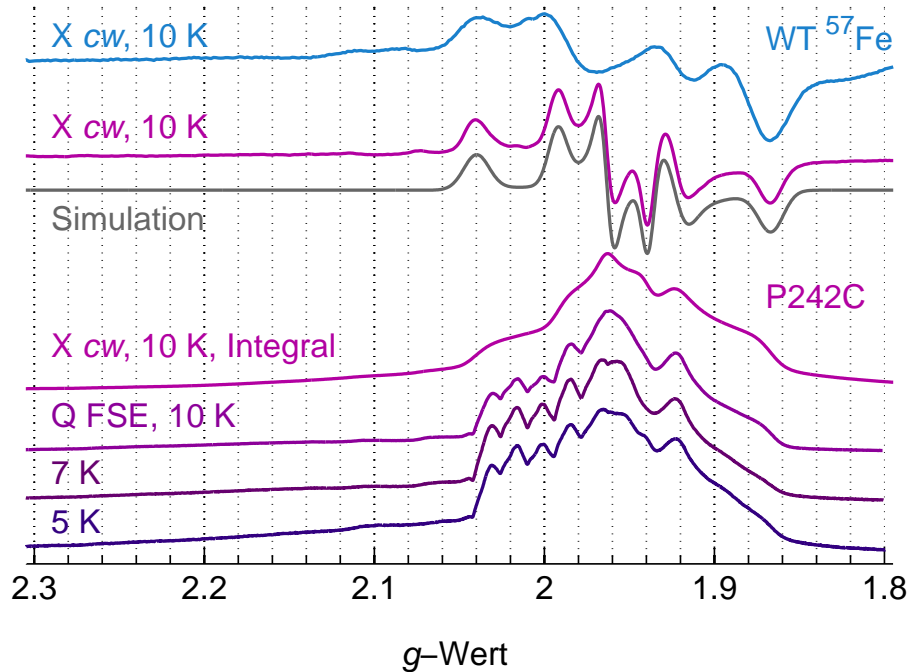
Die Relaxationsmessungen lassen folgende Möglichkeiten zu: Zum einen könnte es sich um zwei Cluster mit unterschiedlichen Relaxationszeiten handeln, die aber in etwa die gleiche  $g$ -Spanne umfassen. Andererseits könnte es sich um gekoppelte Spezies handeln, die durch ihre Wechselwirkung identische Relaxationszeiten haben. Dabei würde es sich um ein biexponentielles  $T_1$ -Verhalten handeln. Eine Trennung der Spektren in einzelne  $g$ -Matrizen kann an dieser Stelle also nicht erfolgen.

### 4.3.3 Mutationsvarianten

In der Mutationsvariante P242C ist ein Prolin nahe dem medialen Cluster gegen ein Cystein ausgetauscht, so dass der vormalige [3Fe4S]-Cluster in einen [4Fe4S]-Cluster umgewandelt ist [9]. Ist im reduzierten Zustand des Wildtyps der [3Fe4S]-Cluster an den proximalen und/oder distalen Cluster gekoppelt, sollte sich mit seiner Umwandlung dieses Kopplungsverhalten verändern.

Abbildung 4.38 stellt die X-Band-*cw*-Messungen von Wildtyp und Mutationsvariante gegenüber. Es ist ersichtlich, dass die Charakteristika bei etwa  $g = 1.87$ ,  $g = 2.04$  sowie  $g = 1.92$  in beiden Proben vorhanden sind. In der Mutante findet sich statt des breiten Wildtypsignals um  $g = 1.99$  eine sichtbar schmalere, rhombische  $g$ -Matrix. Es gibt kein Signal bei kleineren  $g$ -Werten, wie es sich im Wildtyp bei  $g = 1.82$  andeutete. Das gesamte Spektrum der P242C kann mit zwei ungekoppelten Clustern mit den  $g$ -Werten  $g_1 = (2.040, 1.924, 1.867) \pm 0.001$  beziehungsweise  $g_2 = (1.993, 1.964, 1.939) \pm 0.001$  simuliert werden (Abbildung 4.38, grau). Diese Werte stimmen grundsätzlich mit denen überein, die von Jaqueline Priebe ( $g_1 = (2.032, 1.918, 1.861)$  und  $g_2 = (1.985, 1.956, 1.933)$ , [145]) und Friedhelm Lendzian ( $g_1 = (2.037, 1.921, 1.865)$ , persönliche Mitteilung) gefunden wurden. Hierbei ähnelt die anisotropere Spezies typischen [4Fe4S]-Clustern [165–167], während sich die schmalere Komponente eher wie ein [2Fe2S]-Cluster ausnimmt [168].

Bemerkenswert ist, dass die Mutationsvariante im Q-Band gleichartige Spektren aufweist. In Abbildung 4.38 sind zusätzlich das Integral der *cw*-Messung sowie gepulste Q-Band-Messungen der P242C-Probe gezeigt. Letztere sind durch Manganverunreinigungen überlagert, weshalb die Integraldarstellung gewählt wurde. Es wird deutlich, dass die Spektren weitgehend dieselbe Form aufweisen, sowohl was ihre Breite als



**Abbildung 4.38:** X-Band-*cw*-Messungen von Wildtyp (blau) und P242C (violett), zugehörige Simulation (grau,  $g_1 = (2.040, 1.924, 1.867)$ ,  $g_2 = (1.993, 1.964, 1.939)$ ) sowie integriertes Spektrum. Dazu FSEs der P242C im Q-Band bei 5-10 K, mit Manganstörsignalen um  $g = 2$ .

auch einzelne Maxima betrifft. Diese Beobachtung bestätigt, dass in der P242C zwei nicht austauschgekoppelte Cluster vorliegen.

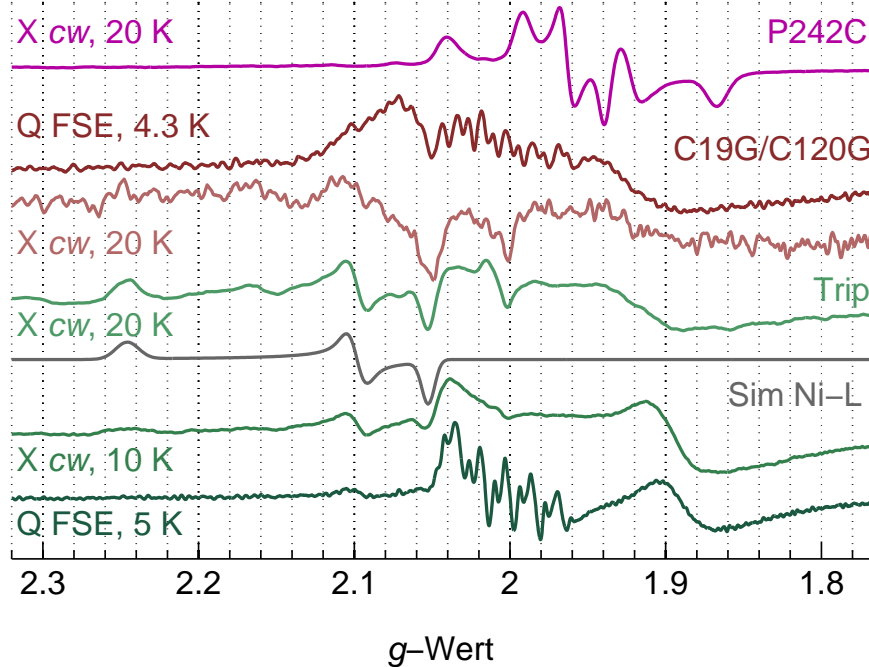
Darüber hinaus kann eine Nullfeldaufspaltung eines einzelnen Clusters in einem höheren Spinzustand ausgeschlossen werden, da sich sonst Unterschiede zwischen X- und Q-Band zeigen müssten. Die verschiedenen Linienbreiten der beiden Signalkomponenten widersprechen dem ebenso wie ihr unterschiedliches Verhalten bezüglich Temperatur und Redoxpotential [145]: Die schmalere Spezies ist bei 40 K bereits deutlich verbreitert, die breitere Spezies ist nahezu unverändert im Vergleich zu geringeren Temperaturen. Zudem taucht die schmalere Spezies ansatzweise schon bei Ascorbatteilreduktion auf, die breitere Spezies erst bei Reduktion durch Wasserstoff.

Der distale Cluster besitzt laut Kristallstruktur in seiner unmittelbarer Nähe ein Histidin [57]. Die Hyperfeinwechselwirkung zwischen einem der Eisen und dem Stickstoff

des Histidinrings könnte mit ENDOR oder ESEEM bestimmt werden. Es kann sich dabei um eine Kopplung bis zu einer Größenordnung von mehreren MHz handeln [169]. Um zu bestimmen, ob das gekoppelte Signal des Wildtyp-FSEs teilweise auf den distalen Cluster zurückzuführen ist, wurden ENDOR und ESEEM-Messungen an der reduzierten Wildtypprobe durchgeführt. Es konnte im ENDOR allerdings kein Signal festgestellt werden, im ESEEM zeigte sich nur die freie Protonenfrequenz. Das kann zum einen bedeuten, dass die Messungen nicht erfolgreich waren, weil die Signalintensität nicht ausreichte, zum anderen wäre es möglich, dass der distale Cluster nicht als paramagnetische Spezies vorkommt und damit auch seine Wechselwirkung mit dem Histidin nicht detektiert werden kann.

Um die Signale der beteiligten Cluster weiter zu entflechten, sollen zwei zusätzliche Mutationsvarianten zur Betrachtung hinzugezogen werden (Abbildung 4.39). In der C19G/C120G-Variante (proximale Mutante) wurde durch Ersetzung der zwei überzähligen Cysteine der proximale Cluster durch ein für Standardhydrogenasen typisches Kuban substituiert. Die Dreifachmutante C19G/C120G/P242C enthält zusätzlich einen [4Fe4S]-Cluster an der medialen Position. Die *cw*-Spektren der reduzierten Proben bei 20 K weisen Signale von Ni-L auf ( $g = (2.246, 2.099, 2.053)$ , Abbildung 4.39, grau). Insbesondere für die Dreifachmutante lässt sich aus dem Vorhandensein des Signals einerseits folgern, dass das Protein trotz weitreichender Veränderungen in der Elektronentransferkette eine, wenn auch stark verminderte, Restaktivität aufweist und Anzeichen eines intakten [NiFe]-Zentrums zeigt. Andererseits deutet Ni-L, welches ohne gesonderte Belichtung auftritt, in der MBH darauf hin, dass möglicherweise Heterogenitäten oder nichtnative Strukturen in der Probe vorliegen [46], da der Übergang zwischen Ni<sub>a</sub>-C und Ni-L in Hydrogenasen typischerweise nur durch Beleuchtung bei niedrigen Temperaturen initiiert werden kann (siehe Kapitel 7 und [25, 26, 170]).

Beide Mutanten verfügen zudem über ein schmales Signal um  $g = 2.001$  sowie ein sehr breites bei  $g = 1.9$ . Das Q-Band-FSE der proximalen Mutante bei tieferen Temperaturen weist sehr wenig Ni-L auf, nur  $g_z$  ist deutlich ausgeprägt (Abbildung 4.39, braun). Insgesamt ist die Intensität der Probe sehr schwach, so dass die Überlagerung mit Mangan deutlich hervor tritt. Die Grundcharakteristika der *cw*-Spektren sind vorhanden, einzig um  $g = 2.07$  kommt es zu verstärkter Intensität. Es gibt keine



**Abbildung 4.39:** X-Band-*cw*-Messungen und pseudomodulierte Q-Band-FSEs der reduzierten medialen P242C (violett), der proximalen C19G/C120G (braun) und der Dreifachmutationsvarianten C19G/C120G/P242C (grün, Trip). Simulation von Ni-L in Grau mit  $g = (2.246, 2.099, 2.053)$ .

Hinweise auf eine Austauschwechselwirkung, die für unterschiedliche Spektren in X- und Q-Band sorgen würde. Ebenso wie im Wildtyp konnte auch für diese Mutationsvariante kein Signal bei  $g = 12$  gemessen werden, wie es in anderen Hydrogenasen für den reduzierten [3Fe4S]-Cluster mit  $S = 2$  charakteristisch ist [9, 149, 154, 159].

Auch das Q-Band-FSE der Dreifachmutante weist deutliche Manganstörsignale auf, zeigt aber bei 5 K klare Unterschiede zur C19G/C120G: Auf der Hochfeldseite kommt es zu einem breiten Signals bei  $g = 1.87$  (schmäler als jenes bei  $g = 1.9$ ), welches zusammen mit einem Maximum bei  $g = 2.04$  auftaucht (Abbildung 4.39, grün). Das *cw*-X-Band-Spektrum dieser Mutante bei 10 K bestätigt die Signale, es liegt also keine Kopplung vor. Diese neu auftretenden Signale in der Dreifachmutanten sind höchstwahrscheinlich dem reduzierten, medialen [4Fe4S]-Cluster zuzuordnen. Sie weisen Ähnlichkeit mit dem von Rousset *et al.* [9] gefundenen, umgewandelten medialen Cluster auf, der nach der Mutation als schnell relaxierende Spezies mit  $g = 1.88$  und



2.08 in Erscheinung tritt. Mit der Absenkung der Temperatur verringert sich außerdem die relative Intensität der Ni-L-Signale (Abbildung 4.39, grün).

Das für die proximale Mutante und bei höheren Temperaturen auch für die Dreifachmutante vorliegende Spektrum wird womöglich durch den reduzierten proximalen [4Fe4S]-Cluster hervorgerufen, dem Vergleich zwischen *cw*-X- und Q-Band nach liegt dieser in ungekoppelter Form vor. Es ist unwahrscheinlich, dass die detektierten Signale vom distalen Cluster herrühren, da in den Spektren der Proben mit intaktem proximalen [4Fe3S]-Cluster (Wildtyp und P242C) kein solch breiter Untergrund auszumachen ist. Der distale Cluster weist aufgrund seines Histidinliganden ein niedrigeres Potential, so dass er unter normaler Wasserstoffeinwirkung ( $-410$  mV bei pH 7.0) noch nicht reduziert ist. Dies stimmt überein mit den Untersuchungen von Rößler *et al.* [164], die für die Hydrogenase-1 aus *E. coli* ebenfalls kein  $S = 1/2$ -Signal dieses Clusters feststellen konnten.

Die Spektren der reduzierten Mutationsvarianten C19G/C120G und C19G/C120G/-P242C mit verändertem proximalen Cluster zeigen keine signifikanten Charakteristika der Wildtyp- oder P242C-Probe. Dies lässt den Schluss zu, dass der proximale [4Fe3S]-Cluster für das Auftreten der starken [FeS]-EPR-Signale in Wildtyp und P242C essentiell ist. Demnach ist der anisotropere Anteil der P242C-Simulation mit  $g_1 = (2.040, 1.924, 1.867)$  voraussichtlich dem proximalen Cluster zuzuordnen, denn der kleinste und größte  $g$ -Wert dieser Matrix ist sowohl im Wildtyp als auch in der P242C zu finden (X- und Q-Band). Rößler *et al.* [164] kommen für Hyd-1 zu einem ähnlichen Ergebnis, allerdings ist in der verwendeten P242C-Probe das schmalere, rhombische Signale wenn überhaupt, dann nur marginal vorhanden und wurde nicht in die Auswertung einbezogen.

Ungewöhnlich ist, dass mit der Veränderung des medialen Clusters jeweils neue, aber unterschiedliche Signale auftreten. Prinzipiell wäre der schmale Anteil der P242C-Simulation mit  $g_2 = (1.993, 1.964, 1.939)$  ebenfalls dem reduzierten medialen [4Fe4S]-Cluster zuzuordnen, auch wenn dies scheinbar der zuvor getroffenen Zuordnung der Signale bei  $g = 1.87$  und  $2.04$  widerspricht. Es stellt sich die Frage, warum ein einzelner Cluster zwei unterschiedliche Signale aufweisen sollte. In der oxidierten Form der P242C-Mutationsvarianten werden aufgrund von EPR-Messungen [145] sowie Röntgenstrukturanalysen an Kristallen Heterogenitäten vermutet. Kristalle der reduzier-

ten Probe weisen allerdings keine derartige Abweichung auf (persönliche Mitteilung von Patrick Scheerer, Proteinstrukturanalyse/Signaltransduktion, Charité Berlin), also ist hier die Ursache nicht zu suchen. Es steht zu vermuten, dass die umfassenden Manipulationen in der C19G/C120G/P242C-Varianten nicht nur einzelne Cluster, sondern die gesamte Elektronentransferkette beeinflussen, so dass diese Mutationsvariante strukturell weiter vom Wildtyp entfernt, wenn nicht sogar im Vergleich dazu geschädigt ist. Darauf deutet die geringe Aktivität wie auch das untypische Auftauchen von Ni-L hin. Demnach ist die auf der P242C basierende Zuordnung des proximalen Clusters zum schmalen  $g_2$ -Signal verlässlicher als jene auf Basis der Dreifachmutanten.

Die Wildtypspektren in Q- und X-Band betrachtend, sollte auch eine orientierungsabhängige  $J$ -Wechselwirkung in Erwägung gezogen werden, wie sie für verschiedene [FeS]-Cluster beobachtet wurde. Zuerst wurde dieser Effekt in Acht-Eisen-Ferredoxinen festgestellt [171], winkelabhängige Simulationen wurden für die [4Fe4S]-Cluster in *Synechocystis* 6803 Photosystem I [172] und für die [FeS]-Cluster dreier Organismen von More *et al.* [173] durchgeführt. Für Clusterabstände zwischen 8 Å und 10 Å wurden Kopplungen zwischen 180 MHz und 130 MHz gefunden. In der Hydrogenase in *Desulfovibrio gigas* koppelt unter reduzierenden Bedingungen das aktive Zentrum an den proximalen Cluster [153, 165]. Bei etwa 12 Å Distanz ergibt sich eine Kopplungsstärke von ungefähr 120 MHz.

Eine derartige Wechselwirkung zwischen aktivem Zentrum und proximalem Cluster kann für die MBH ausgeschlossen werden, Ni<sub>a</sub>-C liegt ohne Aufspaltung vor (Abbildung 4.31). Es ist also fraglich, welche beiden Cluster auf diese Art und Weise wechselwirken könnten. Sollten proximaler und distaler Cluster in paramagnetischer Form vorliegen, würde der Abstand von etwa 18 Å in einer sehr kleinen Wechselwirkung münden, die keine Auswirkungen zeigen würde. Der mutmaßlich mit  $S = 2$  vorliegende, mediale Cluster könnte zwischen den anderen beiden vermitteln. Geht man hingegen nach der vorhergehenden Betrachtung der Mutationsvarianten davon aus, dass der distale Cluster in diamagnetischer Form vorliegt und sich nicht an der Wechselwirkung beteiligt, bleiben nur medialer und proximaler Cluster als Kopplungspartner. Eine Simulation ist aufgrund der Vielzahl unbekannter Parameter –  $g$ -Werte des medialen Clusters, seine Nullfeldaufspaltung, Stärke und Orientierung

der Kopplung dieses Clusters an den proximalen und eventuell distalen Cluster – zu diesem Zeitpunkt nicht sinnvoll.

## 4.4 Zusammenfassung

Im vorliegenden Kapitel wurden die elektronischen Charakteristika der im oxidierten beziehungsweise reduzierten Zustand paramagnetisch vorliegenden Zentren vorgestellt und diskutiert.

Durch die temperaturabhängigen EPR-Messungen der gefrorenen, oxidierten Lösung des Wildtyps und einer Mutationsvariante konnten die  $g$ -Werte für den medialen Cluster und das aktive Zentrum bestätigt werden. PEANUT-Messungen ließen erstmals erkennen, dass der proximale Cluster mit einem Spin  $S = 3/2$  vorliegt, medialer Cluster und [NiFe]-Cluster haben jeweils den Spin  $S = 1/2$ . Aus den Kristallmessungen konnte geschlossen werden, dass in der MBH die  $g$ -Achsen des aktiven Zentrums auf die gleiche Weise ausgerichtet sind wie in der Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. Außerdem ließen sich dadurch die Austauschkopplungen des proximalen Clusters an das aktive Zentrum und den medialen Cluster abschätzen. Relaxationszeitmessungen zeigten, dass die Wechselwirkungen der drei Zentren dafür sorgen, dass sich ihre Relaxationszeiten nahezu komplett angleichen.

Für die reduzierte Probe konnten in der P242C-Mutationsvarianten die  $g$ -Werte zweier ungekoppelter paramagnetischer Spezies festgestellt werden. Die anisotropere Spezies stellt aller Voraussicht nach den proximalen Cluster dar, da diese in ähnlicher Weise auch im Wildtyp zu finden ist, nicht aber in den Mutationsvarianten des proximalen Clusters. Die isotropere Spezies ist vermutlich dem medialen [4Fe4S]-Cluster zuzuordnen. Der distale Cluster tritt höchstwahrscheinlich weder im Wildtyp noch in den Mutationsvarianten in Erscheinung. Relaxationszeitmessungen deuten darauf hin, dass im Wildtyp sich entweder zwei Spezies auf der gesamten Breite des Q-Band-FSEs überlagern oder es durch die Kopplung der beteiligten Cluster (proximaler und medialer Cluster) zu einem biexponentiellen Zerfall kommt, so dass die Spektren nicht getrennt werden können. Für den Wildtyp wurde außerdem ermittelt, dass am beobachteten Q-Band-FSE ausschließlich Cluster mit Spin  $S = 1/2$  beteiligt sind.

### 4.5 Ausblick

Zukünftig könnten W-Band-Messungen an der oxidierten MBH vorgenommen werden. Bei höherem Feld und höherer Frequenz kann eine größere  $g$ -Aufspaltung erzielt werden, während Beiträge wie Hyperfeinwechselwirkung, Austauschkopplung oder Nullfeldaufspaltung keine Feldabhängigkeit aufweisen und entweder vernachlässigbar klein werden oder durch Vergleich mit anderen Frequenzbändern separiert werden können. So wäre es durch PEANUT-Messungen möglich, die  $g$ -Werte des proximalen Clusters zu bestimmen. Ebenso könnten W-Band-EPR-Messungen an Kristallen die Orientierungen der  $g$ -Achsen der beiden [FeS]-Cluster erkennen lassen und die Ausrichtung derer des aktiven Zentrums bestätigen.

S-Band-Messungen an der reduzierten Probe könnten weitere Auskünfte über die Größenordnung der Kopplung der Cluster im Wildtyp geben, da sich dort die Aufspaltung durch Austauschwechselwirkung gegenüber der  $g$ -Anisotropie stärker zeigen würde. Dies würde eine wesentlich größere Probenmenge erfordern. W-Band-Messungen hingegen könnten die Zahl der beteiligten Cluster einschränken, die Umstände wären denen im S-Band entgegengesetzt. Alle Wahrscheinlichkeit nach wäre die  $J$ -Aufspaltung klein gegen die  $g$ -Anisotropie, so dass die  $g$ -Hauptwerte nahezu ungestört beobachtet werden könnten. Eine Mutationsvariante des distalen Clusters, bei der der Histidinligand durch ein Cystein ausgetauscht würde, könnte das Redoxpotential des Clusters erhöhen. EPR-Messungen könnten durch das eventuelle zusätzliche Signal bestätigen, dass der Cluster vorher diamagnetisch war und somit die Zuordnung von Signalen zu den anderen Zentren stützen.

---

# STICKSTOFFKOPPLUNGEN DES PROXIMALEN CLUSTERS DER MBH

---

Die Umgebung des aktiven Zentrums der MBH stimmt mit der von Standardhydrogenasen überein (siehe Abschnitt 2.2.1). Bedeutender Unterschied ist hingegen der ungewöhnlich aufgeweitete, proximale [4Fe3S]-Cluster der MBH, der von sechs Cysteinen koordiniert wird. Er ist höchstwahrscheinlich Ursache der Sauerstofftoleranz des Enzyms. Aus der Kristallstruktur des reduzierten Enzyms [57] geht hervor, dass der vierte anorganische Schwefel des Clusters in der MBH durch den Schwefel des Cysteins 19 ersetzt wurde. Dieses ist nun direkt mit Fe1 und Fe4 verbunden, zudem gleicht Cystein 120 die fehlende Bindung an Fe3 aus. Es besteht die Möglichkeit, dass es im oxidierten Zustand unter Sauerstoffeinfluss zu weiteren Modifikationen kommt. Da die Verformung des Clusters mit Bindungen zu anderen Aminosäuren einhergehen muss, ließe sich eine Strukturänderung durch Messung solcher Kopplungen nachweisen. In Frage kämen Cysteine, die über den Thiolschwefel gebunden würden, dazu stickstoffhaltige Aminosäuren, was die Restgruppen von Glutamin, Histidin oder Asparagin ebenso einschließt wie Amidstickstoffe des Peptidrückgrates.

Die Hyperfeinwechselwirkung kann als lokale Sonde der elektronischen Struktur dienen, denn sie reagiert empfindlich auf strukturelle Veränderungen der Kofaktoren und

der Proteinumgebung. Dazu benutzt man den elektronischen Spin des paramagnetischen Zentrums als Referenzpunkt. Da Feldspektren von Hydrogenasen typischerweise relativ große Linienbreiten aufweisen (1-2 mT), ist die Hyperfeinwechselwirkung zwischen Elektronenspin und umgebenden Kernen im FSE sehr schlecht aufgelöst. Detailliertere Informationen lassen sich mit ENDOR und ESEEM gewinnen, komplementäre Messmethoden hoher spektraler Auflösung, die unterschiedlich starke Kopplungen zwischen Elektronen und Kernen abbilden können.

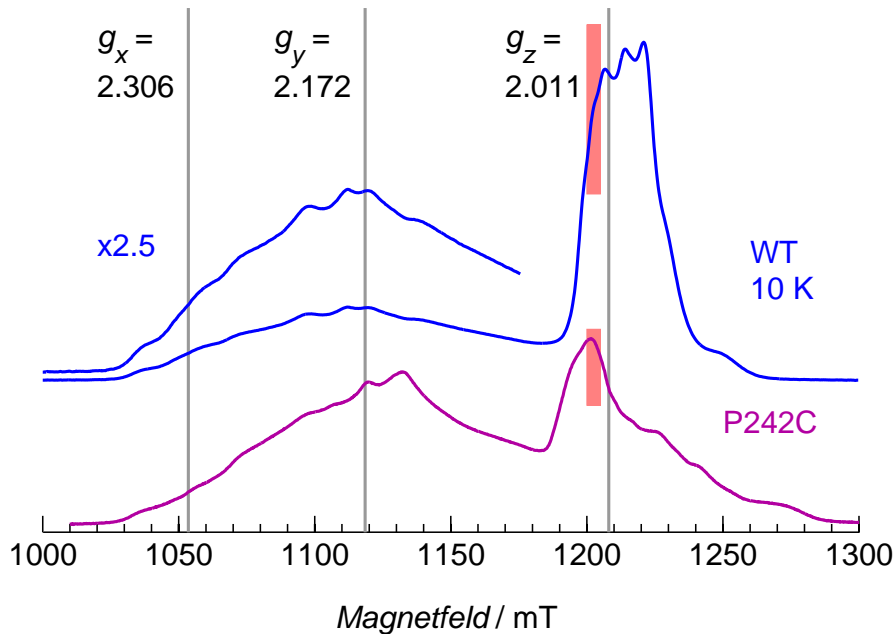
Dieses Kapitel beinhaltet die Ergebnisse der Untersuchungen am proximalen Cluster der MBH im *as-isolated*-Zustand, beginnend mit einer kurzen Wiederholung der EPR-Charakteristika des Proteins. Es folgen die Ergebnisse der Untersuchung starker Hyperfeinkopplungen mittels Doppelresonanzmethoden, anschließend werden die Resultate von Echomodulationsmessungen zur Detektion schwacher Hyperfeinwechselwirkungen vorgestellt.

### 5.1 EPR der MBH

Wie zuvor in Abschnitt 4.1 erläutert, liegen im *as-isolated*-Zustand der proximale und der mediale Cluster sowie das aktive Zentrum paramagnetisch vor. Durch  $J$ -Kopplung kommt es zur Aufspaltung der einzelnen Signale.

Abbildung 5.1 gibt das Feldspektrum im Q-Band bei 10 K wieder. Bei der höheren Temperatur (vergleiche Abbildung 4.1) zeigt sich nur das aktive Zentrum in Form von Ni<sub>r</sub>-B, mit den  $g$ -Werten  $g = (2.306, 2.172, 2.011)$ . Die [FeS]-Cluster sind aufgrund der schnelleren Relaxation nur bei tiefen Temperaturen zu finden, sie weisen eine geringe  $g$ -Anisotropie auf und haben Signale nahe  $g = 2$ . In diesem tiefen Temperaturbereich zeigt sich auch eine Aufspaltung der  $g$ -Werte des Nickels, verursacht durch  $J$ -Kopplung der drei paramagnetischen Spezies.

Die mediale Mutante weicht vom Wildtyp ab, ihre Besonderheit besteht darin, dass in der unmittelbaren Nähe des medialen Clusters Prolin 242 gegen ein Cystein ausgetauscht wurde, so dass das [3Fe4S]-Zentrum des Wildtyps durch einen [4Fe4S]-Cluster ersetzt ist. Dieser kubane Cluster ist damit unter oxidierenden Bedingungen EPR-inaktiv, im Feldspektrum äußert sich dies durch einen stark reduzierten [FeS]-Bereich



**Abbildung 5.1:** Q-Band-FSE des Wildtyps (WT, blau) und der medialen P242C-Mutante (violett) der MBH. Grau markiert sind die  $g$ -Werte von Ni<sub>r</sub>-B, rot unterlegt die Position der <sup>14</sup>N-ENDOR-Messungen. Messbedingungen:  $T = 10$  K.

(Abbildung 5.1, violett). Die aufgespaltenen Nickelsignale sind weiterhin vorhanden, was darauf schließen lässt, dass auch die Kopplung zwischen aktivem Zentrum und proximalem Cluster erhalten bleibt.

Während es bereits im Q-Band eine Überlappung der unterschiedlichen Cluster gibt, die vor allem  $g_z$  von Ni<sub>r</sub>-B und die größtenteils unstrukturierte [FeS]-Region betrifft, ist dies bei Feldspektren bei kleinerer Mikrowellenfrequenz wie im X-Band deutlich gravierender (vergleiche Abbildung 5.5). Es muss insbesondere bei weiterführenden Messungen klar unterschieden werden, von welchem paramagnetischen Zentrum welcher Signalanteil stammt, zum Beispiel durch feldabhängige Messungen, Referenzmessungen an Mutationsvarianten oder mittels Ausnutzen unterschiedlichen Relaxationsverhaltens einzelner Spinzentren.

## 5.2 Starke Kopplungen – ENDOR

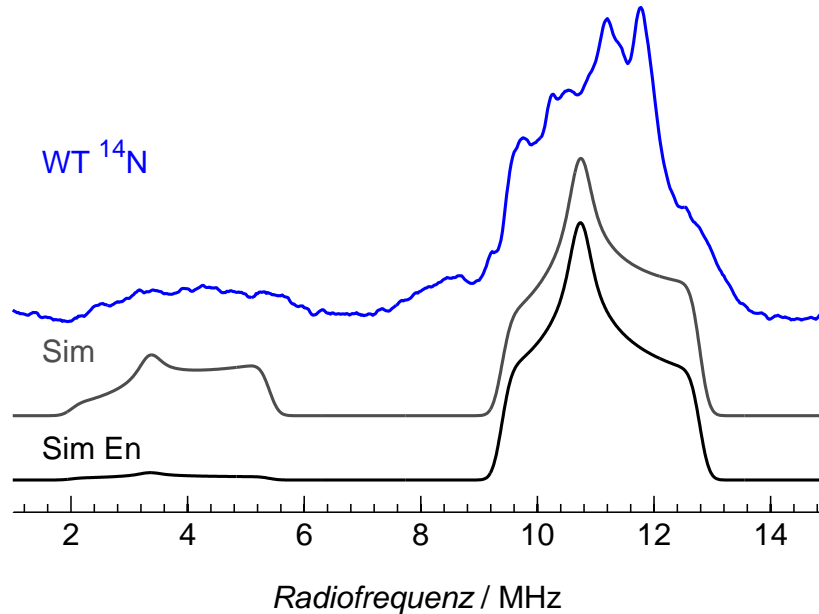
Um festzustellen, ob der Cluster mit seiner Umgebung Bindungen hauptsächlich kovalenten Charakters eingeht, wurden gepulste Davies-ENDOR-Messungen im Q-Band durchgeführt. Die Untersuchung gliedert sich wie folgt: Zunächst wird der Wildtyp analysiert, zur Bestätigung und Vereinfachung des ENDOR-Spektrums wird folgend eine isotopenausgetauschte Wildtypprobe vermessen. Mutationsvarianten in der Nähe verschiedener Cluster werden herangezogen, um gefundene Bindungen einem jener Cluster zuzuordnen und schließlich wird ihre Bedeutung hinsichtlich Struktur und Funktion diskutiert.

Kovalente Bindungen würden sich in starken Hyperfeinkopplungen äußern. Q-Band-Davies-ENDOR-Messungen am Wildtyp erfolgten auf der linken Flanke der [FeS]-Region des Feldspektrums, bei 1205 mT ( $g = 2.016$ ), da sowohl im Wildtyp als auch bei der medialen Mutante hier im FSE Signale auftreten (siehe Abbildung 5.1). Dies deutet auf die Position des proximalen Clusters hin.

Abbildung 5.2 (blau) gibt das Davies-ENDOR-Spektrum des Wildtyps bei 7 K wieder. Im Radiofrequenzbereich unter 15 MHz stechen zwei Signalgebiete deutlich hervor, die sich um 4 MHz sowie 11 MHz konzentrieren. In diesem Frequenzintervall findet man typischerweise starke Stickstoffbindungen mit hohem kovalenten Anteil, wie aus Messungen von Gurbiel *et al.* [169], Dicus *et al.* [174] sowie einer Aufstellung von Cammack und MacMillan [175] hervorgeht.

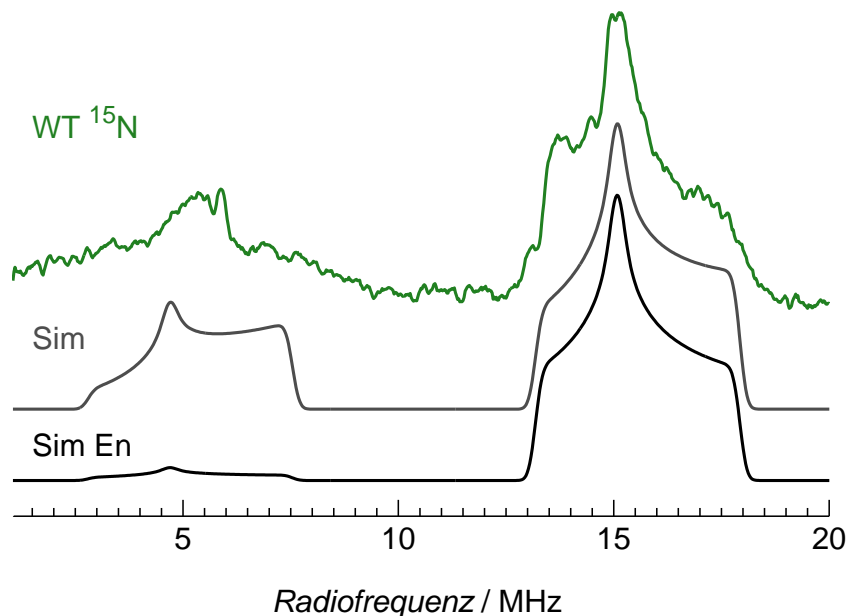
Es handelt sich hierbei um den sogenannten starken Kopplungsfall, da im Vergleich zur freien Frequenz von  $^{14}\text{N}$  eine starke Hyperfeinkopplung vorliegt. Die Signale sind um  $A/2$  zentriert, die Aufspaltung beträgt das Doppelte der freien Frequenz. In der vorliegenden Messung befindet sich das Zentrum demnach bei  $A/2 \approx 7.5$  MHz, im Abstand von  $\nu_{^{14}\text{N}} = 3.7$  MHz nach links bzw. rechts das Signal des jeweiligen ENDOR-Übergangs. Der höherfrequente Anteil zeigt sich aufgrund des Temperatureinflusses deutlich intensiver, zudem ist hier die Einwirkung der Kernquadrupolwechselwirkung auffällig, die sich als zackige Struktur äußert. Bei  $^{14}\text{N}$  handelt es sich um einen Kern, der einen Spin von  $I = 1$  trägt, das Quadrupolmoment sorgt zusätzlich zur Hyperfeinkopplung für Aufspaltungen der Signale.





**Abbildung 5.2:** Q-Band-Davies-ENDOR vom  $^{14}\text{N}$ -Wildtyp (blau) und Simulation der reinen Hyperfeinwechselwirkung mit  $A = (11.4, 14.1, 18.2)$  MHz (grau). In Schwarz die Simulation unter Einbeziehung von ENDOR *enhancement*. Messbedingungen:  $T = 7$  K.

**Kernisotop  $^{15}\text{N}$ .** Um die Hyperfeinwechselwirkung von der Quadrupolkopplung unbeeinflusst detektieren zu können, wurde eine Wildtypprobe präpariert, die ausschließlich unter  $^{15}\text{N}$  aufwuchs. Aufgrund des Kernspins von  $I_{^{15}\text{N}} = 1/2$  weist dieses Stickstoffisotop kein Quadrupolmoment auf. Das Wegfallen dieser zusätzlichen Aufspaltungen vereinfacht das ENDOR-Spektrum im Vergleich zur  $^{14}\text{N}$ -Variante maßgeblich. Da das FSE dieser Probe sich nicht vom  $^{14}\text{N}$ -Fall unterscheidet, wurde auf eine gesonderte Darstellung verzichtet. In Abbildung 5.3 (grün) ist ein solches  $^{15}\text{N}$ -ENDOR-Spektrum des Wildtyps aufgeführt, ebenfalls bei 7 K und auf der linken [FeS]-Flanke des Feldspektrums gemessen. Auch hier gibt es zwei Bereiche konzentrierter Signalintensität, sie sind im Vergleich zu  $^{14}\text{N}$  um den Faktor 1.4 zu höheren Frequenzen hin verschoben. Hierbei handelt es sich um den Unterschied in den gyromagnetischen Verhältnissen der beiden Kerne  $\gamma_{^{15}\text{N}}/\gamma_{^{14}\text{N}} = 1.4$ . Die beiden Hauptsignale bei 5 MHz und 15 MHz sind um  $2\nu_{^{15}\text{N}} = 10.4$  MHz voneinander separiert, Mittelpunkt ist bei  $A/2 \approx 11$  MHz. Das höherfrequente Signal lässt die Form einer rhombischen Matrix

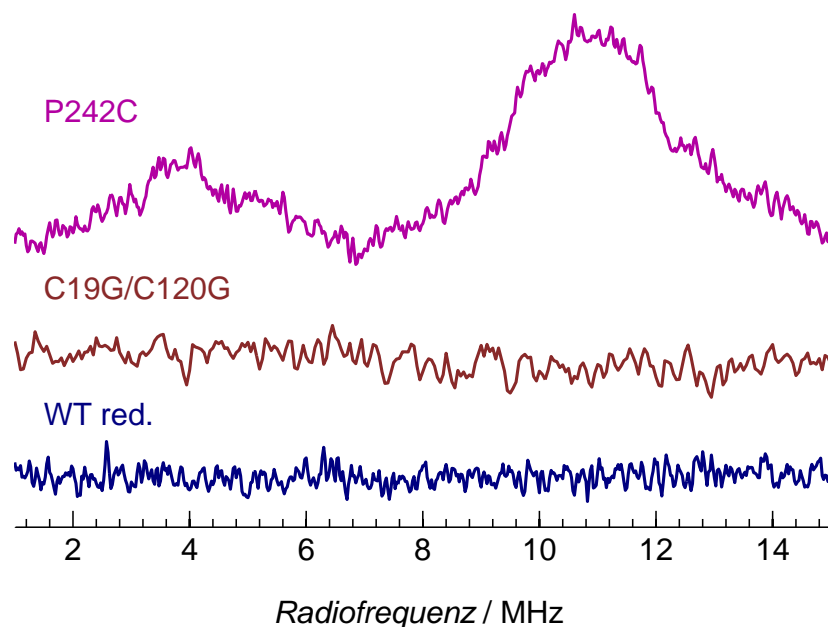


**Abbildung 5.3:** Q-Band-Davies-ENDOR vom  $^{15}\text{N}$ -Wildtyp (grün) und Simulation der Hyperfeinwechselwirkung mit  $A = (16.0, 19.8, 25.5)$  MHz (grau). In Schwarz die Simulation unter Einbeziehung von ENDOR *enhancement*. Messbedingungen:  $T = 7$  K.

erkennen.

Das Spektrum lässt sich mit einer Hyperfeinmatrix  $A_{^{15}\text{N}} = (16.0, 19.8, 25.5) \pm 0.1$  MHz simulieren (Abbildung 5.3, grau), und es zeigt sich, dass der isotrope Anteil mit  $a_{\text{iso}} = 20.4$  MHz das Spektrum dominiert. Das entspricht für den  $^{14}\text{N}$ -Wildtyp Werten von  $A_{^{14}\text{N}} = (11.4, 14.1, 18.2)$  MHz (Abbildung 5.2, grau). Diese Größenordnung ist kennzeichnend für direkte, also vornehmlich kovalente Stickstoff-Metall-Bindungen [169, 176–178].

Zur weiteren Untersuchung dieser Hyperfeinwechselwirkung wurden HYSORE-Experimente durchgeführt, es konnten jedoch keine brauchbaren Ergebnisse gewonnen werden. Dieses Phänomen der Signalabwesenheit wurde auch von Rößler *et al.* [164] für den Wildtyp der Hydrogenase-1 aus *E. coli* beobachtet. Alternativ wurden zur näheren Bestimmung der Quadrupolparameter Messungen zur ELDOR-*detected* NMR angesetzt, doch auch diese ergaben während der Auswertung keinerlei verwertbare



**Abbildung 5.4:** Q-Band-Davies-ENDOR von medialer P242C- und proximaler C19G/C120G-Variante (violett beziehungsweise braun) und der reduzierten MBH (dunkelblau). Messbedingungen:  $T = 11$  K, 10 K und 5 K.

Informationen.

**Mutationsvarianten.** ENDOR-Messungen im identischen Feldbereich der P242C-Mutante zeigen die gleiche starke Kopplung wie der Wildtyp (Abbildung 5.4, violett), auch wenn das Signal aufgrund der weit geringeren EPR-Intensität deutlich schwächer ausfällt. Die Umformung des medialen [3Fe4S]-Clusters in die [4Fe4S]-Form macht ihn diamagnetisch, er kann also nicht Ursache der starken Kopplung sein. Der distale Cluster ist als [4Fe4S]-Zentrum im oxidierten Zustand ebenso diamagnetisch und nicht Urheber. In der Mutationsvariante des Proteins C19G/C120G fehlen die beiden zusätzlichen Cysteine, die in der Wildtyp-MBH um den proximalen Cluster angeordnet sind. Dadurch verbleibt der Cluster in der kubanen Form, geht also keine weiteren Bindungen mit nahen Aminosäuren ein. Da für diese Mutationsvariante keine Stickstoffhyperfeinwechselwirkungen im ENDOR ersichtlich sind (Abbildung 5.4, braun), kann auch das aktive Zentrum als Signalursprung ausgeschlossen werden, so dass nur der proximale Cluster als Urheber in Frage kommt.

**Diskussion.** Die Analyse der Kristallstruktur des reduzierten Clusters zeigt, dass von möglichen Stickstoffbindungspartnern die Peptidstickstoffatome der Cysteine 19 und 20 der kleinen Untereinheit dem Cluster am nächsten sind, dabei betragen die Abstände  $d = 3.64 \text{ \AA}$  zwischen  $\text{N}(\text{Cys}19^{\text{S}})$  und Fe1, beziehungsweise  $d = 3.29 \text{ \AA}$  zwischen  $\text{N}(\text{Cys}20^{\text{S}})$  und Fe4 (pdb-Struktur 3RGW). ENDOR-Messungen der reduzierten Probe weisen keine starken Stickstoffkopplungen auf (Abbildung 5.4, dunkelblau), was bedeutet, dass diese Abstände für eine kovalente Bindung zu groß sind. Durch eine Verformung des Clusters könnte sich jedoch die Distanz verringern und eine Bindung ermöglicht werden.

Neueste Röntgenstrukturuntersuchungen durch unsere Kooperationspartner aus der AG Scheerer (Proteinstrukturanalyse/Signaltransduktion, Charité Berlin) an Kristallen der MBH im oxidierten und ascorbatreduzierten Zustand bestärken die Vermutung einer Clusteraufweitung mit begleitender Bindung desselben an den Peptidhauptstrang (pdb-Strukturen 4IUB und 4IUC, [58]). Fe4 durchläuft eine Positionsänderung um  $1.36 \text{ \AA}$  aus dem Cluster heraus in Richtung des Stickstoffes von Cystein 20. Gleichzeitig wird die Bindung zum anorganischen Schwefel S3 unterbrochen. Dadurch verringert sich der Abstand zwischen  $\text{N}(\text{Cys}20^{\text{S}})$  und Fe4 auf  $d = 2.11 \text{ \AA}$  und eine neue Bindung entsteht mit dem deprotonierten  $\text{N}(\text{Cys}20^{\text{S}})$ . Die ascorbatreduzierte Variante des Proteins zeigt eine Überlagerung beider Positionen und bestätigt die Bewegung.

Dichtefunktionaltheorierechnungen (DFT) wurden freundlicherweise von unseren Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Kaupp (Theoretische Chemie/Quantenchemie, Technische Universität Berlin) zur Verfügung gestellt. Mit  $A_{15\text{N}} = (15.5, 22.0, 26.6) \text{ MHz}$  sind sowohl Rhombizität als auch isotroper Anteil der gemessenen Hyperfeinwechselwirkung  $A_{15\text{N},\text{ex}} = (16.0, 19.8, 25.5) \text{ MHz}$  sehr gut wiedergegeben [58].

Derartige, starke Eisen-Peptidstickstoff-Bindungen sind selten in biologischen Systemen, bisher fand man sie nur in der Nitrogenase sowie der Nitrilhydratase [179, 180]. In letzterer ist das Eisen des aktiven Zentrums durch den Stickstoff im +3-Zustand stabilisiert. Es liegt nahe, dass eine solche Stabilisierung auch in der MBH vonstatten geht und eine Absenkung des eigentlich hohen Potentials des Redoxübergangs bewirkt. Im Zuge der Oxidation kann der Cluster somit drei Redoxzustände in phy-

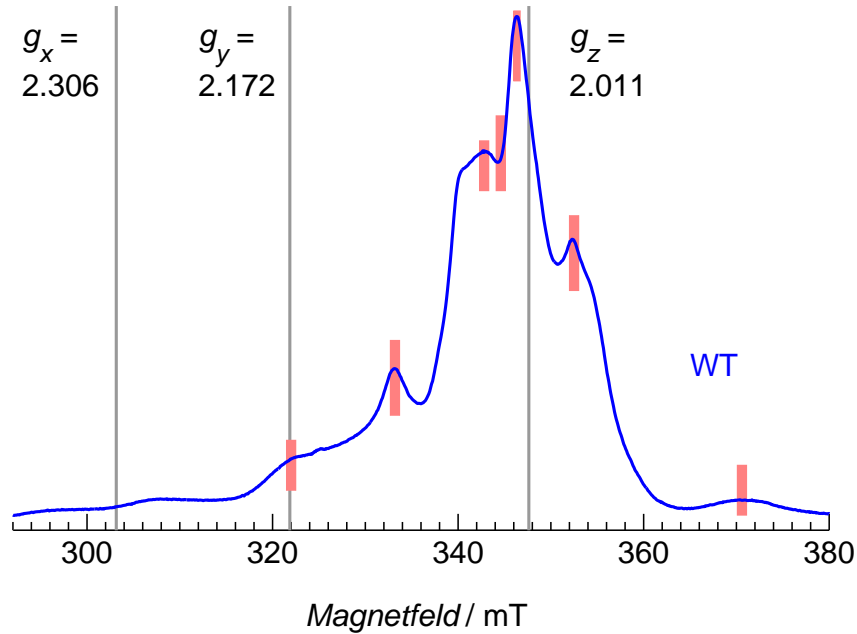
siologisch relevanter Reichweite durchlaufen. Sie reichen von +3 bis +5 und erfuhren eine Neubezeichnung wie folgt: Der vollständig oxidierte Zustand mit der Oxidationsstufe +5 wurde in „superoxidiert“ umbenannt, während der Zwischenzustand unter Ascorbateinfluss nun als „oxidiert“ gilt. Als „reduziert“ zählt weiterhin der Zustand +3. Zwei Elektronen können allein durch diese Umwandlung bereits für mögliche Sauerstoffreduktion zur Verfügung gestellt werden.

Ähnliche Strukturänderungen konnten unlängst auch für die Hydrogenase aus *H. marinus* sowie Hydrogenase-1 aus *E. coli* gefunden werden [164, 181, 182]. Für die P242C-Variante von Hyd-1 fanden Rökler *et al.* [164] eine Stickstoffhyperfeinkopplung der Größe  $A = (11.5, 11.5, 16.0) \pm 0.3$  MHz, die mit der hier bestimmten Wechselwirkung ( $A_{14\text{N}} = (11.4, 14.1, 18.2)$  MHz) im Wesentlichen übereinstimmt. Da beide Enzyme wie die MBH aus *R.e.* sauerstofftolerante Spezies sind, steht zu vermuten, dass die strukturelle Veränderung des proximalen Clusters mit der Toleranz gegenüber Sauerstoff einhergeht und ein erfolgreich etablierter Abwehrmechanismus verschiedener Hydrogenasen ist.

### 5.3 Schwache Kopplungen – ESEEM

Neben dem Vorhandensein starker Hyperfeinkopplungen, wie sie im vorherigen Abschnitt betrachtet wurden, ist es möglich, auch schwächere Wechselwirkungen vorzufinden. Diese können zum Beispiel zwischen Metallkofaktoren und Kernen in deren zweiter Koordinationssphäre stattfinden. Eine geeignete Methode zur Detektion sind ESEEM-Messungen. Im günstigsten Fall kann man sich hier zu Nutze machen, dass die Hyperfeinwechselwirkung die Größenordnung der Kern-Zeeman-Wechselwirkung in einem bestimmten Frequenzband hat, wodurch einzig die Quadrupolwechselwirkung Einfluss auf die Spektren nimmt. Dieser Fall der sogenannten *exact cancellation* hat Gültigkeit, wenn zum Beispiel Stickstoffatome, deren freie Frequenz im X-Band bei 1.1 MHz liegt, über eine etwa 2 MHz starke Wechselwirkung mit dem beobachteten Spin verfügen.

Aufgrund der Vielzahl von sich eventuell überlagernden Signalen, wie sie im 2-Puls-ESEEM vorkommen, wurde der 3-Puls-Variante der Vorzug gegeben. Durch den zusätzlichen Puls zeigt 3-Puls-ESEEM einzig die Basisfrequenzen und weder Summen

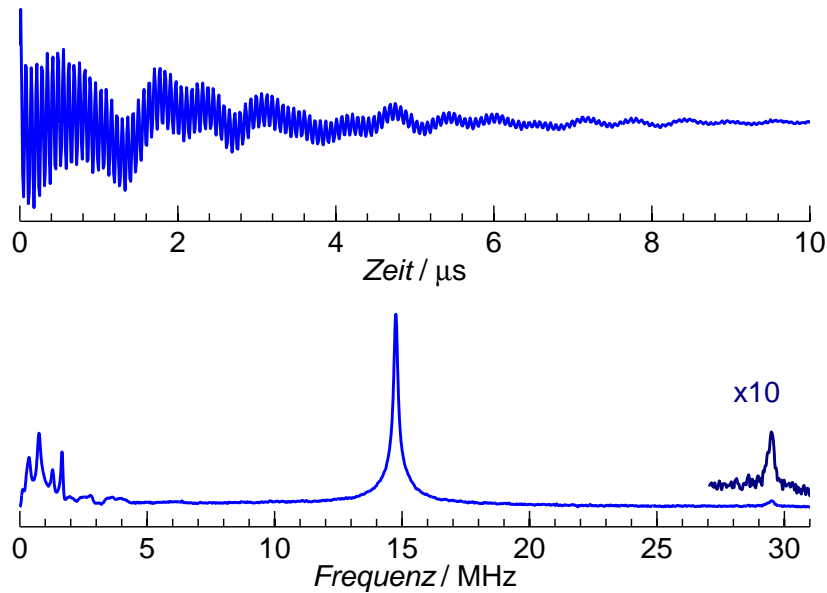


**Abbildung 5.5:** X-Band-FSE des Wildtyps der MBH. Rot markiert sind die Positionen der ESEEM-Messungen, in grau die  $g$ -Werte von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ . Messbedingungen:  $T = 10\text{ K}$ .

noch Differenzen an, allerdings weist diese Methode den Nachteil auf, in Abhängigkeit vom Pulsabstand  $\tau$  Signale zu unterdrücken. Um dieses *blind-spot*-Verhalten zu umgehen, wurden an verschiedenen Stellen zweidimensionale 3-Puls-Messungen durchgeführt, bei denen auch  $\tau$  variiert wurde (2vs3-Puls-ESEEM).

Im weiteren Verlauf wird zuerst der Wildtyp untersucht, eine Vereinfachung der Zuordnung der verschiedenen ESEEM-Signale durch Rücksichtnahme auf unterschiedliche Relaxationszeiten sowie durch Analyse isotopenausgetauschter Proben ist der nächste Schritt. Daraufhin erfolgt eine genauere Zuweisung der Signalgruppen zu einzelnen Clustern unter Zuhilfenahme von Mutationsvarianten und schließlich wird eine spezifische Festlegung der Wechselwirkungspartner angestrebt.

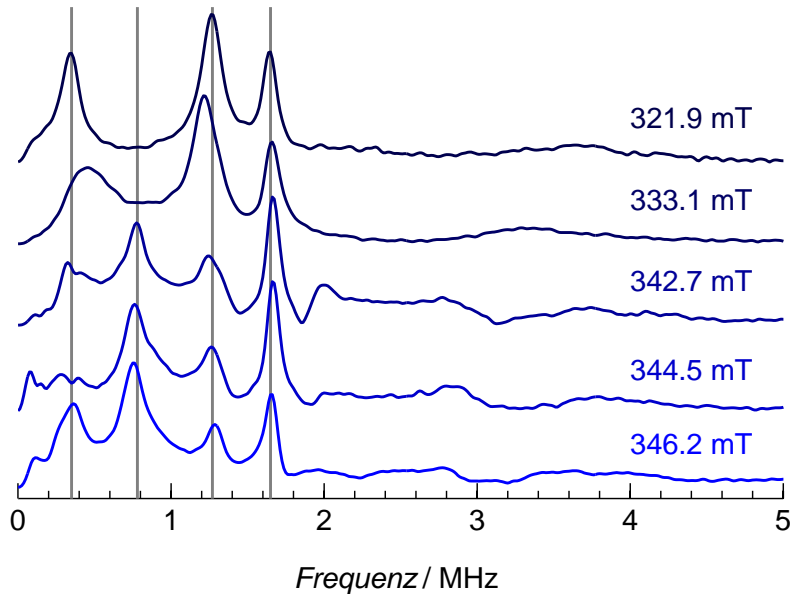
**Wildtyp.** Aufgenommen auf dem Maximum des X-Band-FSE (Grafik 5.5), zeigt Abbildung 5.6 beispielhaft eine hintergrundkorrigierte ESEEM-Zeitspur mit zugehöriger Fourier-Transformation, welche die Frequenzen verschiedener Kopplungen auf-



**Abbildung 5.6:** 3-Puls-ESEEM im X-Band des Wildtyps der MBH bei 10 K. Oben: Ausschnitt der Zeitspur, originale Länge 20  $\mu\text{s}$ ; unten: Fourier-transformiertes Spektrum.

weist. Nahe 15 MHz findet sich die freie Frequenz von Protonen, das zugehörige Doppelquantensignal entsprechend bei  $\approx 30$  MHz (vergrößert dargestellt). In der Zeitspur zeigen sich diese Frequenzen als kurzweilige Schwingungen. Oszillationen höherer Wellenlänge hingegen tauchen in der Fourier-Transformierten im Niederfrequenzbereich auf. Da sich die unterschiedlichen Cluster im X-Band stark überlappen, erfolgten die Messungen im gesamten Feldbereich, beginnend nahe  $g_y$  von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ , bei folgenden Feldpositionen, wie sie in Grafik 5.5 markiert sind: 321.9 mT, 333.1 mT, 342.7 mT, 344.5 mT, 346.2 mT, 352.4 mT und 370.5 mT. Abbildung 5.7 gibt den niederfrequenten Bereich der Fourier-Transformierten vergrößert wieder, die Spektren sind nach Feldposition angeordnet.

Bei 321.9 mT sowie 333.1 mT ist das Spektrum jeweils von drei klaren Übergängen dominiert, die sich bei 0.35 MHz, 1.27 MHz und 1.65 MHz befinden. Im mittleren Magnetfeldbereich zwischen 342.7 mT und 346.2 mT gibt es ein weiteres starkes Signal bei 0.78 MHz, schwächere Signale zeichnen sich zwischen 2 und 3 MHz ab. Oberhalb von 352 mT gibt es keine ESEEM-Signale (nicht gezeigt), was darauf schließen lässt,



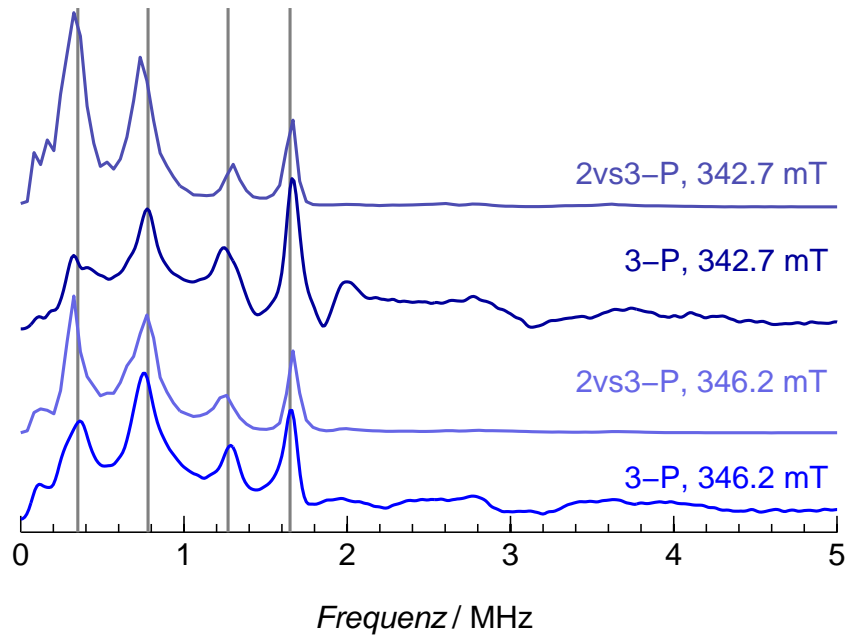
**Abbildung 5.7:** 3-Puls-ESEEMs im X-Band des Wildtyps der MBH. In grau die Positionen der vier stärksten Signale (0.35 MHz, 0.78 MHz, 1.27 MHz, 1.65 MHz). Messbedingungen:  $T = 10$  K.

dass einer der zwei in Frage kommenden [FeS]-Cluster über keine derartigen Kopplungen verfügt und somit im Hochfeldbereich allein zum FSE-Signal beiträgt.

Für den Fall der *exact cancellation* sind für einen Kern mit  $I = 1$  drei Nullfeldübergänge zu erwarten,  $\nu_0$ ,  $\nu_-$  und  $\nu_+$ . Dies ist für den Niederfeldbereich der Fall, hier sind drei klar unterscheidbare Nullfeldübergänge zu finden. Mit  $0.35 \text{ MHz} + 1.27 \text{ MHz} \approx 1.65 \text{ MHz}$  genügen sie der Bedingung  $\nu_0 + \nu_- = \nu_+$ .

Im Hauptbereich der Überlagerung zwischen [NiFe]-Zentrum und den [FeS]-Clustern, das heißt bei Feldstärken um 340-350 mT, zeigen sich vier scharfe Signale, so dass mindestens eine weitere Kopplung vorliegen muss. Für zwei verschiedene Quadrupolkopplungen unter *exact-cancellation*-Bedingung wären allerdings sechs Signale zu erwarten. Um eine  $\tau$ -abhängige Frequenzunterdrückung auszuschließen, die für ausgeblendete Übergänge sorgen könnte, wurden bei 342.7 mT und 346.2 mT 2vs3-Puls-Messungen vorgenommen (Abbildung 5.8). Es tritt zwar eine Verschiebung der einzelnen Intensitäten auf, ein neues Signal kommt jedoch nicht hinzu. Das entsprechende Spektrum bei 352.4 mT bestätigt die Abwesenheit von Kopplungen oberhalb

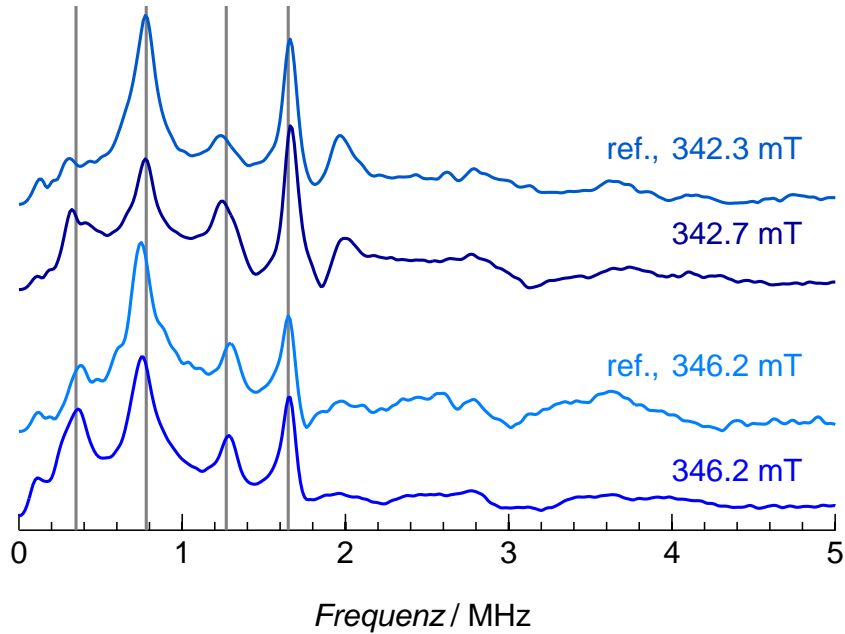




**Abbildung 5.8:** Summenprojektion von 2vs3-Puls-ESEEM-Messungen verglichen mit 3-Puls-ESEEMs bei gleicher Feldposition (identisch zu Abbildung 5.7). Messbedingungen:  $T = 10$  K.

dieses Magnetfeldwertes (nicht gezeigt). Ein Kern mit  $I = 1/2$  könnte unter der *exact-cancellation*-Bedingung, d.h.  $\nu_1 \approx 1$  MHz, ein einzelnes Signal beitragen, doch kein passendes Isotop nennenswerter natürlicher Häufigkeit liegt in der Probe vor. Demnach kann nur die Überlagerung verschiedener Übergänge Grund für ihre unerwartet geringe Anzahl sein.

**Relaxationsfilter und Isotopenaustausch.** Um Überschneidungen wie die oben genannten zu entflechten, können relaxationszeitgefilterte Messungen helfen. Der eigentlichen Pulssequenz wird ein Puls vorangestellt, dessen Abstand zur eigentlichen Pulsfolge auf die Relaxationszeit  $T_1$  einer Spezies angepasst ist, so dass diese zumindest partiell ausgeblendet werden kann. Da der Anteil dieser Spezies im FSE vermindert ist, zeigen sich auch Auswirkungen im ESEEM. Abbildung 5.9 verdeutlicht, dass durch den Filterpuls die Signale bei 0.35 MHz und 1.27 MHz im Vergleich zu 0.78 MHz und 1.65 MHz abgeschwächt werden, wenn man das im Vergleich zu den [FeS]-Clustern etwas langsamer relaxierende Nickelzentrum partiell unterdrückt. Zu-

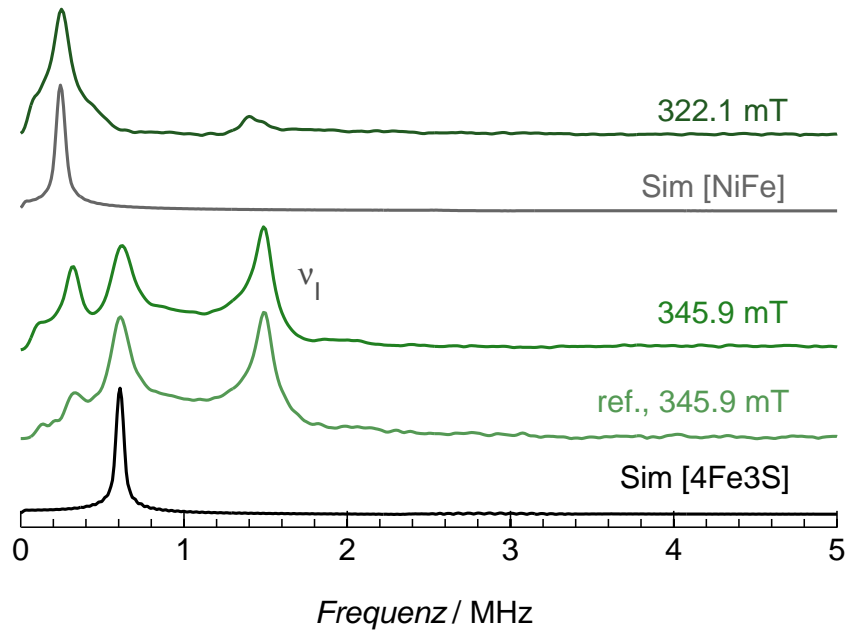


**Abbildung 5.9:** ESEEM-Messungen im X-Band des Wildtyps der MBH. Hellblau: Relaxationszeitgefilterte 3-Puls-ESEEM-Messungen, dunkelblau: ungefilterte 3-Puls-ESEEMs (vgl. Abb. 5.7). „ref.“ steht für REFINED. Beim Maximum bei 2 MHz handelt es sich um den Alias-Effekt des Protonensignals bei 14 MHz, verursacht durch das  $T$ -Inkrement von 60 ns, welches nach Nyquist diese Frequenz unzureichend abtastet. Messbedingungen:  $T = 10$  K.

---

dem ergibt sich eine Intensitätsverschiebung, so dass das Signal bei 0.78 MHz deutlich stärker auftritt als jenes bei 1.65 MHz. Es ist außerdem breiter als das höherfrequente. Daraus lässt sich ableiten, dass bei 0.78 MHz zwei Übergänge vorliegen, also die drei erwarteten Signale eines typischen 3-Puls-ESEEMs zu zwei Signalen kollabiert sind. Der verbleibende dritte Übergang liegt bei 1.65 MHz, überlagert sich dort mit dem dritten Signal der anderen Quadrupolkopplung, was die nur leichte Abschwächung bei Filterung erklärt.

Bei etwa 4 MHz wären Doppelquantenübergänge zu erwarten, wie sie bei *exact cancellation* aus der zweiten Spinmannigfaltigkeit resultieren, für welche die gegenseitige Aufhebung von Hyperfein- und Kernquadrupolwechselwirkung nicht gilt (Gleichung 3.39). Aufgrund starker Verbreiterung heben sie sich jedoch nicht aus dem Rauschen hervor. Das Fehlen dieser Signale erschwert es, korrekte Werte für die Hyperfeinwech-



**Abbildung 5.10:** 3-Puls-ESEEMs im X-Band des  $^{15}\text{N}$ -Wildtyps der MBH. Messbedingungen:  $T = 10\text{ K}$ .

selwirkung zu bestimmen.

Wie zuvor für die ENDOR-Messungen beschrieben, ist auch hier ein kompletter Isotopenaustausch von  $^{14}\text{N}$  zu  $^{15}\text{N}$  hilfreich. Durch den Kernspin  $I = 1/2$  entfällt die Kernquadrupolwechselwirkung, was das Spektrum vereinfacht. Im Fall der *exact cancellation* wird für derartige Kerne neben der freien Frequenz nur ein einzelnes Maximum in der niederfrequenten Region erwartet. Nach den Gleichungen 3.36 können aus diesen beiden Signalen sowohl der isotrope Hyperfeinwert als auch eine axiale Anisotropie berechnet werden.

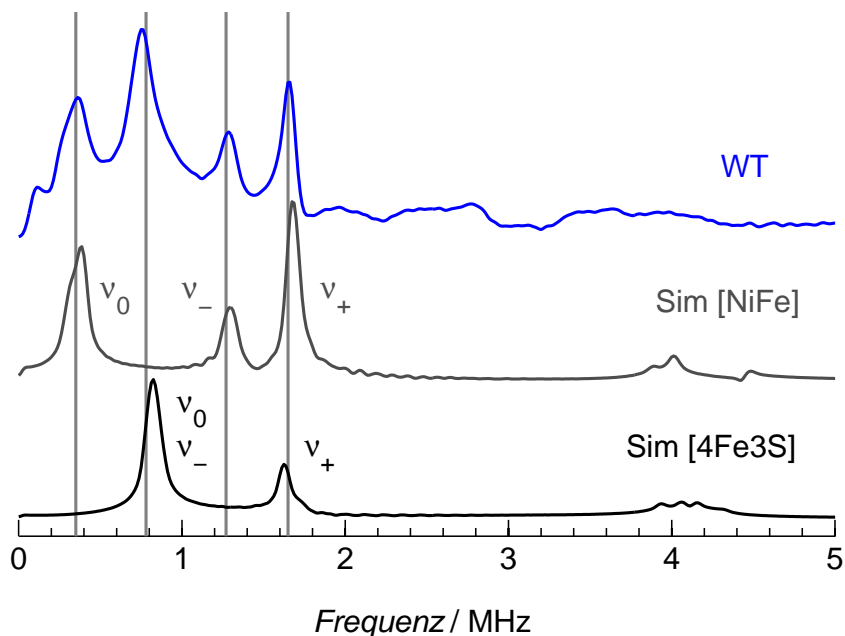
Das FSE der isotopenausgetauschten Variante des Wildtyps zeigt sich identisch zum natürlichen Wildtyp, deshalb wurde auf eine gesonderte Darstellung verzichtet. Auch für diese Probe wurden 3-Puls-ESEEM-Spektren bei diversen Magnetfeldstärken aufgezeichnet. Abbildung 5.10 gibt repräsentativ zwei davon wieder, hier findet man alle Charakteristika, die auch die ungezeigten Spektren aufweisen. Die ESEEM-Spektren oberhalb von 352 mT weisen wie die  $^{14}\text{N}$ -Variante des Wildtyps keine schwachen Stickstoffkopplungen auf und sind deshalb nicht dargestellt.

Unterhalb eines Magnetfeldwertes von 333.5 mT ist neben der freien Frequenz von  $^{15}\text{N}$  bei  $\nu_1 = 1.385$  MHz ein Signal bei 0.25 MHz zu verzeichnen. Zum mittleren Magnetfeldbereich hin verschiebt sich die freie Frequenz auf  $\nu_1 = 1.495$  MHz, ein drittes Signal bei 0.61 MHz kommt hinzu. Partielle Unterdrückung durch Relaxationszeitfilterung bestätigt die Zugehörigkeit des niederfrequenten Signals zur [NiFe]-Region, während das mittlere Signal von einem der [FeS]-Cluster stammt (Abbildung 5.10, hellgrün). Das Auftreten von jeweils nur einem Maximum deutet darauf hin, dass die Hyperfeinanisotropie hauptsächlich axialen Charakters ist. Im rhombischen Fall käme es zu einer Aufspaltung dieser Linie, wie Gleichung 3.37 es angibt. Die *exact cancellation*-Bedingung ist jedoch weitestgehend erfüllt, so dass innerhalb der vorliegenden Linienbreite nur mit geringer Rhombizität  $\delta < 0.1$  MHz zu rechnen ist.

Für beide Signalgruppen wurden die Gleichungen 3.36 angewendet sowie Simulationen durchgeführt. Für die Signale mit Ursprung beim aktiven Zentrum ergibt sich die isotrope Hyperfeinwechselwirkung  $a_{\text{iso}, ^{15}\text{N}, \text{Ni}} = 2.65 \pm 0.05$  MHz und die Anisotropie  $T_{^{15}\text{N}, \text{Ni}} = (-0.33, -0.33, 0.66) \pm 0.05$  MHz (Abbildung 5.10, grau). Mittels des gyromagnetischen Verhältnisses der beiden Isotope von 1.4 kann man diese Werte für den  $^{14}\text{N}$ -Wildtyp umrechnen:  $a_{\text{iso}, ^{14}\text{N}, \text{Ni}} = 1.89$  MHz und  $T_{^{14}\text{N}, \text{Ni}} = (-0.24, -0.24, 0.48)$  MHz.

Entsprechende Behandlung der relaxationszeitgefilterten 3-Puls-ESEEM-Messung bei 345.9 mT, also des Signals des [FeS]-Clusters, mündet in den Werten  $a_{\text{iso}, ^{15}\text{N}} = 2.58 \pm 0.05$  MHz und  $T_{^{15}\text{N}} = (-0.81, -0.81, 1.63) \pm 0.05$  MHz (Abbildung 5.10, schwarz). Hier liefert die Umrechnung von  $^{15}\text{N}$  zu  $^{14}\text{N}$  folgende Parameter:  $a_{\text{iso}, ^{14}\text{N}} = 1.84$  MHz sowie  $T_{^{14}\text{N}} = (-0.58, -0.58, 1.16)$  MHz.

Zur Auswertung der Wechselwirkungen in der  $^{14}\text{N}$ -Variante des Wildtyps gibt Darstellung 5.11 deren 3-Puls-ESEEM bei 346.2 mT wieder, sowie die Simulationen der beiden enthaltenen Spezies. Die bei geringem Magnetfeld für Nickel auftauchenden Nullfeldübergänge  $\nu_0$ ,  $\nu_-$  und  $\nu_+$  lassen sich mit den Kernquadrupolparametern  $e^2Qq/h = 1.94 \pm 0.02$  MHz und  $\eta = 0.36 \pm 0.03$  modellieren, dies stimmt mit den aus den Gleichungen 3.38 erhaltenen Werten überein. Anhand der zuvor ermittelten Hyperfeinwerte aus der  $^{15}\text{N}$ -Probe wurden isotrope Hyperfeinwechselwirkung und Anisotropie in der Simulation derart angepasst, dass das Doppelquantensignal bei 4 MHz sehr gering ausfällt (Abbildung 5.11, grau). Mit  $T = (-0.25, -0.25, 0.50) \pm 0.05$  MHz und



**Abbildung 5.11:** Simulation der ESEEM-Messung bei 346.2 mT. Blau: Experimentelles Spektrum des Wildtyps (siehe Abb. 5.7). Grau: Simulation von His82<sup>L</sup> am aktiven Zentrum, schwarz: Simulation des Histidins am proximalen Cluster.

$a_{\text{iso}} = 1.8 \pm 0.05$  MHz ergeben sich insbesondere für die Anisotropie nur sehr geringe Abweichungen.

Die Quadrupolwerte stimmen mit denen überein, die bei vorherigen ESEEM-Messungen für Ni<sub>r</sub>-B gefunden wurden [55]. Sie sind typisch für ein Histidin in der Nähe des aktiven Zentrums, welches über den Schwefel eines verbrückenden Cysteins an das Metallzentrum gebunden ist. Genauer gesagt, handelt es sich um den protonierten, endständigen Stickstoff N<sub>r</sub> im Ring des Histidins (vergleiche Abbildung 7.10). Diverse sauerstofftolerante und -empfindliche Hydrogenasen verfügen über dieses schwach gekoppelte Histidin, die entsprechenden Parameter sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. In der Standardhydrogenase *D. vulgaris* Miyazaki F trägt dieses Histidin die Nummer 88 und entstammt der großen Untereinheit, in der MBH findet man es als His82<sup>L</sup>, wie aus reduzierter und oxidiertes Kristallstruktur hervorgeht [57, 58].

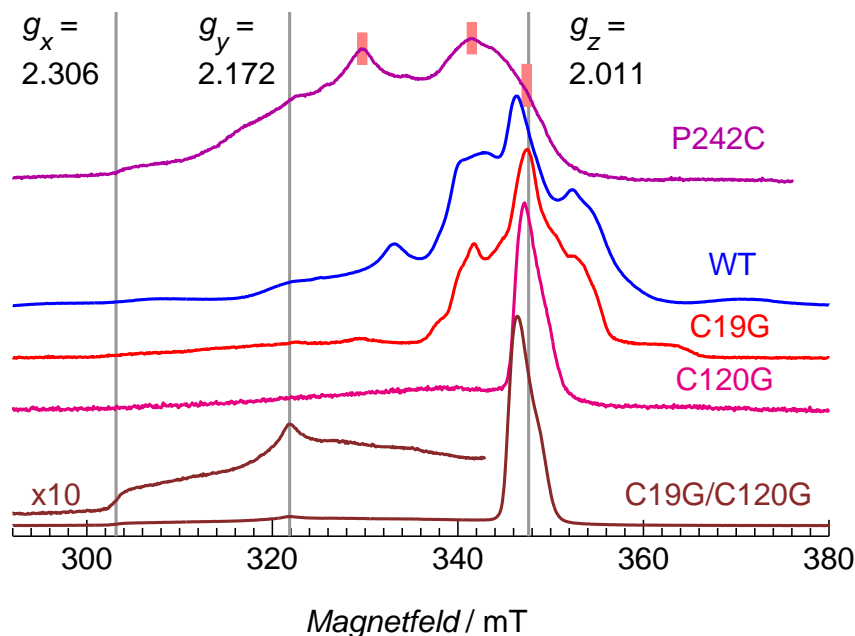
Die zusätzlichen ESEEM-Signale der [FeS]-Region bei 0.78 MHz und 1.65 MHz können unter Annahme eines zweiten Stickstoffes, für den ebenso die *exact-cancellation*-

**Tabelle 5.1:** Kernquadrupol- und Hyperfeinparameter von Histidinen am aktiven Zentrum. Sauerstofftolerante Spezies sind mit einem Stern markiert (\*). Im unteren Teil ist zudem das Histidin am proximalen Cluster angegeben.

Organismus	$e^2Qq/h$ MHz	$\eta$	$a_{\text{iso}}$ MHz	Ref.
<i>R. eutropha</i> MBH *	1.94	0.36	1.8	
	1.94	0.38	1.4-1.6	[55]
<i>A. aeolicus</i> Hydrogenase I *	1.92	0.40	1.54	[30]
<i>D. gigas</i>	1.9	0.4	$\approx 2$	[183]
<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F	1.90	0.37	1.57	[184]
<i>E. coli</i> Hyd-1, P242C *	1.9	0.4	2.2	[164]
<i>T. roseopersicina</i>	1.93	0.39	1.6	[185]
<i>R. eutropha</i> MBH *, His229 <sup>L</sup>	1.62	0.97	1.75	

Bedingung gilt, mit diesen Parametern simuliert werden (Abbildung 5.11, schwarz): Die Quadrupolwerte sind  $e^2Qq/h = 1.62 \pm 0.02$  MHz und  $\eta = 0.97 \pm 0.03$ . Die Hyperfeinparameter  $a_{\text{iso}} = 1.75 \pm 0.05$  MHz und  $T = (-0.28, 0.19, 0.09) \pm 0.05$  MHz sorgen auch in diesem Fall dafür, dass die Doppelquantenübergänge nahezu verschwinden. Die Hyperfeinwerte weichen stärker von jenen ab, die aus der  $^{15}\text{N}$ -Messung bestimmt wurden ( $1.84 + (-0.58, -0.58, 1.16)$  MHz), insbesondere die Anisotropie ist deutlich kleiner und rhombischer.

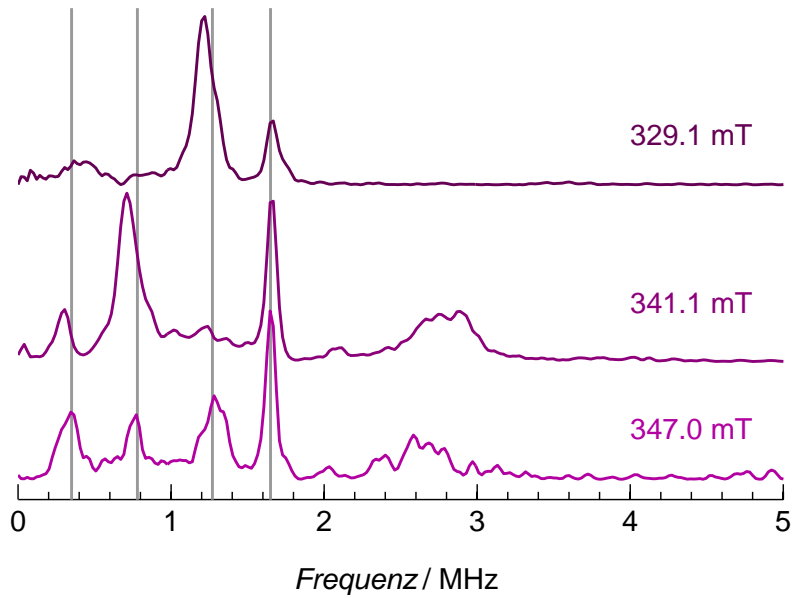
**Mutationsvarianten.** Wie im vorherigen Abschnitt (5.2) dargelegt, kommt der distale Cluster als Quelle einer Hyperfein- oder Quadrupolwechselwirkung nicht in Frage, weil er im oxidierten Zustand des Enzyms nicht paramagnetisch ist. Um den Ursprung der schwachen Kopplung aus der [FeS]-Region eindeutig zu klären, wurden wie zuvor beim ENDOR die mediale P242C-Mutante und die proximale Doppelmutter C19G/C120G herangezogen. Im Feldspektrum ersterer (Abbildung 5.12 oben) zeigen sich bereits Unterschiede, so hat die Region der [FeS]-Cluster im Vergleich zum Nickelbereich stark an Intensität nachgelassen. Das Spektrum ist zudem schmaler, da es oberhalb von 350 mT kaum mehr nennenswerte Signale gibt, was auf den Wegfall des medialen Clusters als Signalursprung zurückzuführen ist. An den folgenden Feldpositionen erfolgten 3-Puls-ESEEM-Messungen, sie sind in der Darstellung rot hinterlegt: 329.1 mT, 341.1 mT und 347.0 mT. Abbildung 5.13 zeigt die Messungen



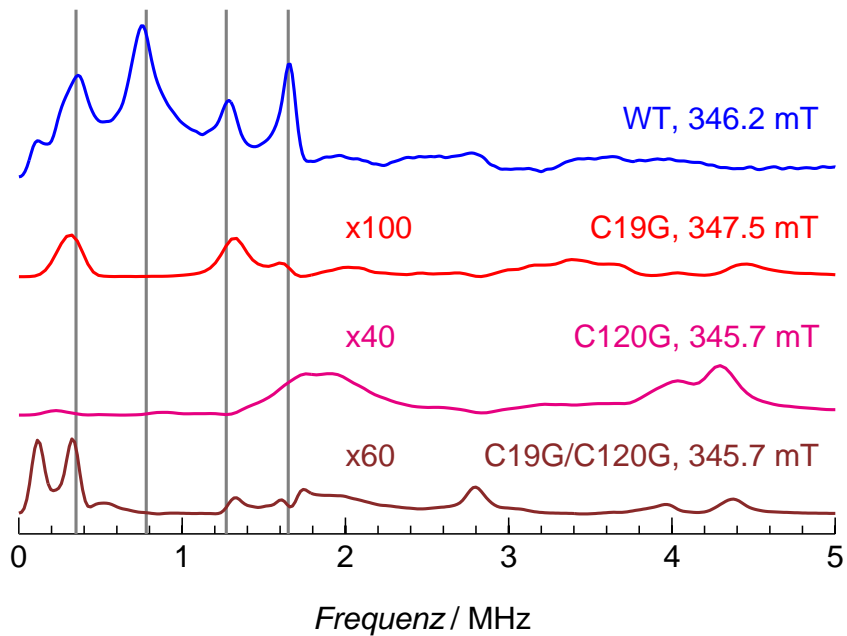
**Abbildung 5.12:** X-Band-FSEs der medialen Mutante P242C, des Wildtyps und der proximalen Mutanten C19G, C120G und C19G/C120G der MBH. Grau markiert sind die  $g$ -Werte von  $\text{Ni}_r\text{-B}$ , rot markiert sind die Positionen der ESEEM-Messungen für die P242C. Messbedingungen:  $T = 15 \text{ K}/10 \text{ K}$ .

bei 10 K und 15 K.

Das Spektrum an der kleinsten Magnetfeldposition zeigt wie sein Gegenstück des Wildtyps drei einzelne Signale bei den Frequenzen 0.35 MHz, 1.27 MHz und 1.65 MHz. Dies entspricht der Kopplung des Nickels an ein Histidin mittels eines der beiden verbrückenden Cysteine. Das Experiment bei 347.0 mT zeigt die zuvor analysierten vier Maxima, die eine Überlagerung der drei oben genannten Signale und jener bei 0.78 MHz sowie 1.65 MHz darstellen. Im Wildtyp sind letztere der [FeS]-Region zugeordnet. Im Spektrum bei 341.1 mT erkennt man gut die  $\tau$ -abhängige Unterdrückung des ESEEM-Signals, was mit der starken Intensitätsminderung des Übergangs bei 1.27 MHz einher geht. Die Quelle des breiten Signals um 2.7 MHz ist nicht bekannt, es lässt sich jedoch ausschließen, dass es sich um den Doppelquantenübergang einer der beiden Kopplungen handelt, da die Frequenz zu klein ist. Das simultane Vorhandensein der vier signifikanten Signale in Wildtyp- wie Mutationsprobe ermöglicht die Zuordnung der zweiten Wechselwirkung zum proximalen Cluster.



**Abbildung 5.13:** 3-Puls-ESEEMs im X-Band der medialen P242C-Mutante der MBH bei 10 K (329.1 mT) beziehungsweise 15 K (341.1 mT und 347.0 mT).



**Abbildung 5.14:** 3-Puls-ESEEMs im X-Band des Wildtyps und der proximalen Mutanten C19G, C120G und C19G/C120G der MBH, jeweils auf dem FSE-Maximum des [FeS]-Bereiches aufgenommen. Messbedingungen:  $T = 10$  K.



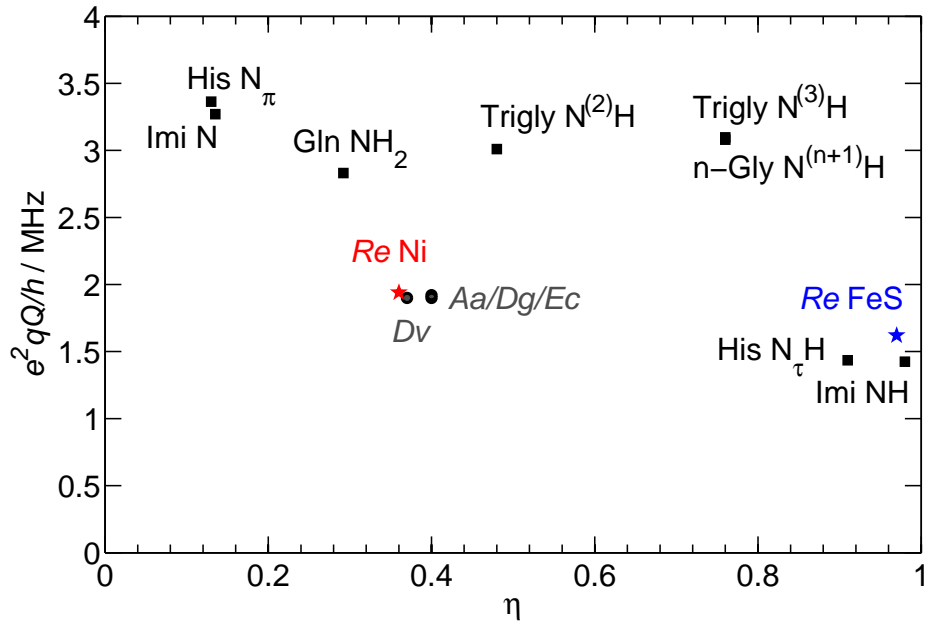
Überprüft wurde diese Zuweisung durch Messung der proximalen Mutanten C19G, C120G und C19G/C120G. Die Mutation des Cys120<sup>S</sup> zu Glycin verursacht eine Entkopplung der [NiFe]- und [FeS]-Cluster, wie es in Abbildung 5.12 für C120G und C19G/C120G ersichtlich ist. Vermutlich dient diese Aminosäure der initialen Aufweitung des proximalen Clusters. Eine Ersetzung des Cys19<sup>S</sup> durch Glycin hingegen verändert das Feldspektrum wenig, eine starke Ähnlichkeit zum Wildtyp besteht weiterhin. Die Cluster sind gekoppelt, wenn auch leicht anders als im Wildtyp.

In Grafik 5.14 sind die ESEEM-Spektren der einzelnen Mutationsvarianten im [FeS]-Bereich dargestellt, bis auf den Wildtyp sind alle stark vergrößert. Allen Mutanten ist die Abwesenheit des prominenten ESEEM-Signals bei 0.78 MHz gemeinsam, ebenso wie ihre teils starke Sauerstoffunverträglichkeit [56]. In der Nickelregion tauchen die drei typischen Peaks der Kopplung zwischen Nickel und His82<sup>L</sup> auf (nicht gezeigt), bei C19G und im Wildtyp zeigen sich diese aufgrund der Kopplung der Cluster auch im ESEEM der [FeS]-Region. Es lässt sich schließen, dass nur ein intakter proximaler Cluster mit sechs umgebenden Cysteinen Sauerstofftoleranz ermöglicht und über das charakteristische ESEEM-Signal bei 0.78 MHz verfügt.

**Ursprung der Wechselwirkungen.** Die Zusammenstellung der beiden Kernquadrupolparameter  $e^2Qq/h$  und  $\eta$  ist charakteristisch für die jeweilige Bindungssituation und Umgebung des Stickstoffes. In Grafik 5.15 sind die beiden Kenngrößen gegeneinander aufgetragen, es ergeben sich Bereiche typischer Stickstoffkopplungen. In der Mitte, bei 1.9/0.4, finden sich endständige, protonierte Histidinstickstoffe, die über einen Cysteinschwefel an ein [NiFe]-Zentrum gebunden sind. Die Kombination großer  $e^2Qq/h$ - und  $\eta$ -Werte weist auf Bindungen an das Peptidrückgrat hin, während ein großes  $e^2Qq/h$  mit kleinem  $\eta$  ein unprotoniertes  $N_\tau$  in einem Imidazolring charakterisiert. Das dementsprechende Gegenstück, das protonierte  $N_\tau$  in einem Imidazolring, zeigt sich mit ebenso gegenteiligen Werten:  $e^2Qq/h$  ist klein,  $\eta$  hingegen groß.

Beide im Wildtyp der MBH gefundenen Stickstoffkopplungen wurden ebenfalls in der Grafik markiert. Die Kombination der Parameter des nickeltypischen Signals bestätigt die Zuordnung als Histidin am aktiven Zentrum.

Die Maße des dem [FeS]-Bereich zugeordneten Signals liegen in der Nähe derer, die man für einen protonierten Stickstoff im Imidazolring oder  $N_\tau H$  in einem Histidin



**Abbildung 5.15:** Auftragung von Quadrupolmoment  $e^2Qq/h$  gegen Rhombizität  $\eta$  mit typischen Stickstoffspezies. Rot: Nickelgebundenes Histidin aus *Re*, blau: Stickstoffkopplung zum proximalen Cluster in *Re*. Referenzen: His  $N_\tau H$ , His  $N_\pi$  [186, 187]. Trigly  $N^{(2)}H$ , Trigly  $N^{(3)}H$  (Peptid) [188]. n-Gly  $N^{(n+1)}H$  [189]. Imi N, Imi NH [190–192]. Gln  $NH_2$  [193]. Für *Aa*, *Dg*, *Dv* und *Ec*, sowie *Re Ni* und *FeS* siehe Tabelle 5.1.

erwartet. Eine Zuhilfenahme der Kristallstrukturen [57, 58] bestätigt diese Zuordnung. In einem Abstand von  $4.2 \text{ \AA}$  zum Fe1 des proximalen Clusters befindet sich ein Histidin, His229<sup>L</sup>.

Der isotrope Hyperfeinanteil ist mit  $a_{\text{iso}} = 1.75 \text{ MHz}$  für eine direkte Bindung über diese Distanz aber bei Weitem zu groß. Ähnlich wie beim Histidin am aktiven Zentrum muss sich hier eine vermittelnde Spezies zwischen protoniertem  $N_\tau$  und Fe1 befinden, die selbst eine gewisse Spindichte trägt. In der Kristallstruktur liegt im Abstand von  $1.81 \text{ \AA}$  zum Eisen und  $2.42 \text{ \AA}$  zu  $N_\tau$  ein Atom vor, bei welchem es sich aller Voraussicht nach um Sauerstoff handelt. FTIR-Messungen wurden von unseren Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Hildebrandt durchgeführt. Durch  $^1H \leftrightarrow ^2H$ - sowie  $^{18}O \leftrightarrow ^{16}O$ -Austausch bestätigen sie das Vorhandensein einer Fe–OH-Streckschwingung. Deren Position bei  $577 \text{ cm}^{-1}$  kann mit einer Distanz

von etwa 1.8 Å assoziiert werden [58], was mit dem Abstand in der Kristallstruktur übereinstimmt.

Auch für den hier beschriebenen Fall der schwachen Kopplung wurden die theoretischen Berechnungen mittels DFT von unseren Kooperationspartnern der AG Kaupp beigetragen [58]. Tabelle 5.2 gibt eine Aufstellung spinprojizierter Hyperfeinanisotropie- und Quadrupolparameter wieder, berücksichtigt sind folgende mögliche Bindungssituationen:

- a) Fe1 ist über den Sauerstoff einer OH-Gruppe mit dem protonierten Stickstoff  $N_\tau$  des His229<sup>L</sup> wasserstoffverbrückt (Fe1–OH $\cdots$ HN $_\tau$ ).
- b) Kein OH-Ligand liegt zwischen Fe1 und His229<sup>L</sup> vor, die Positionen beider sind weitestgehend beibehalten (Fe1—HN $_\tau$ ).
- c) Fe1 ist in Richtung des Histidins verschoben und direkt an  $N_\tau$  gebunden,  $N_\pi$  ist protoniert, es gibt keinen OH-Liganden (Fe1–N $_\tau$ ).
- d) Es liegt eine Bindung von Fe1 zu N(Cys19<sup>S</sup>) vor, auch hier gibt es keinen OH-Liganden (Fe1–N(Cys19<sup>S</sup>)).

Die Übersicht zeigt, dass nur das Modell, welches einen OH-Liganden am Fe1 vorweist, die simulierten experimentellen Daten hinreichend genau reproduzieren kann. Mit  $e^2Qq/h = 1.60$  MHz und  $\eta = 0.99$  stimmen Experiment und Theorie hinsichtlich der Quadrupolparameter gut überein.

Unterstützt wird die Annahme des zwischenliegenden Sauerstoffliganden durch eine Berechnung der Anisotropie mittels Punkt-Dipol-Näherung, wie sie in Abschnitt 3.1.2 ausgeführt ist. Über diese Näherung lässt sich überprüfen, inwiefern dipolare Bindungsstärke und Abstände der beteiligten Spezies im und um den proximalen Cluster übereinstimmen. Grundlage der Berechnungen sind die durch DFT optimierten Strukturen und die so bestimmten Spinprojektionskoeffizienten  $k_1 = -\frac{110}{81}$ ,  $k_2 = -\frac{88}{81}$ ,  $k_3 = \frac{10}{9}$  und  $k_4 = \frac{7}{3}$  der einzelnen Eisenatome [58]. Tabelle 5.2 gibt auch die entsprechenden Anisotropiegrößen der Punkt-Dipol-Näherung wieder, sie sind kursiv geschrieben. Für den Fall einer Fe1–OH $\cdots$ HN $_\tau$ -Bindung decken sich Anisotropie aus Punkt-Dipol-Näherung und DFT mit den experimentellen ESEEM-Daten.

Verworfen werden können aufgrund der berechneten Quadrupol- und Hyperfeinano-

**Tabelle 5.2:** Theoretisch berechnete Kernquadrupol- und Hyperfeinparameter von Stickstoffen am proximalen Cluster. Für die Erklärung der Bindungssituationen siehe Text. Ergebnisse der Punkt-Dipol-Näherung sind kursiv dargestellt, die spinprojizierten DFT-Werte in Normaldruck sind [58] entnommen, zum Vergleich ist in der ersten Zeile der experimentelle Datensatz angegeben.

Situation	Stickstoff	$e^2Qq/h$ MHz	$\eta$	$T$ MHz
Experiment	$N_\tau$	1.62	0.97	−0.28, 0.19, 0.09
Fe1–OH···HN $_\tau$	$N_\tau$	1.60	0.99	−0.26, 0.12, 0.14 <i>−0.20, 0.11, 0.09</i>
	$N_\pi$	−4.15	0.10	−0.05, 0.02, 0.04 <i>−0.04, 0.03, 0.01</i>
Fe1—HN $_\tau$	$N_\tau$	2.33	0.21	−0.13, 0.05, 0.07 <i>−0.15, 0.08, 0.07</i>
	$N_\pi$	−4.24	0.04	−0.03, 0.01, 0.02 <i>−0.03, 0.02, 0.01</i>
Fe1–N $_\tau$	$N_\tau$	−2.72	0.33	−1.50, 0.74, 0.76 <i>−1.39, 0.71, 0.68</i>
Fe1–N(Cys19 <sup>S</sup> )	N(Cys19 <sup>S</sup> )	-	-	<i>1.17, −0.74, −0.44</i>

tropieparameter sowohl eine Bindung an  $N_\pi$  des Histidins als auch eine zum Peptidstickstoff von Cystein 19, wie sie von Rößler *et al.* [164] für *E. coli* Hyd-1 vorgeschlagen wurde.

Eine der Fe4-Bewegung ähnliche Verschiebung des Eisens Fe1 zur wahrscheinlichen Position des Sauerstoffs hin kann ausgeschlossen werden, da für diese direkte Fe1–N $_\tau$ -Bindung die per Punkt-Dipol-Näherung bestimmte Anisotropie Werte umfasst, die stark vom Experiment abweichen. Die theoretischen Werte sind deutlich größer als die der ESEEM-Messung.

Anzumerken ist, dass die hier wiedergegebene theoretische DFT-Analyse kritisch zu betrachten ist, da sie auf einem Spinzustand von  $S = 1/2$  basiert. Eine erneute Berechnung muss zeigen, inwieweit es durch  $S = 3/2$  zu Abweichungen der Werte kommt. Dennoch ist zu vermuten, dass die anhand der Kristallstruktur optimierten Rech-

nungen durch Kernquadrupolparameter wie  $e^2Qq/h$  und  $\eta$  die Charakteristik der Stickstoffatome im Wesentlichen bereits widerspiegeln können.

Ungeachtet der auf dem Spinzustand basierenden Berechnungen würde für die direkte Fe1–N $_{\tau}$ -Bindung eine bedeutend größere isotrope Hyperfeinkopplung erwartet [194, 195]. Dies ist ebenso wenig der Fall wie eine veränderte Fe1-Position in der Kristallstruktur [58], so dass die Bindungssituationen b und c auch ohne Einbeziehung der DFT-Rechnungen weitestgehend ausgeschlossen werden können.

Die Abweichung der Kernquadrupolparameter der verschiedenen Histidine untereinander lässt sich auf ihre jeweilige Bindungssituation zurückführen. Der Fall einer Wasserstoffbrückenbindung an ein Sauerstoffatom wurde von Fritscher *et al.* [196] theoretisch untersucht, es zeigt sich, dass nicht nur die Länge der Bindung eine Rolle spielt, sondern auch der Winkel der beteiligten Partner zueinander und zur Ebene des Imidazolringes. Ashby *et al.* [197] konnten zudem nachweisen, dass auch die Akzeptoreigenschaften unterschiedlicher Liganden am Histidin Einfluss auf die Quadrupolparameter nehmen. Dies ist in Abschnitt 7.3 genauer ausgeführt.

## 5.4 Zusammenfassung

Puls-EPR-Messungen ermöglichten eine umfassende Charakterisierung des proximalen Clusters der membrangebundenen Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* und seiner redoxabhängigen Verformung. Unterstützt durch Isotopenaustausch konnte mittels ENDOR am oxidierten Zustand gezeigt werden, dass eine starke, vorwiegend kovalente Bindung zwischen Fe4 und dem N(Cys20<sup>S</sup>) des Peptidrückgrates besteht, welche im reduzierten Zustand nicht vorliegt. Im Zuge dessen verschiebt sich die Position des Fe4 in Richtung des Cys20<sup>S</sup>. Zudem entsteht bei Oxidation des Proteins und damit des Clusters eine Bindung des Fe1 zu einem nahen Histidin, His229<sup>L</sup>, welche mutmaßlich durch eine OH<sup>-</sup>-Spezies vermittelt wird. Dies konnte mit ESEEM-Messungen belegt werden. Durch Mutationen in der Umgebung des proximalen und medialen Clusters wurde ersterer als Ursprung der Signale bestätigt.

Im Gegensatz zu Standardhydrogenasen unterläuft die MBH unter Bildung der nachgewiesenen Kopplungen eine Aufweitung des Clusters, es finden zwei Redoxübergänge

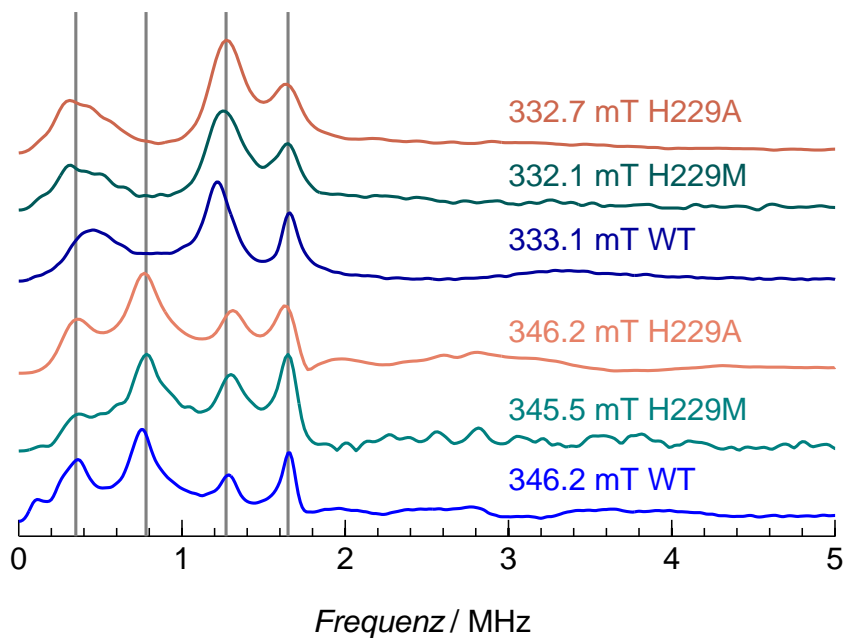
statt. Dadurch stehen für die Deaktivierung schädlicher Sauerstoffspezies zwei Elektronen zur Verfügung. Die Ergebnisse der Messungen geben Hinweise auf einen möglichen Reaktionsmechanismus, mit dem die MBH Sauerstofftoleranz erreicht. Das gefundene Histidin 229 könnte Teil eines Transferpfades sein, der unter anderem His229<sup>L</sup>, E72<sup>L</sup> und His82<sup>L</sup> umfasst. Um am aktiven Zentrum reaktive O<sub>2</sub>-Spezies zu reduzieren, könnte darüber ein Proton vom proximalen Cluster zugeführt werden [58]. Ein zweites Proton stünde durch die Deprotonierung des N(Cys20<sup>S</sup>) zur Verfügung.

## 5.5 Ausblick

Neueste Messungen an Mutationsvarianten des proximalen Clusters, bei denen das Histidin 229 durch ein Methionin (H229M) beziehungsweise durch ein Alanin (H229A) ersetzt wurde, ergaben Signale gleich denen des Wildtyps (Abbildung 5.16). Es liegen zwei schwache Hyperfeinwechselwirkungen inklusive Kernquadrupolkopplung vor, zum einen die des Histidins am aktiven Zentrum, zum andere eine, die im Verlauf dieses Kapitels dem Histidin 229 zugeordnet wurde. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine andere Zuordnung der zweiten, schwachen ESEEM-Kopplung möglich ist. Ein denkbarer Kandidat wäre das naheliegende N(Cys19<sup>S</sup>). Die aus der <sup>15</sup>N-ESEEM-Messung bestimmte Hyperfeinanisotropie würde mit jener aus der Punkt-Dipol-Abschätzung weitestgehend übereinstimmen, allerdings gibt es klare Diskrepanzen zu den <sup>14</sup>N-ESEEM-Messungen: Hier stimmen weder die Hyperfeinanisotropiewerte, noch würden für einen derartigen Stickstoff des Proteinrückgrates Quadrupolparameter eines Histidins erwartet.

Zukünftige Messungen sollten demnach darauf ausgerichtet sein, herauszufinden, welche Bindungen ähnliche Quadrupol- und Hyperfeinmerkmale aufweisen könnten wie die an einen Histidinstickstoff und wie die Diskrepanz zwischen <sup>14</sup>N- und <sup>15</sup>N-ESEEM-Experimenten zustande kommt.

ENDOR-Messungen an H<sub>2</sub><sup>17</sup>O-ausgetauschten Proben und solchen, die mit <sup>17</sup>O<sub>2</sub> oxidiert wurden, sind in Planung, um die mutmaßliche OH<sup>-</sup>-Spezies zwischen Fe1 und His229 zu untersuchen. Andererseits sollen sie auch Aufschluss darüber geben, ob Sauerstoff aus dem Wasseranteil des Lösungsmittels oder direkt aus der Atmosphäre



**Abbildung 5.16:** 3-Puls-ESEEMs im X-Band des Wildtyps (blau) und der Histidin-Mutanten H229A (lachs) und H229M (grün) der MBH bei vergleichbaren Feldpositionen. Messbedingungen:  $T = 10$  K.

am proximalen Cluster und in der Brückenposition des aktiven Zentrums eingebunden wird, um dort  $\text{Ni}_r\text{-B}$  zu bilden.

W-Band-ESEEM-Messungen können möglicherweise Aufschluss über die Quadrupolparameter des Peptidrückgratstickstoffes  $\text{N}(\text{Cys}20^{\text{S}})$  geben.





---

# BESTIMMUNG DER $^{57}\text{Fe}$ – HYPERFEINPARAMETER DER MBH

---

Hyperfeinkopplungen geben ein charakteristisches Bild der Umgebung der untersuchten Spinsonde wieder. In [FeS]-Clustern ist insbesondere das Verhalten der einzelnen Eisenatome zueinander von Interesse, da dies Rückschlüsse auf die Bindungsstruktur des Clusters erlaubt. Isotopenaustausch von  $^{56}\text{Fe}$  zu  $^{57}\text{Fe}$  ermöglicht durch die Einführung von Kernspins ( $I = 1/2$ ) die Detektion der eisenatomspezifischen Hyperfeinkopplungen, die bei  $^{56}\text{Fe}$ -haltigen Proben aufgrund des fehlenden Kernspins nicht vermessen werden können (siehe Abschnitt 3.3.7).

Mit Hinblick auf mögliche Mechanismen der Sauerstofftoleranz werden im Folgenden die Ergebnisse der ENDOR-Messungen an isotopenausgetauschten MBH-Proben im reduzierten und oxidierten Zustand beschrieben, die durchgeführt wurden, um die jeweils paramagnetisch vorliegenden Cluster genauer zu charakterisieren.

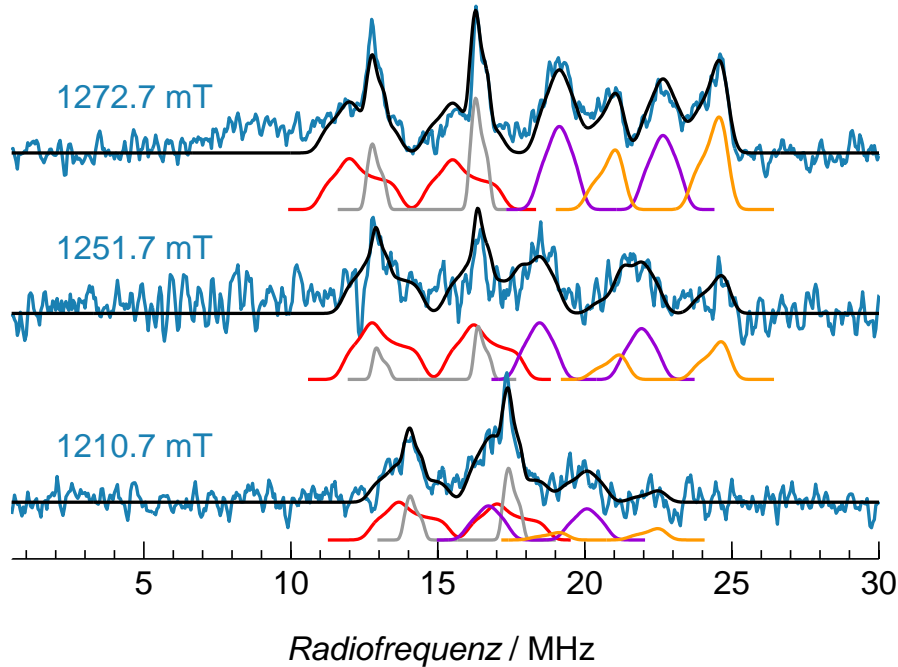
Aus den in Kapitel 4 vorgestellten Messungen geht hervor, dass sowohl im oxidierten wie im reduzierten Zustand die  $g$ -Werte der am FSE-Signal beteiligten [FeS]-Cluster komplett überlagert sind. Eine Trennung nach Relaxationszeit oder Nutationsfrequenz ist entweder nicht durchführbar oder nicht zielführend. Die Zuordnung von ENDOR-Signalen zu einzelnen Clustern kann demnach nicht über die Auswahl von

bestimmten Magnetfeldpositionen erfolgen, sondern muss anhand von Literaturvergleichen vorgenommen werden. Wegen der sehr geringen Spindichte auf dem Eisen werden keine signifikanten  $^{57}\text{Fe}$ -Signale des [NiFe]-Zentrums erwartet (siehe Abschnitt 2.1).

## 6.1 $^{57}\text{Fe}$ – ENDOR der reduzierten Probe

Zur Bestimmung der Hyperfeinparameter der [FeS]-Cluster wurden Davies-ENDOR-Messungen im Q-Band durchgeführt. Qualitativ betrachtet zeigen die Spektren der reduzierten Probe eine deutliche Magnetfeldabhängigkeit, also Orientierungsselektion über die  $g$ -Hauptwerte der Cluster. Abbildung 6.1 gibt die experimentellen Spektren (blau) bei den drei Feldpositionen 1210.7 mT, 1251.7 mT und 1272.7 mT ( $g = 2.006$ , 1.939 und 1.909, vergleiche Abbildung 4.31) sowie die zugehörigen Simulationen wieder.

Da im Q-Band beide  $g$ -Matrizen in etwa den gleichen Wertebereich umfassen oder dies durch ihre Austauschwechselwirkung erreicht wird, ist es bei den vorliegenden ENDOR-Untersuchungen sehr schwer, Hyperfeinkopplungen dem einen oder anderen Cluster zuzuordnen. Die einzelnen Simulationen erfolgten unabhängig von  $g$ -Werten der möglicherweise beteiligten Cluster, weil die jeweiligen  $g$ -Matrizen, ihre Orientierungen sowie das Kopplungsschema größtenteils unbekannt sind. Auf eine Zuordnung von Euler-Winkeln wurde aus den gleichen Gründen verzichtet. Wegen des zunehmend schlechteren Signal-Rausch-Verhältnisses zum Rand des FSEs kann zudem nicht der gesamte, die Cluster umfassende Feldbereich mit ENDOR-Messungen abgedeckt werden. Aus den erfolgreichen Messungen und ihren voneinander unabhängigen Simulationen wurde eine Abschätzung der Größenordnung der gesamten Hyperfeinwechselwirkungen dadurch erreicht, dass von jeder Kopplung die Extremwerte über alle Feldstellen zu einer Matrix zusammengefasst wurden. Diese sind ebenso wie die Parameter der einzelnen Simulationen in Tabelle 6.1 angegeben. Die Vorzeichen der einzelnen Kopplungen wurden durch Simulation aus dem Intensitätsverhalten der beiden zugehörigen Komponenten bestimmt. Ein negatives Vorzeichen bedeutet in diesem Fall, dass die bei höherem Feld gelegene Linie schwächer ist. Eine zwingende Korrelation mit den echten Vorzeichen ist nicht gegeben, da zusätzliche Einflüsse wie



**Abbildung 6.1:** Davis-ENDOR-Messungen im Q-Band der reduzierten MBH  $^{57}\text{Fe}$  an unterschiedlichen Feldstellen (blau), vergleiche Abbildung 4.31. Farbcodes der simulierten Hyperfeinmatrizen wie in Tabelle 6.1, in schwarz ihre Summe. Messbedingungen:  $T = 6\text{ K}$ .

die Kennlinie des RF-Verstärkers oder Kreuz- und Kernrelaxationseffekte vorhanden sind. Eine Bestimmung der relativen Vorzeichen wäre zum Beispiel durch Doppel-RF-Methoden wie double ENDOR möglich [198].

Vier Hyperfeinmatrizen lassen sich im Experiment unterscheiden, sie sind in Abbildung 6.1 mit verschiedenen Farben gekennzeichnet, die im Folgenden erklärt werden. Im Vergleich zur Larmor-Frequenz von  $^{57}\text{Fe}$  handelt es sich um starke Kopplungen, das heißt, die jeweiligen Übergänge sind um  $A/2$  zentriert und liegen im Abstand der doppelten freien Frequenz von  $^{57}\text{Fe}$  im Q-Band, also  $2\nu_{^{57}\text{Fe}} \approx 3.4\text{ MHz}$ .

Die intensivsten und schmalsten Signale, welche um 15 MHz zentriert sind, wandern mit zunehmender Feldstärke zu kleineren RF-Frequenzen, also zu geringeren Hyperfeinwerten. Es handelt sich um eine relativ isotrope Kopplung von etwa 30 MHz, die entsprechende Simulation ist in grau dargestellt. Sie wird mit  $A_{r1}$  bezeichnet, die

Simulationsparameter je Feldstelle sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Im Spektrum bei 1272.7 mT tauchen bei höheren Frequenzen vier weitere scharfe Signale auf, sie sind paarweise durch  $2\nu_{^{57}\text{Fe}}$  getrennt. Das durch die violette Simulation wiedergegebene Linienpaar, es entspricht etwa  $A_{r2} = 40$  MHz, verhält sich gegenläufig zur grauen Variante, mit zunehmendem Feld vergrößert sich hier auch die Hyperfeinkopplung. Die größte Wechselwirkung  $A_{r3}$  ist durch die orange Spur simuliert, mit steigender Feldstärke vergrößert sich die Kopplung zuerst und nimmt dann wieder ab. Im mittleren Feldbereich überlagert sich dadurch eine Komponente dieser Kopplung mit einer Linie der zuvor genannten Kopplung  $A_{r2}$ , so dass sich eine Dreierstruktur ergibt.

Insbesondere bei 1272.7 mT ist ersichtlich, dass eine weitere Kopplung  $A_{r4}$  im Bereich um 30 MHz vorhanden sein muss, sie ist im Spektrum breiter, also anisotroper. Als rote Spur simuliert zeigt sie die bisher größte Anisotropie. Bei der geringsten vermessenen Feldstärke überlagert sich ihre höherfrequente Linie mit der Niederfrequenzkomponente der Kopplung  $A_{r2}$ .

Die ENDOR-Spektren bei 1272.7 mT und 1251.7 mT zeigen zusätzliche breite Signale um 8 MHz. Da aber beide  $g$ -Matrizen über den vermessenen Feldbereich gleichermaßen vorliegen, somit entsprechende Kopplungen im gesamten Feldbereich auftreten sollten, wurde auf eine Simulation und Zuordnung dieser Wechselwirkungen verzichtet. Nicht auszuschließen ist zudem, dass weitere, kleinere Kopplungen um 2-4 MHz im ENDOR vorhanden sind, die unterdrückt werden. Sie sind vermutlich aufgrund sehr geringer Intensität nicht vom Rauschen zu unterscheiden.

[4Fe4S]-Cluster können häufig als aus zwei gekoppelten Eisen-Eisen-Paaren zusammen gesetzt betrachtet werden [143, 154, 199], dadurch ergeben sich typischerweise zwei Gruppen von Hyperfeinwerten pro Cluster. Im vorliegenden Fall könnte die Anzahl der im ENDOR gefundenen vier Kopplungen mit der Annahme übereinstimmen, dass für die reduzierte Probe zwei Parametersätze für den distalen Cluster  $[\text{4Fe4S}]^{1+}$  sowie zwei für den proximalen Cluster  $[\text{4Fe3S}]^{3+}$  zu erwarten sind. Dagegen spricht tendenziell der aus der Kristallstruktur [57] ersichtliche Symmetriebruch des Clusters.

Zum Vergleich stehen experimentelle Hyperfeinparameter aus Studien zu Hydrogenase I aus *A. aeolicus* (Pandelia *et al.*, [143]), der Hydrogenase aus *D. gigas* (Teixeira

**Tabelle 6.1:** Hyperfeinparameter aus der Simulation der ENDOR-Spektren der reduzierten <sup>57</sup>Fe-Probe, geordnet nach Größe. Die Fehler für  $A$  aus der Simulation sind jeweils  $\pm(0.5, 0.2, 0.5)$ , Vorzeichen nicht verbindlich (siehe Text). Die rechte Spalte gibt die Zusammenfassung der größten und kleinsten Hyperfeinanteile aller Magnetfelder.

	$B(\text{mT})$	$A(\text{MHz})$			$A_{\text{ges}}(\text{MHz})$		
$A_{r4}$ rot	1210.7	-28.7	-30.7	-34.2	} -25.5	-(27.5-30.5)	-34.2
	1251.7	-27.0	-29.0	-32.5			
	1272.7	-25.5	-27.5	-31.0			
$A_{r1}$ grau	1210.7	31.0	31.5	32.5	} 28.6	29.0-31.5	32.5
	1251.7	29.0	29.3	30.3			
	1272.7	28.6	29.1	30.1			
$A_{r2}$ lila	1210.7	-35.2	-36.8	-38.3	} -35.2	-(37.0-42.0)	-43.3
	1251.7	-38.8	-40.4	-41.9			
	1272.7	-40.2	-41.8	-43.3			
$A_{r3}$ orange	1210.7	39.6	41.7	42.3	} 39.6	42.0-46.0	46.5
	1251.7	48.3	45.9	46.5			
	1272.7	43.6	45.7	46.3			

*et al.*, [154]) sowie der Fe-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Hildenborough (Pereina *et al.*, [199]) zur Verfügung, wie sie in Tabelle 6.2 angegeben sind. Die beiden erstgenannten Enzyme zeigen einen ähnlichen Trend, was zum Beispiel die Werte für den medialen oder distalen Cluster betrifft. Es gibt jedoch auch deutliche Abweichungen der Literaturwerte untereinander und in Bezug auf die hier vorliegenden Messungen. Zusätzlich bieten die teils sehr großzügig bemessenen Fehlerintervalle einen weiten Spielraum für die Zuordnung von Kopplungen.

Der mediale Cluster muss mangels EPR-Signal nicht betrachtet werden, die mittels ENDOR ermittelten Wechselwirkungen sind nur mit proximalen und distalen Clustern der diversen Enzyme zu vergleichen. Die beiden größeren Matrizen  $A_{r2}$  (lila) und  $A_{r3}$  (orange) sind höchstwahrscheinlich dem proximalen Cluster zuzuordnen, da sowohl bei *A. aeolicus* als auch *D. gigas* die größten Hyperfeinwerte diesem Cluster entsprechen. Für die mit  $A_{r4}$  (rot) und  $A_{r1}$  (grau) designierten Matrizen kämen sowohl die größeren Kopplungen der distalen Cluster in Frage, als auch die Gruppe kleinerer Kopplungen des proximalen Clusters, wie er in *A. aeolicus* zu finden ist. Aufgrund

**Tabelle 6.2:** Experimentelle Hyperfeinparameter aus  $^{57}\text{Fe}$ -Mößbauer-Messungen von reduzierten Hydrogenaseproben aus *D. gigas* [154], *A. aeolicus* [143] und *D. vulgaris* [199] (keine Unterscheidung zwischen proximalem und distalem [4Fe4S]-Cluster). EPR-sichtbar sind proximaler und distaler Cluster, die Parameter des medialen Clusters sind ausgegraut. Theoretische DFT-Parameter anhand der Kristallstruktur von *R. eutropha* sind [200] entnommen. Fehler, so vorhanden, sind in Klammern angegeben.

Organismus	Cluster	#Fe	A(MHz)		
<i>D. gigas</i>	[4Fe4S] <sup>1+</sup>	2	11.3(6.9)	11.5(6.9)	11.5(6.9)
	proximal	2	-38.7(2.8)	-29.0(2.8)	-6.9(1.4)
<i>A. aeolicus</i>	[4Fe3S] <sup>3+</sup>	1	-41.4	-44.2	-44.2
	proximal	1	-20.7	-41.4	-41.4
		1	16.6	30.4	35.9
		1	16.6	20.7	20.7
<i>R. eutropha</i> DFT	[4Fe3S] <sup>3+</sup>	1	-32.0	-36.8	-41.6
	proximal	1	-32.9	-36.8	-40.1
		1	13.2	26.2	29.3
		1	3.2	14.6	19.6
<i>D. gigas</i>	[3Fe4S] <sup>0</sup>	1	-15.0(7)	-13.0(3)	-11.5(2)
	medial	2	6.8(5)	13.0(5)	12.7(2)
<i>A. aeolicus</i>	[3Fe4S] <sup>0</sup>	1	8.3	16.6	17.5
	medial	2	-22.1	-20.7	-17.0
<i>D. gigas</i>	[4Fe4S] <sup>1+</sup>	2	4.1(1.4)	4.1(1.4)	4.1(1.4)
	distal	2	-24.9(2.8)	-30.4(2.8)	-34.5(2.8)
<i>A. aeolicus</i>	[4Fe4S] <sup>1+</sup>	2	3.0	3.0	3.0
	distal	2	-38.4	-33.2	-5.5
<i>D. vulgaris</i>	[4Fe4S] <sup>1+</sup>	2	26.3(13.8)	13.0(13.8)	6.9(13.8)
	pr. & di.	2	-21.7(20.7)	-35.9(27.6)	-32.3(20.7)

der aus der Kristallstruktur der reduzierten MBH [57] hervorgehenden Asymmetrie des Clusters ist die zweite Variante zu bevorzugen. Eine getrennte Zuordnung zu den Clustern aus *D. vulgaris* lässt sich nicht treffen, da diese nicht unterschieden werden. Der Größenordnung nach stimmen die vorliegenden Werte aber auch hiermit überein. Weitergehende Vergleiche mit der Literatur zeigen eine Übereinstimmung mit [4Fe4S]-Clustern anderer Organismen [201, 202].

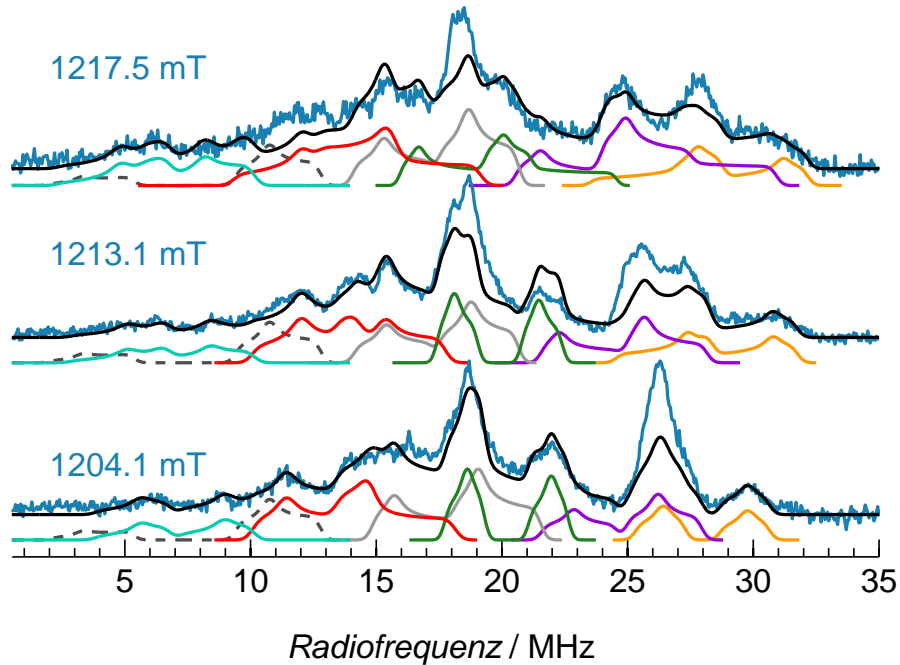
Die kürzlich veröffentlichte, auf der Kristallstruktur der MBH basierende DFT-Studie von Tabrizi *et al.* [200] bestätigt die beiden größeren Kopplungen für den proximalen Cluster mit  $S = 1/2$ . Für die anderen beiden liegt innerhalb des verwendeten Kopplungsschemas eine deutlich größere Anisotropie vor, eine Berechnung der Parameter des distalen Clusters wurde nicht durchgeführt.

Eine genauere Zuordnung der Cluster und Hyperfeinkopplungen über die hier durchgeführte Abschätzung der Grenzwerte hinaus könnte durch  $^{57}\text{Fe}$ -Mößbauer-Daten erleichtert werden. Solche Messungen wurden bereits unternommen, eine Auswertung steht allerdings noch aus (persönliche Mitteilung von Dr. Eckhard Bill, Max-Planck-Institut für chemische Energiekonversion (MPI-CEC), Mülheim).

## 6.2 $^{57}\text{Fe}$ – ENDOR der oxidierten Probe

Die Q-Band-ENDOR-Spektren der oxidierten Probe wurden über einen Feldbereich von 1204.1-1217.5 mT, also einen  $g$ -Bereich von 2.017-1.995 aufgenommen (vergleiche Abbildung 4.1). Dies umfasst sowohl  $g$ -Werte des medialen Clusters ( $g = (2.022, 2.016, 1.997)$ ) als auch jene, die für den proximalen Cluster inklusive Nullfeldaufspaltung vermutet werden (Abschnitt 4.2.1, ab Seite 100). Durch die Austauschkopplungen zwischen den drei Zentren kommt es zudem zu einer Aufspaltung und Verbreiterung der EPR-Signale. Wie beim reduzierten Cluster lässt sich demnach auch hier keines der beiden Zentren über seine  $g$ -Werte auswählen.

Abbildung 6.2 gibt die experimentellen Spektren an drei Feldstellen wieder (blau), dazu die korrespondierenden Simulationen und ihre Summe (schwarz). Es können sechs Hyperfeinkopplungen festgestellt werden, die sich teilweise stark überlagern. Die Betrachtung beginnt bei den signifikanten Linien zwischen 20 und 30 MHz, von denen



**Abbildung 6.2:** Davis-ENDOR-Messungen im Q-Band der *as-isolated* MBH  $^{57}\text{Fe}$  an unterschiedlichen Feldstellen (blau), vergleiche Abbildung 4.31. Die  $^{14}\text{N}$ -Peptidrückgratskopplung, wie sie im Wildtyp gefunden wurde, ist gestrichelt dargestellt. Farbcodes der simulierten Hyperfeinmatrizen wie in Tabelle 6.3, in schwarz ihre Summe. Keine farbliche Korrelation zur reduzierten Probe! Messbedingungen:  $T = 6\text{ K}$ .

sich zwei bei 1204.1 mT überlagern und mit zunehmender Feldstärke auseinanderlaufen. Über die Aufspaltung  $2\nu_{^{57}\text{Fe}} \approx 3.4\text{ MHz}$  lassen sich die zu diesen Kopplungen  $A_{o1}$  und  $A_{o2}$  gehörigen zweiten Komponenten festlegen. Diese Wechselwirkungen sind in Grafik 6.2 als Simulationen in violett und orange vertreten. Mit größer werdendem Feld nimmt ihre Anisotropie zu, alle Werte sind in Tabelle 6.3 verzeichnet.

Als nächstes steht das starke Signal um 18 MHz im Fokus, die Intensität deutet darauf hin, dass sich auch hier zwei Linien überlagern. Beide beteiligten Kopplungen,  $A_{o3}$  und  $A_{o4}$  (grün und grau), verringern sich mit zunehmender Feldstärke, Wechselwirkung  $A_{o3}$  gewinnt dabei deutlich an Anisotropie.

Bei 1217.5 mT und 1213.1 mT taucht etwa um 15-16 MHz eine klare Struktur auf, hier wird Kopplung  $A_{o4}$  von einer weiteren, stark anisotropen Wechselwirkung  $A_{o5}$



(rot) überlagert, die sich in den Spektren bis unter 10 MHz erstreckt.

Der Niederfrequenzbereich schließlich ist deutlich unstrukturierter und wegen der Unterdrückung kleiner Frequenzen auch weniger intensiv. Die entsprechend simulierte Wechselwirkung  $A_{o6}$  (türkis) ist nicht derart strikt festgelegt, es wäre auch eine größere Anisotropie möglich. Außerdem sind noch kleinere Hyperfeinkopplungen denkbar, da das Rauschniveau unterhalb von 4 MHz leicht höher ist als im Bereich über 33 MHz. In diesem Bereich wurde auf eine Zuordnung konkreter Kopplungen verzichtet, da sich diese durch eine hohe Ungenauigkeit auszeichnen würden. Der Vollständigkeit halber sind sie als Wechselwirkung  $A_{o7}$  mit etwa 2-4 MHz in Tabelle 6.3 zusammengefasst.

Im oxidierten Zustand sind medialer und proximaler Cluster EPR-aktiv, was bedeutet, dass es bei sechs beziehungsweise sieben Hyperfeinkopplungen keine gleichartigen Eisenspezies mit identischen Matrizen wie im reduzierten Fall gibt. Von den bestimmten Wechselwirkungen sind  $A_{o6}$  (türkis) und  $A_{o3}$  (grün) mit der mittleren und größten Kopplung der medialen Cluster aus *D. gigas* und *A. aeolicus* vergleichbar (Tabelle 6.4). Eine dazu passende, sehr kleine Kopplung um 3 MHz könnte mit der möglicherweise in den Spektren vorhandenen Kopplung  $A_{o7}$  korreliert werden, deren Intensität stark unterdrückt wäre.

Bezüglich des proximalen Clusters besteht die einzige Referenz in den Messungen von Pandelia *et al.* an Hase I [143], drei von vier der dort ermittelten Kopplungen weisen eine sehr starke Anisotropie auf, was eine deutliche Abweichung zum reduzierten Fall ist. Die hier vorliegenden Kopplungen der MBH stimmen mit diesem Verhalten bezüglich der reduzierten Variante überein, auch hier gibt es größere Extremwerte. Die spektrenüberspannende Anisotropie scheint jedoch nicht vorhanden zu sein. Den Maximalwerten nach zu urteilen, wären die Kopplungen  $A_{o1}$  (lila) und  $A_{o2}$  (orange) den beiden Kopplungen größter Anisotropie aus Hydrognase I zuzuordnen,  $A_{o5}$  (rot) und  $A_{o4}$  (grau) entsprächen somit den verbleibenden beiden Matrizen des proximalen Clusters. Für die MBH wurden die Vorzeichen der Matrizen ausschließlich anhand des Temperaturverhaltens der Intensitäten der einzelnen Übergänge in den ENDOR-Simulationen bestimmt. Auch hier würde eine Bestimmung von Mößbauer-Parametern eine Eingrenzung und Zuordnung der Werte erleichtern.

**Tabelle 6.3:** Hyperfeinparameter aus der Simulation der ENDOR-Spektren der oxidierten  $^{57}\text{Fe}$ -Probe, nach Größe geordnet. Die Fehler für  $A$  aus der Simulation sind jeweils  $\pm (0.5, 0.2, 0.5)$ , Vorzeichen nicht verbindlich (siehe Text). Die rechte Spalte gibt die Zusammenfassung der größten und kleinsten Hyperfeinanteile aller Magnetfelder. Sternchen markieren die Zuordnung zum medialen Cluster.

	$B(\text{mT})$	$A(\text{MHz})$			$A_{\text{ges}}(\text{MHz})$		
$A_{o7}$	1204.1	2-4			} 2-4		
	1213.1	2-4					
*	1217.5	2-4					
$A_{o6}$	1204.1	-11.0	-14.6	-17.0	} -8.0 -(13.0-14.5) -17.0		
türkis	1213.1	-9.0	-13.5	-17.0			
*	1217.5	-8.0	-13.0	-17.0			
$A_{o5}$	1204.1	-23.5	-26.2	-33.0	} -22.0 -(26.0-27.5) -35.0		
rot	1213.1	-23.5	-27.4	-32.2			
	1217.5	-22.0	-27.5	-35.0			
$A_{o4}$	1204.1	33.0	34.8	39.8	} 31.5 34.0-35.0 39.8		
grau	1213.1	31.6	34.2	38.0			
	1217.5	31.5	34.0	38.0			
$A_{o3}$	1204.1	-38.8	-40.6	-42.0	} -35.3 -(37.0-40.5) -45.8		
grün	1213.1	-38.2	-39.6	-41.5			
*	1217.5	-35.3	-36.8	-45.8			
$A_{o1}$	1204.1	46.5	49.1	52.6	} 44.5 46.5-49.0 58.5		
lila	1213.1	46.5	48.0	53.0			
	1217.5	44.5	46.5	58.5			
$A_{o2}$	1204.1	-54.0	-56.2	-58.0	} -50.5 -(56.0-59.0) -61.0		
orange	1213.1	-52.5	-58.2	-60.2			
	1217.5	-50.5	-59.0	-61.0			

**Tabelle 6.4:** Hyperfeinparameter aus  $^{57}\text{Fe}$ -Mößbauer-Messungen von oxidierten Hydrogenaseproben aus *D. gigas* und *A. aeolicus*. [143, 154]. EPR-sichtbar sind (proximaler) und medialer Cluster. Der distale Cluster und im Fall von *D. gigas* auch der proximale entfallen wegen  $[\text{4Fe4S}]^{2+}$ , also  $S=0$ . Fehler, so vorhanden, sind in Klammern angegeben.

Organismus	Cluster	$A(\text{MHz})$		
<i>A. aeolicus</i>	$[\text{4Fe3S}]^{5+}$	-23.5	-18.0	-59.4
	proximal	-12.8	-70.5	-60.7
		7.0	41.9	28.0
		27.6	35.0	37.9
<i>D. gigas</i>	$[\text{3Fe4S}]^{1+}$	-47.0(4.1)	-38.7(4.1)	-44.2(4.1)
	medial	13.8(2.8)	15.2(2.8)	15.2(2.8)
		2.5	2.5	2.5
<i>A. aeolicus</i>	$[\text{3Fe4S}]^{1+}$	-24.9	-38.4	-40.1
	medial	12.4	12.4	12.4
		3.5	3.5	3.5

Die Anzahl der Kopplungen, wie sie hier gefunden wurde, spricht deutlich für das Vorhandensein zweier paramagnetischer Zentren in der oxidierten MBH-Probe, dies sind proximaler und medialer Cluster. In Standardhydrogenasen liegen proximaler und distaler Cluster in der kubanen  $[\text{4Fe4S}]$ -Form vor und sind diamagnetisch. Im reduzierten Fall sind dort je zwei Eisen zu einem Paar gekoppelt, so dass jeweils zwei der erwarteten vier Hyperfeinkopplungen gleicher Größe sind [143, 154, 199]. Da bei Oxidation keine gravierende strukturelle Veränderung dieser  $[\text{4Fe4S}]$ -Zentren zu erwarten steht, sollte sich an dieser Zweierkopplung nicht viel ändern. Dem entgegenstehend können dem proximalen Cluster der MBH vier Hyperfeinwechselwirkungen zugeordnet werden. Dies ist in Übereinstimmung mit Hase I aus *A. aeolicus* und bestätigt die ungewöhnliche Beschaffenheit dieses Zentrums in den beiden sauerstofftoleranten Enzymen. Durch die Öffnung des Clusters und Bindung an einen Stickstoff des Peptidrückgrates unter oxidierenden Bedingungen (Abschnitt 5.2) wird die in  $[\text{4Fe4S}]$ -Clustern mögliche Äquivalenz zweier Eisenatome aufgehoben, es liegen vier klar unterscheidbare Eisenatome mit individuellen Kopplungen vor.

### 6.3 Zusammenfassung

Es konnten für die reduzierte Version der MBH vier Hyperfeinkopplungen festgestellt werden. Hierbei könnte es sich einerseits um den distalen und den proximalen Cluster handeln, wobei je zwei Eisenatome dieselbe Wechselwirkung aufwiesen. Andererseits besteht die Möglichkeit, nur den proximalen Cluster mit vier Kopplungen für seine vier Eisenatome vorzufinden, was aufgrund der Clusteraufweitung wahrscheinlicher ist. Die Größenordnungen und Anzahl der gefundenen Parameter stimmen mit denen überein, die für sauerstoffempfindliche und andere -tolerante Hydrogenasen gefunden wurden. Darüber hinaus liegen die Werte in dem Bereich, der auch für andere [4Fe4S]-Cluster [201, 202] und 2Fe-Ferredoxine [203] gefunden wurde.

Die Analyse der oxidierten Probe ergab sechs (beziehungsweise sieben) Kopplungen, auch sie sind den Literaturwerten ähnlich. Es handelt sich um die Kopplungen der einzelnen Eisenatome im proximalen sowie medialen Cluster. Dieses Ergebnis stützt das Modell, dass der proximale Cluster unter Oxidation einer Strukturänderung unterliegt, welche wesentlicher Bestandteil der Sauerstofftoleranz der MBH ist (vergleiche Kapitel 5 und [58]).

### 6.4 Ausblick

Eine präzisere Zuordnung kann durch die Auswertung der bereits erfolgten Mößbauer-Messungen erfolgen. Zusätzliche ENDOR-Messungen an den Flanken der FSEs könnten abstecken, wie weit die Hyperfeinwerte sich erstrecken, jedoch sind diese Experimente aufgrund der schwächeren Signalintensität um ein Vielfaches zeitaufwendiger. Isotopenaustausch und  $^{57}\text{Fe}$ -ENDOR-Messungen an Mutationsvarianten, namentlich die P242C- und die C19G/C120G-Variante, könnten die Zuordnung von Hyperfeinparametern zu proximalem und medialem Cluster bekräftigen.

---

# CHARAKTERISIERUNG DES AKTIVEN ZENTRUMS DER SH

---

Die SH ist aufgrund ihrer Zusammensetzung und Funktion komplexer als Standardhydrogenasen. Sie kombiniert  $\text{NAD}^+$ -Reduktion im Diaphorasemodul ( $\text{NAD}^+$ -Reduktasemodul) mit Wasserstoffspaltung im Hydrogenasemodul. Dabei weist die Diaphoraseuntereinheit Ähnlichkeiten mit der peripheren Untereinheit in Komplex I auf, während die Hydrogenaseuntereinheit und im Speziellen das aktive Zentrum vergleichbar zu dem der MBH und zu Standardhydrogenasen aufgebaut ist [204]. Nickel und Eisen bilden seine Grundlage, Letzteres ist von zwei  $\text{CN}^-$ - und einem CO-Liganden koordiniert [70, 71].

Für ein Verständnis des katalytischen Mechanismus der SH und ihrer Sauerstofftoleranz ist es essentiell, Informationen über das verbrückende Substrat sowie die elektronische Umgebung des aktiven Zentrums zu gewinnen. Orientierungsselektives ENDOR und komplementär dazu HYSCORE eignen sich, um Hyperfeinkopplungen des Spins des [NiFe]-Zentrums mit umgebenden Kernen zu analysieren. Die Hyperfeinwechselwirkung kann als lokale Sonde der elektronischen Struktur dienen, denn sie reagiert empfindlich auf strukturelle Veränderungen der Kofaktoren und der Proteinumgebung.

In diesem Kapitel wird zunächst eine *cw*-EPR-Charakterisierung vorgestellt, im weiteren Verlauf werden gepulste Doppelresonanz- und HYSCORE-Messungen gezeigt,

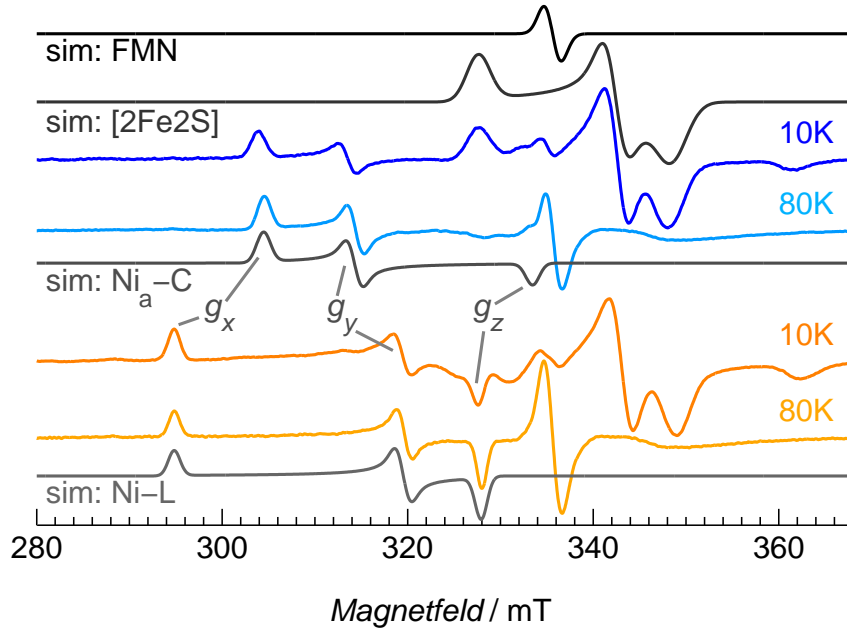
um sowohl den reduzierten Ni<sub>a</sub>-C- als auch den lichtinduzierten Ni-L-Zustand in Hinblick auf verbrückende Liganden zu untersuchen. Abschließend werden schwache Stickstoffhyperfeinkopplungen behandelt, die mit Echomodulationsmethoden analysiert wurden.

## 7.1 EPR-Spektren der SH

Im NADH-reduzierten Zustand liegt das aktive Zentrum der SH als Ni<sub>a</sub>-C vor. Abbildung 7.1 zeigt in Blau X-Band-*cw*-EPR-Spektren der SH in gefrorener Lösung bei 10 K sowie 80 K und in Grau die korrespondierende Simulation von Ni<sub>a</sub>-C. Durch diese können die *g*-Hauptwerte von Ni<sub>a</sub>-C bestimmt werden als  $g = (2.208, 2.139, 2.016) \pm 0.001$ . Dies stimmt mit Werten sauerstofftoleranter und -empfindlicher [NiFe]-Hydrogenasen wie RH [26, 205] oder *Desulfivibrio vulgaris* Miyazaki F [25] überein. DFT-Rechnungen konnten zeigen, dass dieser Ni<sup>3+</sup>-Zustand durch eine Elektronenkonfiguration beschrieben werden kann, in der das ungepaarte Elektron das *d*<sub>z<sup>2</sup>-Orbital des Nickels besetzt [206, 207].</sub>

Es konnte keine Aufspaltung von Ni<sub>a</sub>-C detektiert werden, wie sie bei Temperaturen unter  $T = 20$  K in Hydrogenase I aus *Aquifex aeolicus* [30], der MBH aus *R. eutropha* (Abschnitt 5.1) oder den drei Hydrogenasen aus *D. gigas* [208], *D. fructosovorans* und *Desulfomicrobium baculatum* [209] vorkommt. Dort ist sie durch magnetische *J*-Kopplung des aktiven Zentrum mit dem proximalen Cluster oder gegebenenfalls einem nahen [4Fe4S]-Zentrum hervorgerufen. Dies stimmt mit vorherigen Ergebnissen überein, dass ein möglicher [4Fe4S]-Cluster der SH aufgrund seines äußerst geringen Redoxpotentials von NADH noch nicht reduziert [153] oder generell nicht EPR-aktiv ist [76, 204].

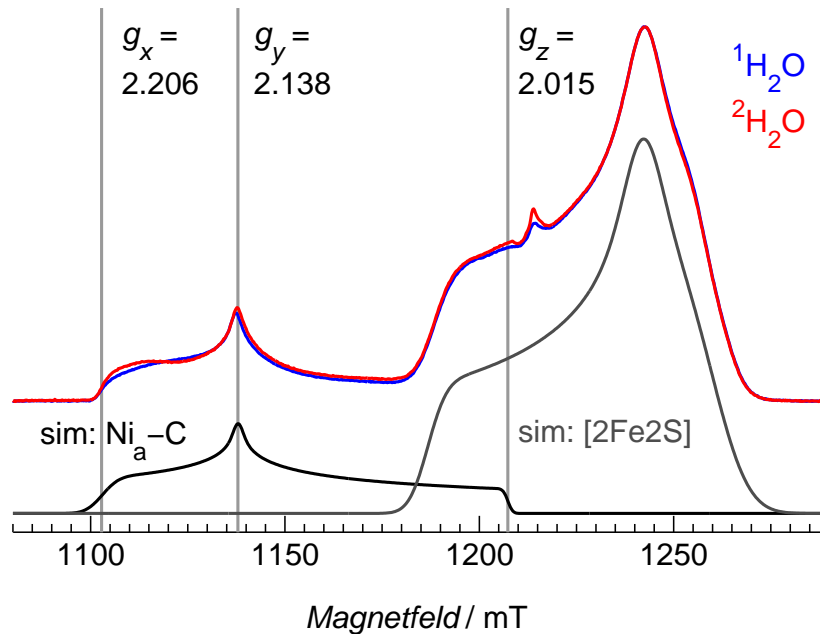
Einstrahlung von weißem Licht verursacht bei kryogenen Temperaturen  $< 160$  K, hier durchgeführt bei 80 K, eine Umwandlung in den Lichtzustand Ni-L. Spektren dieses Zustandes sind für  $T = 10$  K und 80 K als orange Spuren in Grafik 7.1 dargestellt, auch hier mit entsprechender Simulation des Nickelzustandes in Grau. Die *g*-Werte ergeben sich zu  $g = (2.281, 2.105, 2.051) \pm 0.001$ , übereinstimmend mit anderen Hydrogenasen [29, 30, 209]. Der *g<sub>z</sub>*-Wert weicht im Vergleich zu Ni<sub>a</sub>-C stärker von *g<sub>e</sub>* ab. Kürzlich angefertigte DFT-Studien schließen, dass es zu einer Rehybridisierung der Ni<sub>a</sub>-C-



**Abbildung 7.1:** X-Band-*cw*-Feldspektren der nativen SH im Dunkelzustand (blau) und beleuchtet (orange), je bei 10 K und 80 K. In Grau sind die Simulationen der einzelnen Spezies gegeben. Messbedingungen:  $P_{\text{mw}} = 2 \text{ mW}$ , Modulationsfrequenz 100 KHz, -amplitude 1 mT,  $\nu = 9.38875 \text{ GHz}$  (dunkel) bzw.  $9.38915 \text{ GHz}$  (beleuchtet), normalisiert auf 9.4 GHz.

Orbitale  $3d_{x^2-y^2}$  und  $3d_{z^2}$  kommt, was für Ni-L zu  $3d_{z^2-y^2}$ - und  $3d_{x^2}$ -Orbitalen führt [207]. Da hauptsächlich das  $3d_{z^2-y^2}$ -Orbital einfach besetzt ist, kommt es verglichen mit Ni<sub>a</sub>-C zu einer Verschiebung der  $g$ -Werte. Dieser Vorgang kann als die lichtinduzierte Abspaltung des verbrückenden Hydrids als Proton interpretiert werden, während die beiden verbleibenden Elektronen Nickel zu Ni<sup>1+</sup> reduzieren [25, 206]. XAS-Messungen und DFT stimmen im Gegenzug dazu darin überein, dass es sich aufgrund von Elektronendichteverchiebung eher um Ni<sup>3+</sup> handelt [207, 210]. Dunkeladaption oberhalb von 200 K sorgt für eine Rückkehr zum Ni<sub>a</sub>-C-Zustand mit erneuter Bindung des Hydrids.

Die Übereinstimmung der  $g$ -Werte sowohl von Ni-L als auch Ni<sub>a</sub>-C mit anderen Hydrogenasen als auch das photosensitive Verhalten legen den Schluss nahe, dass das aktive Zentrum grundsätzlich eine gleichartige elektronische Struktur wie Standardhydrogenasen besitzt. Die hier gefundenen Parameter stimmen mit zuvor gemachten



**Abbildung 7.2:** Q-Band-Puls-Feldspektren der nativen SH im Dunkelzustand in  $^1\text{H}_2\text{O}$ - (blau) und  $^2\text{H}_2\text{O}$ -Puffer (rot). In Grau sind die Simulationen der zwei Spezies gegeben. Messbedingungen: 15 K,  $\text{srt} = 2 \text{ ms}$ ,  $\pi = 20 \text{ ns}$ .

Experimenten an ganzen Zellen überein [70] und befürworten das Standardset zweiatomiger Liganden (CO und zwei  $\text{CN}^-$ ) sowie das Vorhandensein mehrerer Redoxzustände für Nickel. In den kürzlich erschienenen Arbeiten von Shafaat *et al.* [19] und Murphy *et al.* [38] wird diskutiert, ob es sich bei Ni-L um eine katalytisch relevante Spezies handeln könnte, da dieser Zustand in Enzymen wie Hyd-1 aus *E. coli* ohne explizite Beleuchtung vorkommt [164]. Dies ist für die SH jedoch nicht der Fall, hier kann Ni-L einzig durch Belichtung bei kryogenen Temperaturen angereichert werden.

Neben dem aktiven Zentrum selbst sind in den Spektren zwei weitere Spezies vorhanden, beide sind ebenfalls als Simulation in Abbildung 7.1 dargestellt. Sie erschweren die Bestimmung gewisser  $g$ -Hauptwerte von Nickel. Bei  $g = 2.004 \pm 0.001$  findet sich die Semichinonform eines Flavinmononukleotids (FMN), welches den kleinsten Wert  $g_z$  von Ni<sub>a</sub>-C überlagert. Ein [2Fe<sub>2</sub>S]-Cluster mit  $g = (2.050, 1.961, 1.927) \pm 0.001$  wird aufgrund seiner geringen Relaxationszeit erst bei geringen Temperaturen sichtbar, sein  $g_x$  überschneidet sich mit dem  $g_z$ -Wert von Ni-L. Dies ist ersichtlich



im 10 K-Spektrum von Ni-L. Beide Signale stimmen überein mit zuvor ermittelten Daten [75, 76]. Die Komponente um 362 mT ( $g \approx 1.86$ ) deutet auf einen weiteren [FeS]-Cluster hin, möglicherweise handelt es sich hierbei um einen [4Fe4S]-Cluster [76, 211].

Abbildung 7.2 zeigt, dass es durch Austausch des Puffers von  $^1\text{H}_2\text{O}$  zu  $^2\text{H}_2\text{O}$  zu keinen signifikanten Unterschieden im EPR-Spektrum kommt. Möglicherweise veränderte Hyperfeinwechselwirkungen sind also nicht aufgelöst. Die Grafik verdeutlicht zudem, dass bereits ab  $g = 2.05$  das Spektrum durch den [2Fe2S]-Cluster dominiert ist, also damit zu rechnen ist, dass Ni- $g_z$ -spezifische Signale überdeckt werden.

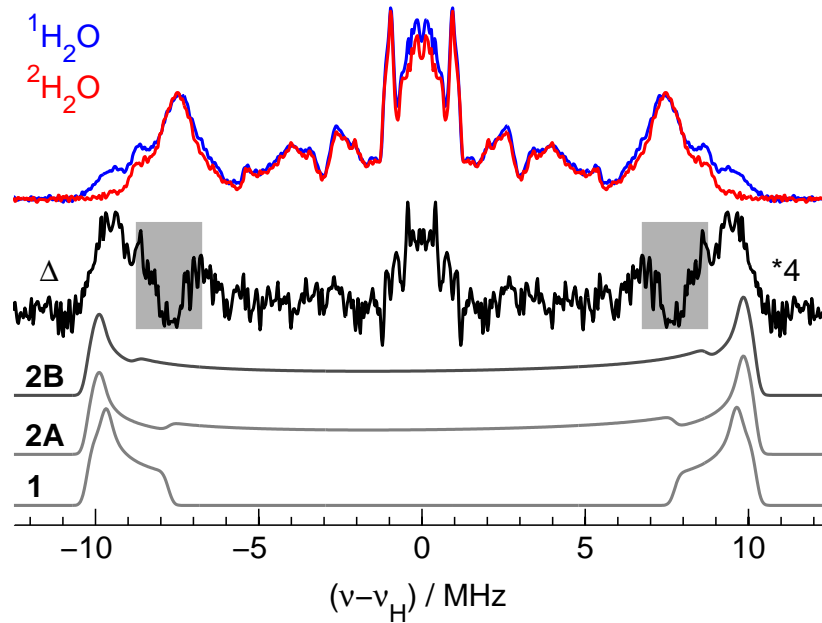
## 7.2 Hydrid als verbrückender Ligand

Bei den Hydrogenasen in *D. vulgaris* Miyazaki F [25], *Thiocapsa roseopersicina* [24] oder der RH aus *R. eutropha* [26] konnte für den mutmaßlich katalytisch aktiven Zustand  $\text{Ni}_a\text{-C}$  in einer der verbrückenden Positionen zwischen Nickel und Eisen ein Hydrid nachgewiesen werden, welches höchstwahrscheinlich Anteil an der heterolytischen Wasserstoffspaltung hat. Da es sich bei diesen Hydrogenasen sowohl um sauerstofftolerante als auch -sensitive Enzyme handelt, stellt sich die Frage, inwieweit sich die SH in diesem Punkt identisch oder abweichend verhält.

### 7.2.1 ENDOR

Zur Detektion starker Hyperfeinkopplungen, wie sie bei direkt gebundenen Protonen auftreten, wurden im Q-Band gepulste Davies-ENDOR-Messungen am  $\text{Ni}_a\text{-C}$ -Zustand durchgeführt. Verglichen mit niedrigeren Frequenzbändern bieten Messungen im Q-Band höhere Empfindlichkeit und bessere Separation der Wechselwirkungen verschiedener Kerne, durch die größere  $g$ -Aufspaltung ist auch eine gewisse Orientierungsselektion möglich.

Um austauschbare Protonen in einer möglichen verbrückenden Position von kovalent gebundenen in der Umgebung zu unterscheiden, wurden zwei verschiedene Proben herangezogen. Während im ersten Fall die SH in protoniertem Puffer vorlag, wurde im zweiten Fall deuterierter Puffer verwendet.  $^1\text{H}_2\text{O}$ -/ $^2\text{H}_2\text{O}$ -Austausch erleichtert die



**Abbildung 7.3:** Q-Band-ENDOR-Messungen der SH in  $^1\text{H}_2\text{O}$ - (blau) und  $^2\text{H}_2\text{O}$ -Puffer (rot), auf  $g_y$  von  $\text{Ni}_a\text{-C}$ . Die Differenz  $\Delta$  ist in schwarz dargestellt, vergrößert um den Faktor 4, Simulationen in grau, Simulationsparameter siehe Text. Messbedingungen:  $T = 10 \text{ K}$ ,  $\text{srt} = 2 \text{ ms}$ , stochastischer Modus.

Zuordnung von Beiträgen ähnlicher Kerne, da Protonen und Deuteronen aufgrund ihrer spezifischen gyromagnetischen Verhältnisse  $\gamma$  unterschiedlich starke Hyperfeinwechselwirkungen und Larmor-Frequenzen aufweisen. So kann ein verbrückendes Hydrid durch  $^2\text{H}^-$  ersetzt werden und zeigt sich damit in einem anderen Frequenzbereich. Der  $^1\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$ -Austausch des Puffers zeigte keinen Effekt auf die Form der Puls-Feldspektren (Abbildung 7.2).

Protonen-ENDOR-Messungen beider Proben sind in Abbildung 7.3 dargestellt, sie wurden auf  $g_y$  von  $\text{Ni}_a\text{-C}$  aufgenommen. Im Vergleich zur Larmor-Frequenz der Protonen im Q-Band ( $\nu_{\text{H}} \approx 48 \text{ MHz}$ ) handelt es sich um schwache Kopplungen, das heißt die von jedem Proton erzeugten zwei Übergänge sind symmetrisch um die freie Frequenz angeordnet. Bei  $S = 1/2$  und  $I = 1/2$  gilt für sie  $\nu_{\text{H}} \pm A/2$ . Um eine direkte Interpretation im Sinne der Hyperfeinkopplungen zu ermöglichen, wurden die Spektren um die Larmor-Frequenz symmetrisiert und relativ zu dieser dargestellt. Damit sind die Spektren um 0 MHz zentriert. Dargestellt ist ebenso die Differenz von  $^1\text{H}_2\text{O}$ - und

$^2\text{H}_2\text{O}$ -Messung (Abbildung 7.3, schwarz). Signale im Zentrum der Spektren, also in unmittelbaren Nähe der freien Frequenz, sind Teil der Protonenmatrix und haben ihren Ursprung bei weit entfernten, nur schwach an das aktive Zentrum gebundenen Kernen. Sie werden hier nicht diskutiert.

Es zeigt sich, dass die  $^2\text{H}_2\text{O}$ -Probe im Protonen-ENDOR weniger Signal aufweist als die  $^1\text{H}_2\text{O}$ -Probe. Diese Unterschiede treten bei etwa  $\pm (8-10)$  MHz auf, was einer Kopplung von circa 20 MHz entspricht. Das bedeutet, dass in dieser Probe ein Proton gegen ein Deuteron ausgetauscht werden konnte, dessen Signale um den Faktor  $\gamma_{^1\text{H}}/\gamma_{^2\text{H}} = 6.51$  zu kleineren Frequenzen verschoben sind.

Abbildung 7.3 umfasst auch die Simulationen des Spektrums des ausgetauschten Protons, bei dem es sich vermutlich um das gesuchte Hydrid handelt. Zwei Elemente der Hyperfeinmatrix  $A_{^1\text{H}}$  sind sofort ersichtlich. Hierbei handelt es sich zum einen um die größte Komponente  $A_z = -20.5 \pm 0.5$  MHz. Sie ist durch die scharfen spektralen Kanten um  $\pm 10$  MHz charakterisiert. Des Weiteren ist mit  $A_y = -19.0 \pm 0.5$  MHz die mittlere Komponente der Matrix anhand der Intensitätsmaxima bei  $\pm 9.5$  MHz erkennbar. Die Fehlerangaben resultieren aus der Simulation.

In Anbetracht des Rauschniveaus des Differenzspektrums lässt sich die kleinste Komponente nur auf einen gewissen Bereich festlegen, der in Grafik 7.3 grau unterlegt ist:  $A_x = 14.5-17.5$  MHz. Eine vollständige Matrix lässt sich unter diesen Umständen auf zwei Arten realisieren.

- 1) Eine größtenteils isotrope Hyperfeinmatrix wird zur Simulation verwendet. Signale unterhalb der Senke bei 7.5 MHz werden hierbei außer Acht gelassen, sie markiert die untere Grenze der Kopplungsmatrix. Das Resultat wäre eine Hyperfeinkomponente der Größe  $A_x = -16.3$  MHz. Dieser Fall entspräche einer vornehmlich kovalenten Bindung und ist in Abbildung 7.3 unter 1 dargestellt.
- 2) Es wird eine Matrix mit großer Hyperfeinanisotropie in Betracht gezogen, die neben den Signalen zwischen 8 MHz und 10 MHz auch kleinere Frequenzen einschließen kann. Eine Bindung hauptsächlich dipolaren Charakters läge vor. Wie aus Abbildung 7.3 ersichtlich, kann in diesem Fall die Zuordnung der dritten Hyperfeinkomponente zum Beispiel zu zwei charakteristischen Merkmalen des Spektrums erfolgen:

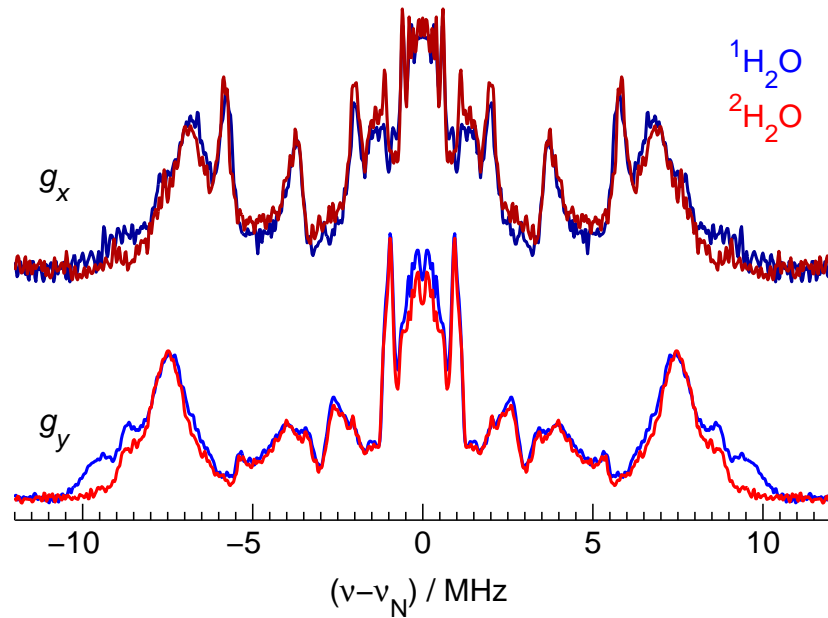
2A) Nimmt man das Maximum um 7 MHz mit dem folgenden Minimum bei 7.5 MHz zusammen, ergäbe sich für den kleinsten Anteil der Wechselwirkungsmatrix ein Vorzeichen, welches dem der anderen beiden Anteile entgegengesetzt ist. Die Kopplung beliefe sich auf  $A_x = 14.5$  MHz. Eine entsprechende Simulation ist als 2A in genannter Grafik zu finden.

2B) Im Gegensatz dazu spräche für eine noch größere Anisotropie das lokale Maximum bei 8.7 MHz, auch hier wäre ein Vorzeichenwechsel in der Matrix das Ergebnis. Die dritte Komponente von  $A$  hätte damit einen größeren Betrag,  $A_x = 17.5$  MHz, dies ist in Abbildung 7.3 als Simulation 2B visualisiert.

Wegen des signifikanten Überlapps mit diversen  $\beta$ -Protonen ist insbesondere die  $A_x$ -Komponente der Hyperfeinmatrix schwer zu bestimmen. Es handelt sich um Protonen der Cysteine aus der zweiten Koordinationssphäre von Nickel. Sie können einen weiten Bereich von Hyperfeinkopplungen umfassen, verstärkt wird dieses Verhalten zudem durch ihre Orientierung gegenüber der  $g$ -Matrix [26, 55, 212, 213].

Orientierungsselektive ENDOR-Messungen wurden durchgeführt, um diesem Problem zu begegnen. Beispielhaft sind bei  $g_x$  aufgenommene Spektren in Grafik 7.4 dargestellt. Beim  $g_x$ -Spektrum der  $^1\text{H}_2\text{O}$ -Probe handelt es sich um eine Summe dreier Spektren, welche insgesamt 89100 Einzelaufnahmen umfassen. Das entspricht einer Akkumulationszeit von 88 Stunden. Es stellt sich heraus, dass trotz zeitintensiver Aufsummierung die Signalstärke im Vergleich zum Rauschen nicht ausreicht, um abseits von  $g_y$  deutliche Unterschiede zwischen  $^1\text{H}_2\text{O}$ - und  $^2\text{H}_2\text{O}$ -Probe auszumachen.

Zusätzlich erweist sich der Überlapp der  $g_z$ -Komponente von  $\text{Ni}_a\text{-C}$  mit dem  $g_x$ -Anteil des [2Fe2S]-Clusters als problematisch (siehe Abbildung 7.2). Um die Beschränkungen des Davies-ENDORs in der Protonenregion zu umgehen, besteht die Möglichkeit, Mims-ENDOR-Messungen in dem für Deuterium typischen Frequenzbereich durchzuführen.  $^2\text{H}$ -Mims-ENDOR ist zur Detektion kleiner Hyperfeinkopplungen gut geeignet. Wegen der periodisch auftretenden Mims-Löcher ist es jedoch für die Detektion der in diesem Fall sehr starken Anisotropie der Kopplung nicht ideal.

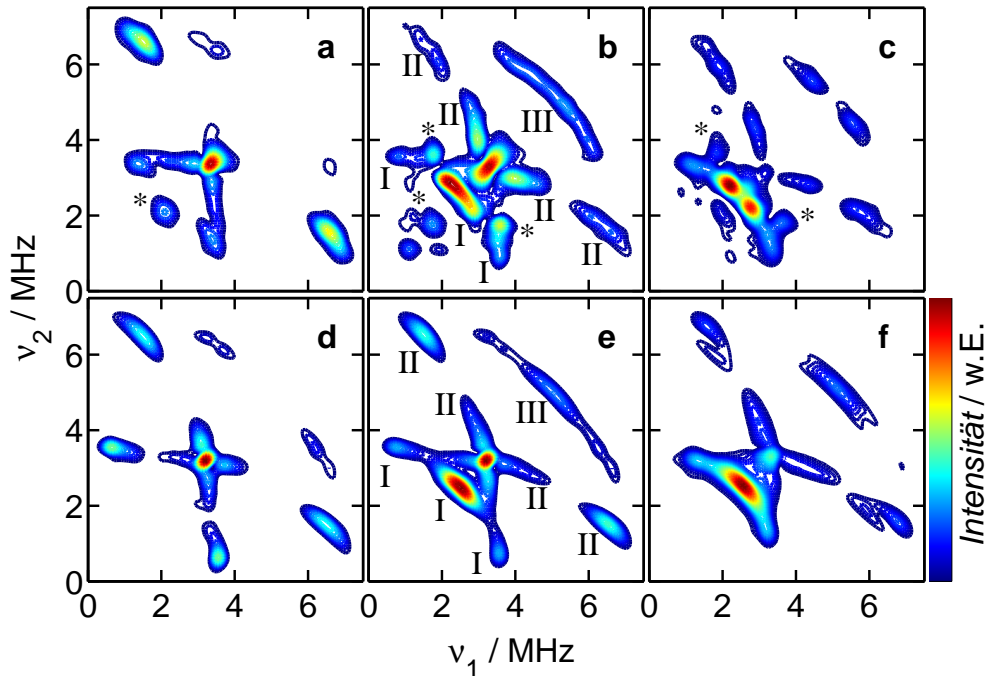


**Abbildung 7.4:** Q-Band-ENDOR-Messungen der SH in  $^1\text{H}_2\text{O}$ - (blau) und  $^2\text{H}_2\text{O}$ -Puffer (rot), auf  $g_x$  und  $g_y$  von  $\text{Ni}_a\text{-C}$ . Messbedingungen:  $T = 10\text{ K}$ , srt 2 ms, stochastischer Modus. Anzahl der Akkumulationen für  $g_y$  ist 29600 ( $^1\text{H}_2\text{O}$ , blau) und 31200 ( $^2\text{H}_2\text{O}$ , rot), für  $g_x$  sind es 40500 ( $^2\text{H}_2\text{O}$ , dunkelrot) und aufsummiert 89100 ( $^1\text{H}_2\text{O}$ , dunkelblau,  $\approx 88\text{ h}$  Messzeit).

## 7.2.2 HYSORE

Komplementär zu ENDOR bietet sich HYSORE an, um Deuteronen in der Nähe ihrer freien Frequenz zu untersuchen. Die Stärke dieser Technik liegt in der Bestimmung großer Hyperfeinanisotropien, als 2D-Methode hat sie zudem den Vorteil höherer Auflösung. X-Band-HYSORE-Messungen wurden, wie zuvor beim ENDOR, an Proben mit  $^1\text{H}_2\text{O}$ -haltigem Puffer sowie dem  $^2\text{H}_2\text{O}$ -haltigen Äquivalent durchgeführt, um das durch  $^2\text{H}^-$  ersetzte, mutmaßliche Hydrid unbeeinflusst von den Protonen zu charakterisieren, die im oben genannten ENDOR Signalverursacher sind. Die freien Frequenzen der beiden Kerne belaufen sich im X-Band bei 350 mT auf  $\nu_{^2\text{H}} = 2.3\text{ MHz}$  und  $\nu_{^1\text{H}} = 14.9\text{ MHz}$ .

Die orientierungsspezifischen Messungen zielen darauf ab, Kenntnisse über die Ausrichtung der Hyperfeinmatrix gegenüber der  $g$ -Matrix zu gewinnen, sie ermöglichen



**Abbildung 7.5:** X-Band-HYSCORE-Messungen der SH in  $^2\text{H}_2\text{O}$ -Puffer, unbeleuchtet, auf  $g_x$  (a),  $g_y$  (b) und nahe  $g_z$  (c) von  $\text{Ni}_a\text{-C}$  und korrespondierende Simulationen (d-f). Für Erläuterung der Markierungen siehe Text. Messbedingungen:  $T = 10$  K,  $\pi = 30$  ns, 127 Inkremente à 30 ns für  $t_1 = 200$  ns und  $t_2 = 300$  ns,  $\tau = 180$  ns bzw. 200 ns.

einen Vergleich mit den derart bereits untersuchten Hydrogenasen aus *D. vulgaris* Miyazaki F [25, 212] und *R. eutropha* (RH) [26]. Bei  $g_z$  selbst sind mögliche Deuteriumkopplungen vollständig durch freies Deuterium überlagert, dies ist ein Beitrag des [2Fe2S]-Clusters, der bei  $g_z$  mit dem Nickelsignal überlappt (vgl. Grafiken 7.2 und 7.7b). Die dort vorliegende Orientierung der  $g$ -Matrix und ihre Relation zur Ausrichtung der Hyperfeinmatrix ist also unbekannt und kann nicht für Auswertungen herangezogen werden, stattdessen wurde eine Feldposition zwischen  $g_y$  und  $g_z$  gewählt.

Aufgenommen bei  $g_x$ ,  $g_y$  und nahe  $g_z$  von  $\text{Ni}_a\text{-C}$  gibt Abbildung 7.5 die HYSCORE-Spektren der unbeleuchteten Probe in Deuteriumpuffer wieder. Zwischen 0 MHz und 7.5 MHz weisen sie eine Vielzahl von Signalen auf, die in der  $^1\text{H}_2\text{O}$ -Probe nicht auftreten (vergleiche Abbildungen 7.6 und 7.8). Beispielhaft beschrieben für  $g_y$  (Abbildung

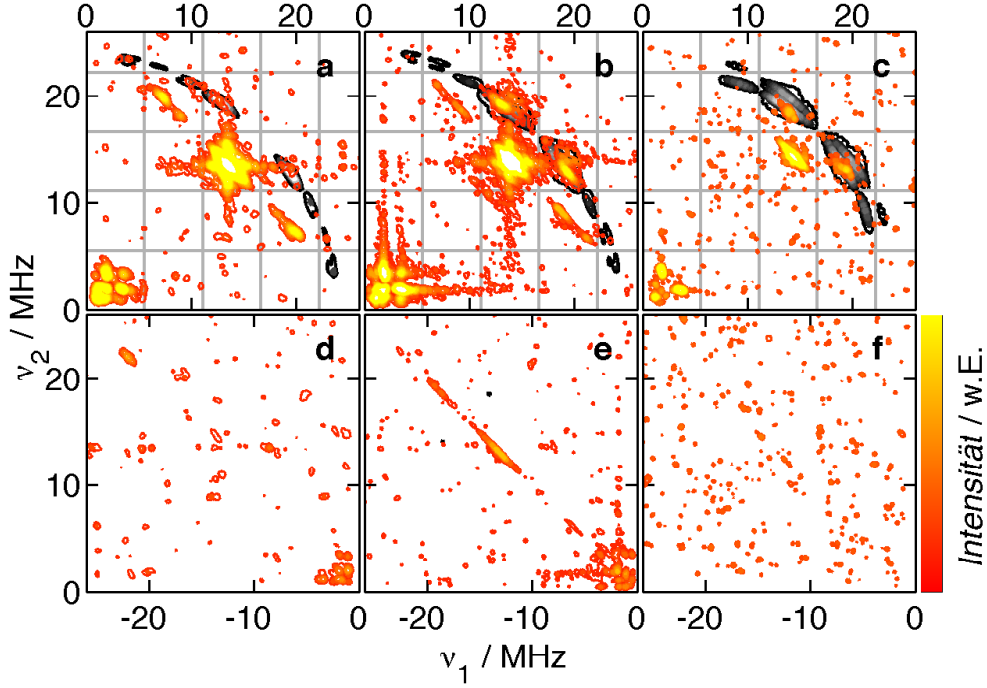
7.5b) ist ihre Bedeutung folgende, die Bezeichnungen sind in der Grafik vermerkt:

- I: Zwischen (1.8, 3.0) MHz und (3.0, 1.8) MHz befinden sich die starken Signale des Korrelationsbereiches der Einzelquantenübergänge der beiden  $m_S$ -Spinmannigfaltigkeiten untereinander. Die Ausläufer reichen bis (0.5, 3.6) MHz und (3.6, 0.5) MHz.
- II: Beginnend beim starken Diagonalsignal um 3.2 MHz ziehen sich Signalgruppen zu (2.8, 4.8) MHz und (4.8, 2.8) MHz, schwächere Flügel tauchen zwischen (2.3, 5.6) MHz und (0.9, 7.0) MHz sowie (5.6, 2.3) MHz und (7.0, 0.9) MHz auf. Diese Region entspricht den Einzelquantenübergängen der beiden  $m_S$ -Spinmannigfaltigkeiten, die mit dem Doppelquantenübergang der jeweils anderen korreliert sind.
- III: Mit ebenfalls schwächerer Signalintensität werden die Frequenzen (3.6, 6.4) MHz bis (6.4, 3.6) MHz überspannt, widergespiegelt sind hier die miteinander korrelierten Doppelquantenübergänge beider  $m_S$ -Mannigfaltigkeiten.

Es zeigt sich, dass die Charakteristika aller drei Signalgruppen durch eine einzige Hyperfeinmatrix nachgebildet werden können,  $A_{2,2H} = (2.4, -2.9, -3.1) \pm 0.1$  MHz. Dabei ergeben sich die Euler-Winkel  $(12^\circ, 66^\circ, 25^\circ) \pm 5^\circ$  mit Bezug auf das  $g$ -Achsen-system (Abbildung 7.5d-f). Skaliert man diese simulierte Hyperfeinkopplung mittels der gyromagnetischen Verhältnisse  $\gamma_{1H}/\gamma_{2H} = 6.51$  von Deuteronen auf Protonen, also  $A_{2,1H} = (15.5, -19.0, -20.5)$  MHz, wird ersichtlich, dass sie mit den anisotroperen Fällen 2A und 2B der ENDOR-Simulationen übereinstimmt.

HYSORE-Messungen wurden ebenso an den  $^1\text{H}_2\text{O}$ -Proben durchgeführt, um die gefundenen Parameter zu bestätigen (Abbildung 7.6). Die Messungen wurden mit einem Inkrement von 16 ns durchgeführt, um höhere Frequenzen zu detektieren. Messungen und Simulationen stimmen dahingehend überein, dass keine Signale von Protonen im zweiten Quadranten zu finden sind und sich im ersten Quadranten die Intensität um etwa (12, 20) MHz und (20, 12) MHz konzentriert. Es ist ersichtlich, dass die  $^1\text{H}$ -HYSORE-Datensätze vom Signal freier Protonen bei 13 MHz dominiert werden, so dass diese Methode zur Bestimmung der Hyperfeinparameter des Hydrids allein nicht ausreichen würde. Eine Überprüfung vorhandener Daten ist damit hingegen möglich.

Vergleicht man die hier identifizierte Hyperfeinkopplung mit den Ergebnissen vor-



**Abbildung 7.6:** X-Band-HYSCORE-Messungen der unbeleuchteten SH in  $^1\text{H}_2\text{O}$ -Puffer auf  $g_x$  (a, d),  $g_y$  (b, e) und nahe  $g_z$  (c, f) von  $\text{Ni}_a\text{-C}$  (farbig) mit darunter gelegter Simulation (schwarzweiß). Oben:  $(++)$ -Quadrant, unten:  $(+-)$ -Quadrant. Das graue Gitter gibt die *blind spots* an. Messbedingungen:  $T = 10\text{ K}$ ,  $\pi/2 = 8\text{ ns}$ ,  $\pi = 14\text{ ns}$ , 239 Inkremente à 16 ns für  $t_1 = 180\text{ ns}$  und  $t_2 = 200\text{ ns}$ ,  $\tau = 180\text{ ns}$ .

**Tabelle 7.1:** Hyperfeinparameter von Hydriden und Kernquadrupolwerte der deuterierten Form am aktiven Zentrum. Sauerstofftolerante Spezies sind mit einem Stern markiert (\*), die HYSCORE-Ergebnisse sind mittels  $\gamma_{1\text{H}}/\gamma_{2\text{H}}$  skaliert. *Aa* – *A. aeolicus*, *Dg* – *D. gigas*, *Dv* – *D. vulgaris*, *Re* – *R. eutropha*

Organismus	$a_{\text{iso}}$ MHz	Anisotropie $T$ MHz			$e^2Qq/h$ kHz	Referenz
<i>Re</i> SH *	-8.0	23.5	-11.0	-12.5	$\leq 100$	HYSCORE
	-8.3	22.8	-10.7	-12.2		ENDOR 2A
	-7.3	25.0	-11.7	-13.2		ENDOR 2B
	-18.6	-2.3	0.4	1.9		ENDOR 1
<i>Re</i> RH *	-3.5	21.9	-7.3	-14.5	$\leq 200$	[26]
<i>Dv</i> Miya. F	"	"	"	"	$\leq 100$	[212]
<i>Aa</i> Hase I *	-1.7	14.4	-4.5	-10.0	$\approx 160$	[30]
<i>Dg</i>	-10.7	25.7	-11.3	-14.3		[27]

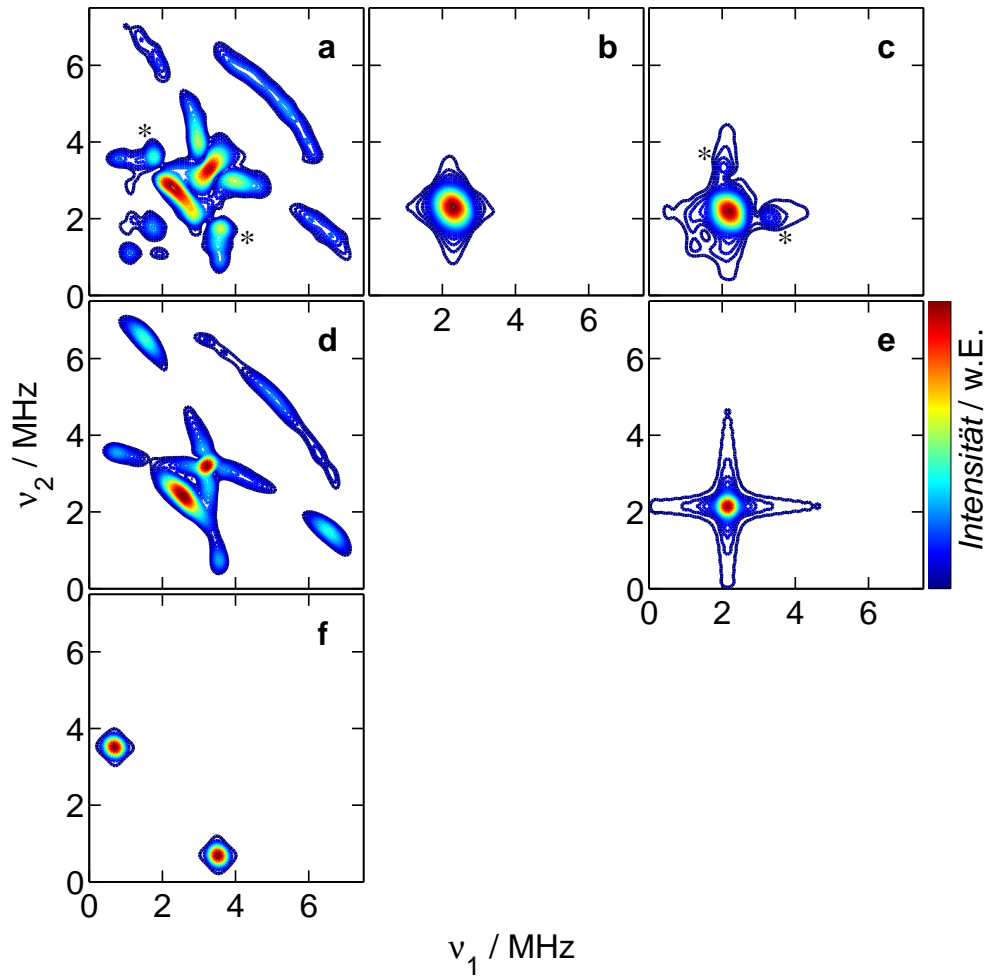


heriger Messungen an unterschiedlichen Hydrogenasen, in denen ein verbrückendes Hydrid nachgewiesen werden konnte, zeigt sich in erster Linie eine Ähnlichkeit mit den Werten der Hydrogenase aus *D. gigas* (Tabelle 7.1, die Werte sind als isotroper und anisotroper Anteil gegeben). Durch die HYSORE-Messung kann der Wert für  $A_x$  eingeschränkt werden, er befindet sich eher im unteren Bereich der zuvor durch ENDOR eingegrenzten Spanne.

Durch weitere Simulationen kann der zuvor angeführte Fall isotroper Hyperfeinwechselwirkung eindeutig ausgeschlossen werden (Abschnitt 7.2.1, Fall 1). Der Versuch, das Spektrum mit den entsprechenden skalierten Parametern nachzubilden, zeigt, dass die komplexe Signalverteilung des  $g_y$ -HYSOREs der unbeleuchteten Probe durch derart isotrope Hyperfeinwechselwirkung nicht verursacht werden kann (Abbildungen 7.7d und f im Vergleich). Es erscheinen nur zwei Doppelquantensignale, die um die Larmor-Frequenz herum mit einem Abstand von etwa 2.9 MHz liegen. Dies entspricht dem skalierten, isotropen Anteil dieser Wechselwirkung  $a_{\text{iso}, ^2\text{H}} = -18.6 \text{ MHz}/6.51 = -2.86 \text{ MHz}$  (Tabelle 7.1).

Aus der Simulation erhält man zusätzlich eine Abschätzung für eine Obergrenze der Quadrupolparameter des Deuterids.  $e^2Qq/h$  ist mit  $\leq 100 \text{ KHz}$  sehr klein, ein größerer Wert würde sich als Linienverbreiterung in der Simulation auswirken. Der Wert ist mit jenen vergleichbar, die für andere Hydrogenasen gefunden wurden, unter anderem in der RH aus *R. eutropha* [26], der Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F [212] und von Hydrogenase I aus *A. aeolicus* [30] (Tabelle 7.1). Diese Parameter sind typisch für metallverbrückende Deuteride, wie sie von Jarrett *et al.* [214] und Guo *et al.* [215] beschrieben wurden, ihre Größenordnung beläuft sich auf  $\approx 20 \text{ MHz}$ .

Nach Beleuchtung der  $^2\text{H}_2\text{O}$ -Probe kollabiert das Muster zahlreicher Signale zu einem einzigen, der freien Frequenz bei 2.1 MHz. Dies wird im Spektrum bei  $g_y$  von Ni-L offenbar (Abbildung 7.7c). Durch Simulation ergibt sich ein sehr kleiner Hyperfeinwert von unter 100 KHz (Abbildung 7.7e). Um grob die Distanz zwischen Nickel und dem abgespaltenen Hydrid abschätzen zu können, wird eine Punkt-Dipol-Näherung angewandt. Ausgehend von der Beobachtung, dass im Dunkelzustand das gebundene Hydrid bereits über eine Anisotropie verfügt, die deutlich größer als der isotrope Wert ist, liegt die Annahme nahe, dass auch die Hyperfeinkopplung zwischen Nickel und abgespaltenem Hydrid in erster Linie anisotrop ist und aus reiner Dipol-Dipol-



**Abbildung 7.7:** Oben: X-Band-HYSCORE-Messungen der unbeleuchteten SH in  $^2\text{H}_2\text{O}$ -Puffer auf  $g_y$  von  $\text{Ni}_a\text{-C}$  (a), auf  $g_z$  von  $\text{Ni}_a\text{-C}$  (b) und nach Beleuchtung auf  $g_y$  von  $\text{Ni-L}$  (c). Darunter sind Simulationen zu a) mit anisotroper (d, identisch zu Abbildung 7.5e, ENDOR-Fall 2) und isotroper Hyperfeinkopplung (f, ENDOR-Fall 1). e) ist die Simulation zu c) mit sehr kleiner Hyperfeinkopplung (siehe Text). Messbedingungen: siehe Abbildung 7.5.

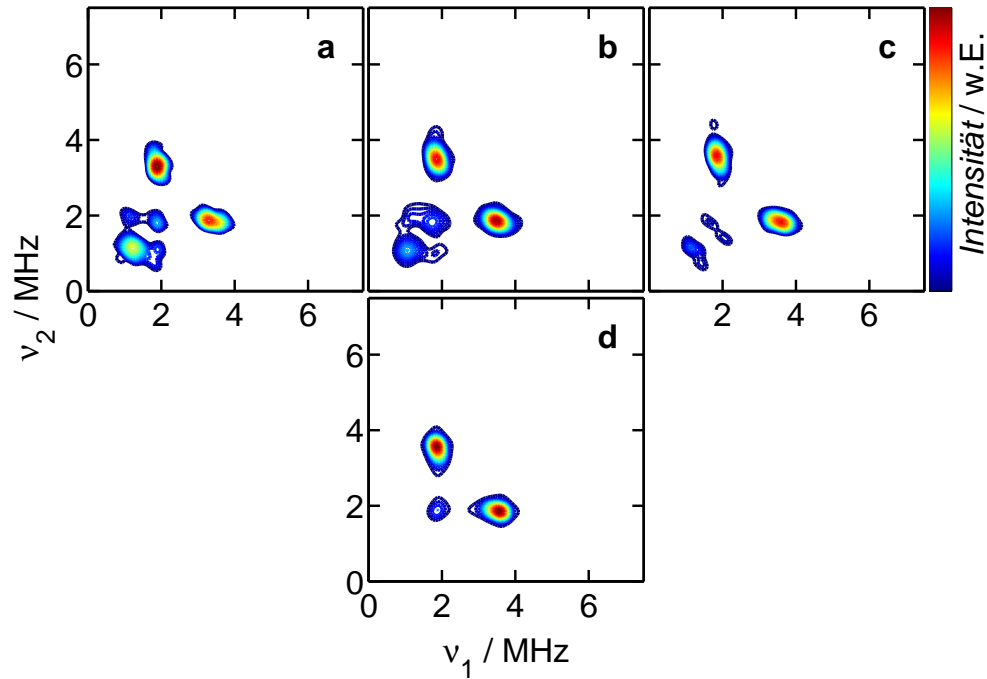
Wechselwirkung herrührt. Die Abschätzung resultiert in einem Abstand größer als 4.5 Å. Der typische Abstand zwischen Nickel und Hydrid beträgt 1.6-1.8 Å [30], die deutlich größere Distanz deutet also darauf hin, dass das Hydrid die verbrückende Position verlassen hat.

Da es zu einem Übergang von Ni<sub>a</sub>-C (formal Ni<sup>3+</sup>) zu Ni-L (formal Ni<sup>1+</sup>) kommt, geschieht die Abspaltung höchstwahrscheinlich in Form eines Deuterons <sup>2</sup>H<sup>+</sup>. Dunkeladaption oberhalb von 200 K stellt das Ni<sub>a</sub>-C-Signal wieder her, es kommt zu einer Neueinbindung des Deuterids ins aktive Zentrum.

Pandelia *et al.* [30] diskutieren für die Hydrogenase I (Hase I) aus *A. aeolicus*, dass ein schwächer gebundenes Hydrid charakteristisch für die Sauerstofftoleranz von Hydrogenasen sein könnte. Vergleichspunkt ist die Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F. Die vorliegenden Messdaten und Simulationen für die SH resultieren in Hyperfeinparametern, die deutlich größer sind als die von Hase I aus *A. aeolicus*, die SH verhält sich bezüglich des Hydrids vielmehr ähnlich wie die Standardhydrogenasen aus *D. gigas* oder *D. vulgaris* Miyazaki F, sowie der RH aus *R. eutropha*. Höchstwahrscheinlich handelt es sich beim verbrückenden Hydrid und seiner Photodissoziation um ein konserviertes Motiv vieler Hydrogenasen, welches auch die SH teilt und das nicht Ursache ihrer Sauerstofftoleranz ist. Die SH betreffend sind die Ursachen dieser Toleranz aller Voraussicht nach in einem anderen, bisher unbekanntem Mechanismus begründet.

### 7.3 Stickstoffkopplung am aktiven Zentrum

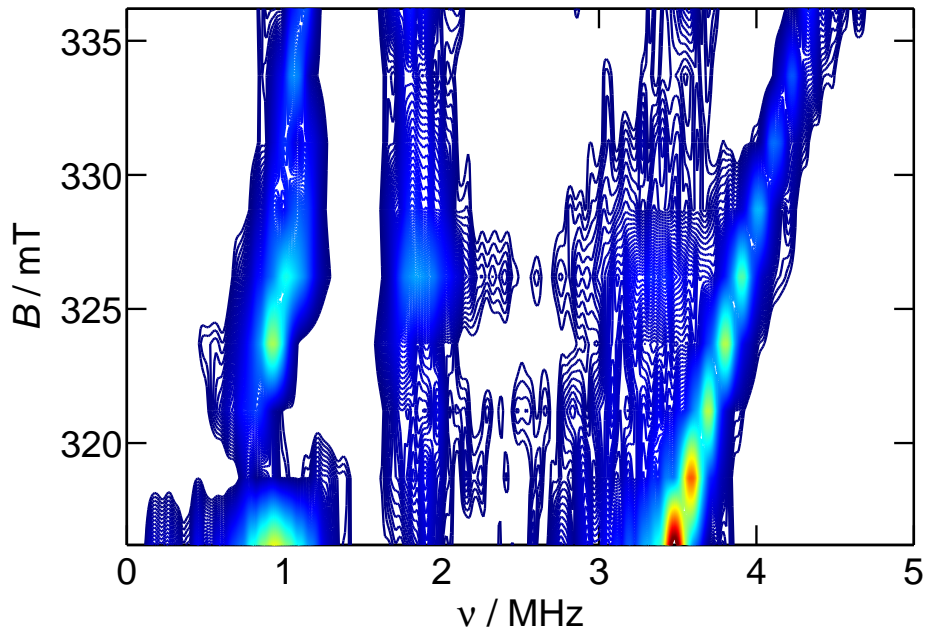
Zusätzlich zu den im vorherigen Abschnitt erklärten komplexen Mustern des Deuterids umfassen die HYSORE-Spektren der <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O-Probe zusätzliche Signale, welche nicht Teil des Deuteriumspektrums sind. Diese sind in den Abbildungen 7.5 und 7.7 durch Sternchen (\*) markiert und treten sowohl für die unbeleuchtete Probe mit Ni<sub>a</sub>-C auf, als auch für den photoinduzierten Ni-L-Zustand. Sie lassen sich nicht durch Simulation von Deuterium nachbilden. Auch in den HYSORE-Messungen der <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O-Probe treten die genannten Signale auf, in diesem Fall, ohne von Deuteriumsignalen überlagert zu werden (vergleiche Abbildung 7.6).



**Abbildung 7.8:** X-Band-HYSCORE-Messungen der unbeleuchteten SH in  $^1\text{H}_2\text{O}$ -Puffer auf  $g_x$ ,  $g_y$  und nahe  $g_z$  von  $\text{Ni}_a\text{-C}$  (a-c) mit Simulation der Stickstoffkopplung (d). Messbedingungen:  $T = 10\text{ K}$ ,  $\pi = 32\text{ ns}$ , 127 Inkremente à  $30\text{ ns}$  für  $t_1 = 200\text{ ns}$  und  $t_2 = 300\text{ ns}$ ,  $\tau = 180\text{ ns}$  bzw.  $212\text{ ns}$ .

Der Niederfrequenzbereich aus Abbildung 7.6 wurde erneut aufgenommen, für eine höhere Auflösung wurde ein größeres Inkrement von  $30\text{ ns}$  gewählt (Grafik 7.8). Zwei verhältnismäßig schwache Signale liegen bei  $1.1\text{ MHz}$  und  $1.8\text{ MHz}$  auf der Diagonalen, es handelt sich um ESEEM-Übergänge, die wegen unvollständiger Populationsinversion durch den  $\pi$ -Puls auch im HYSCORE auftreten. Darüber hinaus sind abseits der Diagonalen bei  $(1.85, 3.5)\text{ MHz}$  und  $(3.5, 1.85)\text{ MHz}$  zwei starke sogenannte *cross-peaks* vorhanden. Es liegt nahe, dass es sich hierbei um die Wechselwirkung mit einem Stickstoff handelt und diese starken Signale Korrelationen der Doppelquantenübergänge der beiden  $m_S$ -Mannigfaltigkeiten entsprechen.

Tauchen in einer HYSCORE-Messung hauptsächlich nur die Doppelquantenübergänge beider  $m_S$ -Mannigfaltigkeiten auf, ist dies ein Zeichen dafür, dass für den betreffenden Stickstoff die *exact-cancellation*-Bedingung  $|A| = 2\nu_n$  nicht erfüllt ist [184, 212, 216]. Bestätigt wird diese Beobachtung durch ein feldabhängiges 3-Puls-



**Abbildung 7.9:** Feldabhängiges X-Band-3-Puls-ESEEM der unbeleuchteten SH in  $^1\text{H}_2\text{O}$ -Puffer. Summe zweier Messungen mit  $\tau = 180$  ns und 190 ns. Messbedingungen:  $T = 10$  K,  $\text{srt} = 8$  ms, Inkrement 100 ns.

ESEEM. Abbildung 7.9 zeigt eine derartige Messung derselben Probe über einen Feldbereich, in dem im FSE die Nickelsignale nicht vom  $[\text{2Fe2S}]$ -Cluster überlagert sind. Gilt die *exact-cancellation*-Bedingung, sind drei Signale zu erwarten,  $\nu_0$ ,  $\nu_-$  und  $\nu_+$ . Durch die Abweichung von dieser Bedingung sind diese drei Komponenten zu einem gewissen Grad miteinander verschmolzen und verzerrt, es tauchen nur zwei Maxima bei etwa 1 MHz und 1.9 MHz auf. Während zudem der Doppelquantenübergang mit größer werdender Feldstärke auch in der Frequenz zunimmt (3.5-4.5 MHz), zeigen die verzerrten Einzelquantenübergänge kaum eine Feldabhängigkeit. Das heißt, auch die Orientierungsselektion über einen großen  $g$ -Bereich (d.h. Feldbereich) deutet auf keine Annäherung an die *exact-cancellation*-Bedingung hin. Da sich im HYSORE kaum Veränderungen über die verschiedenen  $g$ -Werte zeigen, erfolgt die nachstehende Betrachtung ohne Rücksichtnahme auf Orientierungen.

S-Band-Messungen würden es ermöglichen, die *exact-cancellation*-Bedingung besser anzupassen und dadurch genauere Daten über die Quadrupolparameter des Stickstoffs

**Tabelle 7.2:** Kernquadrupol- und Hyperfeinparameter von Histidinen am aktiven Zentrum. Sauerstofftolerante Spezies sind mit Stern markiert (\*). Die Daten wurden für Ni<sub>a</sub>-C-Zustände erhoben, mit Ausnahme von *D. vulgaris* Miyazaki F und *R. eutropha* MBH, in welchen Ni<sub>r</sub>-B vorlag.

Organismus	$e^2Qq/h$ MHz	$\eta$	$a_{\text{iso}}$ MHz	Ref.
<i>R. eutropha</i> SH *	1.7	0.9	0.98	
<i>R. eutropha</i> RH Q67H *	1.79	0.53	1.7	[205]
<i>R. eutropha</i> MBH *	1.94	0.36	1.8	[58]
<i>A. aeolicus</i> Hydrogenase I *	1.92	0.40	1.54	[30]
<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F	1.90	0.37	1.57	[184]
<i>D. gigas</i>	1.9	0.4	$\approx 2$	[183]
<i>E. coli</i> Hyd-1, P242C *	1.9	0.4	2.2	[164]
<i>T. roseopersicina</i>	1.93	0.39	1.6	[185]
freies Histidin, HN <sub><math>\tau</math></sub>	1.437	0.915	-	[187]

zu sammeln. Sie waren aber aufgrund der deutlich geringeren Empfindlichkeit des Spektrometers und der begrenzten Probenmenge und -konzentration nicht erfolgreich.

Die experimentellen HYSCORE-X-Band-Spektren können durch die Kopplung an einen Stickstoff mit den folgenden Parametern simuliert werden. Die Quadrupolwerte ergeben sich zu  $e^2Qq/h = 1.65\text{-}1.75$  MHz und  $\eta = 0.8\text{-}1$ , die Hyperfeinwerte zu  $A_{\text{N}} = (1.35, 0.95, 0.65) \pm (0.05, 0.10, 0.20)$  MHz. Dies ist in Übereinstimmung damit, dass die *exact-cancellation*-Bedingung  $|A| = 2\nu_{\text{n}}$  nicht erfüllt ist.

Vergleicht man die Werte mit der Literatur (Tabelle 7.2), stellt sich heraus, dass sie denen für ein endständiges, protoniertes N <sub>$\tau$</sub>  in einem Histidinring ähnlich sind (Abbildung 7.10). Ein solches Histidin ist als Teil von Motiv L2 (bzw. 2L, R-x-C-G-x-C-x-x-x-H) stark konserviert [170]. In diversen Hydrogenasen liegt dieses Motiv vor, dort ist das Histidin über den Schwefel eines verbrückenden Cysteins an das aktive Zentrum gebunden (Tabelle 7.3). Laut Volbeda *et al.* [6] könnten überzählige Protonen, die bei der Spaltung von Wasserstoff am aktiven Zentrum entstehen, über einen erhaltenen Transferpfad zur Proteinoberfläche abgeführt werden, der dieses Histidin einschließt. Eine Ausnahme stellen regulatorische Hydrogenasen dar. Aufgrund ihrer sehr geringen katalytischen Aktivität [47] und vorwiegenden Funktion als Wasserstoffsensoren erübrigt sich eventuell eine Konservierung des Histidins.

**Tabelle 7.3:** Auszug aus Peptidsequenzen der großen Untereinheiten diverser Hydrogenasen. *Re* RH, *Ah* hupL und *Bj* hupV haben als regulatorische Hydrogenasen ein Glutamin (rot) an Stelle des Histidins (blau). Gelb: konservierte Cysteine. Kürzel: *Aa* – *A. aeolicus*, *Ah* – *Alcaligenes hydrogenophilus*, *Bj* – *Bradyrhizobium japonicum*, *Dg* – *D. gigas*, *Dv* – *D. vulgaris*, *Ec* – *E. coli*, *Re* – *R. eutropha*. Die zweite Spalte gibt die uniprot-Kennung an. Quellen: [217–225]

<i>Re</i> SH	P22320	-----	-----	MSRKLVIDPV	TRIEGHGKVV	20
<i>Re</i> MBH	P31891	----MSAYAT	QGF---NLDD	RGRRIVVDPV	TRIEGHMRCE	33
<i>Aa</i> H1	O66895	-----	-----	-MKRVVVDPV	TRIEGHLRIE	19
<i>Dv</i> M.F	P21852	MSGCRAQNAP	GGIPVTPKSS	YSGPIVVDPV	TRIEGHLRIE	40
<i>Dg</i>	P12944	-----	-----MSEM	QGNKIVVDPI	TRIEGHLRIE	24
<i>Ec</i> Hyd-1	POACD8	---MSTQYET	QGY---TINN	AGRRLVVDPI	TRIEGHMRCE	34
<i>Re</i> RH	Q79IP6	-----	-----	-MERLVVGP	NRVEGDLEVN	19
<i>Ah</i> hupL	P94155	-----	-----	-MTRLIVGPF	NRVEGDLEVQ	19
<i>Bj</i> hupV	Q45255	-----	-----	-MTRITIGPF	NRVEGDLEVR	19
<i>Re</i> SH	P22320	VHLDDD-NKV	VDAKLHVVEF	RGFEKQVQGH	PFWEAPMFLQ	59
<i>Re</i> MBH	P31891	VNVDAN-NVI	RNAVSTGTMW	RGLEVILKGR	DPRDAWAFVE	72
<i>Aa</i> H1	O66895	IMVDEETQV	KDALSAGTMW	RGIELIVRNR	DPRDVWAFVQ	59
<i>Dv</i> M.F	P21852	VEVEN--GKV	KNAYSSSTLF	RGLEIILKGR	DPRDAQHFTQ	78
<i>Dg</i>	P12944	VEVEG--GKI	KNAWSMSTLF	RGLEMILKGR	DPRDAQHFTQ	62
<i>Ec</i> Hyd-1	POACD8	VNINDQ-NVI	TNAVSCGTMF	RGLEIILQGR	DPRDAWAFVE	73
<i>Re</i> RH	Q79IP6	LEVAS--GRV	CSARVNATMY	RGLEQILLHR	HPLDALVYAP	57
<i>Ah</i> hupL	P94155	LDIAD--GQV	RTAKVNAPMF	RGFEQILLGK	LPMDALVYAP	57
<i>Bj</i> hupV	Q45255	LDVES--GRV	MRAEVTAPLY	RGFEQILEGR	PPLDALALAP	57
<i>Re</i> SH	P22320	RICGICFVSH	HLCGAKALDD	MVGVGLKSGI	HVTPTAEKMR	99
<i>Re</i> MBH	P31891	RICGVCTGCH	ALASVRAVEN	ALDIRI----	--PKNAHLIR	106
<i>Aa</i> H1	O66895	RICGVCTSIH	ALASLRAVED	ALEITI----	--PKNANYIR	93
<i>Dv</i> M.F	P21852	RTCGVCTYTH	ALASTRCVDN	AVGVHI----	--PKNATYIR	112
<i>Dg</i>	P12944	RACGVCTYVH	ALASVRAVDN	CVGVKI----	--PENATLMR	96
<i>Ec</i> Hyd-1	POACD8	RICGVCTGVH	ALASVYAIED	AIGIKV----	--PDNANIIR	107
<i>Re</i> RH	Q79IP6	RVCGICSVSQ	SVAASRALAD	LAGVTV----	--PANGMLAM	91
<i>Ah</i> hupL	P94155	RICGICSVSQ	SVAAARALED	ATGVIA----	--PLNGQLLT	91
<i>Bj</i> hupV	Q45255	RICGICSVSQ	SVAAAAALRD	AMSIEA----	--APNGLLAT	91

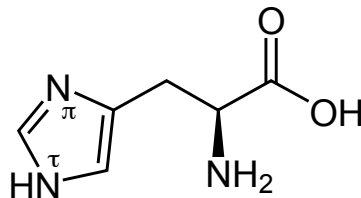


Abbildung 7.10: Schema eines Histidins mit protoniertem  $N_\tau$ .

In der SH handelt es sich höchstwahrscheinlich um das Histidin 69. Die Bedeutung dieses Histidins in der SH wurde in früheren Untersuchungen dargelegt. Ersetzung dieses Histidins in der SH wurde in früheren Untersuchungen dargelegt. Ersetzung durch Leucin resultiert in einem instabilen Enzym mit verschwindender Aktivität [226], Substitution mit Glutamin erhält zwar die Stabilität, dennoch ist auch hier die Aktivität der  $H_2$ -Oxidation auf 20 % gefallen [227]. Burke *et al.* [205] schließen zudem aus der verringerten Linienbreite der EPR-Signale der RH-HoxC-Q67H-Variante darauf, dass in anderen Hydrogenasen eine Stabilisierung der nahen [NiFe]-Umgebung durch das Histidin erfolgt.

Erstaunlicherweise weichen die hier für die SH gewonnenen Daten ( $e^2Qq/h \approx 1.7$  MHz und  $\eta \approx 0.9$ ) von denen ab, die für andere Hydrogenasen gefunden wurden, also  $e^2Qq/h \approx 1.9$  MHz und  $\eta \approx 0.4$ . Das kann unterschiedliche Ursachen haben, die nachfolgend erörtert werden. Zum einen wird eine einfache Verkürzung der Cys-S-N-Bindung diskutiert, wie sie in einer RH-Mutationsvariante auftritt. Danach wird allgemeiner auf mögliche Einflüsse durch Ligandierung und vor allem Wasserstoffbrückenbindungen eingegangen. Abschließend erfolgt eine Betrachtung zur Einbindung von Sauerstoff.

**Bindungslänge.** Die den Standardhydrogenasen ähnlichere RH-Variante RH HoxC Q67H stellt eine Ausnahme dar, die sich zwischen der SH und den Standardhydrogenasen befindet [205]. Das für regulatorische Hydrogenasen spezifische Glutamin nahe dem aktiven Zentrum wurde durch ein Histidin ersetzt. Es ergaben sich mit  $e^2Qq/h = 1.79$  MHz und  $\eta = 0.53$  Quadrupolwerte, die nicht komplett mit denen von Standardhydrogenasen übereinstimmen (Tabelle 7.2). DFT-Rechnungen zeigten eine Abhängigkeit dieser Parameter von der Länge der Wasserstoffbrückenbindung zwischen  $HN_\tau$  und dem Schwefel des Cysteins, sofern eine Konstellation aus unprotoniertem  $N_\pi$  und



protoniertem  $N_\tau$  vorliegt. Verringert sich die Distanz, verringert sich auch  $e^2Qq/h$ .  $\eta$  hingegen wird größer. Die Quadrupolwerte von *D. vulgaris* Miyazaki F entsprechen einem Abstand von 3.08 Å zwischen Stickstoff und Schwefel, die von RH HoxC Q67H passen zur Distanz von 3.01 Å. In Übereinstimmung mit der Theorie vergrößert sich mit der Abstandsverringering die experimentell gefundene Hyperfeinkopplung von 1.57 MHz (*Dv*) auf 1.7 MHz (RH).

Berücksichtigt man, dass für die SH  $e^2Qq/h$  und  $\eta$  wiederum kleiner beziehungsweise größer sind als bei der RH-Variante, bestünde nach dem vorliegenden Modell ein Abstand von weniger als 2.8 Å zwischen Schwefel und Stickstoff. Dementsprechend wäre mit einer isotropen Hyperfeinkopplung zu rechnen, die deutlich größer als 1.7 MHz ist. Das ist bei der SH nicht der Fall. Mit  $a_{\text{iso}} = 0.98$  MHz ist die Hyperfeinwechselwirkung merklich kleiner als die der anderen Hydrogenasen und deutet auf einen größeren Abstand zwischen Histidin und dem spintragenden, verbrückenden Cystein-Schwefel hin.

**Liganden und Wasserstoffbrücken.** Über Änderungen von Bindungslängen hinaus spiegeln die Kernquadrupolparameter eines Atoms charakteristisch Bindungssituationen zu umliegenden Atomen wider. So gibt es aufgrund ihrer gleichartigen Struktur starke Ähnlichkeiten zwischen protoniertem  $N_\tau$  und unprotoniertem  $N_\pi$  in einem Histidin sowie ihrem protonierten beziehungsweise unprotonierten Gegenstück in einem Imidazol. Unterschiedliche Ligandierung an Imidazolringen kann die Kernquadrupolwerte verändern, wie Ashby *et al.* analysierten [197]. Es wurden Bindungen an den Iminostickstoff betrachtet, über induktive Effekte wirken sich Veränderungen an diesem auch auf die Orbitale des Aminostickstoffes aus. Eine Bindung des Iminostickstoffes an eine Lewissäure bewirkt, dass für den Aminostickstoff  $\eta$  zunimmt und  $e^2Qq/h$  sich verringert, wenn die Stärke des Akzeptors ansteigt. Neben der Charakteristik als Akzeptor spielen auch Ladungsdelokalisation und Größe der Liganden, insbesondere die der Gegenionen, eine Rolle.

Das Eingehen von Wasserstoffbrücken ist allerdings weit bedeutender als die bereits genannten Eigenschaften [197]. Konsistent mit der zuvor erläuterten grundlegenden Theorie von Burke *et al.* [205] wird geschlossen, dass der Aminostickstoff eine geringere Kernquadrupolwechselwirkung erfährt, wenn es sich um Liganden handelt, die

stärkere Wasserstoffbrücken eingehen. Dies wird deutlich durch folgende Überlegung: Allein die Einbindung von Histidinen in eine kristalline Umgebung erzeugt durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen unprotoniertem Stickstoff und Proton des protonierten Stickstoffes ausgeprägte Wechselwirkungen, die zu einer signifikanten Veränderung der Quadrupolparameter führen. So weist das freie Histidin in der Gasphase Werte von  $e^2Qq/h = 2.542$  MHz und  $\eta = 0.294$  auf [192], während es im Histidinkristall bereits  $e^2Qq/h = 1.391$  MHz und  $\eta = 0.930$  sind [228]. Ein unterschiedlich starker Transfer von Spindichte über die Wasserstoffbrücke kann sich auch auf die Hyperfeinkopplung auswirken [205].

Neben der Bindungslänge  $N_\tau-H \cdots S$  kann es auch durch Drehungen oder Krümmungen der Wasserstoffbrückenbindung zur Veränderung der Quadrupolparameter kommen, wie Fritscher *et al.* [196] theoretisch zeigten. Dies wurde am Beispiel des Knickwinkels  $\alpha$  und des Winkels  $\beta$  bezüglich der Histidinringebene untersucht (siehe Abb. 1 in [196]). Eine eindeutige Richtung der Veränderungen lässt sich ohne genauere strukturelle Daten jedoch nicht festlegen. Abhängig vom Abstand können identische Verdrehungen gleichartig auf einen Parameter einwirken (zum Beispiel Vergrößerung von  $e^2Qq/h$ ) oder gegenläufig (Vergrößerung oder Verkleinerung von  $\eta$  je nach Abstand).

In Anbetracht der genannten Möglichkeiten könnte die SH im Vergleich zu Standardhydrogenasen eine mehr oder weniger stark veränderte Geometrie aufweisen, die die zweite Koordinationssphäre um das aktive Zentrum betrifft. Einen Hinweis darauf könnten die Peptidsequenzen verschiedener Hydrogenasen liefern, die in Tabelle 7.3 aufgeführt sind. Dem typischen Histidin folgend liegen Alanin, Leucin, noch einmal Alanin und Serin vor. Bei der SH hingegen sind die Alanine durch Histidin beziehungsweise Cystein ersetzt, an Stelle des Serins findet man Glycin. Die ersten beiden Aminosäuren sind zum einen deutlich größer, zum anderen durch Imidazolring und SH-Gruppe weit bindungsaffiner als ihre ersetzten Gegenstücke. Da bisher keine Kristallstruktur der SH existiert, ist eine eindeutige Simulation beziehungsweise DFT-Rechnung nicht praktikabel, weil die Anzahl möglicher Kombinationen aus Winkeln und Abständen zu groß ist. Somit sind Auswirkungen dieser ausgetauschten Aminosäuren schwer vorherzusehen, es wäre aber möglich, dass beträchtliche Veränderungen auch eine Modifikation der Bindung zwischen Histidin 69 und dem verbrückenden Cy-

stein 461 nach sich ziehen könnten. In Unkenntnis der strukturellen Begebenheiten könnte darüber hinaus eine Beteiligung von Histidin 70 anstelle von Histidin 69 in Betracht gezogen werden, was die kleineren Hyperfeinwerte und die ungewöhnlichen Quadrupolparameter erklären könnte.

**Sauerstoff.** Die durch die kleine Hyperfeinwechselwirkung zur Vermutung stehende größere Distanz zwischen Histidin und verbrückendem Cystein könnte ein Anzeichen für höhere strukturelle Flexibilität der SH sein. Sie könnte eine umkehrbare Sulfoxigenierung begünstigen, wie sie kürzlich von Horch *et al.* vorgeschlagen wurde [77]. Unter Einwirkung von O<sub>2</sub> würde hierbei im Laufe des H<sub>2</sub>-Zyklus Sauerstoff zeitweilig zwischen Eisen und einem Brückencysteinschwefel des aktiven Zentrums zwischengelagert, um die mutmaßliche Peroxidspezies des Ni<sub>u</sub>-A-Zustandes schnellstmöglich abzubauen und in Folge zu Wasser zu neutralisieren. Somit verbliebe der Ni<sub>r</sub>-B-Zustand, der sich weit schneller reaktivieren lässt als Ni<sub>u</sub>-A [229]. Eine solche Modifikation wurde bereits zuvor basierend auf Röntgenabsorptionsspektroskopie vermutet [63].

Sulfoxigenierung von Cysteinen spielt in diversen Enzymen eine Rolle, unter anderem in der Nitrilhydratase oder der NADH-Peroxidase [230]. Untersuchungen an Modellkomplexen des aktiven Zentrums von Hydrogenasen, ( $\mu$ -SRS)[Fe(CO)<sub>x</sub>]<sub>2</sub> beispielsweise, kamen zu dem Schluss, dass die Oxygenierung von Schwefel mit einer verringerten Sauerstoffempfindlichkeit im Zusammenhang stehen könnte, vorausgesetzt, die Umkehrreaktion, also die Abspaltung von Sauerstoff aus dieser Verbindung, ist ebenso möglich [231, 232]. Demzufolge scheint es denkbar, dass die SH über die erste Koordinationssphäre des aktiven Zentrums hinaus strukturelle und chemische Veränderungen durchläuft. Damit würde Sauerstofftoleranz garantiert, während die wesentlichen Merkmale, die zur Wasserstoffspaltung notwendig sind – wie das durch Licht abspaltbare, verbrückende Hydrid zwischen Nickel und Eisen – unbeeinflusst blieben.

## 7.4 Zusammenfassung

Mittels ENDOR-Messungen an der löslichen Hydrogenase aus *R. eutropha* in  $^2\text{H}_2\text{O}$ - und  $^1\text{H}_2\text{O}$ -Puffer konnte für den mutmaßlich katalytisch aktiven Zustand  $\text{Ni}_a\text{-C}$  eine Hydridspezies in der verbrückenden Position des  $[\text{NiFe}]$ -Zentrums nachgewiesen werden. Durch HYSCORE-Untersuchungen am beleuchteten und unbeleuchteten Zustand der deuterierten Probe konnte die Zuordnung bestätigt und die gefundenen Hyperfein- und Quadrupolkopplungsparameter weiter eingegrenzt werden. Zudem wurde gezeigt, dass Beleuchtung bei kryogenen Temperaturen die Photodissoziation des besagten Hydrids initiiert, es bildet sich  $\text{Ni-L}$ . Unter Ausschluss von Licht kommt es oberhalb von 200 K zu einer erneuten Bindung des abgespaltenen Hydrids, es findet eine Rückkehr in den  $\text{Ni}_a\text{-C}$ -Zustand statt. Die SH verhält sich damit analog zu diversen sauerstoffempfindlichen und -toleranten  $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen.

Die ESEEM- und HYSCORE-Analyse der SH-Probe in nicht-ausgetauschtem Puffer ermöglichte es, das nahe dem aktiven Zentrum vorliegende Histidin zu charakterisieren. Wie in diversen Hydrogenasen ist es auch in der löslichen Hydrogenase Teil des konservierten Motivs L2, voraussichtlich dient es in erster Linie der Stabilisierung. Abweichungen von den typischen Quadrupol- und Hyperfeinparametern deuten jedoch ebenso wie die Peptidsequenz auf Unterschiede in seiner unmittelbaren Umgebung hin. Dies lässt vermuten, dass weitere Funktionen durch dieses Histidin und seine Bindungspartner erfüllt werden. Durch die geringe Entfernung zum  $[\text{NiFe}]$ -Cluster könnte hier eine Ursache für die Sauerstoffunempfindlichkeit der SH liegen.

## 7.5 Ausblick

Mutationsvarianten mit Aminosäureaustausch in der Nähe des aktiven Zentrums könnten die SH Standardhydrogenasen ähnlicher machen. Etwaige Auswirkungen auf die Sauerstofftoleranz könnten mit einzelnen Aminosäuren korreliert werden, vorrangig sind hier die das ungewöhnliche Histidin 69 umgebenden Aminosäuren Histidin, Cystein und Glycin von Interesse. Ferner könnten Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des oxidierten Zustandes Aufschluss darüber geben, ob eine strukturelle Veränderung im Vergleich zu anderen Hydrogenasen vorliegt.

---

## FAZIT

---

In Enzymen sind Struktur und Funktion eng verknüpft und dennoch können unterschiedliche Vorgehensweisen im Aufbau enzymatischer Systeme zum gleichen Ziel führen. In *Ralstonia eutropha* liegen drei sauerstoffunempfindliche Hydrogenasen vor und sie weisen unterschiedliche Mechanismen der Sauerstofftoleranz auf. Während in der regulatorischen Hydrogenase RH vermutlich ein Gaskanal das Vordringen von Sauerstoff zum aktiven Zentrum verhindert [51], deutet die aktuelle Forschung darauf hin, in der membrangebundenen Hydrogenase die Ursache beim proximalen Cluster zu suchen und in der NAD<sup>+</sup>-reduzierenden SH das Hauptaugenmerk auf die Umgebung des aktiven Zentrums zu legen, insbesondere den verbrückenden Liganden und die erste und zweite Koordinationssphäre zu betrachten.

In der vorliegenden Arbeit wurden diverse *cw*- und Puls-EPR-Methoden angewandt, um diese Kofaktoren der beiden letztgenannten Enzyme eingehend zu studieren und mit Standard- sowie anderen sauerstofftoleranten Hydrogenasen zu vergleichen.

**MBH.** Im reduzierten Zustand zeigen Nutationsmessungen, dass der proximale Cluster der MBH einen Spin von  $S = 1/2$  aufweist. In diesem Punkt verhält sich dieser Cluster wie jener in Standardhydrogenasen, dennoch zeigen sich erste Abweichungen: FSE-Messungen am Wildtyp lassen keine Austauschkopplung zum aktiven Zentrum erkennen, wohl aber zum medialen Cluster (mutmaßlich  $S = 2$ ). Diese äußert sich in den Feldspektren in Form von spektralen Unterschieden zwischen zwei Frequenz-

bändern, während die mediale Mutationsvariante keine derartige Abhängigkeit zeigt. Laut Relaxationszeitmessungen ist es möglich, dass der distale Cluster nicht am gemessenen FSE-Signal beteiligt ist.

In Folge dessen könnte es sein, dass die mit  $^{57}\text{Fe}$ -ENDOR-Untersuchungen gefundenen Hyperfeinsignale allein dem proximalen Cluster zuzuordnen sind. Das würde bedeuten, dass dieser Cluster bereits im reduzierten Zustand vier nicht-äquivalente Eisenatome aufweist, was sich deckt mit den Erkenntnissen der Kristallstruktur der reduzierten MBH [57], in der der Cluster durch zwei zusätzliche Cysteine und Ersetzung eines anorganischen Schwefels durch einen Thiolschwefel aus der kubanen Form heraus deformiert und quasi geöffnet ist. Zu vermuten steht eine durch die Ersetzung abgeschwächte Austauschkopplung innerhalb des Clusters, wie sie von Herskovitz *et al.* [233] für  $[\text{2Fe2S}]^{2+}$ -Cluster nachgewiesen wurde.

Unter Sauerstoffeinfluss, also bei Oxidation, kommt es zu einer weiteren Öffnung des proximalen Clusters. Die Bindung zwischen Fe4 und dem anorganischen Schwefel S3 wird gelöst, es kommt zu einer Positionsverschiebung dieses Eisens in Richtung des Peptidrückgratstickstoffes N(Cys20<sup>S</sup>). In Folge entsteht dort eine Bindung kovalenten Charakters, die mit ENDOR-Messungen nachgewiesen werden konnte und im reduzierten Zustand nicht vorliegt. Eine weitere Stabilisierung des Clusters wird durch eine Wasserstoffbrücke über ein mutmaßliches Hydroxid erreicht. ESEEM-Untersuchungen zeigen eine schwache, vermittelte Bindung des Clusters an ein nahes Histidin, die Kristallstruktur [58] deutet auf His229<sup>L</sup> hin, welches demnach an Fe1 gebunden ist. Messungen an Mutationsvarianten von proximalem und medialem Cluster bestätigen die Zuordnung der Bindungen zum proximalen Cluster.

Durch die Verformung des Clusters und die Bindungsbrüche sowie -neubildungen können zwei Elektronen zur Verfügung gestellt werden, aus der Deprotonierung des Stickstoffes N(Cys20<sup>S</sup>) außerdem ein Proton. Im Einklang mit Infrarot- und Resonanz-Raman-Untersuchungen [58, 234], die darauf hinweisen, dass der Sauerstoff im angenommenen Hydroxidliganden in erster Linie als gasförmiger Sauerstoff in das Enzym gelangt, liegt der Schluss nahe, die Umformung des proximalen Clusters und Bindung des schädlichen Sauerstoffs als Hydroxid als Abfang- und Schutzreaktion gegenüber dem aktiven Zentrum zu verstehen. Dadurch wird verhindert, dass dieses in den nur langsam und aufwendig zu reaktivierenden Ni<sub>u</sub>-A-Zustand übergeht, so dass das En-

---

zym in Folge weitgehend funktionsfähig bleibt.

Nutations- und  $^{57}\text{Fe}$ -ENDOR-Messungen unterstützen die Annahme des ungewöhnlichen Verhaltens: Der proximale Cluster zeigt im oxidierten Zustand einen Gesamtspin von  $S = 3/2$  und Hyperfeinparameter, die auf vier nichtäquivalente Eisenatome hindeuten. Der Cluster weicht damit deutlich von seinem Pendant in Standardhydrogenasen ab, bei dem aufgrund der kubanen Struktur je zwei Eisenatome als elektronisch gleichartig betrachtet werden.

Zusätzlich gibt es starke Austauschkopplungen sowohl zum aktiven Zentrum als auch zum medialen Cluster. Relaxationsmessungen zeigten, wie sich dadurch die  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeiten der einzelnen Cluster stark einander annähern und die Untersuchungen an Einkristallen ermöglichten eine Abschätzung der Größenordnung dieser Wechselwirkungen. Diese Art von Bindung erleichtert möglicherweise den Elektronentransfer innerhalb der Clusterkette, um die Einwirkung von unerwünschtem Sauerstoff schnellstmöglich zu neutralisieren und das [NiFe]-Zentrum wieder in den aktiven Zustand zu versetzen. Es ist wahrscheinlich, dass dies Hand in Hand geht mit der Anhebung der Redoxpotentiale der Cluster (*Re*: 160 mV für den proximalen Cluster [58], und 20 mV für den medialen Cluster, persönliche Mitteilung von Friedhelm Lenzian, gegenüber *Dg* mit -350 mV und -70 mV [23, 154, 235]). Auch dieses Verhalten ist bisher in Standardhydrogenasen nicht beobachtet worden. Die Einkristallmessungen bestätigen zudem, dass das aktive Zentrum elektronisch sehr ähnlich zu dem sauerstoffempfindlicher Hydrogenasen aufgebaut und auch gleichartig ausgerichtet ist, also tendenziell nicht die Ursache der Toleranz ist.

**SH.** Auch das aktive Zentrum der  $\text{NAD}^+$ -reduzierenden Hydrogenase weist starke Ähnlichkeiten zu dem von Standardhydrogenasen auf. Mit ENDOR- und HYSORE-Messungen konnte mittels Deuteriumaustausch ein typisches Hydrid in der Brückenposition zwischen Nickel und Eisen nachgewiesen werden, welches unter Lichteinfluss dissoziiert und bei Dunkeladaption rückbindet. Die mit *cw*-EPR untersuchten Redoxzustände  $\text{Ni}_a\text{-C}$  und  $\text{Ni-L}$  stimmen mit denen anderer Hydrogenasen überein.

Ungewöhnlich ist hingegen die Bindung von Nickel an ein nahes Histidin. Eine klar schwächere Hyperfeinwechselwirkung sowie abweichende Quadrupolparameter konnten durch HYSORE- und ESEEM-Untersuchungen festgestellt werden und geben

Anlass zu der Vermutung, dass in der zweiten Koordinationssphäre des aktiven Zentrums eine gewisse Flexibilität in der Struktur gegeben ist. Zusammen mit der veränderten Aminosäuresequenz könnte dies eine Sulfoxygenierung der Cysteinbindungen ermöglichen, wie sie kürzlich anhand von Infrarotspektroskopie vorgeschlagen wurde [77]. Eindringender Sauerstoff würde dadurch von der verbrückenden Position des aktiven Zentrums ferngehalten beziehungsweise schnell abtransportiert werden.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen lassen mit Hinblick auf den aktuellen Forschungshintergrund erkennen, dass in beiden Hydrogenasen strukturelle Flexibilität und von Redoxbedingungen abhängige Bindungsveränderungen den Schlüssel zur jeweiligen Sauerstofftoleranz darstellen. Auf diese Weise kann trotz unterschiedlicher lokaler Umgebungen und Kofaktoren die Funktionsfähigkeit des [NiFe]-Zentrums erhalten werden, ohne dieses selbst einer Veränderung zu unterziehen.

Die Erkenntnisse, die hier gewonnen werden konnten, eröffnen Raum für weiterführende Fragen: Wie kommt der Spinzustand des proximalen Clusters zustande und findet sich der Mechanismus der Öffnung so auch in anderen Hydrogenasen wieder? Wie wirkt sich die Umgebung des Histidins der SH auf die Strukturflexibilität aus? Lassen sich die Eigenarten der verschiedenen sauerstofftoleranten Hydrogenasen miteinander verbinden, um artifizielle Enzyme herzustellen, die gleich durch mehrere Mechanismen vor Sauerstoff geschützt und somit als günstige Katalysatoren einsetzbar sind?

Somit bieten sich im Bereich der sauerstofftoleranten Hydrogenasen zahlreiche Möglichkeiten und diverse Richtungen für weitere Forschung sowohl bezüglich der Grundlagen als auch weiterführender Anwendungen.



---

## ANHANG: EULERWINKEL

---

Die Orientierung zweier Koordinatensysteme zueinander kann durch eine Drehmatrix  $\mathbf{R}$  beschrieben werden, welche sich wiederum multiplikativ aus den drei Rotationsmatrizen um jeweils eine der Achsen zusammensetzt. Die einzelnen Rotationsmatrizen sind:

$$R_x(\alpha) = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \alpha & \sin \alpha \\ 0 & -\sin \alpha & \cos \alpha \end{pmatrix}$$

$$R_y(\beta) = \begin{pmatrix} \cos \beta & 0 & -\sin \beta \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \beta & 0 & \cos \beta \end{pmatrix}$$

$$R_z(\gamma) = \begin{pmatrix} \cos \gamma & \sin \gamma & 0 \\ -\sin \gamma & \cos \gamma & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Für die Transformation von einem Achsensystem in das andere werden nacheinander folgende Euler-Drehungen ausgeführt, hier in  $zyz$ -Konvention, wie sie auch Verwendung bei EasySpin findet. Man dreht zuerst um die  $z$ -Achse um den Winkel  $\phi$ , dann

um die neue  $y$ -Achse um den Winkel  $\theta$  und schließlich um die neue  $z$ -Achse um den Winkel  $\psi$ :

$$\begin{aligned}
\mathbf{R} &= R_{z''}(\psi) \cdot R_{y'}(\theta) \cdot R_z(\phi) \\
&= \begin{pmatrix} \cos \psi & \sin \psi & 0 \\ -\sin \psi & \cos \psi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \cos \theta & 0 & -\sin \theta \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \theta & 0 & \cos \theta \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \cos \phi & \sin \phi & 0 \\ -\sin \phi & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (\text{A.1}) \\
&= \begin{pmatrix} \cos \psi \cos \theta \cos \phi - \sin \psi \sin \phi & \cos \psi \cos \theta \sin \phi + \sin \psi \cos \phi & -\cos \psi \sin \theta \\ -\sin \psi \cos \theta \cos \phi - \cos \psi \sin \phi & -\sin \psi \cos \theta \sin \phi + \cos \psi \cos \phi & \sin \psi \sin \theta \\ \sin \theta \cos \phi & \sin \theta \sin \phi & \cos \theta \end{pmatrix}
\end{aligned}$$

Die Spalten von  $\mathbf{R}$  enthalten die Vektoren  $x$ ,  $y$  und  $z$  im  $X$ -,  $Y$ - und  $Z$ -System. Davon gibt zum Beispiel die letzte Spalte den Vektor  $z$ , wie er durch seine Richtungskosini im  $X$ -,  $Y$ -,  $Z$ -System (Kristallsystem) repräsentiert wird, wieder.

Um die Eulerwinkel aus den Richtungskosini zu erhalten, folgt man der Berechnung:

$$\begin{aligned}
\theta &= \arccos(R_{3,3}) \\
\phi &= \text{atan2}(R_{3,1}, R_{3,2}) \\
\psi &= \text{atan2}(-R_{1,3}, R_{2,3})
\end{aligned} \quad (\text{A.2})$$

Dabei ist  $\text{atan2}$  ein Arcustangens, der durch das zweite Argument Auskunft über das Vorzeichen erhält.

# ABKÜRZUNGEN

---

<i>Aa</i>	<i>Aquifex aeolicus</i> . Auch <i>A. aeolicus</i> , <i>A. a.</i>
<i>Ah</i>	<i>Alcaligenes hydrogenophilus</i> . Auch <i>A. hydrogenophilus</i> , <i>A. h.</i>
<i>Bj</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> . Auch <i>B. japonicum</i> , <i>B. j.</i>
<i>cw</i>	kontinuierlich eingestrahlt (engl. <i>continuous wave</i> )
Cys	Cystein
<i>Df</i>	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i> . Auch <i>D. fructosovorans</i> , <i>D. f.</i>
<i>Dg</i>	<i>Desulfovibrio gigas</i> . Auch <i>D. gigas</i> , <i>D. g.</i>
<i>Dv</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> . Auch <i>D. vulgaris</i> , <i>D. v.</i>
DFT	Dichtefunktionaltheorie
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i> . Auch <i>E. coli</i> , <i>E. c.</i>
ELDOR	Elektron-Elektron-Doppelresonanz (engl. <i>ELectron-Electron DOuble Resonance</i> )
ENDOR	Elektron-Kern-Doppelresonanz (engl. <i>Electron-Nuclear DOuble Resonance</i> )
ESEEM	Modulation der Einhüllenden der Elektronenspinechos (engl. <i>Electron Spin-Echo Envelope Modulation</i> )
EPR	Elektronenspinresonanz (engl. <i>Electron Paramagnetic Resonance</i> )
EZ	Elektron-Zeeman-Wechselwirkung
FFT	schnelle Fourier-Transformation (engl. <i>Fast Fourier Transform</i> )
FID	Freier Induktionszerfall (engl. <i>Free Induction Decay</i> )
FMN	Flavinmononukleotid
FSE	feldabhängiges Hahn-Echo-Experiment (engl. <i>Field-Swept-Echo</i> )
FTIR	Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie (engl. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )

## ABKÜRZUNGEN

---

Hase I	Hydrogenase I aus <i>Aquifex aeolicus</i>
HFI	Hyperfeinwechselwirkung (engl. <i>HyperFine Interaction</i> )
His	Histidin
HTA-Puls	<i>high-turning-angle</i> -Puls, mehr als 360°
Hyd-1	Hydrogenase 1 aus <i>Escherichia coli</i>
iFT	inverse Fourier-Transformation
iLT	inverse Laplace-Transformation
IR	$T_1$ -Messung mit Rückkehr aus der Inversion (engl. <i>Inversion Recovery</i> )
HYSCORE	(engl. <i>HYperfine Sublevel CORrElation spectroscopy</i> )
MBH	Membrangebundene Hydrogenase (engl. <i>Membrane-Bound Hydrogenase</i> )
MW	Mikrowelle
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotids
NMR	Kernspinresonanz (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
NQI	Kernquadrupolwechselwirkung (engl. <i>Nuclear Quadrupole Interaction</i> )
NZ	Kern-Zeeman-Wechselwirkung (engl. <i>Nuclear Zeeman Interaction</i> )
pdb	Proteindatenbank (engl. <i>Protein Data Bank</i> )
PEANUT	echoamplitudendetektiertes Nutationsexperiment (engl. <i>Phase-inverted Echo-Amplitude detected NUTation</i> )
Q-Band	Mikrowellenfrequenz 33-50 GHz (meist bei 34 GHz)
<i>Re</i>	<i>Ralstonia eutropha</i> . Auch <i>R. eutropha</i> , <i>R. e.</i>
REFINE	Relaxationszeitfilter (engl. <i>RElaxation FIItered hyperfiNE</i> )
RF	Radiofrequenz
RH	Regulatorische Hydrogenase (engl. <i>Regulatory Hydrogenase</i> )
S-Band	Mikrowellenfrequenz 2-4 GHz (meist bei 3.6 GHz)
SH	NAD <sup>+</sup> -reduzierende bzw. lösliche Hydrogenase (engl. <i>Soluble Hydrogenase</i> )
SR	$T_1$ -Messung mit Rückkehr aus der Sättigung (engl. <i>Saturation Recovery</i> )
<i>Tr</i>	<i>Thiocapsa roseopersicina</i> . Auch <i>T. roseopersicina</i> , <i>T. r.</i>
W-Band	Mikrowellenfrequenz 75-110 GHz (meist bei 94 GHz)
WT	Wildtyp
X-Band	Mikrowellenfrequenz 8-12 GHz (meist bei 9.7 GHz)
ZFI	Nullfeldaufspaltung (engl. <i>Zero Field Interaction</i> )
2vs3-Puls	Kopplung von 2-Puls- und 3-Puls-ESEEM-Experiment

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

2.1	[NiFe]-Struktur . . . . .	7
2.2	Schema der MBH . . . . .	10
2.3	Stereoansicht des prox. Cluster . . . . .	12
2.4	Schema der SH . . . . .	13
3.1	Zeeman-Aufspaltung . . . . .	17
3.2	Rhombische $g$ -Matrix . . . . .	19
3.3	Aufspaltung $S = I = 1/2$ und $S = 1/2, I = 1$ . . . . .	23
3.4	Transiente Nutation . . . . .	27
3.5	Nutationspektrum . . . . .	28
3.6	Hahn-Echo-Sequenz . . . . .	30
3.7	$T_2$ - und $T_1$ -Messung (Hahn-Echo und <i>inversion recovery</i> ) . . . . .	32
3.8	REFINE, $T_1$ -Zeiten . . . . .	34
3.9	REFINE-Sequenzen . . . . .	35
3.10	PEANUT-Sequenz . . . . .	37
3.11	3-Puls-ESEEM . . . . .	41
3.12	<i>exact cancellation</i> , Schema . . . . .	43
3.13	4-Puls-ESEEM/HYSCORE . . . . .	44
3.14	HYSCORE-Quadranten . . . . .	46
3.15	Pulssequenz im Davies-ENDOR . . . . .	48
3.16	ENDOR-Schema . . . . .	49
4.1	MBH WT, Q-Band, FSE temp. . . . .	58
4.2	MBH WT, X-Band, FSE temp. . . . .	59
4.3	MBH C19G/C120G, Q-Band, FSE temp. . . . .	61

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

4.4	MBH P242C, Q-Band, FSE temp. . . . .	62
4.5	MBH P242C & WT, Q-Band, FSE . . . . .	63
4.6	MBH C19G/C120G, P242C, WT, X-/Q-Band, FSE, FeS . . . . .	64
4.7	MBH C19G/C120G, Q-Band, $T_1$ & iLT . . . . .	66
4.8	MBH C19G/C120G, Q-Band, FSE & iLT . . . . .	66
4.9	MBH P242C, X- & Q-Band, iLT von $T_1$ & $T_2$ . . . . .	67
4.10	MBH WT, X- & Q-Band, iLT von $T_1$ & $T_2$ . . . . .	69
4.11	MBH C19G/C120G, Q-Band, PEANUT . . . . .	71
4.12	MBH WT, Q-Band, PEANUT . . . . .	73
4.13	MBH WT, X-Band, PEANUT . . . . .	75
4.14	MBH WT, X-&Q-Band, PEANUT, $g$ -Achse . . . . .	79
4.15	Koordinatensysteme im Kristall . . . . .	81
4.16	MBH Elementarzelle . . . . .	85
4.17	MBH Kristall 2, Q-Band, Winkel-FSE, 15K . . . . .	87
4.18	MBH Kristall 2, Q-Band, Winkel-FSE, Grenzbereiche, 15K . . . . .	89
4.19	MBH Kristall 2, Q-Band, Winkel-FSE & Ni-Sim ohne $J$ , 15K, 1 . . . . .	90
4.20	MBH Kristall 2, Q-Band, Winkel-FSE & Ni-Sim ohne $J$ , 15K, 2 . . . . .	90
4.21	MBH Kristall 2, Q-Band, Winkel-FSE & Ni-Sim ohne $J$ , 15K, 3 . . . . .	91
4.22	MBH Kristall 2, Q-Band, Winkel-FSE & Ni-Sim ohne $J$ , 15K, 4 . . . . .	91
4.23	MBH Kristall 2, Q-Band, Winkel-FSE & Ni-Sim ohne $J$ , 15K, 5 . . . . .	92
4.24	MBH Kristall 2, Q-Band, Winkel-FSE & Ni-Sim mit $J_{12}$ , 15K, 5 . . . . .	95
4.25	MBH Kristall 2, Q-Band, Winkel-FSE & Ni-Sim mit $J_{12}$ , 15K, 3 . . . . .	96
4.26	MBH Kristall 2, Q-Band, Winkel-FSE & Ni-Sim mit $J_{12}$ , 15K, 4 . . . . .	96
4.27	MBH Kristall 2, Q-Band, Winkel-FSE & Ni-Sim mit $J_{12}$ und $J_{23}$ , 15K . . . . .	97
4.28	MBH Kristall 4, Q-Band, Winkel-FSE & Ni-Sim mit $J_{12}$ , 10K . . . . .	99
4.29	MBH P242C, Q-Band, FSE, 10K, Simulation . . . . .	101
4.30	MBH WT, P242C, X-Band FSE, 10K, Simulation . . . . .	103
4.31	MBH WT & WT- $^{57}\text{Fe}$ red., Q-Band, FSE . . . . .	107
4.32	MBH WT red., Q-Band, FSE . . . . .	108
4.33	MBH WT $^{57}\text{Fe}$ red., X-Band $cw$ & Q-Band FSE . . . . .	109
4.34	MBH WT red., Q-Band, PEANUT . . . . .	111
4.35	MBH WT red., Q-Band, $T_1$ . . . . .	113
4.36	MBH WT red., Q-Band, iLT der IR . . . . .	113
4.37	MBH WT red., Q-Band, IR & SR, Zeitspurfit . . . . .	114
4.38	MBH P242C red., X-Band $cw$ & Q-Band FSE . . . . .	116

4.39	MBH C19G/C120G & C19G/C120G/P242C red., X-Band <i>cw</i> & Q-Band FSE	118
5.1	MBH WT und P242C, Q-Band, Puls-Feldspektren	125
5.2	MBH, Q-Band, $^{14}\text{N}$ -ENDOR und Simulation	127
5.3	MBH, Q-Band, $^{15}\text{N}$ -ENDOR und Simulation	128
5.4	MBH P242C, C19G/C120G & red. WT, Q-Band, $^{14}\text{N}$ -ENDOR	129
5.5	MBH, X-Band, Puls-Feldspektren	132
5.6	MBH, X-Band, 3P-ESEEM & Zeitspur	133
5.7	MBH, X-Band, 3P-ESEEMs	134
5.8	MBH, X-Band, 2vs3P-ESEEMs	135
5.9	MBH, X-Band, relaxationszeitgefilterte 3P-ESEEMs	136
5.10	MBH, X-Band, 3P-ESEEMs für $^{15}\text{N}$	137
5.11	MBH, X-Band, 3P-ESEEM und Simulationen	139
5.12	MBH WT, med., prox. Mutanten, X-Band, Puls-Feldspektrum	141
5.13	MBH P242C, X-Band, 3P-ESEEMs	142
5.14	MBH prox. Mutanten, X-Band, 3P-ESEEMs	142
5.15	Quadrupolcharakteristika von Stickstoffen	144
5.16	MBH His-Mutanten, X-Band, 3P-ESEEMs	149
6.1	MBH $^{57}\text{Fe}$ red., Q-Band, ENDOR	153
6.2	MBH $^{57}\text{Fe}$ ox., Q-Band, ENDOR	158
7.1	SH, X-Band, <i>cw</i> -Feldspektrum	165
7.2	SH, Q-Band, Puls-Feldspektrum	166
7.3	SH, Q-Band, ENDOR, $g_y$ & Simulationen	168
7.4	SH, Q-Band, ENDOR, $g_x$ & $g_y$	171
7.5	SH, X-Band, $^2\text{H}$ -HYSCORE, $g_x$ , $g_y$ & bei $g_z$ sowie Simulationen	172
7.6	SH, X-Band, H-HYSCORE, $g_y$ , $g_y$ & $g_z$ von $\text{Ni}_a\text{-C}$	174
7.7	SH, X-Band, $^2\text{H}$ -HYSCORE, $g_y$ , $g_z$ von $\text{Ni}_a\text{-C}$ & $g_y$ von $\text{Ni-L}$ , Sim mit iso. und aniso. HFI	176
7.8	SH, X-Band, HYSCORE, Histidin & Simulationen	178
7.9	SH, X-Band, 3P-ESEEM, Histidin & Simulation	179
7.10	Histidin	182

# TABELLENVERZEICHNIS

---

3.1	Kernisotope . . . . .	52
4.1	MBH <i>J</i> -Kopplungen und Literatur . . . . .	105
5.1	MBH Histidin: Quadrupol- und Hyperfeinwerte . . . . .	140
5.2	MBH Histidin: DFT- und Punkt-Dipol-Werte für NQI und HFI . . . . .	146
6.1	MBH <sup>57</sup> Fe HFI: reduziert . . . . .	155
6.2	<sup>57</sup> Fe HFI <i>Dg</i> & <i>Aa</i> , reduziert . . . . .	156
6.3	MBH <sup>57</sup> Fe HFI: oxidiert . . . . .	160
6.4	<sup>57</sup> Fe HFI <i>Dg</i> & <i>Aa</i> , oxidiert . . . . .	161
7.1	SH Hydrid: Hyperfeinwerte . . . . .	174
7.2	SH Histidin: Quadrupol- und Hyperfeinwerte . . . . .	180
7.3	Peptidsequenz, Histidin . . . . .	181



# LITERATURVERZEICHNIS

---

- [1] ATKINS P. W. UND DE PAULA J.: *Physical Chemistry*. Oxford University Press (1994)  
(Zitiert auf Seite 1)
- [2] VIGNAIS P. M. UND BILLOUD B.: Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chemical Reviews* 107(10), 4206–4272 (2007). doi: 10.1021/cr050196r (Zitiert auf Seite 5)
- [3] PETERS J. W., LANZILOTTA W. N., LEMON B. J. UND SEEFELDT L. C.: X-ray Crystal Structure of the Fe-Only Hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 Angstrom Resolution. *Science* 282(5395), 1853–1858 (1998). doi: 10.1126/science.282.5395.1853 (Zitiert auf Seite 5)
- [4] SHIMA S., PILAK O., VOGT S., SCHICK M., STAGNI M. S., MEYER-KLAUCKE W., WARKENTIN E., THAUER R. K. UND ERMILER U.: The Crystal Structure of [Fe]-Hydrogenase Reveals the Geometry of the Active Site. *Science* 321(5888), 572–575 (2008). doi: 10.1126/science.1158978 (Zitiert auf Seite 5)
- [5] ALBRACHT S. P. J., GRAF E.-G. UND THAUER R. K.: The EPR properties of nickel in hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *FEBS Letters* 140(2), 311–313 (1982). doi: 10.1016/0014-5793(82)80921-6 (Zitiert auf Seite 5)
- [6] VOLBEDA A., CHARON M.-H., PIRAS C., HATCHIKIAN E. C., FREY M. UND FONTECILLA-CAMPS J. C.: Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373(6515), 580–587 (1995). doi: 10.1038/373580a0 (Zitiert auf den Seiten 5, 6 und 180)
- [7] LUBITZ W., OGATA H., RÜDIGER O. UND REIJERSE E. J.: Hydrogenases. *Chemical Reviews* 114(8), 4081–4148 (2014). doi: 10.1021/cr4005814 (Zitiert auf Seite 5)

- [8] HIGUCHI Y., YAGI T. UND YASUOKA N.: Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* 5(12), 1671–1680 (1997). doi: 10.1016/S0969-2126(97)00313-4 (Zitiert auf den Seiten 6 und 82)
- [9] ROUSSET M., MONTET Y., GUIGLIARELLI B., FORGET N., ASSO M., BERTRAND P., FONTECILLA-CAMPS J. C. UND HATCHIKIAN E. C.: [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95(20), 11625–11630 (1998). doi: 10.1073/pnas.95.20.11625 (Zitiert auf den Seiten 6, 62, 112, 115 und 118)
- [10] JOHNSON D. C., DEAN D. R., SMITH A. D., UND JOHNSON M. K.: Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry* 74, 247–281 (2005). doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133518 (Zitiert auf Seite 6)
- [11] NOODLEMAN L., LOVELL T., LIU T., HIMO F. UND TORRES R. A.: Insights into properties and energetics of iron-sulfur proteins from simple clusters to nitrogenase. *Current Opinion in Chemical Biology* 6(2), 259–273 (2002). doi: 10.1016/S1367-5931(02)00309-5 (Zitiert auf Seite 6)
- [12] VOLBEDA A., GARCIN E., PIRAS C., LACEY A. L. D., FERNANDEZ V. M., HATCHIKIAN E. C., FREY M. UND FONTECILLA-CAMPS J. C.: Structure of the [NiFe] Hydrogenase Active Site: Evidence for Biologically Uncommon Fe Ligands. *Journal of the American Chemical Society* 118(51), 12989–12996 (1996). doi: 10.1021/ja962270g (Zitiert auf Seite 6)
- [13] PIERIK A. J., ROSEBOOM W., HAPPE R. P., BAGLEY K. A. UND ALBRACHT S. P. J.: Carbon Monoxide and Cyanide as Intrinsic Ligands to Iron in the Active Site of [NiFe]-Hydrogenases. *Journal of Biological Chemistry* 274(6), 3331–3337 (1999). doi: 10.1074/jbc.274.6.3331 (Zitiert auf Seite 6)
- [14] HAPPE R. P., ROSEBOOM W., PIERIK A. J., ALBRACHT S. P. J. UND BAGLEY K. A.: Biological activation of hydrogen. *Nature* 385(6612), 126 (1997). doi: 10.1038/385126a0 (Zitiert auf Seite 6)
- [15] LACEY A. L. D., HATCHIKIAN E. C., VOLBEDA A., FREY M., FONTECILLA-CAMPS J. C., UND FERNANDEZ V. M.: Infrared-Spectroelectrochemical Characterization of the [NiFe] Hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. *Journal of the American Chemical*

- Society* 119(31), 7181–7189 (1997). doi: 10.1021/ja963802w (Zitiert auf den Seiten 6 und 8)
- [16] HUYETT J. E., CAREPO M., PAMPLONA A., FRANCO R., MOURA I., MOURA J. J. G. UND HOFFMAN B. M.:  $^{57}\text{Fe}$  Q-Band Pulsed ENDOR of the Hetero-Dinuclear Site of Nickel Hydrogenase: Comparison of the NiA, NiB, and NiC States. *Journal of the American Chemical Society* 119(39), 9291–9292 (1997). doi: 10.1021/ja9700919 (Zitiert auf Seite 6)
- [17] DOLE F., FOURNEL A., MAGRO V., HATCHIKIAN E. C., BERTRAND P. UND GUIGLIARELLI B.: Nature and Electronic Structure of the Ni-X Dinuclear Center of *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase. Implications for the Enzymatic Mechanism. *Biochemistry* 36(25), 7847–7854 (1997). doi: 10.1021/bi963171i (Zitiert auf Seite 6)
- [18] VOLBEDA A., MARTIN L., CAVAZZA C., MATHO M., FABER B. W., ROSEBOOM W., ALBRACHT S. P. J., GARCIN E., ROUSSET M. UND FONTECILLA-CAMPS J. C.: Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 10(3), 239–249 (2005). doi: 10.1007/s00775-005-0632-x (Zitiert auf den Seiten 7, 8 und 59)
- [19] SHAFAT H. S., RÜDIGER O., OGATA H. UND LUBITZ W.: [NiFe] hydrogenases: A common active site for hydrogen metabolism under diverse conditions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1827(8–9), 986–1002 (2013). doi: 10.1016/j.bbabi.2013.01.015 (Zitiert auf den Seiten 7, 8 und 166)
- [20] VAN GASTEL M., STEIN M., BRECHT M., SCHRÖDER O., LENDZIAN F., BITTL R., OGATA H., HIGUCHI Y. UND LUBITZ W.: A single-crystal ENDOR and density functional theory study of the oxidized states of the [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11(1), 41–51 (2006). doi: 10.1007/s00775-005-0048-7 (Zitiert auf Seite 7)
- [21] CAREPO M., TIERNEY D. L., BRONDINO C. D., YANG T. C., PAMPLONA A., TELSER J., MOURA I., MOURA J. J. G. UND HOFFMAN B. M.:  $^{17}\text{O}$  ENDOR Detection of a Solvent-Derived Ni-(OH<sub>x</sub>)-Fe Bridge That Is Lost upon Activation of the Hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Journal of the American Chemical Society* 124(2), 281–286 (2002). doi: 10.1021/ja010204v (Zitiert auf Seite 7)
- [22] OGATA H., HIROTA S., NAKAHARA A., KOMORI H., SHIBATA N., KATO T., KANO K. UND HIGUCHI Y.: Activation Process of [NiFe] Hydrogenase Elucidated by High-Resolution X-Ray Analyses: Conversion of the Ready to the Unready State. *Structure*

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- 13(11), 1635–1642 (2005). doi: 10.1016/j.str.2005.07.018 (Zitiert auf den Seiten 7, 59 und 83)
- [23] LUBITZ W., REIJERSE E. J. UND VAN GASTEL M.: [NiFe] and [FeFe] Hydrogenases Studied by Advanced Magnetic Resonance Techniques. *Chemical Reviews* 107(10), 4331–4365 (2007). doi: 10.1021/cr050186q (Zitiert auf den Seiten 8 und 189)
- [24] WHITEHEAD J. P., GURBIEL R. J., BAGYINKA C., HOFFMAN B. M. UND MARONEY M. J.: The Hydrogen Binding Site in Hydrogenase: 35-GHz ENDOR and XAS Studies of the Ni-C Active Form and the Ni-L Photoproduct. *Journal of the American Chemical Society* 115(13), 5629–5635 (1993). doi: 10.1021/ja00066a032 (Zitiert auf den Seiten 8 und 167)
- [25] FOERSTER S., STEIN M., BRECHT M., OGATA H., HIGUCHI Y. UND LUBITZ W.: Single Crystal EPR Studies of the Reduced Active Site of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Journal of the American Chemical Society* 125(1), 83–93 (2003). doi: 10.1021/ja027522u (Zitiert auf den Seiten 8, 117, 164, 165, 167 und 172)
- [26] BRECHT M., VAN GASTEL M., BUHRKE T., FRIEDRICH B. UND LUBITZ W.: Direct Detection of a Hydrogen Ligand in the [NiFe] Center of the Regulatory H<sub>2</sub>-Sensing Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* in its Reduced State by HYSCORE and ENDOR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 125(43), 13075–13083 (2003). doi: 10.1021/ja036624x (Zitiert auf den Seiten 8, 117, 164, 167, 170, 172, 174 und 175)
- [27] FAN C., TEIXEIRA M., MOURA J. J. G., MOURA I., HUYNH B.-H., GALL J. L., PECK JR. H. D. UND HOFFMAN B. M.: Detection and Characterization of Exchangeable Protons Bound to the Hydrogen-Activation Nickel Site of *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase: A proton and deuterium Q-Band ENDOR Study. *Journal of the American Chemical Society* 113(1), 20–24 (1991). doi: 10.1021/ja00001a003 (Zitiert auf den Seiten 8 und 174)
- [28] FICHTNER C., VAN GASTEL M. UND LUBITZ W.: Wavelength dependence of the photo-induced conversion of the Ni-C to the Ni-L redox state in the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Physical Chemistry Chemical Physics* 5(24), 5507–5513 (2003). doi: 10.1039/B310205J (Zitiert auf Seite 8)
- [29] KELLERS P., PANDELIA M.-E., CURRELL L. J., GÖRNERA H. UND LUBITZ W.: FTIR study on the light sensitivity of the [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: Ni-C to Ni-L photoconversion, kinetics of proton rebinding and

- H/D isotope effect. *Physical Chemistry Chemical Physics* 11(39), 8680–8683 (2009). doi: 10.1039/b913635e (Zitiert auf den Seiten 8 und 164)
- [30] PANDELIA M.-E., INFOSSI P., STEIN M., GIUDICI-ORTICONI M.-T. UND LUBITZ W.: Spectroscopic characterization of the key catalytic intermediate Ni–C in the O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe] hydrogenase I from *Aquifex aeolicus*: evidence of a weakly bound hydride. *Chemical Communications* 48(6), 823–825 (2012). doi: 10.1039/C1CC16109A (Zitiert auf den Seiten 8, 107, 140, 164, 174, 175, 177 und 180)
- [31] KRASNA A. I.: Hydrogenase: Properties and applications. *Enzyme and Microbial Technology* 1(3), 165–172 (1979). doi: 10.1016/0141-0229(79)90023-1 (Zitiert auf Seite 8)
- [32] KRASNA A. I.: Oxygen-stable hydrogenase and assay. *Methods in Enzymology* 53, 296–314 (1978). doi: 10.1016/S0076-6879(78)53036-X (Zitiert auf Seite 8)
- [33] VAN DER ZWAAN J. W., ALBRACHT S. P. J., FONTIJN R. D. UND SLATER E. C.: Monovalent nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. Light sensitivity and evidence for direct interaction with hydrogen. *FEBS Letters* 179(2), 271–277 (1984). doi: 10.1016/0014-5793(85)80533-0 (Zitiert auf Seite 8)
- [34] BLEIJLEVENS B., VAN BROEKHUIZEN F. A., LACEY A. L. D., ROSEBOOM W., FERNANDEZ V. M. UND ALBRACHT S. P. J.: The activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. An infrared spectro-electrochemical study. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 9(6), 743–752 (2004). doi: 10.1007/s00775-004-0570-z (Zitiert auf Seite 8)
- [35] FICHTNER C., LAURICH C., BOTHE E. UND LUBITZ W.: Spectroelectrochemical Characterization of the [NiFe] Hydrogenase of *Desulfovibrio Vulgaris* Miyazaki F. *Biochemistry* 45(32), 9706–9716 (2006). doi: 10.1021/bi0602462 (Zitiert auf Seite 8)
- [36] OGATA H., LUBITZ W. UND HIGUCHI Y.: [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism. *Dalton Transactions* 37, 7577–7587 (2009). doi: 10.1039/b903840j (Zitiert auf Seite 8)
- [37] HIDALGO R., ASH P. A., HEALY A. J. UND VINCENT K. A.: Infrared Spectroscopy During Electrocatalytic Turnover Reveals the Ni-L Active Site State During H<sub>2</sub> Oxidation by a NiFe Hydrogenase. *Angewandte Chemie International Edition English* 54(24), 7110–7113 (2015). doi: 10.1002/anie.201502338 (Zitiert auf Seite 8)
- [38] MURPHY B. J., HIDALGO R., ROESSLER M. M., EVANS R. M., ASH P. A., MYERS

- W. K., VINCENT K. A. UND ARMSTRONG F. A.: Discovery of Dark pH-Dependent H<sup>+</sup> Migration in a [NiFe]-Hydrogenase and Its Mechanistic Relevance: Mobilizing the Hydrido Ligand of the Ni-C Intermediate. *Journal of the American Chemical Society* 137(26), 8484–8489 (2015). doi: 10.1021/jacs.5b03182 (Zitiert auf den Seiten 8 und 166)
- [39] FONTECILLA-CAMPS J. C., VOLBEDA A., CAVAZZA C. UND NICOLET Y.: Structure/Function Relationships of [NiFe]- and [FeFe]-Hydrogenases. *Chemical Reviews* 107(10), 4273–4303 (2007). doi: 10.1021/cr050195z (Zitiert auf Seite 8)
- [40] LUDWIG M., CRACKNELL J. A., VINCENT K. A., ARMSTRONG F. A. UND LENZ O.: Oxygen-tolerant H<sub>2</sub> Oxidation by Membrane-bound [NiFe] Hydrogenases of *Ralstonia* Species. Coping with low Level H<sub>2</sub> in Air. *Journal of Biological Chemistry* 284(1), 465–477 (2009). doi: 10.1074/jbc.M803676200 (Zitiert auf den Seiten 8, 10 und 70)
- [41] LAMLE S. E., ALBRACHT S. P. J. UND ARMSTRONG F. A.: Electrochemical Potential-Step Investigations of the Aerobic Interconversions of [NiFe]-Hydrogenase from *Allochromatium vinosum*: Insights into the Puzzling Difference between Unready and Ready Oxidized Inactive States. *Journal of the American Chemical Society* 126(45), 14899–14909 (2004). doi: 10.1021/ja047939v (Zitiert auf Seite 8)
- [42] LIEBGOTT P.-P., DEMENTIN S., LEGER C. UND ROUSSET M.: Towards engineering O<sub>2</sub>-tolerance in [Ni-Fe] hydrogenases. *Energy & Environmental Science* 4, 33–41 (2011). doi: 10.1039/C0EE00093K (Zitiert auf Seite 8)
- [43] VINCENT K. A., CRACKNELL J. A., LENZ O., ZEBGER I., FRIEDRICH B. UND ARMSTRONG F. A.: Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102(47), 16951–16954 (2005). doi: 10.1073/pnas.0504499102 (Zitiert auf Seite 9)
- [44] PANDELIA M.-E., FOURMOND V., IZSAK R., TRON-INFOSSI P., LOJOU E., BERTRAND P., LEGER C., GIUDICI-ORTICONI M.-T. UND LUBITZ W.: Membrane-bound hydrogenase I from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: enzyme activation, redox intermediates and oxygen tolerance. *Journal of the American Chemical Society* 132(20), 6991–7004 (2010). doi: 10.1021/ja910838d (Zitiert auf Seite 9)
- [45] KNÜTTEL K., SCHNEIDER K., ERKENS A., PLASS W., MÜLLER A., BILL E. UND TRAUTWEIN A. X.: Redox Properties of the Metal Centres in the Membrane-Bound Hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences Chemistry* 42(4), 495–511 (1994). <http://pub.uni-bielefeld.de/publication/1640833> (Zitiert auf den Seiten 9, 12, 109 und 110)

- [46] SAGGU M., ZEBGER I., LUDWIG M., LENZ O., FRIEDRICH B., HILDEBRANDT P. UND LENDZIAN F.: Spectroscopic Insights into the Oxygen-tolerant Membrane-associated [NiFe] Hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Biological Chemistry* 284(24), 16264–16276 (2009). doi: 10.1074/jbc.M805690200 (Zitiert auf den Seiten 9, 10, 12, 82, 104, 106 und 117)
- [47] BERNHARD M., BUHRKE T., BLEIJLEVENS B., LACEY A. L. D., FERNANDEZ V. M., ALBRACHT S. P. J. UND FRIEDRICH B.: The H<sub>2</sub> Sensor of *Ralstonia eutropha*. Biochemical Characteristics, Spectroscopic Properties, and its Interaction with a Histidine Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 276(19), 15592–15597 (2001). doi: 10.1074/jbc.M009802200 (Zitiert auf den Seiten 9 und 180)
- [48] LENZ O. UND FRIEDRICH B.: A novel multicomponent regulatory system mediates H<sub>2</sub> sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95(21), 12474–12479 (1998). doi: 10.1073/pnas.95.21.12474 (Zitiert auf Seite 9)
- [49] CRACKNELL J. A., WAIT A. F., LENZ O., FRIEDRICH B. UND ARMSTRONG F. A.: A kinetic and thermodynamic understanding of O<sub>2</sub> tolerance in [NiFe]-hydrogenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106(49), 20681–20686 (2009). doi: 10.1073/pnas.0905959106 (Zitiert auf Seite 9)
- [50] PIERIK A. J., SCHMELZ M., LENZ O., FRIEDRICH B. UND ALBRACHT S. P.: Characterization of the active site of a hydrogen sensor from *Alcaligenes eutrophus*. *FEBS Letters* 438(3), 231–235 (1998). doi: 10.1016/S0014-5793(98)01306-4 (Zitiert auf Seite 9)
- [51] BUHRKE T., LENZ O., KRAUSS N. UND FRIEDRICH B.: Oxygen Tolerance of the H<sub>2</sub>-sensing [NiFe] Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 Is Based on Limited Access of Oxygen to the Active Site. *Journal of Biological Chemistry* 280(25), 23791–23796 (2005). doi: 10.1074/jbc.M503260200 (Zitiert auf den Seiten 9 und 187)
- [52] DUCHE O., ELSSEN S., COURNAC L. UND COLBEAU A.: Enlarging the gas access channel to the active site renders the regulatory hydrogenase HupUV of *Rhodobacter capsulatus* O<sub>2</sub> sensitive without affecting its transducing activity. *FEBS Journal* 272(15), 3899–3908 (2005). doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04806.x (Zitiert auf Seite 9)
- [53] GOLDET G., WAIT A. F., CRACKNELL J. A., VINCENT K. A., LUDWIG M., LENZ O., FRIEDRICH B. UND ARMSTRONG F. A.: Hydrogen Production under Aerobic Conditions by Membrane-Bound Hydrogenases from *Ralstonia* Species. *Journal of the American Chemical Society* 130(33), 11106–11113 (2008). doi: 10.1021/ja8027668 (Zitiert auf Seite 10)

- [54] VINCENT K. A., PARKIN A., LENZ O., ALBRACHT S. P. J., FONTECILLA-CAMPS J. C., CAMMACK R., FRIEDRICH B. UND ARMSTRONG F. A.: Electrochemical Definitions of O Sensitivity and Oxidative Inactivation in Hydrogenases. *Journal of the American Chemical Society* 127(51), 18179–18189 (2005). doi: 10.1021/ja055160v (Zitiert auf Seite 10)
- [55] SAGGU M., TEUTLOFF C., LUDWIG M., BRECHT M., PANDELIA M.-E., LENZ O., FRIEDRICH B., LUBITZ W., HILDEBRANDT P., LENDZIAN F. UND BITTL R.: Comparison of the membrane-bound [NiFe] hydrogenases from *R. eutropha* H16 and *D. vulgaris* Miyazaki F in the oxidized ready state by pulsed EPR. *Physical Chemistry Chemical Physics* 12, 2139–2148 (2010). doi: 10.1039/B922236G (Zitiert auf den Seiten 10, 11, 58, 59, 60, 82, 94, 104, 105, 106, 139, 140 und 170)
- [56] GORIS T., WAIT A. F., SAGGU M., FRITSCH J., HEIDARY N., STEIN M., ZEBGER I., LENDZIAN F., ARMSTRONG F. A., FRIEDRICH B. UND LENZ O.: A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase. *Nature Chemical Biology* 7(5), 310–318 (2011). doi: 10.1038/nchembio.555 (Zitiert auf den Seiten 11, 54, 60 und 143)
- [57] FRITSCH J., SCHEERER P., FRIELINGSDORF S., KROSCHINSKY S., FRIEDRICH B., LENZ O. UND SPAHN C. M. T.: The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature* 479(7372), 249–252 (2011). doi: 10.1038/nature10505 (Zitiert auf den Seiten 11, 12, 54, 60, 70, 82, 84, 94, 116, 123, 139, 144, 154, 157 und 188)
- [58] FRIELINGSDORF S., FRITSCH J., SCHMIDT A., HAMMER M., LÖWENSTEIN J., SIEBERT E., PELMENSCHIKOV V., JAENICKE T., KALMS J., RIPPERS Y., LENDZIAN F., ZEBGER I., TEUTLOFF C., KAUPP M., BITTL R., HILDEBRANDT P., FRIEDRICH B., LENZ O. UND SCHEERER P.: Reversible [4Fe-3S] cluster morphing in an O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe] hydrogenase. *Nature Chemical Biology* 10(5), 378–385 (2014). doi: 10.1038/nchembio.1500 (Zitiert auf den Seiten 11, 54, 83, 85, 94, 130, 139, 144, 145, 146, 147, 148, 162, 180, 188 und 189)
- [59] LENZ O., LUDWIG M., SCHUBERT T., BÜRSTEL I., GANSKOW S., GORIS T., SCHWARZE A. UND FRIEDRICH B.: H<sub>2</sub> Conversion in the Presence of O<sub>2</sub> as Performed by the Membrane-Bound [NiFe]-Hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *ChemPhysChem* 11(6), 1107–1119 (2010). doi: 10.1002/cphc.200901002 (Zitiert auf Seite 11)
- [60] BRUGNA-GUIRAL M., TRON P., NITSCHKE W., STETTER K.-O., BURLAT B., GU-



- IGLIARELLI B., BRUSCHI M. UND GIUDICI-ORTICONI M. T.: [NiFe] hydrogenases from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: properties, function, and phylogenetics. *Extremophiles* 7(2), 145–157 (2003). doi: 10.1007/s00792-002-0306-3 (Zitiert auf Seite 11)
- [61] LUKEY M. J., ROESSLER M. M., PARKIN A., EVANS R. M., DAVIES R. A., LENZ O., FRIEDRICH B., SARGENT F. UND ARMSTRONG F. A.: Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenases: The Individual and Collective Importance of Supernumerary Cysteines at the Proximal Fe-S Cluster. *Journal of the American Chemical Society* 133(42), 16881–16892 (2011). doi: 10.1021/ja205393w (Zitiert auf den Seiten 12 und 58)
- [62] SHOMURA Y., HAGIYA K., YOON K.-S., NISHIHARAC H. UND HIGUCHI Y.: Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of membrane-bound respiratory [NiFe] hydrogenase from *Hydrogenovibrio marinus*. *Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 67(7), 827–829 (2011). doi: 10.1107/S1744309111019804 (Zitiert auf Seite 12)
- [63] BURGDORF T., LÖSCHER S., LIEBISCH P., VAN DER LINDEN E., GALANDER M., LENDZIAN F., MEYER-KLAUCKE W., ALBRACHT S. P. J., FRIEDRICH B., DAU H. UND HAUMANN M.: Structural and Oxidation-State Changes at Its Nonstandard Ni-Fe Site during Activation of the NAD-Reducing Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* Detected by X-ray Absorption, EPR, and FTIR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 127(2), 576–592 (2004). doi: 10.1021/ja0461926 (Zitiert auf den Seiten 12 und 185)
- [64] SCHNEIDER K. UND SCHLEGEL H. G.: Purification and Properties of Soluble Hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochimica et Biophysica Acta* 452(1), 66–80 (1976). doi: 10.1016/0005-2744(76)90058-9 (Zitiert auf Seite 12)
- [65] SCHNEIDER K. UND SCHLEGEL H. G.: Production of Superoxide Radicals by Soluble Hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochemical Journal* 193(1), 99–107 (1981). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1162581/> (Zitiert auf Seite 12)
- [66] BURGDORF T., VAN DER LINDEN E., BERNHARD M., YIN Q. Y., BACK J. W., HARTOG A. F., MUIJSERS A. O., DE KOSTER C. G., ALBRACHT S. P. J. UND FRIEDRICH B.: The Soluble NAD<sup>+</sup>-Reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 Consists of Six Subunits and Can Be Specifically Activated by NADPH. *Journal of Bacteriology* 187(9), 3122–3132 (2005). doi: 10.1128/JB.187.9.3122-3132.2005 (Zitiert auf Seite 13)

- [67] HAPPE R. P., ROSEBOOM W., EGERT G., FRIEDRICH C. G., MASSANZ C., FRIEDRICH B. UND ALBRACHT S. P. J.: Unusual FTIR and EPR properties of the H<sub>2</sub>-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Letters* 466(2–3), 259–263 (2000). doi: 10.1016/S0014-5793(99)01799-8 (Zitiert auf Seite 13)
- [68] VAN DER LINDEN E., BURGDORF T., BERNHARD M., BLEIJLEVENS B., FRIEDRICH B. UND ALBRACHT S. P. J.: The soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* contains four cyanides in its active site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 9(5), 616–626 (2004). doi: 10.1007/s00775-004-0555-y (Zitiert auf Seite 13)
- [69] BLEIJLEVENS B., BUHRKE T., VAN DER LINDEN E., FRIEDRICH B. UND ALBRACHT S. P. J.: The Auxiliary Protein HypX Provides Oxygen Tolerance to the Soluble [NiFe]-Hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16 by Way of a Cyanide Ligand to Nickel. *Journal of Biological Chemistry* 45, 46686–46691 (2004). doi: 10.1074/jbc.M406942200 (Zitiert auf Seite 13)
- [70] HORCH M., LAUTERBACH L., SAGGU M., HILDEBRANDT P., LENDZIAN F., BITTL R., LENZ O. UND ZEBGER I.: Probing the Active Site of an O<sub>2</sub>-Tolerant NAD<sup>+</sup>-Reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 by In Situ EPR and FTIR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition English* 49(43), 8026–8029 (2010). doi: 10.1002/anie.201002197 (Zitiert auf den Seiten 13, 14, 163 und 166)
- [71] HORCH M., RIPPERS Y., MROGINSKI M. A., HILDEBRANDT P. UND ZEBGER I.: Combining spectroscopy and theory to evaluate structural models of metalloenzymes: a case study on the soluble [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *ChemPhysChem* 14(1), 185–191 (2013). doi: 10.1002/cphc.201200853 (Zitiert auf den Seiten 13 und 163)
- [72] LAUTERBACH L. UND LENZ O.: Catalytic Production of Hydrogen Peroxide and Water by Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase during H<sub>2</sub> Cycling in the Presence of O<sub>2</sub>. *Journal of the American Chemical Society* 135(47), 17897–17905 (2013). doi: 10.1021/ja408420d (Zitiert auf den Seiten 13, 14 und 54)
- [73] ERKENS A., SCHNEIDER K. UND MÜLLER A.: The NAD-linked soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16: detection and characterization of EPR signals deriving from nickel and flavin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 1(2), 99–110 (1996). doi: 10.1007/s007750050028 (Zitiert auf Seite 13)

- [74] PANDELIA M.-E., OGATA H., CURRELL L. J., FLORES M. UND LUBITZ W.: Inhibition of the [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F by Carbon Monoxide: An FTIR and EPR Spectroscopic Study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797(2), 304–313 (2010). doi: 10.1016/j.bbabi.2009.11.002 (Zitiert auf Seite 13)
- [75] VAN DER LINDEN E., BURGDORF T., LACEY A. L. D., BUHRKE T., SCHOLTE M., FERNANDEZ V. M., FRIEDRICH B. UND ALBRACHT S. P. J.: An proved purification procedure for the soluble [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*: new insights into its (in)stability and spectroscopic properties. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11(2), 247–260 (2006). doi: 10.1007/s00775-005-0075-4 (Zitiert auf den Seiten 13 und 167)
- [76] KARSTENS K., WAHLEFELD S., HORCH M., GRUNZEL M., LAUTERBACH L., LENDZIAN F., ZEBGER I. UND LENZ O.: Impact of the Iron-Sulfur Cluster Proximal to the Active Site on the Catalytic Function of an O<sub>2</sub>-Tolerant NAD<sup>+</sup>-Reducing [NiFe]-Hydrogenase. *Biochemistry* 54(2), 389–403 (2015). doi: 10.1021/bi501347u (Zitiert auf den Seiten 14, 164 und 167)
- [77] HORCH M., LAUTERBACH L., MROGINSKI M. A., HILDEBRANDT P., LENZ O. UND ZEBGER I.: Reversible Active Site Sulfoxxygenation Can Explain the Oxygen Tolerance of a NAD(+)-Reducing [NiFe] Hydrogenase and Its Unusual Infrared Spectroscopic Properties. *Journal of the American Chemical Society* 137(7), 2555–2564 (2015). doi: 10.1021/ja5111154y (Zitiert auf den Seiten 14, 185 und 190)
- [78] OGATA H., NISHIKAWA K. UND LUBITZ W.: Hydrogens Detected by Subatomic Resolution Protein Crystallography in a [NiFe] Hydrogenase. *Nature* 520, 571–574 (2015). doi: 10.1038/nature14110 (Zitiert auf Seite 14)
- [79] GARCIN E., VERNEDE X., HATCHIKIAN E. C., VOLBEDA A., FREY M. UND FONTECILLA-CAMPS J. C.: The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure* 7(5), 557–566 (1999). doi: 10.1016/S0969-2126(99)80072-0 (Zitiert auf Seite 14)
- [80] ATHERTON N. M.: *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellis Horwood PTR Prentice Hall (1993) (Zitiert auf den Seiten 15 und 21)
- [81] WEIL J. A., BOLTON J. R. UND WERTZ J. E.: *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*. John Wiley & Sons (1994) (Zitiert auf Seite 15)

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [82] POOLE JR. C.: *Electron Spin Resonance: A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques*. Dover Publications, Inc., Mineola, New York (1983) (Zitiert auf Seite 15)
- [83] HOFF A.: *Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry*. Elsevier, Leiden, Niederlande (1989) (Zitiert auf den Seiten 15 und 27)
- [84] SCHWEIGER A. UND JESCHKE G.: *Principles of pulse electron paramagnetic resonance*. Oxford University Press (2001) (Zitiert auf den Seiten 15, 29, 33, 37, 38, 50 und 78)
- [85] JACKSON J.: *Classical Electrodynamics*. John Wiley & Sons, New York (1962) (Zitiert auf Seite 21)
- [86] FIEGE R., ZWEYGART W., BITTL R., ADIR N., RENGER G. UND LUBITZ W.: EPR and ENDOR studies of the water oxidizing complex of Photosystem II. *Photosynthesis Research* 48(1-2), 227–237 (1996). doi: 10.1007/BF00041013 (Zitiert auf Seite 22)
- [87] BENCINI A. UND GATTESCHI D.: *EPR of Exchange Coupled Systems*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany (1990) (Zitiert auf Seite 24)
- [88] TORREY H. C.: Transient Nutations in Nuclear Magnetic Resonance. *Physical Review* 76(8), 1059–1068 (1949). doi: 10.1103/PhysRev.76.1059 (Zitiert auf den Seiten 27 und 28)
- [89] RABI I. I.: Space Quantization in a Gyating Magnetic Field. *Physical Review* 51(1), 652–654 (1937). doi: 10.1103/PhysRev.51.652 (Zitiert auf Seite 28)
- [90] HAHN E. L.: Spin Echoes. *Physical Review* 80(4), 580–594 (1950). doi: 10.1103/PhysRev.80.580 (Zitiert auf Seite 29)
- [91] EATON S. S. UND EATON G. R.: Saturation Recovery EPR. In Eaton S. S., Eaton G. R. und Berliner L., Hrsg., *Biomedical EPR, Part B: Methodology, Instrumentation, and Dynamics*, Band 24B, Kap. 1, 3–18. Springer Science New York (2005). doi: 10.1007/0-306-48533-8\_1 (Zitiert auf Seite 32)
- [92] BRUSTOLON M., MANIERO A. L., BONORA M. UND SEGRE U.: Electron spin relaxation times and internal motions of radicals in the solid state investigated by ENDOR and pulsed EPR. *Applied Magnetic Resonance* 11(1), 99–103 (1996). doi: 10.1007/BF03163530 (Zitiert auf Seite 33)
- [93] YIN J.-J. UND HYDE J. S.: Spin-Label Saturation-Recovery Electron Spin Resonance Measurement of Oxygen Transport in Membranes. *Zeitschrift für Physikalische Che-*

- mie* 153(1\_2), 57–65 (1987). doi: 10.1524/zpch.1987.153.Part\_1\_2.057 (Zitiert auf den Seiten 33 und 114)
- [94] HYDE J. S.: Saturation recovery methodology. In Kevan L. und Schwartz R. N., Hrsg., *Time Domain Electron Spin Resonance*, 1–30. John Wiley & Sons (1979) (Zitiert auf den Seiten 33 und 114)
- [95] LUPULESCU A., KOTECHA M. UND FRYDMAN L.: Relaxation-Assisted Separation of Chemical Sites in NMR Spectroscopy of Static Solids. *Journal of the American Chemical Society* 125(11), 3376–3383 (2003). doi: 10.1021/ja021173m (Zitiert auf den Seiten 33 und 34)
- [96] MALY T., MACMILLAN F., ZWICKER K., KASHANI-POOR N., BRANDT U. UND PRISNER T. F.: Relaxation filtered hyperfine (REFINE) spectroscopy: a novel tool for studying overlapping biological electron paramagnetic resonance signals applied to mitochondrial complex I. *Biochemistry* 43(13), 3969–3978 (2004). doi: 10.1021/bi035865e (Zitiert auf Seite 33)
- [97] MALY T. UND PRISNER T. F.: Relaxation filtered hyperfine spectroscopy (REFINE). *Journal of Magnetic Resonance* 170(1), 88–96 (2004). doi: 10.1016/j.jmr.2004.06.003 (Zitiert auf Seite 33)
- [98] LYUBENOVA S., MALY T., ZWICKER K., BRANDT U., LUDWIG B. UND PRISNER T.: Multifrequency Pulsed Electron Paramagnetic Resonance on Metalloproteins. *Accounts of Chemical Research* 43(2), 181–189 (2010). doi: 10.1021/ar900050d (Zitiert auf Seite 33)
- [99] MALY T., ZWICKER K., CERNESCU A., BRANDT U. UND PRISNER T. F.: New pulsed EPR methods and their application to characterize mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787(6), 584–592 (2009). doi: 10.1016/j.bbabi.2009.02.003 (Zitiert auf den Seiten 33 und 35)
- [100] CERNESCU A., MALY T. UND PRISNER T. F.: 2D-REFINE spectroscopy: Separation of overlapping hyperfine spectra. *Journal of Magnetic Resonance* 192(19), 78–84 (2008). doi: 10.1016/j.jmr.2008.02.018 (Zitiert auf den Seiten 34 und 36)
- [101] CRAIG I. J. D. UND THOMPSON A. M.: Why Laplace transforms are difficult to invert numerically. *Computers in Physics* 8(6), 648–654 (1994). doi: 10.1063/1.4823347 (Zitiert auf Seite 35)
- [102] STOLL S., JESCHKE G., WILLER M. UND SCHWEIGER A.: Nutation-Frequency Cor-

- related EPR Spectroscopy: The PEANUT Experiment. *Journal of Magnetic Resonance* 130(1), 86–96 (1998). doi: 10.1006/jmre.1997.1285 (Zitiert auf den Seiten 37, 38 und 72)
- [103] MIMS W. B.: Spin Echoes from Broad Resonance Lines with High Turning Angles. *Physical Review* 141(2), 499–502 (1966). doi: 10.1103/PhysRev.141.499 (Zitiert auf Seite 37)
- [104] ASTASHKIN A. UND SCHWEIGER A.: Electron-spin transient nutation: a new approach to simplify the interpretation of ESR spectra. *Chemical Physics Letters* 174(6), 595–602 (1990). doi: 10.1016/0009-2614(90)85493-V (Zitiert auf Seite 37)
- [105] WILLER M. UND SCHWEIGER A.: Forbidden-transition-labelled EPR (FORTE): An approach for the sensitive measurement of forbidden EPR transitions. *Chemical Physics Letters* 230(1–2), 67–74 (1994). doi: 10.1016/0009-2614(94)01133-8 (Zitiert auf Seite 37)
- [106] STEHLIK D., BOCK C. H. UND THURNAUER M. C.: Chapter 11 - Transient EPR-Spectroscopy of Photoinduced Electronic Spin States in Rigid Matrices. In Hoff A., Hrsg., *Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry*, Kap. 11, 371–403. Elsevier, Leiden, Niederlande (1989). doi: 10.1016/B978-0-444-88050-5.50016-1 (Zitiert auf Seite 37)
- [107] DREW S. C., PILBROW J. F. B. A. R., BOYD P. D. W., PAUL P. UND REED C. A.: Spin States of  $C_{60}^{3-}$  and  $C_{120}O^{n-}$  ( $n = 2, 3, 4$ ) Anions Using Electron Spin Transient Nutation Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* 107(41), 11353–11359 (2003). doi: 10.1021/jp035632x (Zitiert auf den Seiten 38 und 78)
- [108] BAUMGARTEN M.: EPR of Free Radicals in Solids II – Trends in Methods and Applications. In Lund A. und Shiotani M., Hrsg., *Progress in Theoretical Chemistry and Physics*, Band 25, Kap. 5. High Spin Molecules Directed Towards Molecular Magnets, 205–244. Springer Science New York (2003). doi: 10.1007/978-94-007-4887-3 (Zitiert auf Seite 38)
- [109] SHOHOJI M. C. B. L., FRANCO M. L. T. M. B., LAZANA M. C. R. L. R., NAKAZAWA S., SATO K., SHIOMI D. UND TAKUI T.: Electronic Quartet and Triplet States of Polyanionic  $C_{60}$  Fullerene and Their Anomalous Spin Relaxation As Studied by cw-ESR/2D-Electron Spin Transient Nutation Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 122(12), 2962–2963 (2000). doi: 10.1021/ja993866h (Zitiert auf den Seiten 38 und 78)

- [110] ROWAN L. G., HAHN E. L. UND MIMS W. B.: Electron-Spin-Echo Envelope Modulation. *Physical Review* 137(1A), A61–A71 (1965). doi: 10.1103/PhysRev.137.A61 (Zitiert auf Seite 39)
- [111] MIMS W. B., NASSAU K. UND MCGEE J. D.: Spectral Diffusion in Electron Resonance Lines. *Physical Review* 123(6), 2059–2069 (1961). doi: 10.1103/PhysRev.123.2059 (Zitiert auf Seite 39)
- [112] MIMS W. B.: Envelope Modulation in Spin-Echo Experiments. *Physical Review B* 5(7), 2409–2419 (1972). doi: 10.1103/PhysRevB.5.2409 (Zitiert auf den Seiten 39, 41 und 47)
- [113] MIMS W. B.: Amplitudes of Superhyperfine Frequencies Displayed in the Electron-Spin-Echo Envelope. *Physical Review B* 6(9), 3543–3545 (1972). doi: 10.1103/PhysRevB.6.3543 (Zitiert auf Seite 39)
- [114] DIKANOV S. A. UND TSVETKOV Y. D.: *Electron Spin Echo Envelope Modulation (Eseem) Spectroscopy*. CRC press, Boca Raton, FL, USA (1992). ISBN 9780849342240 (Zitiert auf den Seiten 39, 40 und 43)
- [115] DELIGIANNAKIS Y., LOULUDI M. UND HADJILIADIS N.: Electron spin echo envelope modulation (ESEEM) spectroscopy as a tool to investigate the coordination environment of metal centers. *Coordination Chemistry Reviews* 204(1), 1–112 (2000). doi: 10.1016/S0010-8545(99)00218-0 (Zitiert auf Seite 39)
- [116] KEVAN L. UND SCHWARTZ R. N.: *Time Domain Electron Spin Resonance*. John Wiley & Sons, New York (1979) (Zitiert auf Seite 39)
- [117] HARRIS F. J.: On the use of windows for harmonic analysis with the discrete Fourier transform. *Proceedings of the IEEE* 66(1), 51–83 (2015). doi: 10.1109/PROC.1978.10837 (Zitiert auf Seite 40)
- [118] FAUTH J.-M., SCHWEIGER A., BRAUNSCHWEILER L., FORRER J. UND ERNST R.: Elimination of unwanted echoes and reduction of dead time in three-pulse electron spin-echo spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* 66(1), 74–85 (1986). doi: 10.1016/0022-2364(86)90105-8 (Zitiert auf Seite 42)
- [119] LAI A., FLANAGAN H. L. UND SINGEL D. J.: Multifrequency electron spin echo envelope modulation in  $S=1/2$ ,  $I=1/2$  systems: Analysis of the spectral amplitudes, line shapes, and linewidths. *Journal of Chemical Physics* 89(12), 7161–7166 (1988). doi: 10.1063/1.455293 (Zitiert auf Seite 42)

- [120] REIJERSE E. J. UND DIKANOV S. A.: Electron spin echo envelope modulation spectroscopy on orientationally disordered systems: Line shape singularities in  $S=1/2$ ,  $I=1/2$  spin systems. *Journal of Chemical Physics* 95(2), 836–845 (1991). doi: 10.1063/1.461091 (Zitiert auf Seite 42)
- [121] FLANAGAN H. L. UND SINGEL D. J.: Analysis of  $^{14}\text{N}$  ESEEM patterns of randomly oriented solids. *Journal of Chemical Physics* 87(10), 5606–5616 (1987). doi: 10.1063/1.453532 (Zitiert auf Seite 43)
- [122] BRITT R. D., SAUER K., KLEIN M. P., KNAFF D. B., KRIAUCIUNAS A., YU C. A., YU L. UND MALKIN R.: Electron spin echo envelope modulation spectroscopy supports the suggested coordination of two histidine ligands to the Rieske iron-sulfur centers of the cytochrome  $b_6f$  complex on spinach and the cytochrome  $bc_1$  complexes of *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides* R-26, and bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 30(7), 1892–1901 (1991). doi: 10.1021/bi00221a023 (Zitiert auf Seite 43)
- [123] ASTASHKIN A. V., DIKANOV S. A. UND TSVETKOV Y. D.: Modulation effects from  $^{14}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  nitrogen nuclei in the electron spin echo of imidazoline nitroxyl radicals containing the 2-oximinoalkyl group. *Journal of Structural Chemistry* 25(1), 45–55 (1984). <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00808550> (Zitiert auf Seite 43)
- [124] TYRYSHKIN A. M., DIKANOV S. A. UND GOLDFARB D.: Sum Combination Harmonics in Four-Pulse ESEEM Spectra. Study of the Ligand Geometry in Aqua-Vanadyl Complexes in Polycrystalline and Glass Matrices. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 105(3), 271–283 (1993). doi: 10.1006/jmra.1993.1281 (Zitiert auf den Seiten 44, 45 und 47)
- [125] MATAR K. UND GOLDFARB D.: The Combination Harmonics in Four-Pulse Electron-Spin-Echo Envelope Modulation of a  $S = 1/2$ ,  $I = 5/2$  Spin System Under Orientational Disorder. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 111(1), 50–61 (1994). doi: 10.1006/jmra.1994.1225 (Zitiert auf Seite 44)
- [126] GEMPERLE C., AEBLI G., SCHWEIGER A. UND ERNST R.: Phase cycling in pulse EPR. *Journal of Magnetic Resonance* 88(2), 241–256 (1990). doi: 10.1016/0022-2364(90)90181-8 (Zitiert auf den Seiten 44 und 45)
- [127] HÖFER P. UND A. GRUPP M. M., H. NEBENFÜHR: Hyperfine sublevel correlation (HYSCORE) spectroscopy: a 2D ESR investigation of the squaric acid radical. *Chem-*



- cal Physics Letters* 132(3), 279–282 (1986). doi: 10.1016/0009-2614(86)80124-5 (Zitiert auf Seite 44)
- [128] HÖFER P.: Distortion-Free Electron-Spin-Echo Envelope-Modulation Spectra of Disordered Solids Obtained from Two-Dimensional and Three-Dimensional HYSORE Experiments. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 111(1), 77–86 (1994). doi: 10.1006/jmra.1994.1228 (Zitiert auf Seite 46)
- [129] DIKANOV S. A., XUN L., KARPIEL A. B., TYRYSHKIN A. M. UND BOWMAN M. K.: Orientationally-Selected Two-Dimensional ESEEM Spectroscopy of the Rieske-Type Iron-Sulfur Cluster in 2,4,5-Trichlorophenoxyacetate Monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100. *Journal of the American Chemical Society* 118(35), 8408–8416 (1996). doi: 10.1021/ja960781x (Zitiert auf Seite 47)
- [130] FEHER G.: Observation of Nuclear Magnetic Resonances via the Electron Spin Resonance Line. *Physical Review* 103(3), 834–835 (1956). doi: 10.1103/PhysRev.103.834 (Zitiert auf Seite 48)
- [131] FEHER G.: Electron Spin Resonance Experiments on Donors in Silicon. I. Electronic Structure of Donors by the Electron Nuclear Double Resonance Technique. *Physical Review* 114(5), 1219–1244 (1959). doi: 10.1103/PhysRev.114.1219 (Zitiert auf Seite 48)
- [132] DAVIES E. R.: A new pulse ENDOR technique. *Physics Letters* 47, 1–2 (1974). doi: 10.1016/0375-9601(74)90078-4 (Zitiert auf Seite 48)
- [133] PRISNER T., ROHRER M. UND MACMILLAN F.: Pulsed EPR spectroscopy: Biological applications. *Annual Review of Physical Chemistry* 52, 279–313 (2001). doi: 10.1146/annurev.physchem.52.1.279 (Zitiert auf Seite 49)
- [134] GEMPERLE C. UND SCHWEIGER A.: Pulsed Electron-Nuclear Double Resonance Methodology. *Chemical Reviews* 91(7), 1481–1505 (1991). doi: 10.1021/cr00007a011 (Zitiert auf Seite 49)
- [135] COLLIGIANI A.: Nuclear quadrupole resonance data (I=1) from endor experiments. *Journal of Molecular Structure* 58, 53–61 (1980). doi: 10.1016/0022-2860(80)85007-1 (Zitiert auf Seite 50)
- [136] FAN C., DOAN P. E., DAVOUST C. E. UND HOFFMAN B. M.: Quantitative studies of davies pulsed ENDOR. *Journal of Magnetic Resonance* 98(1), 62–72 (1969). doi: 10.1016/0022-2364(92)90109-K (Zitiert auf Seite 50)
- [137] HARMER J., MITRIKAS G. UND SCHWEIGER A.: Advanced Pulse EPR Methods for

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- the Characterization of Metalloproteins. In Hanson G. und Berliner L., Hrsg., *High Resolution EPR*, Band 28, Kap. 2, 13–61. Springer Science New York (2009). doi: 10.1007/978-0-387-84856-3\_2 (Zitiert auf Seite 50)
- [138] DOAN P. E., LEES N. S., SHANMUGAM M. UND HOFFMAN B. M.: Simulating Suppression Effects in Pulsed ENDOR, and the ‘Hole in the Middle’ of Mims and Davies ENDOR Spectra. *Applied Magnetic Resonance* 37(1), 763–779 (2010). doi: 10.1007/s00723-009-0083-6 (Zitiert auf Seite 50)
- [139] WUKOWITZ S. W. UND YEATES T. O.: Why protein crystals favour some space-groups over others. *Nature Structural Biology* 2(12), 1062–1067 (1995). doi: 10.1038/nsb1295-1062 (Zitiert auf den Seiten 54 und 84)
- [140] FRITSCH J.: *Molekulare Grundlagen der Sauerstofftoleranz der membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase aus Ralstonia eutropha H16*. Ph.D. thesis, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Deutschland (2011) (Zitiert auf den Seiten 54 und 63)
- [141] STOLL S. UND SCHWEIGER A.: EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *Journal of Magnetic Resonance* 178(1), 42–55 (2006). doi: 10.1016/j.jmr.2005.08.013 (Zitiert auf den Seiten 56 und 81)
- [142] STOLL S. UND BRITT R. D.: General and efficient simulation of pulse EPR spectra. *Physical Chemistry Chemical Physics* 11, 6614–6625 (2009). doi: 10.1039/b907277b (Zitiert auf den Seiten 56 und 81)
- [143] PANDELIA M.-E., BYKOV D., IZSAK R., INFOSSI P., GIUDICI-ORTICONI M.-T., BILL E., NEESE F. UND LUBITZ W.: Electronic structure of the unique [4Fe-3S] cluster in O<sub>2</sub>-tolerant hydrogenases characterized by <sup>57</sup>Fe Mößbauer and EPR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 110(2), 483–488 (2013). doi: 10.1073/pnas.1202575110 (Zitiert auf den Seiten 58, 60, 61, 82, 84, 104, 105, 154, 156, 159 und 161)
- [144] TROFANCHUK O., STEIN M., GESSNER C., LENDZIAN F., HIGUCHI Y. UND LUBITZ W.: Single crystal EPR studies of the oxidized active site of [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 5(1), 36–44 (2000). <http://link.springer.com/article/10.1007/PL00010654> (Zitiert auf den Seiten 59, 82 und 89)
- [145] PRIEBE J.: *EPR-spektroskopische Untersuchungen an Hydrogenasen*. Diplomarbeit,

- Technische Universität Berlin, Berlin, Deutschland (2011) (Zitiert auf den Seiten 61, 63, 70, 115, 116 und 119)
- [146] BRECHT M.: *Hochfeld- und Puls-EPR-Untersuchungen an den Kofaktoren von [NiFe]-Hydrogenasen: Beiträge zur Klärung des Mechanismus der biologischen Wasserstoffspaltung*. Doktorarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin, Deutschland (2001) (Zitiert auf Seite 61)
- [147] PANDELIA M.-E., NITSCHKE W., INFOSSI P., GIUDICI-ORTICONI M.-T., BILL E. UND LUBITZ W.: Characterization of a unique [FeS] cluster in the electron transfer chain of the oxygen tolerant [NiFe] hydrogenase from *Aquifex aeolicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 108(15), 6097–6102 (2011). doi: 10.1073/pnas.1100610108 (Zitiert auf den Seiten 61, 105, 107, 109 und 110)
- [148] PANDELIA M.-E., OGATA H. UND LUBITZ W.: Intermediates in the Catalytic Cycle of [NiFe] Hydrogenase: Functional Spectroscopy of the Active Site. *ChemPhysChem* 11(6), 1127–1140 (2010). doi: 10.1002/cphc.200900950 (Zitiert auf Seite 61)
- [149] DUFF J. L. C., BRETON J. L. J., BUTT J. N., ARMSTRONG F. A. UND THOMSON A. J.: Novel Redox Chemistry of [3Fe-4S] Clusters: Electrochemical Characterization of the All-Fe(II) Form of the [3Fe-4S] Cluster Generated Reversibly in Various Proteins and Its Spectroscopic Investigation in *Sulfolobus acidocaldarius* Ferredoxin. *Journal of the American Chemical Society* 118(36), 8593–8603 (1996). doi: 10.1021/ja961465l (Zitiert auf den Seiten 70 und 118)
- [150] THOMSON A. J., ROBINSON A. E., JOHNSON M. K., MOURA J. J. G., MOURA I., XAVIER A. V. UND LEGALL J.: The three-iron cluster in a ferredoxin from *Desulphovibrio gigas* A low-temperature magnetic circular dichroism study. *Biochimica et Biophysica Acta* 670(1), 93–100 (1981). doi: 10.1016/0005-2795(81)90053-2 (Zitiert auf Seite 70)
- [151] WILLER M. UND SCHWEIGER A.: Determination of g values by a new electron spin transient nutation experiment: the  $g_{\perp}$  value of titanium-doped sapphire. *Chemical Physics Letters* 264(1-2), 1–8 (1997). doi: 10.1016/S0009-2614(96)01311-5 (Zitiert auf Seite 72)
- [152] TAKUI T., SATO K., SHIOMI D., ITOH K., KANEKO T., TSUCHIDA E. UND NISHIDE H.: FT Pulsed ESR/Electron Spin Transient Nutation (ESTN) Spectroscopy Applied to High-Spin Systems in Solids; Direct Evidence of a Topologically Controlled High-Spin Polymer as Models for Quasi 1D Organic Ferro- and Superpara-Magnets.

- Molecular Crystals and Liquids Crystals Science and Technology Section A Molecular Crystals and Liquid Crystals* 279(1), 155–176 (1996). doi: 10.1080/10587259608042188 (Zitiert auf Seite 77)
- [153] GUIGLIARELLI B., MORE C., FOURNEL A., ASSO M., HATCHIKIAN E. C., WILLIAMS R., CAMMACK R. UND BERTRAND P.: Structural organization of the Ni and (4Fe-4S) centers in the active form of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. Analysis of the magnetic interactions by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 34(14), 4781–4790 (1995). doi: 10.1021/bi00014a036 (Zitiert auf den Seiten 105, 106, 120 und 164)
- [154] TEIXEIRA M., MOURA I., XAVIER A. V., MOURA J. J. G., LEGALL J., DERVARTANIAN D. V., PECK JR. H. D. UND HUYNH B.-H.: Redox intermediates of *Desulfovibrio gigas* [NiFe] hydrogenase generated under hydrogen. Mößbauer and EPR characterization of the metal centers. *Journal of Biological Chemistry* 264(28), 16435–16450 (1989). <http://www.jbc.org/content/264/28/16435> (Zitiert auf den Seiten 106, 107, 108, 112, 118, 154, 155, 156, 161 und 189)
- [155] DOLE F., MEDINA M., MORE C., CAMMACK R., BERTRAND P. UND GUIGLIARELLI B.: Spin-Spin Interactions between the Ni Site and the [4Fe-4S] Centers as a Probe of Light-Induced Structural Changes in Active *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase. *Biochemistry* 35(50), 16399–16406 (1996). doi: 10.1021/bi961662x (Zitiert auf Seite 106)
- [156] LAZUKIN V. N., CHEPELEVA I. V., ZHILINSKAYA E. A. UND CHERNOV A. P.: On the hyperfine structure of the  $Mn^{2+}$  EPR line with  $g = 4.3$  in chalcogenide glasses of some ternary systems. *Physica Status Solidi B: Basic Solid State Physics* 69(2), 399–405 (1975). doi: 10.1002/pssb.2220690211 (Zitiert auf Seite 106)
- [157] FEDOTOVS A., BERZINS D., SARAKOVSKIS A., ROGULIS U. UND DOKE G.: EPR studies of the oxyfluoride glass ceramics using  $Mn^{2+}$  as a paramagnetic probe. *IOP Conf Series: Materials Science and Engineering* 15(1), 1–4 (2010). doi: 10.1088/1757-899X/15/1/012068 (Zitiert auf Seite 106)
- [158] HUYNH B.-H., PATIL D. S., MOURA I., TEIXEIRA M., MOURA J. J. G., DERVARTANIAN D. V., CZECHOWSKI M. H., PRICKRIL B. C., PECK JR. H. D. UND LEGALL J.: On the active sites of the [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. Mößbauer and redox-titration studies. *Journal of Biological Chemistry* 262(2), 795–800 (1987). doi: <http://www.jbc.org/content/262/2/795> (Zitiert auf Seite 107)

- [159] PAPAETHYMIU V., GIRERD J. J., MOURA I., MOURA J. J. G. UND MÜNCK E.: Mößbauer Study of *D. gigas* Ferredoxin II and Spin-Coupling Model for Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub> Cluster with Valence Delocalization. *Journal of the American Chemical Society* 109(15), 4073–4710 (1987). doi: 10.1021/ja00249a037 (Zitiert auf den Seiten 107 und 118)
- [160] KENT T. A., DREYER J.-L., KENNEDY M. C., HUYNH B.-H., EMPTAGE M. H., BEINERT H. UND MÜNCK E.: Mößbauer studies of beef heart aconitase: evidence for facile interconversions of iron-sulfur clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 79(4), 1096–1100 (1982). <http://www.pnas.org/content/79/4/1096> (Zitiert auf Seite 108)
- [161] EMPTAGE M. H., KENT T. A., KENNEDY M. C., BEINERT H. UND MÜNCK E.: Mößbauer and EPR studies of activated aconitase: Development of a localized valence state at a subsite of the [4Fe-4S] cluster on binding of citrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 80(15), 4674–4678 (1983). <http://www.pnas.org/content/80/15/4674> (Zitiert auf Seite 108)
- [162] EMPTAGE M. H., DREYER J.-L., KENNEDY M. C. UND BEINERT H.: Optical and EPR Characterization of Different Species of Active and Inactive Aconitase. *Journal of Biological Chemistry* 258(18), 11106–11111 (1983). <http://www.jbc.org/content/258/18/11106> (Zitiert auf Seite 108)
- [163] SCHNEIDER K., PATIL D. S. UND CAMMACK R.: ESR properties of membrane-bound hydrogenases from aerobic hydrogen bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 748(3), 353–361 (1983). doi: 10.1016/0167-4838(83)90179-6 (Zitiert auf Seite 109)
- [164] ROESSLER M. M., EVANS R. M., DAVIES R. A., HARMER J. UND ARMSTRONG F. A.: EPR Spectroscopic Studies of the Fe–S clusters in the O<sub>2</sub>-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase Hyd-1 from *Escherichia coli* and Characterization of the Unique [4Fe–3S] Cluster by HYSORE. *Journal of the American Chemical Society* 134(37), 15581–15594 (2012). doi: 10.1021/ja307117y (Zitiert auf den Seiten 110, 119, 128, 131, 140, 146, 166 und 180)
- [165] BERTRAND P., CAMENSULI P., MORE C. UND GUIGLIARELLI B.: A Local Spin Model to Describe the Magnetic Interactions in Biological Molecules Containing [4Fe–4S]<sup>+</sup> Clusters. Application to Ni–Fe Hydrogenases. *Journal of the American Chemical Society* 118(6), 1426–1434 (1996). doi: 10.1021/ja951981w (Zitiert auf den Seiten 115 und 120)
- [166] PIERIK A. J., HAGEN W. R., REDEKER J. S., WOLBERT R. B. G., BOERSMA M.,

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- VERHAGEN M. F. J. M., GRANDE H. J., VEEGER C., MUTSAERS P. H. A., SANDS R. H. UND DUNHAM W. R.: Redox properties of the iron-sulfur clusters in activated Fe-hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *FEBS Letters* 209(1), 63–72 (1992). doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17261.x (Zitiert auf Seite 115)
- [167] YU L., ZHAO J., LU W., BRYANT D. A. UND GOLBECK J. H.: Characterization of the [3Fe-4S] and [4Fe-4S] clusters in unbound PsaC mutants C14D and C51D. Midpoint potentials of the single [4Fe-4S] clusters are identical to F<sub>A</sub> and F<sub>B</sub> in bound PsaC of photosystem I. *Biochemistry* 32(32), 8251–8258 (1993). doi: 10.1021/bi00083a028 (Zitiert auf Seite 115)
- [168] CHATELET C. UND MEYER J.: The [2Fe-2S] protein I (Shetna protein I) from *Azotobacter vinelandii* is homologous to the [2Fe-2S] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 4(3), 311–317 (1999). doi: 10.1007/s007750050317 (Zitiert auf Seite 115)
- [169] GURBIEL R. J., BATIE C. J., SIVARAJA M., TRUE A. E., FEE J. A., HOFFMAN B. M. UND BALLOU D. P.: Electron-Nuclear Double Resonance Spectroscopy of <sup>15</sup>N-Enriched Phthalate Dioxygenase from *Pseudomonas cepacia* Proves That Two Histidines Are Coordinated to the [2Fe-2S] Rieske-Type Clusters. *Biochemistry* 28(11), 4861–4871 (1998). doi: 10.1021/bi00437a051 (Zitiert auf den Seiten 117, 126 und 128)
- [170] ALBRACHT S. P. J.: Nickel hydrogenases: in search of the active site. *Biochimica et Biophysica Acta* 1188(3), 167–204 (1994). doi: 10.1016/0005-2728(94)90036-1 (Zitiert auf den Seiten 117 und 180)
- [171] MATHEWS R., CHARLTON S., SANDS R. H. UND PALMER G.: On the Nature of the Spin Coupling between the Iron-Sulfur Clusters in the Eight-Iron Ferredoxins. *Journal of Biological Chemistry* 249(13), 4326–4328 (1974). <http://www.jbc.org/content/249/13/4326> (Zitiert auf Seite 120)
- [172] GUIGLIARELLI B., GUILLAUSIER J., MORE C., SETIF P., BOTTIN H. UND BERTRAND P.: Structural Organization of the Iron-Sulfur Centers in *Synechocystis* 6803 Photosystem I. *Journal of Biological Chemistry* 268(2), 900–908 (1993). <http://www.jbc.org/content/268/2/900> (Zitiert auf Seite 120)
- [173] MORE C., CAMENSULI P., DOLE F., GUIGLIARELLI B., ASSO M., FOURNE A. UND BERTRAND P.: A new approach for the structural study of metalloproteins: the quantitative analysis of intercenter magnetic interactions. *Journal of Biological*

- Inorganic Chemistry* 1(2), 152–161 (1996). doi: 10.1007/s007750050034 (Zitiert auf Seite 120)
- [174] DICUS M. M., CONLAN A., NECHUSHTAI R., JENNINGS P. A., PADDOCK M. L., BRITT R. D. UND STOLL S.: Binding of Histidine in the (Cys)<sub>3</sub>(His)<sub>1</sub>-Coordinated [2Fe–2S] Cluster of Human MitoNEET. *Journal of the American Chemical Society* 132(6), 2037–2049 (2010). doi: 10.1021/ja909359g (Zitiert auf Seite 126)
- [175] CAMMACK R. UND MACMILLAN F.: Electron Magnetic Resonance of Iron–Sulfur Proteins in Electron-Transfer Chains: Resolving Complexity. In Hanson G. und Berliner L., Hrsg., *Metals in Biology: Applications of High-Resolution EPR to Metalloenzymes*, Band 49, Kap. 2, 11–44. Springer Science New York (2010). doi: 10.1007/978-1-4419-1139-1\_2 (Zitiert auf Seite 126)
- [176] BENDER C. J., ROSENZWEIG A. C., LIPPARD S. J. UND PEISACH J.: Nuclear Hyperfine Coupling of Nitrogen in the Coordination Sphere of the Diiron Center of Methane Monooxygenase Hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* 269(23), 15993–15998 (1994). <http://www.jbc.org/content/269/23/15993> (Zitiert auf Seite 128)
- [177] MAGLIOZZO R. S. UND PEISACH J.: Evaluation of Nitrogen Nuclear Hyperfine and Quadrupole Coupling Parameters for the Proximal Imidazole in Myoglobin-Azide, -Cyanide, and -Mercaptoethanol Complexes by Electron Spin Echo Envelope Modulation Spectroscopy. *Biochemistry* 32(33), 8446–8456 (1993). doi: 10.1021/bi00084a009 (Zitiert auf Seite 128)
- [178] MIYAMOTO R., OHBA Y. UND IWAIZUMI M.: Hyperfine interactions of coordinating nitrogens in the copper(II) complexes having a N2S2 donor set and blue copper proteins. *Inorganic Chemistry* 29(17), 3234–3238 (1990). doi: 10.1021/ic00342a037 (Zitiert auf Seite 128)
- [179] PETERS J. W., STOWELL M. H. B., SOLTIS S. M., FINNEGAN M. G., JOHNSON M. K. UND REES D. C.: Redox-Dependent Structural Changes in the Nitrogenase P-Cluster. *Biochemistry* 36(6), 1181–1187 (1997). doi: 10.1021/bi9626665 (Zitiert auf Seite 130)
- [180] HUANG W., JIA J., CUMMINGS J., NELSON M., SCHNEIDER G. UND LINDQVIST Y.: Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold. *Structure* 5(5), 691–699 (1997). doi: 10.1016/S0969-2126(97)00223-2 (Zitiert auf Seite 130)

- [181] SHOMURA Y., YOON K.-S., NISHIHARA H. UND HIGUCHI Y.: Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *Nature* 479(7372), 253–256 (2011). doi: 10.1038/nature10504 (Zitiert auf Seite 131)
- [182] VOLBEDA A., AMARA P., DARNAULT C., MOUESCA J.-M., PARKIN A., ROESSLER M. M., ARMSTRONG F. A. UND FONTECILLA-CAMPS J. C.: X-ray crystallographic and computational studies of the O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe]-hydrogenase 1 from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 109(14), 5305–5310 (2012). doi: 10.1073/pnas.1119806109 (Zitiert auf Seite 131)
- [183] CHAPMAN A., CAMMACK R., HATCHIKIAN C. E., MCCRACKEN J. UND PEISACH J.: A pulsed EPR study of redox-dependent hyperfine interactions for the nickel centre of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. *FEBS Letters* 242(1), 134–138 (1988). doi: 10.1016/0014-5793(88)81001-9 (Zitiert auf den Seiten 140 und 180)
- [184] AGRAWAL A. G., VAN GASTEL M., GÄRTNER W. UND LUBITZ W.: Hydrogen Bonding Affects the [NiFe] Active Site of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F Hydrogenase: A Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy and Density Functional Theory Study. *Journal of Physical Chemistry B* 110(15), 8142–8150 (2006). doi: 10.1021/jp0573902 (Zitiert auf den Seiten 140, 178 und 180)
- [185] CAMMACK R., KOVACS K. L., MCCRACKEN J. UND PEISACH J.: Spectroscopic characterization of the nickel and iron-sulphur clusters of hydrogenase from the purple photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*; 2. Electron spin-echo spectroscopy. *European Journal of Biochemistry* 182(2), 363–366 (1989). doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14839.x (Zitiert auf den Seiten 140 und 180)
- [186] EDMONDS D. T. UND SUMMERS C. P.: <sup>14</sup>N Pure Quadrupole Resonance in Solid Amino Acids. *Journal of Magnetic Resonance* 12(1), 134–142 (1973). doi: 10.1016/0022-2364(73)90136-4 (Zitiert auf Seite 144)
- [187] EDMONDS D. T.: Nuclear Quadrupole Double Resonance. *Physics Reports* 29(4), 233–290 (1977). doi: 10.1016/0370-1573(77)90062-X (Zitiert auf den Seiten 144 und 180)
- [188] EDMONDS D. T. UND SPEIGHT P. A.: Nitrogen quadrupole resonance in amino acids. *Physics Letters A* 34(6), 325–326 (1971). doi: 10.1016/0375-9601(71)90894-2 (Zitiert auf Seite 144)
- [189] BLINC R., MALI M., OSREDKAR R., SELIGER J. UND EHRENBERG L.: <sup>14</sup>N Qua-



- drupole Resonance in Polyglycine. *Chemical Physics Letters* 28(2), 158–159 (1974). doi: 10.1016/0009-2614(74)80041-2 (Zitiert auf Seite 144)
- [190] HUNT M. J., MACKAY A. L. UND EDMONDS D. T.: Nuclear quadrupole resonance of  $^{14}\text{N}$  in imidazole and related compounds. *Chemical Physics Letters* 34(3), 473–475 (1975). doi: 10.1016/0009-2614(75)85542-4 (Zitiert auf Seite 144)
- [191] KOO J. UND HSIEH Y.-N.:  $^{14}\text{N}$  nuclear quadrupole coupling constants in imidazole. *Chemical Physics Letters* 9(3), 238–241 (1971). doi: 10.1016/0009-2614(71)85039-X (Zitiert auf Seite 144)
- [192] CHRISTEN D., GRIFFITHS J. H. UND SHERIDAN J.: The Microwave Spectrum of Imidazole; Complete Structure and the Electron Distribution from Nuclear Quadrupole Coupling Tensors and Dipole Moment Orientation. *Zeitschrift für Naturforschung — Section A, A Journal of Physical Sciences* 36a, 1378–1385 (1981). <http://www.znaturforsch.com/aa/v36a/c36a.htm> (Zitiert auf den Seiten 144 und 184)
- [193] HUNT M. J. UND MACKAY A. L.: Deuterium and nitrogen pure quadrupole resonance in amino acids. II. *Journal of Magnetic Resonance* 22(2), 295–301 (1976). doi: 10.1016/0022-2364(76)90304-8 (Zitiert auf Seite 144)
- [194] DEROSE V. J., TELSER J., ANDERSON M. E., LINDAHL P. A. UND HOFFMAN B. M.: A Multinuclear ENDOR Study of the C-Cluster in CO Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*: Evidence for  $\text{H}_x\text{O}$  and Histidine Coordination to the  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  Center. *Journal of the American Chemical Society* 120(34), 8767–8776 (1998). doi: 10.1021/ja9731480 (Zitiert auf Seite 147)
- [195] SHERGILL J. K. UND CAMMACK R.: ESEEM and ENDOR studies of the Rieske iron-sulphur protein in bovine heart mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1185(1), 39–42 (1993). doi: 10.1016/0005-2728(94)90190-2 (Zitiert auf Seite 147)
- [196] FRITSCHER J.: Influence of hydrogen bond geometry on quadrupole coupling parameters: A theoretical study of imidazole–water and imidazole–semiquinone complexes. *Physical Chemistry Chemical Physics* 6, 4950–4956 (2004). doi: 10.1039/b408764j (Zitiert auf den Seiten 147 und 184)
- [197] ASHBY C. I. H., CHENG C. P. UND BROWN T. L.:  $^{14}\text{N}$  nuclear quadrupole resonance spectra of coordinated imidazole. *Journal of the American Chemical Society* 100(19), 6057–6063 (1978). doi: 10.1021/ja00487a014 (Zitiert auf den Seiten 147 und 183)
- [198] COOK R. J. UND WHIFFEN D. H.: Relative signs of hyperfine coupling constants

- by a double ENDOR experiment. *Proceedings of the Physical Society* 84(6), 845–848 (1964). <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0370-1328/84/6/302> (Zitiert auf Seite 153)
- [199] PEREIRA A. S., TAVARES P., MOURA I., MOURA J. J. G. UND HUYNH B.-H.: Mößbauer Characterization of the Iron-Sulfur Clusters in *Desulfovibrio vulgaris* Hydrogenase. *Journal of the American Chemical Society* 123(12), 2771–2782 (2001). doi: 10.1021/ja003176+ (Zitiert auf den Seiten 154, 155, 156 und 161)
- [200] TABRIZI S. G., PELMENSCHIKOV V., NOODLEMAN L. UND KAUPP M.: The Mössbauer Parameters of the Proximal Cluster of Membrane-Bound Hydrogenase Revisited: A Density Functional Theory Study. *Journal of Chemical Theory and Computation* 12(1), 174–187 (2016). doi: 10.1021/acs.jctc.5b00854 (Zitiert auf den Seiten 156 und 157)
- [201] DILG A. W. E., CAPOZZI F., MENTLER M., IAKOVLEVA O., LUCHINAT C., BERTINI I. UND PARAK F. G.: Comparison and characterization of the  $[Fe_4S_4]^{2+/3+}$  centre in the wild-type and C77S mutated HiPIPs from *Chromatium vinosum* monitored by Mössbauer,  $^{57}Fe$  ENDOR and EPR spectroscopies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 6(3), 232–246 (2001). doi: 10.1007/s007750000191 (Zitiert auf den Seiten 157 und 162)
- [202] DILG A. W. E., MINCIONE G., ACHTERHOLD K., IAKOVLEVA O., MENTLER M., LUCHINAT C., BERTINI I. UND PARAK F. G.: Simultaneous interpretation of Mössbauer, EPR and  $^{57}Fe$  ENDOR spectra of the  $[Fe_4S_4]$  cluster in the high-potential iron protein I from *Ectothiorhodospira halophila*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 4(6), 727–741 (1999). doi: 10.1007/s007750050345 (Zitiert auf den Seiten 157 und 162)
- [203] GEORGE E. C., III., DOAN P. E., HOFFMAN B. M., MEYER J. UND TELSER J.: EPR and  $^{57}Fe$  ENDOR investigation of 2Fe ferredoxins from *Aquifex aeolicus*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 17(8), 1137–1150 (2012). doi: 10.1007/s00775-012-0927-7 (Zitiert auf Seite 162)
- [204] LAUTERBACH L., LIU J., HORCH M., HUMMEL P., SCHWARZE A., HAUMANN M., VINCENT K. A., LENZ O. UND ZEBGER I.: The Hydrogenase Subcomplex of the NAD<sup>+</sup>-Reducing [NiFe] Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* – Insights into Catalysis and Redox Interconversions. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2011(7), 1067–1079 (2011). doi: 10.1002/ejic.201001053 (Zitiert auf den Seiten 163 und 164)

- [205] BUHRKE T., BRECHT M., LUBITZ W. UND FRIEDRICH B.: The H<sub>2</sub> sensor of *Ralstonia eutropha*: biochemical and spectroscopic analysis of mutant proteins modified at a conserved glutamine residue close to the [NiFe] active site. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 7(7–8), 897–908 (2002). doi: 10.1007/s00775-002-0379-6 (Zitiert auf den Seiten 164, 180, 182, 183 und 184)
- [206] STEIN M. UND LUBITZ W.: DFT calculations of the electronic structure of the paramagnetic states Ni-A, Ni-B and Ni-C of [NiFe] hydrogenase. *Physical Chemistry Chemical Physics* 3(13), 2668–2675 (2001). doi: 10.1039/B101508G (Zitiert auf den Seiten 164 und 165)
- [207] KAMPA M., PANDELIA M.-E., LUBITZ W., VAN GASTEL M. UND NEESE F.: A Metal–Metal Bond in the Light-Induced State of [NiFe] Hydrogenases with Relevance to Hydrogen Evolution. *Journal of the American Chemical Society* 135(10), 3915–3925 (2013). doi: 10.1021/ja3115899 (Zitiert auf den Seiten 164 und 165)
- [208] CAMMACK R., PATIL D. S., HATCHIKIAN E. C. UND FERNANDEZ V. M.: Nickel and iron-sulphur centres in *Desulfovibrio gigas* hydrogenase: ESR spectra, redox properties and interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 912(1), 98–109 (1987). doi: 10.1016/0167-4838(87)90252-4 (Zitiert auf Seite 164)
- [209] MEDINA M., HATCHIKIAN E. C. UND CAMMACK R.: Studies of light-induced nickel EPR signals in hydrogenase: comparison of enzymes with and without selenium. *Biochimica et Biophysica Acta* 1275(3), 227–236 (1996). doi: 10.1016/0005-2728(96)00007-2 (Zitiert auf Seite 164)
- [210] DAVIDSON G., CHOUDHURY S. B., GU Z., BOSE K., ROSEBOOM W., ALBRACHT S. P. J. UND MARONEY M. J.: Structural Examination of the Nickel Site in *Chromatium vinosum* Hydrogenase: Redox State Oscillations and Structural Changes Accompanying Reductive Activation and CO Binding. *Biochemistry* 39(25), 7468–7479 (2000). doi: 10.1021/bi000300t (Zitiert auf Seite 165)
- [211] SCHNEIDER K., CAMMACK R., SCHLEGEL H. G. UND HALL D. O.: The Iron-Sulfur Centres of Soluble Hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 578(2), 445–461 (1979). doi: 10.1016/0005-2795(79)90175-2 (Zitiert auf Seite 167)
- [212] FOERSTER S., VAN GASTEL M., BRECHT M. UND LUBITZ W.: An orientation-selected ENDOR and HYSCORE study of the Ni–C active state of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 10(1), 51–62 (2005). doi: 10.1007/s00775-004-0613-5 (Zitiert auf den Seiten 170, 172, 174, 175 und 178)

- [213] MÜLLER A., TSCHERNY I., KAPPL R., HATCHIKIAN E. C., HÜTTERMANN J. UND CAMMACK R.: Hydrogenases in the “active” state: determination of g-matrix axes and electron spin distribution at the active site by  $^1\text{H}$  ENDOR spectroscopy. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 7(1–2), 177–194 (2002). doi: 10.1007/s007750100285 (Zitiert auf Seite 170)
- [214] JARRETT W. L., FARLEE R. D. UND BUTLER L. G.: Observation of Bridging and Terminal Metal Hydrides by Solid-State Deuterium NMR Spectroscopy: Application to Bis(cyclopentadienyl)zirconium Dideuteride. *Inorganic Chemistry* 26(9), 1381–1383 (1987). doi: 10.1021/ic00256a009 (Zitiert auf Seite 175)
- [215] GUO K., JARRETT W. L. UND BUTLER L. G.: Deuterium Quadrupole Coupling Constants and Asymmetry Parameters in Metal Hydrides: Calculation of Model Systems Representing Three Modes of Metal-Hydrogen Bonding. *Inorganic Chemistry* 26(18), 3001–3004 (1987). doi: 10.1021/ic00265a016 (Zitiert auf Seite 175)
- [216] FLANAGAN H. L., GERFEN G. J., LAI A. UND SINGEL D. J.: Orientation-selective  $^{14}\text{N}$  electron spin echo envelope modulation (ESEEM): The determination of  $^{14}\text{N}$  quadrupole coupling tensor principal axis orientations in orientationally disordered solids. *Journal of Chemical Physics* 88(4), 2162–2168 (1988). doi: 10.1063/1.454049 (Zitiert auf Seite 178)
- [217] TRAN-BETCKE A., WARNECKE U., BÖCKER C., ZABOROSCH C. UND FRIEDRICH B.: Cloning and nucleotide sequences of the genes for the subunits of NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of Bacteriology* 172(6), 2920–2929 (1990). <http://jb.asm.org/content/172/6/2920> (Zitiert auf Seite 181)
- [218] KORTLÜKE C., HORSTMANN K., SCHWARTZ E., ROHDE M., BINSACK R. UND FRIEDRICH B.: A gene complex coding for the membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of Bacteriology* 174(19), 6277–6289 (1992). <http://jb.asm.org/content/174/19/6277> (Zitiert auf Seite 181)
- [219] DECKERT G., WARREN P. V., GAASTERLAND T., YOUNG W. G., LENOX A. L., GRAHAM D. E., OVERBEEK R., SNEAD M. A., KELLER M., AUJAY M., HUBER R., FELDMAN R. A., SHORT J. M., OLSEN G. J. UND SWANSON R. V.: The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 393(6674), 353–358 (1998). doi: 10.1038/32831 (Zitiert auf Seite 181)
- [220] DECKERS H. M., WILSON F. R. UND VOORDOUW G.: Cloning and sequencing of a [NiFe] hydrogenase operon from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Journal of General*

- Microbiology* 136(10), 2021–2028 (1990). doi: 10.1099/00221287-136-10-2021 (Zitiert auf Seite 181)
- [221] VOORDOUW G., MENON N. K., LEGALL J., CHOI E.-S., PECK JR. H. D. UND PRZYBYLA A. E.: Analysis and comparison of nucleotide sequences encoding the genes for [NiFe] and [NiFeSe] hydrogenases from *Desulfovibrio gigas* and *Desulfovibrio baculatus*. *Journal of Bacteriology* 171(5), 2894–2899 (1989). <http://jb.asm.org/content/171/5/2894> (Zitiert auf Seite 181)
- [222] MENON N. K., ROBBINS J., PECK JR. H. D., CHATELUS C. Y., CHOI E.-S. UND PRZYBYLA A. E.: Cloning and Sequencing of a Putative *Escherichia coli* [NiFe] Hydrogenase-1 Operon Containing Six Open Reading Frames. *Journal of Bacteriology* 172(4), 1969–1977 (1990). <http://jb.asm.org/content/172/4/1969> (Zitiert auf Seite 181)
- [223] SCHWARTZ E., HENNE A., CRAMM R., EITINGER T., FRIEDRICH B. UND GOTTSCHALK G.: Complete Nucleotide Sequence of pHG1: A *Ralstonia eutropha* H16 Megaplasmid Encoding Key Enzymes of H<sub>2</sub>-based Lithoautotrophy and Anaerobiosis. *Journal of Molecular Biology* 332(2), 369–383 (2003). doi: 10.1016/S0022-2836(03)00894-5 (Zitiert auf Seite 181)
- [224] LENZ O., STRACK A., TRAN-BETCKE A. UND FRIEDRICH B.: A hydrogen-sensing system in transcriptional regulation of hydrogenase gene expression in *Alcaligenes* species. *Journal of Bacteriology* 179(5), 1655–1663 (1997). <http://jb.asm.org/content/179/5/1655> (Zitiert auf Seite 181)
- [225] BLACK L. K., FU C. UND MAIER R. J.: Sequences and characterization of *hupU* and *hupV* genes of *Bradyrhizobium japonicum* encoding a possible nickel-sensing complex involved in hydrogenase expression. *Journal of Bacteriology* 176(22), 7102–7106 (1994). <http://jb.asm.org/content/176/22/7102> (Zitiert auf Seite 181)
- [226] MASSANZ C. UND FRIEDRICH B.: Amino Acid Replacements at the H<sub>2</sub>-Activating Site of the NAD-Reducing Hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochemistry* 38(43), 14330–14337 (1999). doi: 10.1021/bi9908080 (Zitiert auf Seite 182)
- [227] BURGDORF T., LACEY A. L. D. UND FRIEDRICH B.: The Soluble NAD<sup>+</sup>-Reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 Consists of Six Subunits and Can Be Specifically Activated by NADPH. *Journal of Bacteriology* 184(22), 6280–6288 (2002). doi: 10.1128/JB.184.22.6280-6288.2002 (Zitiert auf Seite 182)
- [228] GARCIA M. L. S., SMITH J. A. S., BAVIN P. M. G. UND GANELLIN C. R.: <sup>14</sup>N and

- $^2\text{H}$  Quadrupole Double Resonance in Substituted Imidazoles. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 9, 1391–1399 (1983). doi: 10.1039/P29830001391 (Zitiert auf Seite 184)
- [229] FERNANDEZ V. M., HATCHIKIAN E. C. UND CAMMACK R.: Properties and reactivation of two different deactivated forms of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* 832(1), 69–79 (1985). doi: 10.1016/0167-4838(85)90175-X (Zitiert auf Seite 185)
- [230] CLAIBORNE A., MALLETT T. C., YEH J. I., LUBA J. UND PARSONAGE D.: Structural, redox, and mechanistic parameters for cysteine-sulfenic acid function in catalysis and regulation. *Advances in Protein Chemistry* 58, 215–76 (2001). doi: 10.1016/S0065-3233(01)58006-7 (Zitiert auf Seite 185)
- [231] FARMER P. J., VERPEAUX J.-N., AMATORE C., DARENSBOURG M. Y. UND MUSIE G.: Reduction-Promoted Sulfur-Oxygen Bond Cleavage in a Nickel Sulfenate as a Model for the Activation of [NiFe] Hydrogenase. *Journal of the American Chemical Society* 116(20), 9355–9356 (1994). doi: 10.1021/ja00099a073 (Zitiert auf Seite 185)
- [232] DARENSBOURG M. Y. UND WEIGAND W.: Sulfoxxygenation of Active Site Models of [NiFe] and [FeFe] Hydrogenases – A Commentary on Possible Chemical Models of Hydrogenase Enzyme Oxygen Sensitivity. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2011(7), 994–1004 (2011). doi: 10.1002/ejic.201001148 (Zitiert auf Seite 185)
- [233] HERSKOVITZ T., DEPAMPHILIS B. V., GILLUM W. O. UND HOLM R. H.: Bis[bis(1,2-ethanedithiolato)ferrate(III)] Dianion, a  $\mu_2$ -Thiolato Dimer. Synthesis and properties. *Inorganic Chemistry* 14(6), 1426–1429 (1975). doi: 10.1021/ic50148a051 (Zitiert auf Seite 188)
- [234] SIEBERT E.: *Vibrational Spectroscopy of the Active Site and Iron Sulfur Clusters of the Membrane Bound Hydrogenase from Ralstonia eutropha*. Doktorarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin, Germany (2015) (Zitiert auf Seite 188)
- [235] PAGE C. C., MOSER C. C., CHEN X. UND DUTTON P. L.: Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation–reduction. *Nature* 402(6757), 47–52 (1999). doi: 10.1038/46972 (Zitiert auf Seite 189)

## Danksagung

Vielen Dank an jene, die mich während dieser Arbeit unterstützten:

Ich danke Robert Bittl für die Gelegenheit, an diesem interessanten Thema arbeiten und die Möglichkeiten eines wahren Spektrometerzoos nutzen zu können. Die stete Offenheit, was Diskussionen und Fragen betrifft, war für mich ebenso wertvoll wie die kritischen Denkanstöße.

Christian Teutloff danke ich für die Einführung in die Eigenarten der Spektrometer inklusive einschlägiger Tipps und Tricks, für fortwährendes Interesse und Anregungen bezüglich der Messungen und der Interpretation der Daten.

Peter Hildebrandt möchte ich für die Bereitschaft danken, als Zweitgutachter dieser Arbeit zu fungieren.

Johannes Fritsch, Stefan Frielingsdorf, Lars Lauterbach und Oliver Lenz danke ich für die unzähligen Proben in verschiedensten Variationen und für ihre ungebrochene Neugier bezüglich der ungewohnten EPR-Spektren. Friedhelm Lenzian danke ich dafür, an seiner langjährigen Hasenexpertise teilhaben zu können.

Für fachliche und nichtfachliche Gespräche, das unvermeidliche Korrekturlesen und Hilfe bei technischen Problemen möchte ich Christopher Engelhard, Susanne Pudollek, Christoph Meier und Till Biskup danken. Klaus-Peter Dinse danke ich für wertvolle Diskussionen und Roswitha Brunn für ihre kontinuierliche Hilfsbereitschaft, was Sicherheitsfragen und das Chemielabor anbelangt. Sie alle trugen wie die anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe stets zu einer angenehmen Atmosphäre bei.

Den Mitarbeitern des TTL möchte ich meinen Dank für ihre Zuverlässigkeit und ihr Improvisationstalent aussprechen, für die ein oder andere Kanne Helium, die ich spontan brauchte.

Meinen Freunden danke ich für Zuspruch und Nachfragen, für abwechslungsreiche Unternehmungen zwischendurch und Geduld, wenn ich mal wieder keine Zeit hatte. Allen voran sind hier Maria, Alexander und erneut Susanne zu nennen.

Abschließend danke ich meinen Eltern und meiner Schwester, für Begleitung und Unterstützung und den Freiraum, bis an diesen Punkt gelangen zu können.

## Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Eine Promotionsarbeit über dieses Thema liegt noch nicht vor.

Julia Löwenstein